

JOÃO PAULO MARTINS DO CARMO

**MODULAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE
MONÓCITOS HUMANOS *IN VITRO* POR
CONTATO COM LINFÓCITOS
PRÉ-AQUECIDOS E/OU IRRADIADOS**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Imunologia).**

**São Paulo
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOÃO PAULO MARTINS DO CARMO

**MODULAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE
MONÓCITOS HUMANOS *IN VITRO* POR
CONTATO COM LINFÓCITOS
PRÉ-AQUECIDOS E/OU IRRADIADOS**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Imunologia).**

Área de Concentração: Imunologia

**Orientador: Prof. Dr. José Alexandre
Marzagão Barbuto**

**São Paulo
2008**

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

© reprodução total

do Carmo, João Paulo Martins.

Modulação fenotípica e funcional de células dendríticas derivadas de monócitos humanos *in vitro* por contato com linfócitos pré-aquecidos e/ou irradiados / João Paulo Martins do Carmo. -- São Paulo, 2008.

Orientador: José Alexandre Marzagão Barbuto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunobiologia de Células Dendríticas.

Versão do título para o inglês: Phenotypic and functional modulation of human monocyte-derived dendritic cells after *in vitro* interaction with pre-heated and/ or irradiated lymphocytes.

Descritores: 1. Células dendríticas 2. Estresse por aquecimento 3. Radiação ionizante 4. Apoptose 5. Citocinas 6. Tolerância Imunológica I. Barbuto, José Alexandre Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB107/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): João Paulo Martins do Carmo.

Título da Tese: Modulação fenotípica e funcional de células dendríticas derivadas de monócitos humanos *in vitro* por contato com linfócitos pré-aquecidos e/ou irradiados .

Orientador(a): José Alexandre Marzagão Barbuto.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Titulares:

1.) Dr. EDILBERTO POSTOL

Doutor pelo ICB/USP, Pesquisador Científico do Departamento de Imunologia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2.) Prof. Dr. NIELS OLSEN SARAIVA CAMARA

Professor Associado do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.) Profa. Dra. SONIA JANCAR NEGRO

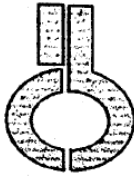
Professor Titular do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.) Dr. ESPER GEORGES KALLAS

Doutor pela EPM/UNIFESP, Médico do Departamento de Infectologia – Laboratório de Imunologia II da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo e Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

5.) Orientador(a): Prof. Dr. JOSE ALEXANDRE MARZAGÃO BARBUTO

Professor Associado do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2416 - cep. 06608-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 07 de abril de 2004

PARECER 559/CEP

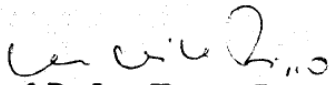
Prezado Senhor

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua quadragésima quarta reunião realizada em 06-abril-04, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Avaliação do potencial tolerogênico de células dendríticas humanas geradas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis".

Informo que, após análise do projeto, esta comissão resolveu acatar o parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Sírio Libanês.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Cordialmente,


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

Ilmo. Sr
JOÃO PAULO MARTINS DO CARMO
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

DEDICATÓRIA

Gostaria de prestar aqui minha homenagem aos entes queridos que se foram durante essa fase de minha vida:

- À minha avó materna Euripa Vicente Ferreira, de infarto fulminante, 5 anos após um enfisema pulmonar, ambos decorrentes do longo hábito de fumar, desde os 17 anos de idade. Provavelmente por câncer de pulmão, subdiagnosticado em Morrinhos, interior de Goiás. 04/01/2002, aos 74 anos de idade.

- Fábio Alex da Silva, colega da XXXIII turma de Biomedicina de Botucatu, acometido por um linfoma fulminante, contra o qual pouco ou nada pudemos fazer como biomédicos (recentemente, seu irmão, Flávio Alex da Silva, juntou-se a ele). Tinha acabado de defender seu mestrado em Histologia pelo ICB-USP. Já havia começado sua carreira como docente de Genética nas Faculdades Santa Rita. No auge da existência, aos 31/12/2003, há exatos 3 meses do aniversário de 33 anos! Em nossa memória, a sua alegria e irreverência transmitidas e pelo menos um paper publicado em vida ajudam a imortalizá-lo. Meus pêsames e solidariedade à família!

- À Cleuza Vicente Souza, prima de minha mãe, que também lutou até a morte contra um câncer de mama. Entretanto, em sua resistência em fazer cirurgia, após refratariedade à quimioterapia, não houve como evitar metástases, que afetaram membros superiores e inferiores. Como biomédico, sinto que ainda precisamos lutar muito contra a nossa própria ignorância científica e social pra evitar ou pelo menos diminuir a morbidade e mortalidade de casos semelhantes. Ficam a sua alegria e força de vontade transmitidas como exemplo para seus filhos e primos. 27/08/2006, exatos 3 anos após meu ingresso no doutorado.

- À minha avó paterna, Geni Martins de Lima, aos 88 anos de idade, em Morrinhos, Goiás, em 01/2007. De causas naturais.

E celebrar, comemorar e brindar à vida de minha bisavó materna, Olívia Lino Vicente Santana, hoje com 104 anos de idade, que se orgulha de nunca ter saído do Estado de Goiás, motivo até de entrevista na TV local. Que Deus a mantenha feliz por quanto tempo quiser (ela já reclamou que não agüenta mais esperar... já viveu tanto!). Se assim ocorrer, ela fará 105 anos em outubro. Exemplo de saúde, força de vontade e qualidade de vida, apesar de fisicamente cega desde os 12 anos de idade, permanece lúcida como uma criança! Essa sim, sabe o que é não só qualidade, mas também, quantidade e intensidade de vida!!! Com o mínimo de estresse possível (risos)!

Uma pequena amostra do por que eu vim parar em um laboratório de Imunologia de Tumores e trabalhar com indução de estresse em linfócitos e interação com células dendríticas.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todos, em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me conceder a vida, a saúde e o dom da ciência. Agradeço pela oportunidade de estudar e realizar uma pós-graduação, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela possibilidade de buscar um caminho diferente e mais feliz para os meus familiares e para mim mesmo.

Tanta gente pra agradecer me faz rezear que esta parte da tese se transforme em um memorial, cheio de lágrimas de saudade e, claro, também de ótimas recordações!

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia de Tumores, atuais e anteriores, começando pelos mais experientes: Célia Regina Pinto Pizzo, Patrícia Cruz Bergami-Santos, Giovana Toledo Alonso, Camila Ferreira, Luís Felipe Chiaverini Ensina, Alexandra Santiago, Luciene Barbosa Anselmo, Maria Ângela Amorim, Roberto Pereira Gonzalez, Aline, Clara Maciel Cavalcanti, Andréia Rodrigues Neves, Marisa Treglia, Ana Paula Azevedo Santos e Silva, Gabriela França Menezes (Gabi), Bruno Luís de Oliveira, Leonardo, Márcio Yuiti Tomiyoshi, Renato Brito Baleeiro, Simone Lo; aos recém-“chegados”: Lyllian Sally Chin, Nayara Delgado André, Graziella Romagnoli (Grazi), Isabella Migliori Katz, Cristiano Jacob, Aline (outra), Daniel Martucci, Bruna Zelante, Lourran... e aos outros que eventualmente eu possa ter esquecido (desculpem-me, por favor!).

Pelas alegrias proporcionadas nestes 5 anos de divertidíssimo ambiente e convívio, conversas, discussões filosóficas, viagens a Americana e congressos (Búzios, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Botucatu, São Paulo etc.), companhias e almoços compartilhados no bandeirão... Em especial àqueles que contribuíram diretamente, principalmente com a sua amizade! Esta não tem preço!

Mais um agradecimento especial à Andréia Neves pelo auxílio no planejamento e realização dos experimentos relativos à geração de células dendríticas, na padronização dos ensaios de apoptose, apresentação autóloga de toxóide tetânico e aloproliferação linfocitária (MLR), na aquisição de amostras no FACS e análise nos programas Cell Quest e WinMDI. À Clara Cavalcanti, hoje BDete (sic) pelo auxílio nos experimentos relativos à separação de linfócitos T por rosetas de eritrócitos, ensaios de proliferação, marcação com anticorpos monoclonais para citometria de fluxo, além de aquisição no FACS Calibur e análise nos programas Cell Quest e

WinMDI. E, claro, Clara! Por tirar minhas dúvidas chatas por email sobre citometria de fluxo quando eu estava na Alemanha. À Gabi por padronizar os ensaios de proliferação com CFSE e curva dose-resposta a PHA e por me ajudar no ELISA.

À Graziela (Grazi) Romagnoli pelo auxílio na organização dos meus resultados em gráficos e tabelas auto-explicativas no Excel e realização de Análise Estatística utilizando os softwares GraphPad InStat e Prisma. À Gabi e à Grazi por me ajudarem na leitura desta tese com suas valiosas críticas e sugestões. À Ana Paula por me ajudar na apresentação da aula para a qualificação, na análise crítica de alguns resultados e com suas poderosas críticas e sugestões durante toda a realização de meu trabalho. À Izabella Katz por me ajudar na estética e configuração de algumas figuras. Ao Cristiano Jacob por me ajudar na manutenção de meu computador (e os do lab também). Ao Roberto por ajudar-nos também na manutenção dos computadores do laboratório, essenciais para a redação de nossos trabalhos e relatórios. Sem auxílio, sugestão ou crítica de cada um de vocês eu não poderia ter trabalhado melhor.

Ao laboratório de Biologia Celular e Molecular da Apoptose do Departamento de Imunologia, em especial ao Professor Dr João Gustavo do Amarante Mendes, os colegas Ana Elisa Bueno, Axel Ulbrich, Ricardo Weinlich, Daniel Carvalho e Jakeline Jacysin pelo esclarecimento quanto ao protocolo dos ensaios de apoptose e marcação das CNAs com PI.

Ao laboratório de Imunologia da Leishmaniose e Malária, na pessoa da Profa. Dra Maria Regina D'Império Lima, pelas discussões e sugestões valiosas nas apresentações de meu relatório CAPES, pós-qualificação da tese e conversas esclarecedoras e auxílios rápidos no corredor; por liberar o uso do computador para análise das amostras adquiridas no FACS Calibur, no seu laboratório e, mais tarde, na sala de estudos; à colega e amiga Ana Paula Freitas, pelas conversas filosóficas e pitorescas quando do curso de Imunologia Humoral, e quanto aos resultados de nossos trabalhos, ao colegas e amigos Ricardo Martins, Luís Sardinha e Rosa Elias pelo auxílio na análise dos experimentos adquiridos no FACS Calibur.

Ao querido orientador Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbutto, por me aceitar no grupo, quando recém-chegado de Botucatu, e permitir utilizar a infraestrutura do Laboratório de Imunologia de Tumores para a realização desta tese, pela supervisão deste trabalho, e pela experiência transmitida, seja como docente de imunologia, pesquisador, professor de alemão e informática, filósofo, pai ou amigo,

ao longo desses 5 anos de convívio. Obrigado também por abrir a sua casa de “veraneio” em Americana para as festas de confraternização do grupo (risos). Obrigado também por me oferecer desafios, instigar e estimular a estudar cada vez mais profundamente as queridas DCs, amigas inseparáveis durante esses últimos 4 anos e meio!

À sempre inesquecível Mariana Braite (Misstressa) Rodrigues de Oliveira, pela amizade de sempre, desde 1997, quando nos conhecemos no curso de Biomedicina. Paixão à primeira vista cresceu com um convite pra vir a São Paulo pela 1ª vez, para comemorar seu aniversário em 21/5/1998. Tornou-se ainda maior minha admiração por ela principalmente quando vim morar nesta megalópole para fazer o doutorado, eu que só tinha experiência de interior de Goiás, Botucatu e música sertaneja. Em março de 2003, ela me acolheu como a um irmão em sua casa por 2 meses, antes de eu ir para o CRUSP. Confiou-me as chaves de sua casa até quando foi a Paris dar uma palestra no Institut Curie, na semana da Páscoa daquele ano. Nossas idas ao único cinema de Botucatu (e discussões filosóficas e científicas advindas destas e das aulas) são inesquecíveis. Já se vão mais de 10 anos, mas eu não esqueço... Quando a encontro no MSN, sempre digo: Miss, I miss you so!

Não poderia deixar de me lembrar também de sua mãe, a Profa. Dra Bete Braite, de Linguística (FFLCH-USP e Mackenzie) pelas dicas sobre comportamento, sobre a língua portuguesa (e o belo ensaio sobre a gramática normativa, a gramática vigente e falante e os regionalismos – surpreendeu-me deveras quando ela me confiou que tinha um CD do goiano Geraldinho, e o utilizava em suas aulas de Linguística), aonde ir, o que fazer, com quem falar, como planejar meu dia e minha semana. Nunca me esquecerei o quanto vocês duas foram importantes para a minha formação humana e acadêmica! Uma verdadeira família!

À Profa. Dra Angelina Batista (Depto de Educação, UNESP, Botucatu) e ao Prof. Dr. José Ricardo Miranda (Depto de Física e Biofísica, IB-UNESP), com quem comecei a estudar Magnetismo na Iniciação Científica e aprendi a gostar do tema irradiação. Mal sabia eu que iria trabalhar com isso no futuro. Mesmo distantes, sempre me receberam de braços abertos, nas minhas idas e voltas de Botucatu, mais que amigos, quase como parentes distantes. Agradeço também aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências e de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. São tantos que não quero cometer

nenhuma injustiça, caso esqueça o nome de algum (Sílvia Rogatto, Eduardo Bagagli, Ramon Kaneno, Maurício Sforcin, Deilson Elgui, Terezinha Peraçoli, Ângela Soares, Alexandrina Sartori, Sílvia, Assunta Marques, Cláudia Helena Pellizon, Lúcia Machado Rocha, Maria José, Maria Vicentini Paulino, Mirtes Ferreira, Cristina Pereira Lima - Kika, Maeli dal Pai Silva, Robson Ferreira, – este colega da XXXIII turma, hoje docente e pós-doutorando do Departamento de Histologia). Um agradecimento especial à Alexandrina Sartori, que me despertou e ampliou o interesse sobre as DCs durante a disciplina optativa de Imunopatologia na graduação.

Ao quadro de funcionários do ICB-USP, Célia Pizzo, Cláudia, Marlene, Silvana, Tânia, Márcio, Otacílio, Milton, Roberto, por me ajudar quando necessário, também nos finais de semana, por fazer e oferecer café, além dos auxílios convencionais na preparação de material de laboratório ou didático, e também por tomar café comigo.

Aos incondicionais amigos Erick da Cruz Castelli (ribeirão-pretense), Rodrigo Otávio Alves de Lima e Christian Kendi Higuchi (paulistanos), por me receberem em suas casas e famílias como a um irmão, quando necessitei ou mesmo quando não necessitei também, desde nossas aventuras na XXXIII turma de Biomedicina (1997).

Ao amigo Raphael Bessa Parmigiani, também da XXXIII, que passou pelo Instituto Ludwig e brevemente pelo Laboratório de Imunologia de Tumores, pela convivência, conversas, considerações filosóficas (nem tanto), no período no Brasil e pelas nossas viagens a Botucatu e a Goiás, onde nascemos. Testemunha da dificuldade da situação de minha família em Goiás, mas que apesar de tudo “segue em frente e segura o rojão, não foge da raia e enfrenta o leão” (Gonzaguinha).

Ao CINTERGEN (Centro Integrado de Terapia Genética) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), principalmente na pessoa do Prof. Dr Esper Kallas, pela permissão de uso do citômetro de fluxo FACS Canto para análise multiparamétrica e aquisição de minhas amostras de DCs e análise do sobrenadante de culturas para presença de citocinas por CBA. À funcionária da BD, Helena, pela paciência em me ajudar no planejamento do protocolo de CBA e na aquisição das amostras de DCs para avaliação de fenótipo no FACS Canto. À professora Karina Carvalho, pelo esclarecimento de dúvidas durante o III Curso de Citometria de fluxo do Instituto Adolfo Lutz. Às professoras Raquel Fazzioli e Marisa Hong, pela

simpatia e eficiente organização da realização do curso de Citometria de Fluxo, durante o qual pude esclarecer muitas dúvidas.

Aos funcionários da Biblioteca que contribuíram na elaboração, na revisão textual e no apoio e suporte de informática das diretrizes para apresentação desta tese. Em especial à funcionária Maria José Carvalho, pela paciência, eficiência, auxílio e orientação diretos quanto às diretrizes e pesquisa bibliográfica de referências. À Delza e à Renata, pela gentileza e solicitude no auxílio e orientação quanto às referências bibliográficas e empréstimos de material e livros didáticos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, responsável pela minha permanência financeira em São Paulo. Aos docentes Sônia Jancar, João Gustavo do Amaral e Maria Regina D'Império Lima, coordenadores de pós-graduação, pelas orientações e críticas valiosas para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao corpo técnico do COSEAS, responsável pela minha manutenção no CRUSP, em especial à Assistente Social, Luzia Canzian, por seu trabalho justo, honesto e prestativo quanto à avaliação de minha documentação e orientação quanto à minha inscrição no processo seletivo e manutenção após os processos de renovação anual da bolsa moradia do CRUSP.

À geóloga Milene Freitas Figueiredo, por me agüentar nesses últimos 4 anos de convivência no CRUSP, quando eu não tinha mais pra quem chorar minhas “pitangas”... Por ter me convidado, como coordenadora do GPP (Grupo de Partilha de Profissionais) a participar do grupo e a partilhar, tarefas importantes para o meu crescimento espiritual, além de social e científico. Amizade INCONDICIONAL! Desinteressada e sempre solícita e prestativa, exemplo humano de um espírito cristão. Sem falar que o seu bolo Romeu e Julieta é divino! Trocamos tantas idéias que ela já aprendeu um pouco sobre Imunologia e eu, sobre a Origem da Vida, e vai pra Maryland em setembro. Ao historiador André Luís Pereira, pela amizade e por me convidar a dar aulas em Taipas. À nutricionista Flávia Buriti, pela amizade e por me substituir nas aulas de Biologia na Escola Estadual Padre Pio. Ao professor Eduardo Brito, pelas aulas de alemão. A todos os outros do GPP por me acolherem como a um irmão, agradeço a todos (são tantos, que não cabem aqui), sem distinção.

Ao DAAD pela concessão da bolsa de pesquisa de curta duração, realizada em Berlim, Alemanha, no 2º semestre de 2007, importante para alguns esclarecimentos relativos a alguns dados de minha tese. Ao pessoal do Instituto Goethe e DAAD-

Pinheiros (Felipe e Prof Thomas Janssen) e Rio de Janeiro (Ursula Dannemann), pelos esclarecimentos durante o processo seletivo e acompanhamento durante minha estada na Alemanha. Ao Prof Dr Peter Walden por abrir as portas de seu laboratório no Departamento de Dermatologia do Hospital Charité, Universidade Humboldt, por acompanhar o meu trabalho durante todo o período, pela orientação e dedicação extremamente profissionais, e por conceder todos os reagentes, equipamentos e infraestrutura necessários para a realização dos experimentos e redação dos relatórios. Ao DRFZ (Centro Alemão de Pesquisas em Reumatologia, Deutsch Rheuma Forschung Zentrum), pela permissão para utilização do FACS LSR II para aquisição de algumas amostras de culturas de células dendríticas. Aos amigos Astrid Geldmacher, Saulius Jarmalavicius e Florian Losch pelo auxílio na minha instalação em Berlim, e durante a preparação, planejamento, realização e discussão dos experimentos e análises no FACS Calibur no laboratório.

À minha família em Itumbiara, pai (João Martins do Carmo), mãe (Maria Joana do Carmo), irmãos (Delerney, Darthas, Dênya, Francisco José, Stefane, Antonio Marcos, Dirley, Fábio Marcelino e Marcelo Henrique) e sobrinhos (José Jorge Jr, Thaís, Ana Lúcia, Carolina, Vítor Hugo, Kamylla, Marco Túlio e João Marcos), por compreenderem minha ausência, às vezes sem entender, mas principalmente por me apoiar e confiar em mim, incondicionalmente.

Aos doadores de sangue, sem os quais, não seria possível sequer iniciar a realização deste trabalho.

À FAPESP, pela concessão do auxílio ao Projeto Temático do laboratório do Prof José Barbuto, ao qual esta tese de doutorado está vinculada.

"O erro não se torna verdade por se difundir e multiplicar facilmente. Do mesmo modo, a verdade não se torna erro pelo fato de ninguém a ver."

Mahatma Ghandi

Seja Você Mesmo

Dê sempre o melhor...
E o melhor virá.
Às vezes as pessoas são egocêntricas,
Ilógicas e insensatas...
Perdoe-as assim mesmo.
Se você é gentil, as pessoas podem
Acusá-lo de egoísta e interesseiro...
Seja gentil assim mesmo.
Se você é um vencedor, terá alguns
Falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros...
Vença assim mesmo.
Se você é honesto e franco,
As pessoas podem enganá-lo...
Seja honesto e franco assim mesmo.
O que você levou anos para construir,
Alguém pode destruir de uma hora para outra...
Construa assim mesmo.
Se você tem paz e é feliz,
As pessoas podem sentir inveja...
Seja feliz assim mesmo.
O bem que você faz hoje
Pode ser esquecido amanhã...
Faça o bem assim mesmo.
Dê ao mundo o melhor de você,
Mas isso pode nunca ser o bastante...
Dê o melhor assim mesmo.
E veja você que, no final das contas,
É entre você e Deus...

NUNCA SERA ENTRE VOCÊ E AS OUTRAS PESSOAS!

[Madre Tereza de Calcutá](#)

SE

Se és capaz de manter tua calma, quando,
todo mundo ao redor já a perdeu e te culpa.
De crer em ti quando estão todos duvidando,
e para esses no entanto achar uma desculpa.

Se és capaz de esperar sem te desesperares,
ou, enganado, não mentir ao mentiroso,
Ou, sendo odiado, sempre ao ódio te
esquivares, e não parecer bom demais,
nem pretensioso.

Se és capaz de pensar - sem que a isso só te
atires, de sonhar - sem fazer dos sonhos teus
senhores. Se, encontrando a Desgraça e o
Triunfo, conseguires, tratar da mesma forma a
esses dois impostores.

Se és capaz de sofrer a dor de ver mudadas,
em armadilhas as verdades que disseste
E as coisas, por que deste a vida estraçalhadas,
e refazê-las com o bem pouco que te reste.

Se és capaz de arriscar numa única parada,
tudo quanto ganhaste em toda a tua vida.
E perder e, ao perder, sem nunca dizer nada,
resignado, tornar ao ponto de partida.

De forçar coração, nervos, músculos, tudo,
a dar seja o que for que neles ainda existe.
E a persistir assim quando, exausto, contudo,
resta a Vontade em ti, que ainda te ordena:
Persiste!

Se és capaz de, entre a plebe, não te
corromperes, e, entre Reis, não perder a
naturalidade. E de amigos, quer bons, quer
maus, te defenderes, se a todos podes ser de
alguma utilidade.

Se és capaz de dar, segundo por segundo,
ao minuto fatal todo valor e brilho.
Tua é a Terra com tudo o que existe no mundo,
e - o que ainda é muito mais - és um Homem,
meu filho!

IF

If you can keep your head when all about you
Are losing theirs and blaming it on you,
If you can trust yourself when all men doubt
you
But make allowance for their doubting too,
If you can wait and not be tired by waiting,
Or being lied about, don't deal in lies,
Or being hated, don't give way to hating,
And yet don't look too good, nor talk too wise:

If you can dream - and not make dreams your
master,
If you can think - and not make thoughts your
aim;
If you can meet with Triumph and Disaster
And treat those two impostors just the same;
If you can bear to hear the truth you've spoken
Twisted by knaves to make a trap for fools,
Or watch the things you gave your life to,
broken,
And stoop and build 'em up with worn-out
tools:

If you can make one heap of all your winnings
And risk it all on one turn of pitch-and-toss,
And lose, and start again at your beginnings
And never breath a word about your loss;
If you can force your heart and nerve and
sinew
To serve your turn long after they are gone,
And so hold on when there is nothing in you
Except the Will which says to them: "Hold
on!"

If you can talk with crowds and keep your
virtue,
Or walk with kings--nor lose the common
touch,

If neither foes nor loving friends can hurt you;
If all men count with you, but none too much,
If you can fill the unforgiving minute
With sixty seconds' worth of distance run,
Yours is the Earth and everything that's in it,
And - which is more - you'll be a Man,
my son!

Rudyard Kipling
(Nobel de Literatura, 1907)

RESUMO

CARMO, J. P. M. **Modulação fenotípica e funcional de células dendríticas humanas derivadas *in vitro* de monócitos por contato com linfócitos pré-aquecidos e/ou irradiados.** 2008. 120f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

As células dendríticas (DCs) são células especializadas na apresentação de antígenos (Ags) para linfócitos T virgens e induzir respostas imunes primárias. Foi demonstrado em células murinas que a tolerância periférica imunológica também é induzida por essas células, pelo processamento e apresentação de Ags próprios de células que morrem durante processo fisiológico de renovação tecidual. A maioria dos trabalhos sobre DCs tolerogênicas foram executados com células de animais e trabalhos com células humanas com o objetivo de elucidar tais mecanismos e processos ainda são bastante controversos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de linfócitos apoptóticos sobre os processos de maturação e atividade funcional de DCs humanas. PBMC foram obtidas por aférese de doadores saudáveis e plaqueadas para aderência por 2h em frascos de cultura (1) na faixa de concentração $3-5 \times 10^7$ células por frasco. Os linfócitos foram transferidos para outro frasco (2) de cultura por 3 dias. No dia 3, linfócitos do frasco 2 foram: 1. mantidos à temperatura de 37°C (37ni), em atmosfera de 5% de CO_2 ; 2. aquecidos por 30 min à temperatura de 43°C em banho-maria (43ni); 3. ^{137}Cs -irradiados a 2500 rads (37i); 4. aquecidos e ^{137}Cs -irradiados (43i). Células de cada grupo (3×10^5) foram coradas com iodeto de propídio (PI) 0, 24 e 48h após irradiação. A cinética de apoptose foi avaliada pela intensidade de fragmentação de DNA marcado com PI, por citometria de fluxo. A média de apoptose de 37i foi $84,2\% \pm 7,5$ ($p < 0,01$) 48h após irradiação, sendo 43i ($39,3\% \pm 8$) mais próxima ao controle (37ni= $21,5\% \pm 10,8$) que 37i. Estes resultados sugerem que o aquecimento de linfócitos a 43°C por 30 min antes da irradiação parece protegê-los da apoptose induzida pela irradiação. Para geração de DCs, PBMC aderentes (frasco 1) foram cultivadas com GM-CSF e IL-4 por 5 dias (iDCs). No 5º dia, as iDCs foram transferidas para placas de 12 poços na concentração de 5×10^6 /poço e TNF- α foi adicionado em 6 poços para maturação. Simultaneamente, 10% ($3-6 \times 10^5$) de 37i ou 43i foram adicionados às culturas de DCs. No 7º dia, o fenótipo de superfície de DCs foi avaliado por citometria de fluxo. A linfoestimulação autóloga (1:10) e alogênica (1:30) das DCs foi avaliada 6-7 dias após a fenotipagem. Houve expressão diferencial de CD86 e CD1a nos diferentes grupos de DCs. Coculturas iDCs+37i induziram aumento de CD1a, correlacionado com altos níveis de IL-10, baixos níveis de IL-12p70 e inibição de proliferação. Coculturas mDCs+HAPO apresentaram níveis menores de CD1a (comparados a mDC) e IL-10, correlacionados com altos níveis de CD86 e IL-12p70 e maiores índices de proliferação. Pode-se concluir que o fenótipo e função de DCs é modulado diferencialmente na presença de 43i, que induzem ativação de DCs *in vitro*, enquanto 37i induzem um fenótipo e função moduladores das DCs. Em suma, sugerimos que o protocolo de ativação de DCs com 43i poderia ser utilizado como um modelo de auto-reatividade *in vitro* e que a modulação da expressão de CD1a pelas DCs com 37i poderia ser utilizada como modelo de imunorregulação homeostática *in vitro*.

Palavras-chave: Células dendríticas; Estresse por aquecimento; Radiação ionizante; Apoptose; Citocinas; Tolerância.

ABSTRACT

CARMO, J. P. M. **Phenotypic and functional modulation of human monocyte-derived dendritic cells after *in vitro* interaction with pre-heated and / or irradiated lymphocytes.** 2008. 120 f. Thesis (PhD in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Dendritic cells are specialized in the function of presenting antigens to naïve lymphocytes and induce primary immune responses. Works with animal models have demonstrated that these cells have the additional property of inducing immunological peripheral tolerance through processing and presentation of self Ags provided by cells which die during the physiological tissue turnover. Works with human cells are scarcer and still quite controversial. Thus, the aim of this work was to investigate the tolerogenic potential of DCs, approaching the effect of apoptotic cells on maturation and functional activity of human monocyte-derived DCs *in vitro*. PBMC were obtained by leukapheresis of healthy donors and plated for two-hour adherence in culture flasks (1) with the concentration range of $3\text{-}5 \times 10^7$ cells/flask. Non-adherent cells (NAdh) were transferred to culture flasks (2) for three days. In the 3rd day, NAdh from flask 2 were: 1. Kept at the culture temperature of 37°C (37ni), in a 5% CO₂ atmosphere; 2. Heated during 30 min at 43°C (43ni); 3. ¹³⁷Cs-irradiated at 2500 rads (37i); 4. Heated and ¹³⁷Cs-irradiated (43i). Cells of each group (3×10^5) were PI-stained 0, 24 and 48h after irradiation. Apoptosis kinetics was evaluated in flow cytometry by intensity of PI-stained, fragmented DNA. Apoptosis mean of 37i was $84,2\% \pm 7,5$, higher than 43i ($39,3\% \pm 8$) and 37ni ($21,5\% \pm 10,8$), 48h after irradiation. These results suggest that heating NAdhs at 43°C during 30 min before irradiation seems to protect them from apoptosis induced by irradiation. To generate DCs, adherent PBMC (frasco 1) were cultured in media containing GM-CSF and IL-4 for 5 days (iDCs). In the 5th day, iDCs were transferred to 12-well plates at the concentration of 5×10^6 /well and received 10% ($3\text{-}6 \times 10^5$) of 37i or 43i, simultaneously to TNF- α addition. In the 7th day, DCs were phenotyped by flow cytometry. Autologous (1:5) or allogeneic (1:30) linfostimulation were evaluated by fluorescence intensity of CFSE labelling and measured by flow cytometry 6-7 days after DC phenotyping. The most significant DC phenotype changes were observed in CD1a and CD86. There was an association between higher CD1a expression, high levels of IL-10 and low levels of IL-12p70 secreted by iDC+APO and decreased allostimulation compared to iDC, what suggests a role for CD1a as a modulatory mechanism of the DC response to apoptotic cells. Moreover, mDC+HAPO had an opposite behavior, with high levels of IL-12p70 and CD86 and low levels in CD1a expression, compared to mDCs, and higher proliferation index. We conclude that DCs phenotype and function is differentially modulated in the presence of 43i, which induce DCs activation *in vitro*, while 37i induce regulatory phenotype and function in DCs. In summary, we suggest that our protocol for DCs activation with 43i could be used as a model of *in vitro* auto-reactivity and modulation of DCs with 37i could be used as a model of homeostatic immunoregulation *in vitro*.

Key words: Dendritic cells; Cellular stress; Irradiation; Apoptosis; Cytokines; Immunological tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. “Dot plots” de FSCxSSC, HLA-DRxCD11c e histogramas (CD14, CD86, CD80 e CCR7) representativos de culturas de células dendríticas (DCs) geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos do sangue periférico, cultivadas durante 7 dias com GM-CSF e IL-4 na ausência de TNF- α (iDC - A) ou na presença dessa citocina (mDCs - B) no 5º dia de cultura (como estímulo para maturação).	46
Fig. 2. Viabilidade (%) de células mononucleares (iDCs vs mDCs) recuperadas no 7º dia de cultura.	47
Fig. 3A. Padrão de distribuição de células (CNAs) por FSC x SSC no momento imediatamente pós-irradiação <i>in vitro</i> (t=0). B. Histogramas referentes aos “dot plots” respectivos.	51
Fig. 4A. Padrão de distribuição de células não aderentes (CNAs) por FSC x SSC 24h pós-irradiação <i>in vitro</i> (t=24h). B. Histogramas referentes aos “dot plots” respectivos.	52
Fig. 5A. Padrão de distribuição de células não aderentes (CNAs) por FSC x SSC 48h pós-irradiação <i>in vitro</i> (t=48h). B. Histogramas referentes aos “dot plots” respectivos.	55
Fig. 6A. Porcentagem de CNAs PI-positivas em relação ao tempo pós-irradiação. Após 2h de aderência de PBMCs, CNAs foram transferidas para garrafa de cultura. No 3º dia, CNAs foram submetidas a diferentes modos de estresse celular e coradas com PI 0, 24 ou 48h pós-irradiação e seu conteúdo de DNA fragmentado, indicativo de morte celular por apoptose, foi avaliado por citometria de fluxo em FACS Calibur.	57
Fig. 7. Expressão de CD3 (A), CD4 (B) e CD8 (C) em CNAs submetidas a diferentes formas de estresse. Números ao lado da linha negra indicam valores de MFI (Intensidade Mediana de Fluorescência); valores abaixo da linha verde representam MFI do controle não marcado com anticorpo.	59
Fig. 8. Expressão de CD4 e CD8 em CNAs presentes após 48h de coculturas com DCs.	65
Fig. 9. Gráfico de dispersão da porcentagem de células viáveis presentes no 7º dia de culturas de iDCs e mDCs e respectivas co-culturas com células apoptóticas (APO) ou apoptóticas estressadas por aquecimento (HAPO) autólogas (A) ou alogênicas (B). A viabilidade foi avaliada por contagem de células que excluíram trypan-blue, dividindo-se o número de células trypan-blue negativas pelo total de células.	68
Fig. 10. Gráficos de dispersão da porcentagem de células CD14 ⁺ presentes no 7º dia de culturas de iDCs e mDCs e respectivas co-culturas com APO ou HAPO autólogas (A) ou alogênicas (B).	71
Fig. 11. Gráficos de dispersão da porcentagem de células CD86 ⁺ presentes na região R1 de análise por citometria de fluxo de culturas de 7 dias de iDCs e mDCs e respectivas co-culturas com APO ou HAPO autólogas (A) ou alogênicas (B).	72
Fig. 12. Gráficos de dispersão da porcentagem (A) e MFI (B) de células CD1a ⁺ presentes na região R1 de análise por citometria de fluxo de culturas de 7 dias de iDCs e mDCs e respectivas co-culturas com APO ou HAPO autólogas.	74
Fig. 13. Gráficos de dispersão da porcentagem (A) e MFI (B) de células CD1a ⁺ presentes na região R1 de análise por citometria de fluxo de culturas de 7 dias de iDCs e mDCs e respectivas co-culturas com APO ou HAPO alogênicas.	75
Fig. 14. Histogramas representativos de MLR autólogas. DCs foram estimuladas	79

com APO ou HAPO por 48h, irradiadas por 1250 rads e estimuladas com linfócitos autólogos.	
Fig. 15. Histogramas representativos de MLR alogênicas. DCs foram estimuladas com APO ou HAPO por 48h, irradiadas por 1250 rads e estimuladas com linfócitos autólogos.	82
Fig. 16. Gráfico de dispersão individual da produção de IL-12p70 no sobrenadante de células dendríticas derivadas <i>in vitro</i> de monócitos de doadores saudáveis na presença de 37i ou 43i autólogas por 48.	83
Fig. 17. Gráfico de dispersão individual da produção de IL-10 no sobrenadante de células dendríticas derivadas <i>in vitro</i> de monócitos de doadores saudáveis na presença de 37i ou 43i autólogas por 48h	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura dos diferentes grupos de linfócitos (CNAs), submetidos a diferentes condições <i>in vitro</i> de estresse celular	37
Tabela 2: Nomenclatura dos diferentes grupos de DCs obtidas, após tratadas com os diferentes estímulos de maturação (TNF- α , 37i e 43i)	38
Tabela 3. Porcentagem de células expressando diferentes marcadores de superfície obtidas de culturas de PBMC, tratadas ou não com acutase.	49
Tabela 4: Porcentagens de células expressando marcadores específicos de linfócitos T, nas CNAs submetidas a diferentes condições <i>in vitro</i> de estresse celular	60

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: Anticorpo

AET: [S(2-Aminoethyl)-Isothionium Bromide Hydrobromide]

Ag: Antígeno

ALO: Alogênicos

APC: Célula Apresentadora de Antígeno

APO: CNAs irradiadas

AUTO: Autólogos

BCG: Bacilo de Calmette-Guerin

BDCA: Antígeno de Célula Dendrítica do Sangue

BSA: Soro-Albumina Bovina

CC: Quimiocinas

CCR: Receptor para Quimiocina

CD: “Cluster of Differentiation”

CFSE: Carboxy Fluoroscein Succinimidyl Ester

CNAs: Células Não Aderentes

CTLs: Linfócitos T Citolíticos

DAMPS: Damage Associated Molecular Patterns

dsRNA: RNA de fita dupla

DCs: Células dendríticas

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FasL: Ligante para Fas

Fc: Fragmento cristalizável de imunoglobulina

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

Gas-6: Growth Arrest Specific Gene 6

GM-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos e Granulócitos

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HAPO: CNAs aquecidas e irradiadas

HLA-DR: Molécula do MHC de classe II

HMGB1: High Mobility Group Box 1

HO-1: Heme-oxigenase 1

HSP: Proteína de choque térmico

IDDM: diabete dependente de insulina

iDC: DC imatura

IDO: Indolamina-dioxigenase

Ig: Imunoglobulina
IL: Interleucina
IFN: Interferon
LB: Linfócito B
LC: Células de Langerhans
LN: Linfonodo
LPS: Lipopolissacarídeo
LT: Linfócito T
mDC: DC madura
MAPK: Quinase ativada por mitógeno (Mithogen Activated Kinase)
M-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos
M-ERK: MAP - ERK
MFG-E8: Milk fat globule EGF/factor VIII, EGF de proteína globular da gordura do leite associado ao fator 8
MFI: Média de Intensidade de Fluorescência
MHC-I e II: Molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I e classe II
mRNA: Ácido Ribonucléico Mensageiro
NK: Células Matadoras Naturais
NOD: Non-Obese Diabetic (mice)
O₂⁻: ânion superóxido
pDC: DCs plasmocitóides
PAMPS: Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC: Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfatos
PHA: Phitohemaglutinina
PI: Iodeto de Propídio
PS: Fosfatidilserina
STAT: Transdutor de Sinais e Ativador da Transcrição
TGF: Fator de Transformação do Crescimento
Th: Linfócito T helper
TIL: Linfócito Infiltrante de Tumor
TLR: Receptor do tipo Toll
TNF: Fator de Necrose Tumoral
TNF-R: Receptor para o TNF
TRAIL: Ligantes Indutores de Apoptose Relacionados ao TNF
VEGF: Fator de Crescimento Endotélio-Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVO	33
3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
	4.1 Casuística	36
	4.2 Diferenciação de DCs a partir de PBMCs <i>in vitro</i>	36
	4.3 Coculturas de iDCs ou mDCs com diferentes grupos de linfócitos, submetidos a diferentes condições de estresse celular <i>in vitro</i>	37
	4.4 Análise de marcadores fenotípicos de membrana por Citometria de Fluxo	38
	4.5 Análise do conteúdo de DNA nuclear por coloração com Iodeto de Propídio (PI)	39
	4.6 Determinação do fenótipo funcional de DCs por Reações Primárias Autólogas e Alogênicas de Leucócitos Misturados (MLR) <i>in vitro</i>	40
	4.7 Separação de linfócitos T por formação de rosetas com hemácias de carneiro	41
	4.8 Detecção da produção de citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	42
	4.9 Análise Estatística	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
	5.1 Caracterização e fenótipo de DCs geradas <i>in vitro</i> a partir de PBMCs aderentes (monócitos) de doadores saudáveis, na presença de GM-CSF e IL-4 por 7 dias	44
	5.2 Comparação entre macrófagos, DCs imaturas (iDCs) e maduras (mDCs) pela expressão de CD14, CD11c e HLA-DR para análise de aderência	49
	5.3 Cinética de Apoptose de Células Não Aderentes (CNAs) submetidas a diferentes condições de estresse celular <i>in vitro</i>	50
	5.3.1 0h após irradiação	51
	5.3.2 24h após irradiação	52
	5.3.3 48h após irradiação	55
	5.3.4 Cinética de apoptose de CNAs submetidas a diferentes condições de estresse celular – gráfico de barras	57
	5.4 Fenótipo de superfície de CNAs submetidas a diferentes condições de estresse celular	58
	5.4.1 Fenótipo de superfície de linfócitos após 48h de cocultura de iDCs com CNAs estressadas de diferentes maneiras	63
	5.5 Efeito da cocultura CNAs estressadas/DCs sobre a viabilidade celular	66
	5.6 Efeito da cocultura DCs/CNAs apoptóticas sobre a expressão de marcadores de superfície de DCs	69
	5.6.1 Expressão de CD14 após cocultura com 37i (APO) ou 43i (HAPO)	69
	5.6.2 Expressão de CD86 após cocultura de DCs com 37i (APO) ou (HAPO)	72
	5.6.3 Expressão de CD1a após cocultura de DCs com 37i (APO) ou 43i (HAPO) autólogas	74

5.6.4 Expressão de CD1a após cocultura de DCs com 37i (APO) ou 43i (HAPO) autólogas		75
5.7 Efeitos linfoestimulador e linfoinibidor de DCs		79
5.7.1 DCs estimuladas com APO ou HAPO autólogas na relação 1:10 e reestimuladas com linfócitos autólogos viáveis na relação 1:5		79
5.7.2 DCs estimuladas com APO ou HAPO autólogas na relação 1:10 e reestimuladas com linfócitos alogênicos viáveis na relação 1:30		81
5.8 Presença de IL-12p70 no sobrenadante das culturas de DCs com diferentes estímulos		83
5.9 Presença de IL-10 no sobrenadante das culturas de DCs com diferentes estímulos.		83
6	DISCUSSÃO GERAL	87
7	CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		101
ANEXOS		114

1 INTRODUÇÃO

Em 1868, Paul Langerhans foi o primeiro a identificar uma população celular com características semelhantes a de células dendríticas (DCs) na camada basal da epiderme, sendo chamadas de células de Langerhans (LC) (LANGERHANS, 1868; VERMAELEN e PAUWELS, 2005). Estas LCs apresentavam uma morfologia dendrítica com longos e ramificados prolongamentos entre as células epiteliais. Esta morfologia peculiar levou Paul Langerhans a considerar esse tipo celular como um neurônio (VERMAELEN e PAUWELS, 2005).

Somente após quase um século, com a descrição inicial por Steinman e Cohn (1973) de “um novo tipo de célula em órgãos linfóides de camundongos”, essas células passaram a ser melhor caracterizadas e chamadas pela primeira vez de células dendríticas. Atualmente, sendo identificadas por suas características morfológicas e funcionais diferentes daquelas presentes em macrófagos, as DCs são vistas coletivamente como um grupo diverso de células derivadas do sistema hematopoiético, indicando uma população heterogênea, com características morfológicas, fenotípicas e funcionais semelhantes, presentes em vários órgãos, além da pele, sangue e órgãos linfóides (MORRISSON III *et al.*, 2003).

A função mais explorada das DCs, ao longo dos anos, e apoiada amplamente por um número cada vez mais crescente de pesquisas, é certamente o seu papel como célula apresentadora de antígeno (APCs, do inglês **Antigen Presenting Cells**) para os linfócitos T. Além de moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), estas células expressam também, na superfície celular, moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86) necessárias para a sinalização e ativação dos linfócitos T. Deste modo, a natureza de qualquer resposta imune específica é influenciada pela interação das APCs com os linfócitos (STEINMAN *et al.*, 2003; TROMBETTA e MELLMAN, 2005).

São consideradas APCs profissionais, os macrófagos, os linfócitos B e as DCs, sendo estas as principais APCs, porque são as únicas células capazes de estimular linfócitos T virgens (STEINMAN e COHN, 1973; STEINMAN *et al.*, 1974; STEINMAN *et al.*, 1975; STEINMAN e WITMER, 1978; STEINMAN *et al.*, 1979; BANCHEREAU *et al.*, 2000, GUERMONPREZ *et al.*, 2002; STEINMAN *et al.*, 2003; TROMBETTA e MELLMAN, 2005). Além destes três tipos celulares, os

monócitos, presentes na circulação sangüínea podem, eventualmente, funcionar como APCs. Estes monócitos, entretanto, têm um papel mais relevante na apresentação antigênica como precursores, tanto de macrófagos como de DCs (CHAPUIS *et al.*, 1997; SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994; ZHOU e TEDDER, 1996).

No sangue periférico humano, duas subpopulações têm sido reconhecidas com base na expressão de CD11c. As células CD11c⁺ no sangue expressam marcadores mielóides, como CD13, CD33, e CD11b, enquanto células CD11c⁻ não expressam níveis significantes de marcadores mielóides (O'DOHERTY *et al.*, 1994). Células CD11c⁻ possuem morfologia plasmocitóide com retículo endoplasmático e aparelho de Golgi bem desenvolvidos. Portanto, as DCs CD11c⁺ são de maneira geral chamadas DCs mielóides com base na expressão de marcadores mielóides, enquanto as CD11c⁻ são chamadas plasmocitóides (pDCs) com base em sua morfologia semelhante a de plasmócitos no estágio precursor de DCs (GROUARD *et al.*, 1997).

Além destas células primárias comprometidas com a diferenciação em DCs, já está bem estabelecido que monócitos se diferenciam em DCs imaturas na presença de GM-CSF e IL-4, ou GM-CSF e IFN- α (SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994; GROUARD *et al.*, 1997; SANTINI *et al.*, 2000). Já foi relatado que DCs mielóides no sangue se desenvolvem em morfologia de macrófagos expressando butirato-esterase e CD14 em resposta a M-CSF, sugerindo que pelo menos uma subpopulação de DCs mielóides sangüíneas é capaz de se diferenciar em macrófagos e assim está relacionada às DCs derivadas de monócitos em termos de origem celular (CHAPUIS *et al.*, 1997; ROBINSON *et al.*, 1999; KADOWAKI, 2007).

Durante uma resposta inflamatória, os monócitos migram para sítios de lesão e atravessam o endotélio interagindo com moléculas de adesão, incluindo a própria CD11c na superfície dos monócitos, atraídos por substâncias produzidas localmente. Uma vez nos tecidos, diferenciam-se em macrófagos residentes ou DCs imaturas, com capacidade de endocitar Ags estranhos, derivados de patógenos ou Ags próprios, provenientes de restos celulares (PALUCKA *et al.*, 1998; KAMATH *et al.*, 2000).

Essa atividade endocitária das DCs imaturas pode ser mediada por diversos receptores de superfície celular, mas também pode ocorrer sem a participação específica destes, pela capacidade das DCs de englobar Ags solúveis de fase fluida, um processo chamado de macropinocitose (SALLUSTO *et al.*, 1994; NORBURY *et al.*, 1997; GUERMONPREZ *et al.*, 2002). Os Ags exógenos endocitados são

processados intracelularmente e os peptídios gerados associam-se a moléculas do MHC de classe II em vesículas endocíticas, sendo expostos posteriormente na superfície da APC. Desta forma, os Ags peptídicos podem ser apresentados em seguida aos linfócitos T CD4⁺, células que, na maior parte das vezes, atuam como linfócitos T “helper” (Th ou auxiliares), sendo fundamentais na indução e regulação da resposta imune (CRESSWELL, 1996).

As DCs encontradas no sangue e em outros órgãos caracterizam-se por expressarem altos níveis de moléculas de classe II, CD11c e baixa ou ausente expressão de CD14. Um subtipo pode ser gerado em cultura pela adição de TGF- β e GM-CSF aos monócitos, que se diferenciam em LCs (GEISSMANN *et al.*, 1998; MOHAMADZADEH *et al.*, 2001). Essas células são caracterizadas pela expressão da molécula CD1a e uma lectina conhecida como langerina em sua superfície, além de possuírem em seu interior, elementos elétron-densos denominados grânulos de Birbeck (BIRBECK *et al.*, 1961; KASHIHARA *et al.*, 1986; LUTZ e SCHULER, 2002).

Dependendo de diferentes fatores, ainda não perfeitamente conhecidos, entre os quais possivelmente está a interação com DCs, os linfócitos podem assumir diferentes padrões de secreção de citocinas, representados, em suas formas polares, pelos padrões Th1 e Th2. A IL-12 e o IFN- γ , quando presentes no microambiente, são as principais citocinas indutoras do padrão Th1, enquanto a IL-4 parece ser a principal citocina indutora de padrão Th2. É interessante ainda notar que citocinas de um destes padrões têm efeitos inibitórios sobre células produtoras de citocinas do outro padrão (MURAILLE e LEO, 1998). Além disso, a produção de IL-10 pelas DCs pode favorecer o surgimento de linfócitos T reguladores (Treg) CD4⁺, caracterizados pela expressão do fator de transcrição FoxP3 e pela produção de citocinas supressoras como TGF- β e IL-10 (SHEVACH *et al.*, 2002; FONTENOT *et al.*, 2003; ZOU, 2005; DAVIDSON *et al.*, 2007).

Outra forma pela qual as DCs podem influenciar a resposta imune é através da ativação de linfócitos citotóxicos ou citolíticos (CTLs). Moléculas de MHC de classe I, que normalmente participam da apresentação de peptídios provenientes de Ags de origem endógena em todas as células nucleadas, nas DCs podem também apresentar peptídios oriundos do processamento de Ags exógenos, num fenômeno conhecido como apresentação cruzada, cujos mecanismos ainda não estão muito bem definidos,

mas vêm se delineando aos poucos (BEVAN, 1976; HEATH e CARBONE, 2001; ACKERMAN *et al.*, 2005). Dessa forma, pela presença de moléculas de MHC de classe I carregadas com peptídios em sua superfície, as DCs participam também da ativação de linfócitos T CD8⁺ CTLs, que podem destruir as células por eles reconhecidas, p.ex., células infectadas por vírus ou células tumorais (CRESSWELL *et al.*, 1999; HEATH e CARBONE, 2001). Há relatos de que a molécula CD1a, citada anteriormente, também participa do processo de ativação de linfócitos T CD8⁺ pelas DCs (KAWASHIMA *et al.*, 2003; COVENTRY e HEINZEL, 2004; BRIGL e BRENNER, 2004; MOODY *et al.*, 2005).

Tendo, portanto, papel tão relevante no desencadeamento da resposta linfocitária, não é surpreendente que as DCs se distribuam amplamente por todo o organismo, localizando-se principalmente na pele, nas mucosas, mas também no sangue e nos espaços intersticiais de muitos órgãos e tecidos (MAHNKE *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2003). Este posicionamento, que depende da expressão de uma série de moléculas de adesão, quimiocinas e receptores de quimiocinas pelas DCs, é estratégico para o mecanismo inato de captura de Ags. Em determinadas situações, a modificação destes padrões de expressão permite a migração das DCs para órgãos linfóides secundários, onde podem apresentar Ags de forma imunogênica ou tolerogênica (FINKELMAN *et al.*, 1996; SALLUSTO *et al.*, 1999; LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2000; LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2001a; LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2001b; ENGERING *et al.*, 2002; MAHNKE *et al.*, 2002).

De modo geral, descreve-se que as DCs presentes nos tecidos, num estado incompletamente maduro, recebem sinais de ativação co-administrados com o Ag. Steinman e colaboradores (2003) apresentaram dois modelos principais que têm sido propostos para explicar esta dualidade funcional das DCs. O primeiro modelo é o proposto por Janeway (1992; JANEWAY, 2003; MEDZHITOV e JANEWAY, 2002) e sugere que as DCs possuem receptores de reconhecimento para identificar padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs, p.ex., LPS e RNA de fita dupla (dsRNA). Neste modelo, as DCs, ao reconhecerem um destes PAMPs sofreriam ativação e só então se tornariam capazes de desencadear uma resposta linfocitária. O segundo modelo, proposto por Matzinger (1994) é mais abrangente que o anterior e é referido como modelo de “perigo”. Neste caso, além de reconhecer sinais oriundos de

produtos de patógenos, as DCs percebem o perigo na forma de fatores liberados por células agredidas durante estresse ou infecções. Estes fatores podem ser proteínas de choque térmico (HSPs - “heat-shock proteins”); nucleotídeos ou produtos mitocondriais (que normalmente seriam encontrados somente no interior de células); intermediários reativos de oxigênio (e.g.: peróxido de hidrogênio [H₂O₂], ânion superóxido [O₂⁻]); produtos de lesão de matriz extracelular; NO (óxido nítrico) e citocinas (IFN- γ , TNF- α) (GALLUCCI, 1999; GALLUCI e MATZINGER, 2001).

Após exposição a estes sinais de maturação, as DCs mudam gradativamente o padrão de síntese de receptores (CCRs) para quimiocinas (CCs), aumentando a expressão principalmente de CCR7, ligante de SLC (do inglês, **S**ecundary **L**ymphoid-**T**issue **C**hemokine), secretada em órgãos linfóides secundários (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Além de mudar o padrão de expressão de receptores para CCs, as DCs também produzem CCs em grandes quantidades após exposição a estímulos de maturação, levando a duas conseqüências principais. A primeira seria o recrutamento de DCs imaturas, que são importantes para sustentar a amostragem de Ag em momentos posteriores. A segunda seria a modulação da expressão de receptores para CCs inflamatórias sobre DCs em maturação, o que facilitaria sua saída dos tecidos inflamados (LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2000; LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2001a; LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2001b; LUTZ e SCHULER, 2002; MAHNKE *et al.*, 2002).

Ainda neste estado, várias alterações morfológicas como reorganização do citoesqueleto, aquisição de motilidade celular e perda de estruturas adesivas acompanham o processo de maturação das DCs, que perdem gradativamente a capacidade fagocitária e adquirem propriedades para ativar linfócitos T “naïve” (virgens) à medida que migram para os LNs. Entre estas propriedades, estão o aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras e de MHC de classe I e II; secreção de citocinas e expressão de novos marcadores, como o CD83, propriedades essas que caracterizariam as DCs como células maduras e/ou ativadas, especializadas para apresentação de antígenos, tendo implicações importantes como iniciadores naturais de rejeição de transplantes, rejeição de tumores e algumas formas de auto-imunidade (GALLUCCI *et al.*, 1999; GALLUCCI e MATZINGER, 2001).

O conceito de que a maturação de DCs como ponto de controle para iniciar a resposta imune poderia trazer riscos, emerge quando se considera que as DCs também

processam Ags de células próprias, liberados em diferentes condições, patológicas ou não (MATZINGER, 1994; GALLUCCI e MATZINGER, 2001). Embora o repertório dos linfócitos T sofra mecanismos de seleção, estes mecanismos não podem eliminar linfócitos capazes de reconhecer todo e qualquer Ag próprio, uma vez que esta seleção depende da presença do Ag no momento da seleção (KIEWSKY e KLEIN, 2006). Isto cria a possibilidade de que a apresentação por uma DC ativada, de um Ag próprio para o qual existe um linfócito T reativo, desencadeie uma reação de auto-imunidade (MATZINGER, 1994; KRUISBEEK e AMSEN, 1996; KONO e ROCK, 2008).

Assim, a manutenção da homeostase requer que as DCs possam apresentar peptídeos próprios e não-próprios de maneiras diversas, com os primeiros induzindo tolerância, ou pelo menos não induzindo resposta, ao passo que os últimos devem induzir imunidade (OHASHI *et al.*, 1991; BOUNEAUD *et al.*, 2000; HEATH e CARBONE, 2001; MASON e POWRIE, 2001; SCHEINECKER *et al.*, 2002; KONO e ROCK, 2008). Neste contexto, a ocorrência, mesmo na ausência de estímulos de maturação, de fluxo migratório basal de DCs e seus precursores para os LNs (IP e LAU, 2004; OHL *et al.*, 2004) torna-se significativa, principalmente quando alguns trabalhos sugerem que o reconhecimento de complexos MHC/peptídeos próprios expressos por essas DCs não completamente maduras poderia induzir tolerância em linfócitos (FEURSTEIN, 2000; JONULEIT *et al.*, 2001; LUTZ e SCHULER, 2002; MAHNKE *et al.*, 2002; GUERMONPREZ *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2002).

Este modelo considera a ativação ou não das DCs como fator determinante do resultado de sua interação com os linfócitos; ignora, porém, a possibilidade de uma “ativação tolerogênica” deste tipo celular. Embora a própria apresentação antigênica por uma DC imatura tenha sido associada à indução de tolerância (RONCAROLO *et al.*, 2000; STEINMAN *et al.*, 2000) ou de linfócitos Treg / supressores (JONULEIT *et al.*, 2001, STEPHENS *et al.*, 2001; SHEVACH, 2002; DAVIDSON *et al.*, 2007), há também a possibilidade de que a indução de tolerância dependa de um fenótipo específico da DC (FINKELMAN *et al.*, 1996; HAWIGER *et al.*, 2001).

Neste aspecto vale notar que Liu *et al.* (2002) demonstraram que a captura de Ags de linfócitos autólogos apoptóticos por DCs murinas e sua apresentação a linfócitos T Ag-específicos levava, a princípio, à proliferação destes linfócitos e, em seguida, a sua deleção por apoptose, levando a um estado de tolerância periférica.

Entretanto, as conseqüências da interação de células apoptóticas com células dendríticas e macrófagos não são ainda muito claras. Se por um lado, há outros dados na literatura que mostram este efeito “supressor” de células apoptóticas sobre a resposta imune (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000; SAUTER *et al.*, 2000), há aqueles que sugerem exatamente o contrário (RONCHETTI *et al.*, 1999; FENG *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2002; FENG *et al.*, 2003, MASSÉ *et al.*, 2004).

Neste contexto, de maneira geral, a apoptose é uma espécie de “suicídio” celular executado de maneira programada. Há várias características unificadoras que podem ser encontradas na maioria das células que estão passando por esse processo de apoptose. Em uma fase inicial, as células expõem o lipídio fosfatidilserina (PS), em sua face externa e são opsonizadas por vários ligantes de PS, como MFG-E8; glicoproteína plasmática $\beta 2$ gp1 e Gas-6, que medeiam a captação dessas células “marcadas” para fagocitose pela interação com receptores de fagócitos através de suas integrinas e outros receptores “scavenger” (MAITI *et al.*, 2008, FRANZ *et al.*, 2007). Este processo de eliminação suprime as respostas inflamatórias e as reações imunes.

Se as células apoptóticas escapam da eliminação imediata, elas começam a formar pequenas protuberâncias (“blebs”), que eventualmente evoluem para corpúsculos apoptóticos e concomitantemente reduzem o volume celular. As células encolhidas ligam-se a ligantes adicionais como C1q, proteína C reativa (PCR), pentraxina longa (PTX-3) e as proteínas surfactantes A e D (SP-A e D). Estas proteínas adaptadoras medeiam uma segunda onda de eliminação para estas células que escaparam da fagocitose dependente de PS e ajudam a evitar a entrada de células apoptóticas em necrose secundária (BASU *et al.*, 2000; SOMERSAN *et al.*, 2001; FRANZ *et al.*, 2007). As opsoninas ligadas às células apoptóticas são então reconhecidas por receptores de fagócitos como Fc γ RIIA, C1qR, CR1, CD91 e calreticulina. Células que morrem após grave impacto e células apoptóticas que não são eliminadas imediatamente sofrem necrose primária e secundária, respectivamente. Em contraste à apoptose, a necrose, especialmente a necrose primária, é pro-inflamatória e conseqüentemente, imunoestimuladora (FRANZ *et al.*, 2007).

Na verdade, as maneiras de se induzir apoptose também variam, podendo provocar a expressão de diferentes padrões moleculares nos corpos apoptóticos, padrões esses referidos como DAMPS (do inglês Damage-Associated Molecular Patterns ou Padrões Moleculares Associados ao Dano celular) por Kono e Rock

(2008), em contraposição aos PAMPS de Janeway (1992), já citados. No modelo de Matzinger (1994), o evento crucial que controla o início de uma resposta imune não é infecção, mas a produção de sinais de perigo (DAMPs) de células estressadas, danificadas e/ou em processo de morte no tecido local. Foi postulado que estes sinais agissem nas DCs de maneira que elas também causassem a migração para o tecido linfóide e apresentassem Ags de maneira imunoestimuladora. Especulou-se que os DAMPs possam ser produzidos em resposta a PAMPs e portanto os DAMPs seriam mediadores finais que promoveriam as respostas imunes em todas as situações, incluindo infecções. Entretanto, é possível também que DAMPs e PAMPs possam alertar o sistema imune para um problema independentemente e ainda possivelmente de maneira sinérgica (MATZINGER *et al.*, 1994; KONO e ROCK, 2008).

Neste contexto, Feng *et al.* (2001, 2002) verificaram que células leucêmicas apoptóticas da linhagem 12B1-D1, submetidas a choque térmico, expressavam HSP60 e HSP72 na superfície e quando co-cultivadas com DCs, eram capazes de induzir uma forte resposta imune contra o tumor em camundongos. Em contraste, células tumorais apoptóticas não estressadas não foram capazes de induzir imunidade, embora seus Ags fossem captados de maneira semelhante aos de células estressadas. Neste modelo, DCs imunogênicas e não-imunogênicas puderam ser diferenciadas pela expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86) e pela secreção de IL-12 (FENG *et al.*, 2001, 2002).

Tais dados sugerem que, pelo menos em camundongos, DCs oriundas de um mesmo precursor, expostas a condições diversas, podem induzir “resposta” ou “tolerância”. Como citado, o processo de apoptose e a expressão de HSPs em células-alvo parecem fenômenos capazes de afetar a função das DCs, provavelmente pela modulação da expressão de moléculas co-estimuladoras e citocinas (FENG *et al.*, 2002; FENG *et al.*, 2003; MASSÉ *et al.*, 2004). Além destes fatores, a quantidade de DCs em relação aos linfócitos T também parece contribuir para a indução de tolerância ou “resposta” do sistema imune (RONCHETTI *et al.*, 1999; LIU, 2001).

No contexto de células tumorais, o papel do sistema imune no reconhecimento e eliminação dessas células foi proposto por Paul Ehrlich no início do século passado. No final da década de 50, Burnet e Thomas reformularam as hipóteses de Ehrlich e propuseram o que hoje é conhecido como Teoria da Vigilância Imunológica (BURNET, 1970). Essa teoria propõe que o sistema imune patrulha o organismo à

procura de células transformadas, sendo capaz de reconhecer e destruí-las, quando os mecanismos internos de reparo celular e tecidual, extremamente eficientes, estão prejudicados e a homeostase celular precisa ser garantida no nível tecidual por outras células, de maneira semelhante aos mecanismos de tolerância central e periférica que ocorreriam para evitar o surgimento de doenças auto-imunes, isto é, por exemplo, pela indução de apoptose em células defeituosas ou alteradas ou indução de citocinas supressoras, como a IL-10 (MEDAWAR, 1986; ZOU, 2005).

Entretanto, se há evidências que apontam para a existência de uma resposta imune contra as neoplasias, e portanto, para a vigilância imunológica, há dados que contradizem essa hipótese, por exemplo, o crescimento de tumores mesmo em indivíduos imunocompetentes e o fato de que indivíduos imunodeficientes não apresentam aumento da incidência de tumores mais comuns no restante da população (PENN, 1991).

Em outra vertente de pesquisa, nos trabalhos pioneiros de Medawar e Owen (MEDAWAR, 1986) na década de 50, foi possível demonstrar que a “tolerância poderia ser adquirida ativamente”, pela observação de que homoenxertos de gados dizigóticos poderiam ser distinguidos de gados monozigóticos, que não rejeitavam enxertos entre si, e este fenômeno era passível de reprodução artificial (MEDAWAR, 1986).

Considerando-se que uma célula tumoral é em tese, é uma célula própria alterada, transformando-se com o passar do tempo, e das interações com o ambiente, de forma que o organismo não o reconhece mais como algo estranho, a ponto de destruí-lo quando necessário, é tentador hipotetizar que o tumor se utilizaria dos mecanismos de tolerância imunológica para escapar da resposta imune e sobreviver às custas de seu “hospedeiro”. De fato, muitos tumores são potencialmente imunogênicos, como se confirma pela presença de respostas tumor-específicas *in vivo*. Entretanto, a eliminação espontânea de tumores estabelecidos por mecanismos imunes endógenos é rara, apesar da existência de vigilância imunológica (ZOU, 2005).

Estamos diante portanto, de uma faca de dois gumes, pois, se por um lado, o foco da maioria das imunoterapias tumorais é suplementar os elementos imunogênicos essenciais para fortalecer a imunidade tumor-específica (ZOU, 2005), por outro lado, algumas imunoterapias antitumorais geralmente tem resultado em fraca eficiência clínica, o que poderia ser explicado pelo fato crescentemente

documentado de que os tumores desenvolvem diversas estratégias para escapar da imunidade tumor-específica (ZOU, 2005).

No caso da imunoterapia com DCs, apesar dos resultados encorajadores obtidos com vacinas em alguns casos, possíveis explicações para a baixa eficiência clínica em alguns pacientes poderiam ser: a baixa eficiência das DCs geradas (baixos níveis de moléculas co-estimuladoras); fatores associados ao sítio tumoral (órgão ou tecido acometido pelo tumor) e ao hospedeiro (variação no microambiente tumoral de cada paciente); a existência de diferentes subpopulações, caracterizada por uma grande heterogeneidade morfológica e funcional das DCs; geração de DCs diferentes quando se utiliza precursores de vários indivíduos, devido à grande variabilidade genética na população humana (NEVES, 2003; BARBUTO *et al.*, 2004; NEVES *et al.*, 2005).

No contexto da imunologia de tumores, a imunidade antitumoral ou a tolerância imune ao tumor significa o sucesso ou a falência, respectivamente, do sistema imune em rejeitar um tumor. O microambiente tumoral, que é composto de células do sistema imune, células tumorais, células do estroma e matriz extracelular é o principal campo de batalha durante o processo neoplásico, facilitando a proliferação, sobrevivência e migração de células tumorais. Os tumores podem não somente sobreviver e se disseminar, como também mimetizar algumas das vias de sinalização do sistema imune para propagar as condições que favorecem a tolerância imunológica – condições “tolerizantes” – e então escapar da imunidade tumoral (ZOU, 2005).

Durante a interação entre tumores e sistema imune no ambiente tumoral, portanto, a tolerância imunológica começa gradual e localmente, progride e finalmente se espalha para o organismo inteiro. Zou (2005) sugere que a tolerância imunológica ao tumor é iniciada e mantida por uma interação constitutiva entre tumores e sistema imune do hospedeiro, e controlada por modificações variáveis. Como citado, é importante ressaltar que muitos dos mecanismos utilizados na tentativa de se imunizar um organismo contra determinados tumores são, na maioria dos casos, os mesmos utilizados pelo sistema imune ao longo do processo *in vivo* de rejeição de um transplante.

Ora, se as condições capazes de tornar uma DC humana tolerogênica ou moduladora forem bem estabelecidas, é possível vislumbrar sua aplicação clínica,

com o desenvolvimento de estratégias para diminuir a resposta imune contra alérgenos, aloenxertos ou em doenças auto-imunes (THOMSOM, 2002; MAHNKE *et al.*, 2002). Desta forma, como a maioria dos autores citados utilizaram células de animais, para o estudo da modulação da resposta imune por DCs, estudos para uma melhor compreensão desta resposta induzida por células humanas se fazem necessários. Assim, a proposta deste trabalho é o estabelecimento comparativo, em células humanas, de condições descritas como capazes de tornar DCs murinas tolerogênicas, utilizando um modelo *in vitro* na ausência de agentes infecciosos ou tumorais.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o estudo de mecanismos moleculares e celulares possivelmente envolvidos na geração de DCs tolerogênicas derivadas *in vitro* de monócitos do sangue periférico humano. Especificamente, pretendeu-se estudar:

- o papel de diferentes estímulos (células apoptóticas submetidas ou não a choque térmico, TNF- α) sobre a ativação funcional de DCs derivadas de monócitos do sangue periférico humano, avaliada pela expressão de marcadores de superfície (HLA de classe II, CD11c, CD14, CD1a, CD80, CD86, CD83 e CCR7), secreção de citocinas (IL-10, IL-12, TNF- α) e capacidade de ativação/inativação de linfócitos autólogos e alogênicos;
- a correlação entre expressão de marcadores de superfície e secreção de citocinas pelas DCs e sua atividade linfo-estimuladora ou inibitória;
- o efeito da concentração relativa de DCs de fenótipo equivalente na indução de ativação/inativação de linfócitos.

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, foram realizados experimentos para diferenciação de DCs *in vitro* a partir de PBMCs de bolsas obtidas de aférese de doadores voluntários para protocolo de vacinação com DCs, atualmente desenvolvido no Laboratório de Imunologia de Tumores do Departamento de Imunologia do ICB-USP (NEVES, 2003; BARBUTO *et al.*, 2003; BARBUTO *et al.*, 2004; NEVES *et al.*, 2005; NEVES *et al.*, 2008), detalhados no item 4 (Material e Métodos) deste relatório. O excedente dessas bolsas foi utilizado para padronização dos experimentos de obtenção de células apoptóticas.

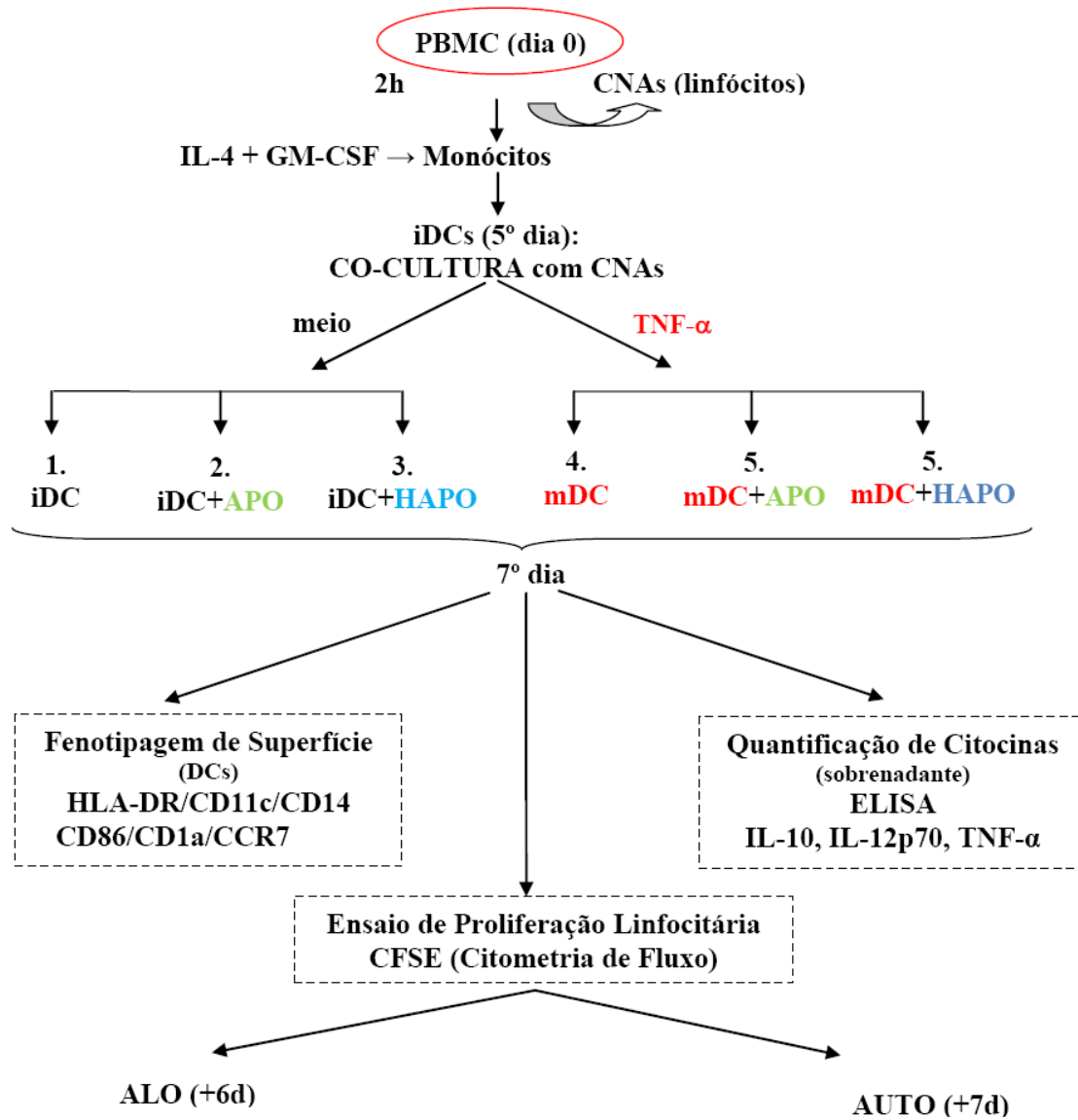
Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram incubadas por duas horas para aderência de monócitos. Após este período, as células não aderentes (CNAs) foram transferidas para frascos de cultura e as células aderentes que restaram na placa foram incubadas com R-10 contendo GM-CSF (50ng/mL) e IL-4 (50 ng/mL) durante 7 dias, para geração de DCs. A estas culturas, no 5º dia, foram adicionados estímulos de maturação conhecidos (TNF- α ou LPS) na presença ou ausência de células apoptóticas, previamente estressadas pelo calor (HAPO) ou não (APO), para avaliar o efeito destas células apoptóticas estressadas de diferentes maneiras, sobre a maturação das DCs.

À medida que foram sendo padronizadas as condições de cultura e estimulação, as DCs obtidas após incubação com os diversos estímulos foram avaliadas quanto aos seguintes marcadores fenotípicos de membrana, por análise em citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD): CD11c, HLA-DR, CD14, CD1a, CD80, CD86, CD83, CCR7. Os sobrenadantes das diversas culturas de DCs foram armazenados e foram avaliados quanto ao perfil de citocinas presentes, IL-12p70, IL-10, TNF- α ou IL-4, por ELISA.

Para análise da atividade funcional das diferentes DCs obtidas, foram realizados ensaios nos quais estas células foram irradiadas em fonte de ^{137}Cs , com a dose de 1250 rads, e em seguida avaliada sua atividade estimuladora para linfócitos T autólogos ou alogênicos, em ensaios de proliferação e produção de citocinas.

Assim, os resultados apresentados no presente trabalho são referentes ao algoritmo esquematizado a seguir.

Algoritmo do Protocolo de Diferenciação e Maturação de DCs na presença de CNAs estressadas de diferentes maneiras:



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram estudadas as células de 35 indivíduos sadios que concordaram previamente em participar da pesquisa, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética em Pesquisa, desta Universidade e aprovado (parecer em anexo). Como critérios de elegibilidade, foram considerados, idade acima de 18 anos, peso maior que 50 kg e sorologia negativa para exames realizados rotineiramente em Banco de Sangue. O material utilizado neste estudo é o excedente da coleta realizada para o protocolo de vacinação, desenvolvido neste laboratório.

4.2 Diferenciação de DCs a partir de PBMCs *in vitro*

Foram coletados 20 mL de produto de aférese dos indivíduos descritos na Casuística. As amostras foram colocadas, individualmente, em tubos cônicos de 50 mL, e submetidas à centrifugação sobre 12 mL de Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Suécia, densidade $1,077 \pm 0,001$ g/mL). O material foi centrifugado por 30 min a 805g à temperatura de 18 °C. A camada de células mononucleares (MONO) foi recuperada, transferida para outro tubo juntamente com “Hanks Balanced Salt Solution” (HBSS) e as células lavadas 2 vezes em meio RPMI 1640, pH 7,2 (Gibco Brl, Life Technologies, Grand Island, NY), com centrifugação a 290g, por 10 minutos cada vez, para eliminação das plaquetas. O botão celular (“pellet”) foi coletado, as células quantificadas na segunda lavagem e a viabilidade celular avaliada por incorporação de azul de trypan 0,4% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (1,42 g de Na_2PO_4 , 0,36 g de NaH_2PO_4 , 8,2 g de HCl e H_2O qsp 1000 mL). Em seguida, as células foram ressuspensas em RPMI-1640 suplementado com 1% de L-glutamina (2mM) e 10% de soro fetal bovino (SBF; Gibco Brl, Life Technologies, Grand Island, NY) [R-10] e colocadas em placas de 12 poços, na concentração de 1×10^7 /mL por poço. As células mononucleares obtidas foram enriquecidas para células aderentes por incubação em placas de 12 poços, em meio R-10 por 2 horas, em estufa com atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de

água, a 37 °C (estufa de CO₂). A concentração inicial de células plaqueadas foi de 1x10⁷/mL, em um volume final de 1 mL por poço.

Após esse período, as células não-aderentes (CNAs) foram coletadas e congeladas em meio apropriado (30% de SBF e 10% de DMSO), a -70 °C, por 72h e, em seguida, transferidas para N₂ líquido, para armazenamento. Para os ensaios de apoptose e alguns ensaios de proliferação, as CNAs foram coletadas, transferidas para garrafas de cultura e mantidas até o 3º ou 7º dia, respectivamente, em estufa de CO₂.

As células aderentes foram cultivadas por 7 dias em R-10, contendo 50 ng/mL (750U/mL) de GM-CSF (PeproTech, Cidade do México, México) e 50ng/mL (1450 U/mL) de IL-4 (PeproTech), em estufa de CO₂ a 37 °C e este grupo de células foi chamado de DCs imaturas (**iDCs**).

Nos dois últimos dias de cultura, foi acrescentado TNF- α (ReD Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA ou PeproTech) na concentração de 50ng/mL a alguns poços, e o grupo de células obtido no 7º dia foi chamado de DCs maduras (**mDCs**).

4.3 Coculturas de iDCs ou mDCs com diferentes grupos de linfócitos, submetidos a diferentes condições de estresse celular *in vitro*

Em outros experimentos, linfócitos (CNAs) alogênicos (Alo) ou autólogos (Auto) estressados ou não por aquecimento (H) foram irradiados (vide item 4.5) para indução de apoptose (APO). Assim, células H, APO ou não foram divididas em 4 grupos de CNAs, esquematizados na tabela 1.

Tabela 1: Nomenclatura dos diferentes grupos de linfócitos (CNAs), submetidos a diferentes condições *in vitro* de estresse celular

1. 37ni	CNAs não irradiadas, mantidas em estufa de cultura na temperatura de 37 °C (células não estressadas – controle negativo)
2. 37i (APO)	CNAs irradiadas com 2500rads (37i ou, posteriormente, APO: células estressadas por irradiação)
3. 43ni (H)	CNAs não irradiadas, aquecidas em banho-maria na temperatura de 43 °C por 30 minutos (células estressadas por aquecimento)
4. 43i (HAPO)	CNAs aquecidas em banho-maria na temperatura de 43 °C por 30 minutos e em seguida, irradiadas em fonte de ¹³⁷ Cs na dose de 2500rads (43i ou, posteriormente, HAPO: células estressadas por aquecimento e irradiação)

As CNAs (APO ou HAPO) foram adicionadas às culturas de DCs na concentração relativa equivalente a 10% do total esperado de DCs recuperadas. Em seguida, foi analisado o efeito de células estressadas de diferentes maneiras sobre o processo de maturação das DCs. Ao todo, foram estudados 6 grupos de DCs potencialmente diferentes, descritas na tabela 2.

Tabela 2: Nomenclatura dos diferentes grupos de DCs obtidas, após tratadas com os diferentes estímulos de maturação (TNF- α , 37i e 43i)

1. iDCs (DCs imaturas)	PBMCs aderentes cultivadas por 7 dias em R-10, contendo 50 ng/mL de GM-CSF e 50ng/mL de IL-4
2. iDC+37i	Coculturas de iDCs com 37i nos dois últimos dias de cultura, na ausência de TNF- α
3. iDC+43i	Coculturas de iDCs com 43i nos dois últimos dias de cultura, na ausência de TNF- α
4. mDCs (DCs maduras)	iDCS cultivadas com 50ng/mL de TNF- α nos dois últimos dias de cultura
5. mDC+37i	Coculturas de mDC com 37i nos dois últimos dias de cultura
6. mDC+43i	Coculturas de mDC com 43i nos dois últimos dias de cultura

Após o período de cultura, o meio contendo células não-aderentes (DCs) foi removido das placas e estas foram lavadas com R-10 para retirada das células semi-aderentes. Um experimento foi realizado na presença de Acutase[®] (Pfizer; gentilmente cedida pela Prof^a. Dra. Maria Regina D'Império Lima), seguida por lavagem das células com PBS.

As células foram centrifugadas a 290 g, por 8 minutos, ressuspensas em meio R-10, quantificadas e avaliadas quanto à viabilidade celular por exclusão de Azul de Trypan 0,4%. O sobrenadante foi armazenado para dosagem de IL-12 e IL-10. Alíquotas das células foram utilizadas para avaliação do fenótipo de membrana em citômetro de fluxo (FACSCalibur BD, BD Biosciences) e/ou MLR.

4.4 Análise de marcadores fenotípicos de membrana por Citometria de Fluxo

Para determinação do fenótipo de membrana, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais (Acs) comerciais (CALTAG Lab/BD Pharmingen) específicos, bem como os Acs controles de isótipo, anti-CD11c (marcador de DCs

mielóides), anti-CD14 (marcador de linhagem de monócitos, ausente em DCs), anti-CD80 (B7-1, molécula co-estimuladora), anti-CD86 (B7-2, molécula co-estimuladora), anti-CD83 (marcador de DCs ativadas), anti-CCR7 (receptor de quimiocinas, expresso por células ativadas) e anti-HLA-DR (marcador de células apresentadoras de Ags peptídicos) e anti-CD1a (marcador de uma subpopulação de DCs e molécula apresentadora de Ags lipídicos)

Após contagem, alíquotas de 3×10^5 DCs obtidas das culturas foram colocadas em tubos plásticos (Eppendorf) de 1,5mL e centrifugadas por 5 min, a 300 g e 4 °C para obtenção de um “pellet”, ao qual foram adicionados anticorpos específicos (em concentrações adequadas) para os marcadores de interesse e o material incubado por 20 min a 4° C. Após este período, o material foi lavado por 2 vezes (5 min, 1200 g, 4 °C) com 500 µL de tampão para citometria (PBS suplementada com 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica). Após as lavagens, as células, já marcadas, foram ressuspensas em 300 µL de tampão para citometria e analisadas no citômetro de fluxo (FACS-Calibur). Os dados obtidos foram analisados usando-se o “software” CellQuest (BD) ou WinMDi (Purdue University, EUA - www.purdue.edu). Alíquotas de células também foram marcadas com os Acs controles de isótipos adequados. Também foi realizada marcação simples dos mesmos grupos de DCs com cada um dos Acs de diferentes cores (FL1-FITC, FL2-PE ou FL3-Cy-5), para calibração do aparelho e compensação adequada das células marcadas, excluindo ou reduzindo células com alta autofluorescência que pudesse interferir no resultado de células marcadas com dupla, tripla ou quádrupla marcação (quando realizada). Em alguns experimentos foi realizada também compensação com auxílio de “beads” magnéticas (CaliBRITE™ 3 ou 4, BD, San Jose, Califórnia, EUA) marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromo adequado (FL1-FITC, FL2-PE, FL3-Cy-5 e FL-4-APC).

4.5 Análise do conteúdo de DNA nuclear por coloração com Iodeto de Propídio (PI)

Para a detecção de morte celular (apoptose) de CNAs, foi utilizada a técnica de coloração com PI para avaliar a porcentagem de fragmentação de DNA nuclear. Para tanto, uma média de $3-5 \times 10^6$ células foram centrifugadas a 240 g por 5 minutos e ressuspensas em 300 µL de tampão hipotônico contendo citrato de sódio a 0,1%,

50µg/mL de PI e 0,1% de Triton-X (detergente em baixa concentração, para tornar a membrana celular levemente permeável). Em seguida, as células foram incubadas por um período de no mínimo 2h. A análise foi feita por citometria de fluxo (FACS-Calibur, BD), sendo monitorada a presença de células apoptóticas ou viáveis empregando-se os seguintes métodos: 1. Alterações morfológicas das células (FSC x SSC – FRANZ *et al.*, 2007); 2. Análise do conteúdo de DNA que produziu um perfil gráfico dependendo da fase do ciclo celular em que as células se encontravam. As células apoptóticas são identificadas com núcleos hipodiplóides (ou subdiplóides), que aparecem à esquerda do pico G0-G1 (NICOLETTI *et al.*, 1991; DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1997; MIRAKIAN *et al.*, 2002; SCHILLER *et al.*, 2008).

4.6 Determinação do fenótipo funcional de DCs por Reações Primárias Autólogas e Alogênicas de Leucócitos Misturados (MLR) *in vitro*

Para avaliar a capacidade estimuladora das células geradas, as DCs irradiadas (1250 rads) obtidas da cultura (células estimuladoras) foram cocultivadas em placas de 96 poços com fundo em U, com células mononucleares alogênicas ou autólogas (linfócitos respondedores) obtidos do sangue periférico de indivíduos saudáveis. As células foram plaqueadas nas concentrações de 1×10^5 células respondedoras pra cada 1×10^4 células estimuladoras (1:10 DC/linfócito) ou $3,33 \times 10^4$ (1:30 DC/linfócito), ambas ressuspensas em meio R-10. Os linfócitos foram corados com CFSE (2µL em PBS a 0,1%) por 20 minutos. Após a incubação, os linfócitos foram centrifugados a 400g por 8 minutos a 20 °C, para retirar o excesso de corante que não entrou nas células e estas, após quantificação, foram ressuspensos em volume de 1mL de R-10, em seguida distribuídos 100 µL da suspensão com linfócitos/poço, nas concentrações relativas DC:linfócitos de 1:10 e 1:30. As células foram mantidas por 5 a 7 dias em estufa de CO₂, a 37 °C.

Como controle negativo foram usados poços contendo apenas células estimuladoras ou apenas células respondedoras e como controle positivo, células respondedoras estimuladas com PHA (fitohemaglutinina A) na concentração de 2 ng/mL. O índice de proliferação (I) foi determinado pela seguinte equação:

$$I = \frac{\text{média geométrica (Geo mean) da intensidade de fluorescência do grupo controle}}{\text{média geométrica (Geo mean) da intensidade de fluorescência do grupo experimental}}$$

4.7 Separação de linfócitos T por formação de rosetas com hemácias de carneiro

As hemácias de carneiro foram colocadas em um tubo plástico estéril de 50 mL e centrifugadas a 400g durante 10 minutos a 20 °C, e a seguir lavadas 2 vezes, com mesma centrifugação, em tampão PBS (SAXON *et al.*, 1976). Estas hemácias foram tratadas com AET (hidrobrometo de 2-amino-etil-iso-tiourânio; Sigma) para mudar a carga elétrica da superfície das hemácias, possibilitando uma maior interação eletrostática com linfócitos T e a formação de rosetas estáveis. Para tanto, foram diluídos 0,5 g de AET em 12,5 mL de água bidestilada e deionizada, com ajuste final do pH para 9,0 utilizando-se NaOH 1,0 N. Após passagem em filtro de 0,22 µm (Millipore), 8 mL de solução de AET foram acrescentados a cada 2 mL de papa de hemácias de carneiro e mantidos durante 20 a 40 minutos a 37 °C. A seguir, as hemácias foram lavadas (centrifugação a 250 g por 10 minutos, até obtenção de sobrenadante claro) com tampão PBS pH 7,2 e ressuspensas finalmente até se obter uma suspensão a 4% em R-10.

Para a recuperação de linfócitos T das co-culturas, foi preparada uma suspensão de linfócitos em concentração máxima de 1×10^7 células/mL, misturada com SFB e hemácias de carneiro pré-tratadas com AET como descrito anteriormente, numa proporção de 1:0,5:1, centrifugada a 200 g, por 5 minutos a 4 °C e incubada em gelo por 1 hora. Após a incubação, as células foram novamente ressuspensas e o número de rosetas contado. A suspensão foi submetida à centrifugação sobre Ficoll-Hypaque (400 g, 4 °C, 35 minutos).

Após a centrifugação, os linfócitos T restavam no “pellet”, no fundo do tubo, formando rosetas com as hemácias de carneiro modificadas. As hemácias foram lisadas com tampão de lise (1:10 de TRIS/NH₄Cl) e em seguida, os linfócitos T foram recuperados após lavagem destas células em meio de cultura (R-10), com centrifugação a 200 g, durante 10 minutos a 20 °C. Os linfócitos T foram ressuspensos em 2 mL de meio R-10, quantificados em câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para $1,0 \times 10^5$ células/mL, para cultura (SAXON *et al.*, 1976).

4.8 Detecção da produção de citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O sobrenadante das co-culturas DCs-CNAs irradiadas / aquecidas e irradiadas foi submetido a ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ , utilizando os kits Opteia para citocinas (BD, San Jose, CA, EUA). Neste método, placas de 96 poços Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com 100 μ L por poço de Ac de captura (4 μ g/mL) para cada citocina, diluído em tampão PBS (pH 7,2) e mantidas a temperatura ambiente “overnight”. Após 3 lavagens com 400 μ L/poço de tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20, pH 7,2), as placas foram bloqueadas com 300 μ L/poço de tampão de bloqueio (PBS contendo 1% BSA, 5% de Sacarose e 0,05% de NaN₃) por 2h a temperatura ambiente.

Em seguida, após 3 lavagens, as amostras e a curva-padrão foram incubadas por um período de 2h em temperatura ambiente. As amostras para dosagem de IL-12 e IL-10 foram diluídas 1:2, as amostras para dosagem de TNF- α foram diluídas 1:4 e as amostras para dosagem de IL-4 não foram diluídas. A diluição foi feita em tampão de diluição (tampão Tris contendo 0,1% de BSA, 0,05% de Tween 20, pH 7,2). Para a curva-padrão, as citocinas recombinantes foram incubadas em duplicatas de 50 μ L por poço das diluições seriadas (fator 2 de diluição), conforme recomendações do fabricante.

O período de incubação das amostras e da curva padrão foi de 2h a temperatura ambiente. Após três lavagens, foram adicionados 50 μ L/poço de Ac de detecção (175 ng/mL diluído em tampão de diluição) e em seguida as amostras foram incubadas novamente por 2h a temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada 3 vezes e 50 μ L/poço de estreptoavidina diluída em tampão de diluição foram adicionados e a placa reincubada por 20 min, no escuro, em temperatura ambiente. Após esse período e outra lavagem (3 vezes), 50 μ L/poço de substrato (H₂O₂ e tetrametil-benzidina, na proporção de 1:1) foram adicionados, com incubação de 20 min, no escuro, em temperatura ambiente.

Por fim, 50 μ L/poço de H₂SO₄ (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. O cálculo das concentrações foi feito com auxílio do “software” Softmax Pro, através da equação de regressão linear com base na curva padrão e a análise de dados foi executada com auxílio do “software” Prisma.

4.9 Análise Estatística

A análise estatística teve início com a determinação do padrão de distribuição dos dados nas amostras, pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Quando a distribuição era normal (Gaussiana), foi utilizado um teste paramétrico, sendo o teste t pareado o escolhido para se verificar diferenças entre DCs imaturas e DCs maduras. Para observar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a viabilidade celular, a expressão de marcadores de superfície de DCs, produção de citocinas e linfoproliferação, os dados foram submetidos à análise das diferenças entre as amostras pelo teste ANOVA (análise de variância) para Medidas Repetidas paramétrico, quando se tratava de mais de duas condições de cultura, seguido de teste de Dunnett para Comparações Múltiplas. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados com o auxílio do “software” Graphpad Prism 2.01 (San Diego, Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização e fenótipo de DCs geradas *in vitro* a partir de PBMCs aderentes (monócitos) de doadores saudáveis, na presença de GM-CSF e IL-4 por 7 dias

As células obtidas nas culturas de monócitos cultivados por 7 dias com GM-CSF e IL-4 foram analisadas quanto aos parâmetros: tamanho (FSC), granulosidade ou complexidade interna do citoplasma (SSC) e expressão das moléculas de superfície CD11c, HLA-DR, CD14, CD80, CD86, CD83 e CCR7. A análise do tamanho foi utilizada para exclusão de restos celulares (células pequenas ou debris, incluindo corpúsculos apoptóticos), que não condizem com a característica morfológica de DCs descrita pela primeira vez por Steinman *et al.* em 1973 (BANCHEREAU *et al.*, 2000; GUERMONPREZ *et al.*, 2002; STEINMAN *et al.*, 2003 e TROMBETTA E MELLMAN *et al.*, 2005).

Na figura 1, estão representados, à esquerda, “dot plots” de iDCs e mDCs adquiridas em citometria de fluxo, mostrando o aspecto morfológico característico de DCs de acordo com FSC ou SSC apresentados. A região (R1) escolhida nesta análise inclui as células usualmente consideradas como DCs (MACKENSEN *et al.*, 1995). Nos “dot plots” seguintes, podem ser observados os fenótipos das DCs imaturas e maduras em termos de expressão de moléculas CD11c e HLA-DR.

A presença de CD11c está de acordo com dados sobre a origem mielóide destas células geradas *in vitro* (GROUARD *et al.*, 1997). A molécula HLA-DR, codificada pelo complexo gênico do MHC de classe II, está relacionada à apresentação de peptídeos exógenos por APCs para linfócitos T CD4⁺ e a detecção em nossos ensaios confirma a diferenciação com GM-CSF e IL-4, uma vez que as DCs apresentam constitutivamente este marcador (BANCHEREAU *et al.*, 2000).

Para facilitar o acompanhamento da figura 1 e análise dos gráficos, serão descritos os resultados referentes às iDCs, e em seguida, às mDCs.

Assim, a fig. 1 mostra a expressão de CD11c e HLA-DR por células humanas consideradas como iDCs (R1, Fig 1A). Como pode ser observado na Fig. 1A, >95% das células consideradas como DCs em R1 (Fig. 1) expressam HLA-DR. No gráfico de HLA-DR por CD11c (Fig.1A), >90% de células são HLA-DR⁺CD11c⁺.

A partir destes dados iniciais, pode-se sugerir que, no 7º dia de cultura, a maior parte das células presentes no dia 0 diferenciaram-se gradativamente em iDCs na medida em que foram cultivados na presença de GM-CSF e IL-4 por 7 dias.

Entretanto, a análise desses dois marcadores não exclui a possibilidade de presença de monócitos/macrófagos contaminantes. Assim, para confirmar esta hipótese de presença de DCs em nossas análises, além dos “gates” selecionados, analisamos também a expressão do marcador CD14, tanto nas culturas de iDCs quanto de mDCs (Fig. 1B). A molécula CD14, além de marcador da linhagem monócitos/macrófagos, é ligante do complexo LPS-LBP e é necessária para a ativação de macrófagos induzida por LPS, entre outros fatores. Mais recentemente, tem sido considerado também um receptor “scavenger” para células apoptóticas (DEVITT *et al.*, 1998; LINGNAU *et al.*, 2007).

Como pode ser observado nos histogramas de CD14 (Fig. 1B), a presença de células CD14⁺ pôde ser considerada desprezível. As células presentes em R1 na figura 1 apresentaram, portanto, baixa ou nenhuma expressão de CD14, e alta expressão de CD11c e HLA-DR, o que corresponde ao esperado numa população de DCs geradas a partir de precursores sangüíneos CD14⁺ (LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 1994).

Na figura 1C, é possível observar que as iDCs apresentaram alta expressão da molécula co-estimuladora CD86, baixa expressão da molécula co-estimuladora CD80 e de CD83, condizente com a característica de DC imatura não ativada. Houve também uma expressão basal de CCR7 pelas iDCs.

Para a caracterização de DCs geradas *in vitro* a partir de PBMCs aderentes de doadores saudáveis, na presença de GM-CSF e IL-4 durante 7 dias e TNF- α nos dois últimos dias de cultura (mDCs), os mesmos parâmetros utilizados para a caracterização de DCs imaturas foram utilizados.

Pode-se observar na figura 1A que as populações celulares das culturas de mDCs apresentaram maior recuperação de células com características de DCs do que as que não foram tratadas com TNF- α . Esta observação confirma dados de trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório (NEVES *et al.*, 2003; NEVES *et al.*, 2005) e da literatura (SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994; LANGENKAMP, 2000; MORRISON III *et al.*, 2003) nos quais estas células se diferenciaram e maturaram diminuindo gradativamente sua adesividade à placa de cultura, o que condiz com a idéia de ganho de características de maturação e migração *in vitro* para um local

distante do local de adesão à placa. Essa maturação foi acompanhada também de aumento na expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), além de CD83 e CCR7, em níveis mais elevados que quando da ausência de TNF- α exógeno adicionado à cultura.

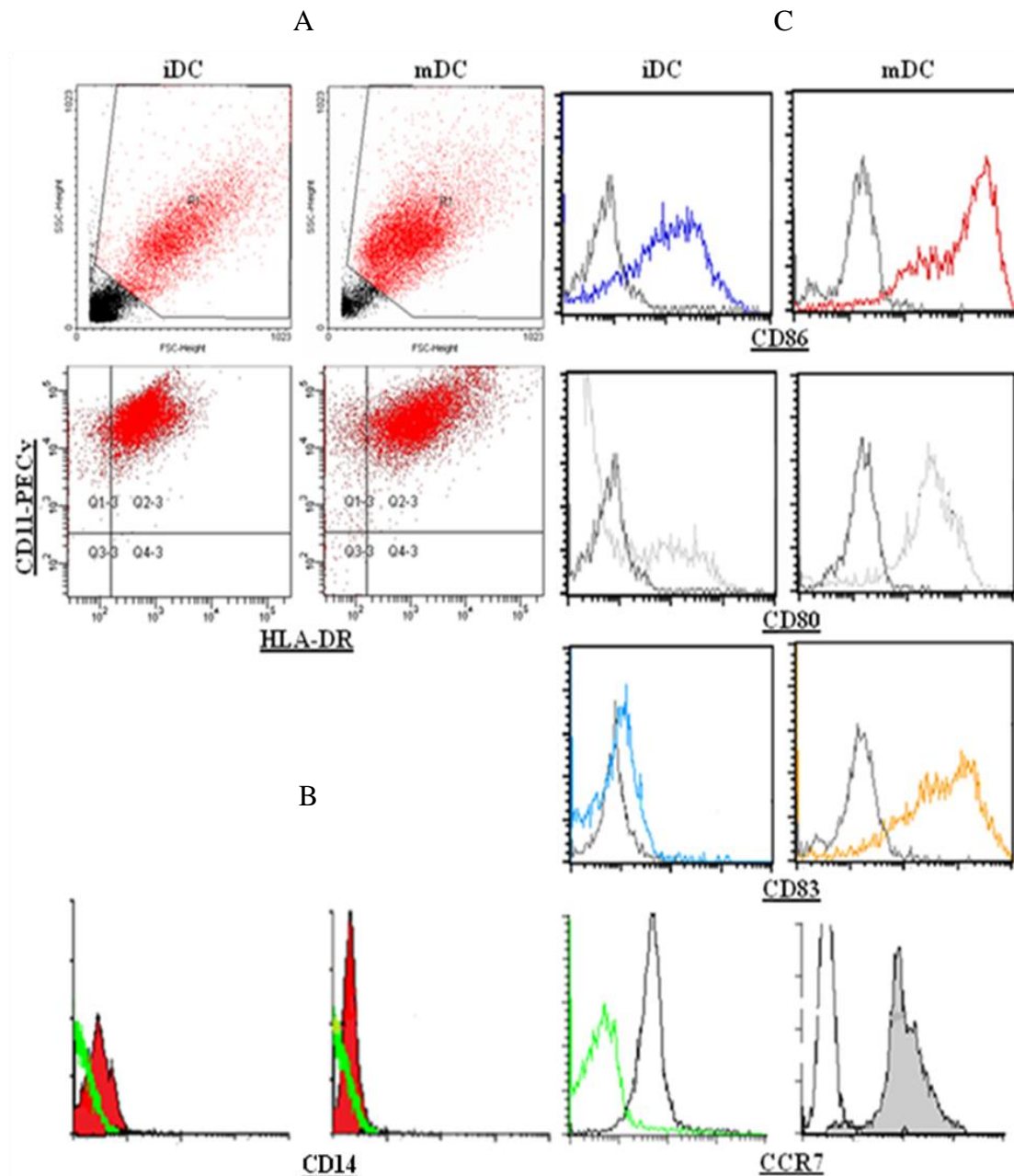


Fig.1. “Dot plots” de FSCxSSC, HLA-DRxCD11c (A) e histogramas de CD14 (B), CD86, CD80, CD83 e CCR7 (C) representativos de culturas de células dendríticas (DCs) geradas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico, cultivadas durante 7 dias com GM-CSF e IL-4. No 5º dia, às culturas de iDCs foram acrescidos 50ng/mL de TNF- α (mDCs), como estímulo para maturação. As células foram selecionadas (R1) segundo padrões característicos de morfologia de DCs em termos de tamanho (FSC) e complexidade ou granulosidade (SSC). Dados representativos de 35 experimentos, adquiridos em FACS Calibur ou FACS Canto (BD Diagnostics SA, San Jose, California, EUA) no ICB (USP) ou no CINTERGEN (UNIFESP), respectivamente.

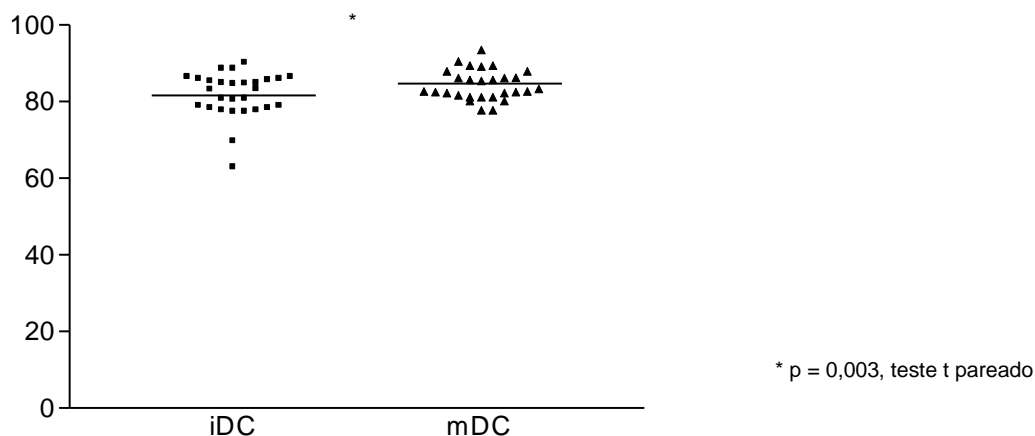


Fig. 2. Viabilidade (%) de células mononucleares (iDCs vs mDCs) recuperadas no 7º dia de cultura. iDCs: células cultivadas somente com meio suplementado com GM-CSF e IL-4 por 7 dias. mDC: iDCs tratadas com 50ng/mL de TNF- α no 5º dia de cultura, como estímulo para maturação.

A nossa observação anterior de que parecia haver uma maior recuperação de mDCs do que iDCs, sugerida pela fig. 1A, parece ficar mais evidente quando se analisa os histogramas de CD14 (Fig. 1B), em que as contagens de eventos, parâmetro mostrado no pelo eixo y, apresentam-se maiores do que os seus respectivos controles. Poder-se-ia especular que esse “aparente” aumento seria um efeito da intensidade dos fluorocromos utilizados. Mas quando se analisa o gráfico de CCR7 (Fig 1C), observa-se que mesmo os controles mDCs não marcados com esse fluorocromo apresentam maior intensidade de fluorescência do que o respectivo controle iDC, não marcado.

Na tentativa de excluir a possibilidade desses artefatos, as células foram quantificadas corando-as com azul de tripan. Assim, a fig. 2 mostra a porcentagem de iDCs e mDCs viáveis recuperadas no 7º dia de cultura. O cálculo da porcentagem foi feito contando-se primeiramente a quantidade total de células recuperadas no 7º dia de cultura. Desse valor, subtraiu-se a quantidade de células que excluíram azul de tripan e foram consideradas mortas. O resultado obtido foi dividido pelo total e obteve-se a porcentagem representada nos gráficos.

Assim, foi confirmada a hipótese de maior viabilidade (Fig. 2) das células obtidas nas culturas realizadas com o acréscimo de TNF- α (Fig. 1). Embora pequena, essa diferença foi bastante significativa ($p=0,003$), talvez indicando que, após a diferenciação inicial, induzida por GM-CSF e IL-4, a viabilidade das células começa a diminuir com o tempo, ou a diferenciação não se completa, a não ser que lhes seja dado um sinal de ativação, o que já é sugerido pela literatura (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ

et al., 2004). Assim, nos experimentos seguintes, no 4º dia de cultura das DCs, GM-CSF e IL-4 foram adicionados na metade da concentração inicial com o objetivo de aumentar o rendimento da culturas.

A expressão de CCR7, também elevada, oferece suporte a nossa sugestão e a de Chen *et al.*, (1998) de que células não tratadas com TNF- α passariam a morrer por falta de estimulação. Segundo Sánchez-Sánchez *et al.*, (2004), este receptor de quimiocinas induz sinalização intracelular dependente de NF- κ B, inibindo a apoptose de DCs. Além disso, já foi bastante documentado de que a aquisição deste receptor é um importante fenômeno durante a maturação das DCs, uma vez que permite a migração destas células para os LNs (BANCHEREAU *et al.*, 2000; GUERMONPREZ *et al.*, 2002; TROMBETTA E MELLMAN *et al.*, 2005).

Também foi interessante observar que mesmo iDCs apresentaram um nível basal de expressão de CCR7, que aumentou quando as células foram tratadas com TNF- α . Isso sugere adicionalmente que, numa situação *in vivo*, haveria também uma migração basal de iDCs na ausência de um estímulo de maturação conhecido, indicando que mesmo num estado de repouso, as iDCs migrariam ativamente para os LNs para induzir tolerância a Ags não perigosos. Estes dados são corroborados por trabalhos *in vitro* de Ip e Lau (2004) e *in vivo* de Ohl *et al.* (2004) e apóiam nossa hipótese de migração basal e aumentada de DCs.

Em resumo, pode-se sugerir que à medida em que ocorre o processo de maturação das iDCs na presença de TNF- α , aumenta a quantidade de mDCs diferenciadas que se soltam espontaneamente da placa de cultura, sem a necessidade de qualquer estímulo físico (“cell scrapper”, por exemplo) ou químico (acutase, tripsina, EDTA) adicional, o que é confirmado pela contagem de células viáveis por exclusão de azul de tripan (Fig. 2). Assim, durante o tratamento com TNF- α , após serem tratadas com GM-CSF e IL-4, sugere-se que maior quantidade de precursores imaturos que não haviam recebido estímulos para maturação completa (Fig. 1A) agora o fizessem na presença de TNF- α , passando a se diferenciar e maturar, adquirindo características de DCs maduras (Fig. 1B). Uma maior quantidade de DCs maduras expressando CCR7 sobreviveriam e migrariam para os LNs para iniciar as respostas imunes, e no caso das iDCs, quando predominantes, na ausência de estímulo pró-inflamatório, também migrariam, em menor quantidade, mas para induzir tolerância.

5.2 Comparação entre macrófagos, DCs imaturas (iDCs) e maduras (mDCs) pela expressão de CD14, CD11c e HLA-DR para análise de aderência.

Uma vez que recuperamos uma maior quantidade de células viáveis quando as culturas foram tratadas com TNF- α , uma pergunta que surgiu foi se as DCs imaturas, que não foram tratadas com essa citocina seriam células aderentes, tendo ficado aderidas na placa. Para investigar essa possibilidade, no 7º dia de cultura, retiramos as DCs eventualmente presentes, como procedimento padrão e em seguida incubamos as células restantes por 20 minutos na presença de acutase, agente liberador de células aderentes de culturas (HO *et al.*, 2004), para verificar o fenótipo dessas células.

Na tabela 3, estão representados os dados de porcentagem de expressão de diferentes marcadores por células recuperadas pelo tratamento com acutase por 20 minutos, após a realização das culturas de 7 dias.

Tabela 3. Porcentagem de células obtidas de culturas de PBMC, tratadas ou não com acutase, expressando diferentes marcadores de superfície.

Células	MØs (PBMCs aderentes)		iDCs (PBMCs aderentes + GM-CSF e IL-4 / 7 dias)		mDCs (iDCs+TNF α)	
	-	Acutase	-	Acutase	-	Acutase
Marcador						
CD11c	96,4	85,5	93,7	95,9	99,2	99,2
HLA-DR	63,5	51,3	96,3	99,3	98,7	95,8
CD14	8,1	79,4	8,5	11,0	16,4	19,2

A análise foi feita sempre utilizando o “gate” R1 e o conjunto dos dados da tabela 3 mostra que há uma porcentagem maior de células aderentes CD14⁺ (79,4%) das culturas de macrófagos do que das outras culturas (mDCs com acutase > mDCs sem acutase > iDCs com acutase) após o tratamento com acutase. A presença de células CD14⁺ nas culturas de iDCs e mDCs pode ser explicada tanto pela maior recuperação de macrófagos após a utilização de acutase, quanto de células ainda incompletamente diferenciadas (iDCs com baixa expressão de CD14, que poderiam se tornar completamente diferenciadas na presença de uma maior quantidade de estímulos).

Lembrando os dados da figura 1, em que mDCs HLA-DR⁺CD11c⁺ não tratadas com acutase apresentaram uma baixa expressão de CD14, concluímos que

estas células não são aderentes, enquanto que iDCs apresentaram uma expressão intermediária entre as 2, condizente com a característica de diferenciação de DCs a partir de monócitos.

A maior expressão de CD14 por mDCs tratadas com acutase, em relação a iDCs tratadas ou não com acutase pode ser devida à maior liberação de macrófagos tratados com acutase e ativados com TNF- α . Outra hipótese seria a própria ação da acutase, que tem um efeito ativador, podendo levar à morte de algumas células (HO *et al.*, 2004), que poderiam ser “limpadas” por células que passariam a aumentar CD14 para exercer esta função, uma vez que esta molécula também tem a função de receptor “scavenger” (DEVITT *et al.*, 1998).

5.3 Cinética de Apoptose de Células Não Aderentes (CNAs) submetidas a diferentes condições de estresse celular *in vitro*

Uma vez determinado o fenótipo das DCs obtidas nas nossas condições de cultura, o próximo objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da co-cultura de células apoptóticas sobre o fenótipo de membrana das DCs. Antes disso, porém, foram realizados experimentos para se avaliar a cinética de apoptose de CNAs submetidas a diferentes condições de estresse celular *in vitro*.

Assim, para a geração de células apoptóticas, foram padronizados ensaios de indução de morte celular, avaliada por trypan blue e iodeto de propídio (PI), como descrito no item material e métodos. Os resultados mostrados aqui são de linfócitos (CNAs) divididos em 4 grupos (1: 37ni, 2: H, 3: 37i ou 4: 43i) esquematizados na tabela 1, página 39 (tabela descrita no item 4.3 de material e métodos).

A análise foi feita quanto aos parâmetros de FSCxSSC e morte celular, avaliada por incorporação de PI pelas CNAs. Após 2h de aderência de monócitos, as CNAs foram transferidas para outros frascos de cultura, onde permaneceram por 3 dias, em uma segunda etapa de aderência. No 3º dia, as CNAs foram removidas dos frascos para realização dos procedimentos acima (aquecimento e ou irradiação). Assim, as CNAs foram incubadas 0, 24 e 48h depois da irradiação (equivalente aos 30 minutos após aquecimento). O período 0h equivale ao 3º dia de cultura de CNAs; 24h equivale ao 4º dia e 48h equivale ao 5º dia de cultura de CNAs. No final de cada período, foram retiradas alíquotas para coloração com PI. Células com DNA diplóide (2n) intacto foram ajustadas no citômetro de fluxo para que os picos ficassem em

torno de 10^3 nos histogramas (MIRAKIAN *et al.*, 2002). Eventos corados com PI apresentando fluorescência à esquerda do pico diplóide em 10^3 foram considerados células ou corpúsculos apoptóticos. Células à direita do pico são consideradas em ciclo. Neste trabalho damos ênfase aos eventos à esquerda do pico (Figuras 3, 4 e 5), por isso usamos escala logarítmica, para melhor avaliarmos a presença de células apoptóticas, enquanto trabalhos que analisam diferentes fases do ciclo celular o fazem a partir de gráficos em escala linear.

5.3.1 0h após irradiação

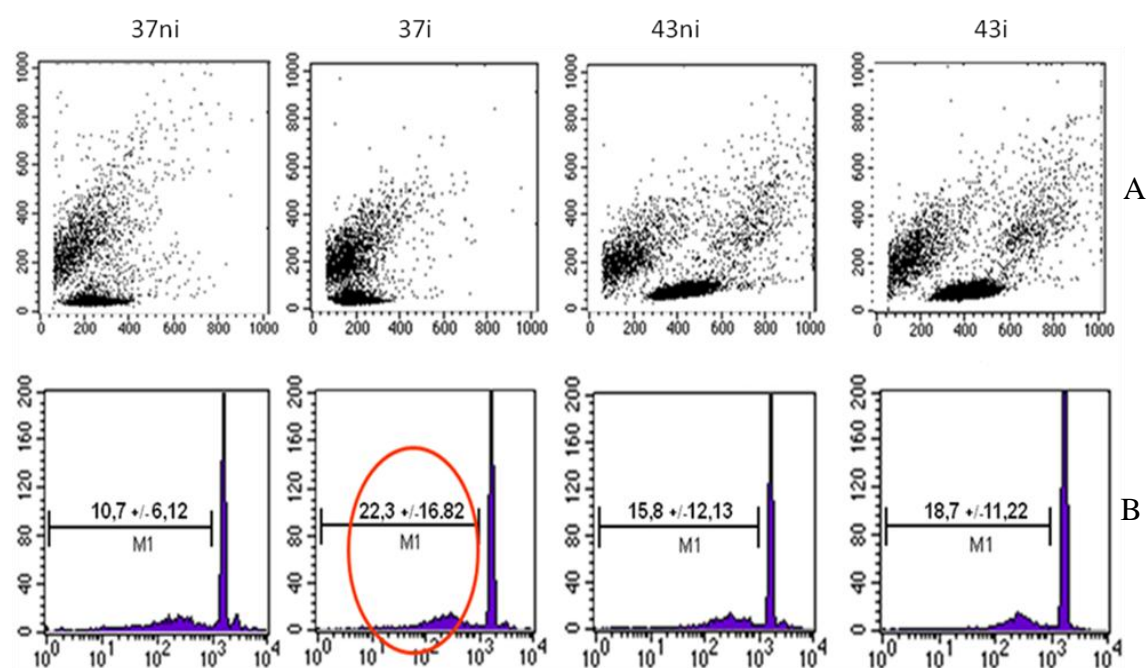


Fig. 3A. Padrão de distribuição de células não aderentes (CNAs) por FSC x SSC em citometria de fluxo. B. Histogramas referentes aos respectivos gráficos anteriores. As CNAs foram cultivadas em frascos de cultura por 3 dias após aderência de PBMCs. No 3º dia, as CNAs foram removidas dos frascos e submetidas a diferentes modos de estresse celular, sendo coradas com PI imediatamente após irradiação ($t=0$) para avaliação do conteúdo de DNA fragmentado, indicativo de morte celular por apoptose. Dados representativos de 14 experimentos independentes, adquiridos em FACS Calibur do Departamento de Imunologia do ICB. Nomenclatura: 1 - 37ni: CNAs não irradiadas (controle), 2 - 37i (CNAs irradiadas), 3 - 43ni (CNAs aquecidas e não irradiadas), 4 - 43i (CNAs aquecidas e irradiadas). Os números no gráfico representam média +/- desvio padrão. A mesma nomenclatura foi mantida nas figuras 4 e 5.

Na figura 3, observa-se o padrão de distribuição em gráficos “dot plots” de FSCxSSC das diferentes CNAs obtidas (1. 37ni, 2. 37i, 3. 43ni e 4. 43i) e a respectiva porcentagem de morte celular (M1) 0h após a irradiação dos grupos 2 e 4. Apesar de não serem detectadas diferenças estatísticas (os desvios-padrão são muito grandes) nas taxas de morte celular 0h após a irradiação, quando se analisa os parâmetros

FSCxSSC é possível observar que células submetidas a aquecimento por 30 minutos a 43 °C (H), independentemente da irradiação, apresentam uma terceira população com tamanho aumentado (FSC > 600), em relação aos respectivos controles (43ni vs 37ni e 43i vs 37i), nos quais essa população não existe. Consideramos como controles, a título de comparação, células com aparência de linfócitos (grupo 37ni: FSC <400, SSC<100).

Em outras palavras, o tamanho observado continua aumentado após irradiação das células aquecidas. Os valores nos gráficos representam a média \pm desvio padrão de 14 experimentos independentes, estatística que será melhor analisada na figura 6.

5.3.2 24h após irradiação

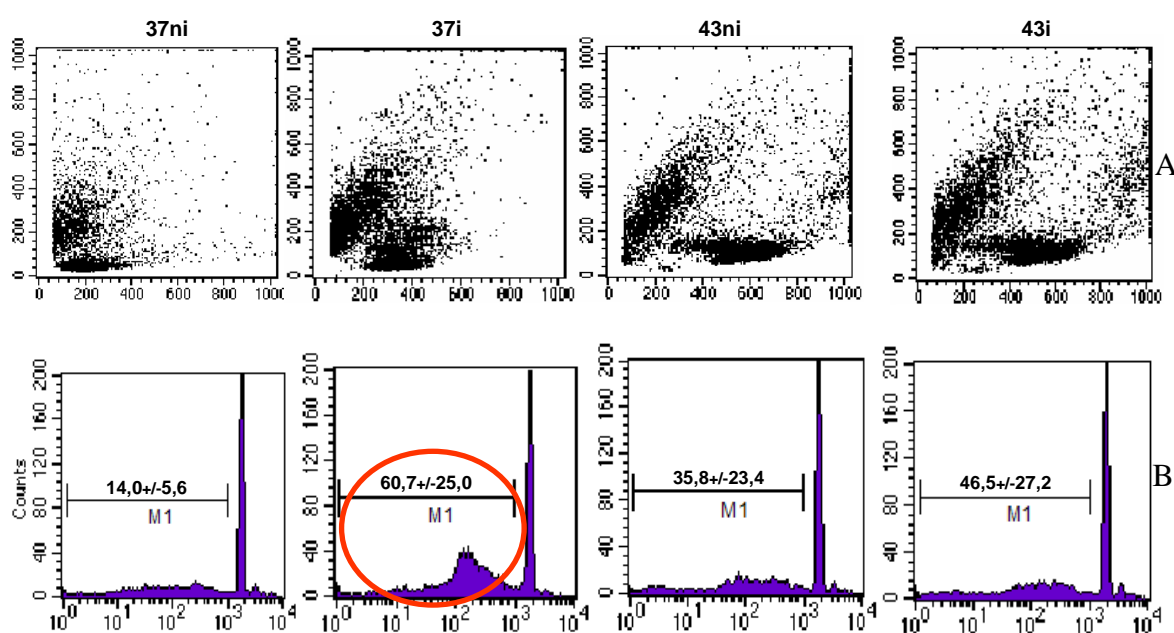


Fig. 4A. Padrão de distribuição de células não aderentes (CNAs) por FSC x SSC em citômetro de fluxo. **B.** Histogramas relativos aos gráficos respectivos anteriores. As CNAs foram cultivadas em frascos de cultura por 3 dias após aderência de PBMCs. No 3º dia, as CNAs foram removidas dos frascos e submetidas a diferentes modos de estresse celular, sendo coradas com PI 24h após irradiação (t=24h) para avaliação do conteúdo de DNA fragmentado, indicativo de morte celular por apoptose. Dados representativos de 20 experimentos independentes, adquiridos em FACS Calibur do Departamento de Imunologia do ICB. Nomenclatura: 1 - 37ni: CNAs não irradiadas (controle), 2 - 37i (CNAs irradiadas), 3 - 43ni (CNAs aquecidas e não irradiadas), 4 - 43i (CNAs aquecidas e irradiadas).

Na figura 4, diferente do observado na figura 3, 24h após irradiação já é possível detectar diferenças estatísticas (Fig. 6) nas taxas de morte celular das CNAs, em relação ao controle (grupo 1, 37ni = 14 \pm 25) com o grupo 2 (37i) apresentando taxa de apoptose da ordem de 67,0% \pm 25 (Fig. 4B). Comparando-se o controle não irradiado da figura 4 (24h) com o da figura 3 (0h), observa-se distribuição idêntica, o

que sugere que a incubação das CNAs não irradiadas por 0 ou 24h não altera o padrão de tamanho e granulosidade apresentados após aquisição em citometria de fluxo.

Apesar dos valores numéricos nos gráficos sugerirem uma tendência a diferenças na taxa de apoptose entre células aquecidas (3. 43ni = 35,8%±23,4) comparadas às CNAs aquecidas e irradiadas (43i = 46,5%±27,2), ou mesmo quando ambas são comparadas aos controles, os desvios-padrão da média são muito grandes, não permitindo diferenças significativas. Entretanto, em relação aos parâmetros de FSCxSSC continua sendo possível observar, da mesma forma que no tempo 0, que as células dos grupos 43ni e 43i apresentam uma pequena população de tamanho grande (FSC>400) e baixa granulosidade (SSC<200), em relação aos respectivos controles (43ni vs 37ni e 43i vs 37i) e em relação à figura 3. Como será verificado a seguir, na figura 5, essas populações se mantêm na cultura após 48h.

É importante ressaltar também que a análise, após 24h de cultura, da população de células somente irradiadas (grupo 2), revela um padrão de distribuição diferente em relação aos outros grupos celulares, e também em relação ao próprio grupo após 0h de cultura. Assim, pode-se observar no gráfico 43i uma população mais densa com FSC<200 e SSC<400, o que coincide com características de células apoptóticas (tamanho e complexidade pequenos). Ao mesmo tempo, há um aumento da granulosidade da população com característica de linfócitos, descrita anteriormente, sugerindo que essas populações celulares ou estão sendo ativadas ou estão entrando em processo de morte celular, ou ainda, os dois fenômenos podem estar ocorrendo simultaneamente.

A análise de FSCxSSC dos grupos 3 e 4 após 24h de cultura também nos fornece detalhes interessantes. Como se pode observar, as populações com tamanho >600 são aparentemente menores do que na figura 3. Na verdade, uma observação mais cuidadosa nos revela que essas populações estão quase saindo do gráfico, o que indica que o tamanho delas é ainda maior que na figura 3. Além disso, temos que lembrar que as células não aumentam de tamanho indefinidamente, e que há um limite físico, no caso, a membrana plasmática, para esse aumento. Em um determinado momento, dependendo da intensidade, do tempo de exposição e do tipo de lesão celular causada pela irradiação, a membrana plasmática pode não suportar as alterações, tendo como conseqüências, entre outras, aumento de sua permeabilidade. Esta, devido à formação de poros e alteração de lipídios da membrana, em associação

com sua normalmente elevada pressão osmótica intracelular, mantida às custas da bomba de Na^+K^+ , facilita a entrada de líquidos e a ruptura da membrana.

No caso de ruptura da membrana, temos aumento da liberação de conteúdo celular e formação de debris celulares. Esta descrição parece bastante semelhante aos eventos que culminam com a necrose celular (MONTENEGRO e FRANCO, 1999). Neste caso, um certo nível de necrose celular é permitido sem que haja grandes alterações ou resposta inflamatória excessiva no microambiente local, de forma que os debris eventualmente presentes possam ser fagocitados pelas células que não são linfócitos, eventualmente presentes na cultura (células com tamanho >600), restabelecendo a homeostase da população celular. De fato, a descrição de macrófagos xantomatosos, característica de células que fagocitam debris celulares e conteúdo lipídico é frequente na literatura (MONTENEGRO e FRANCO, 1999).

Entretanto, se a lesão celular é extensa, com a ruptura da membrana de várias células, a liberação de conteúdo intracelular em grande quantidade pode ser prejudicial. O que antes estava escondido e livre da ação das células do sistema imune, agora pode ser percebido como perigo (“danger”) (MATZINGER, 1994; teoria reformulada por KONO e ROCK, 2008), e suscitar uma resposta pró-inflamatória, dependendo da quantidade de células lesadas e conteúdo liberado, como nas hipóteses de Janeway (1992) e Matzinger (1994) reunidas em uma só, semelhante ao que propomos inicialmente neste trabalho.

A análise de marcadores de superfície em outros experimentos, 48h após irradiação, revelou-nos que parte das células com tamanho aumentado expressa CD14 (dados não mostrados), o que nos dá margem a uma hipótese alternativa. Como essa população de células possivelmente necróticas (trypan blue ou PI positivas e com $\text{FSC}>600$) não é muito grande, considerando os gráficos anteriores, a presença de uma pequena quantidade destas células CD14 facilitaria a limpeza do meio e o restabelecimento de um certo equilíbrio homeostático. De fato, quando analisamos as fotos de microscopia óptica dos grupos 1, 2, 3 e 4, verificamos que as células que foram aquecidas previamente à irradiação apresentam um aspecto mais “limpo” de cultura, isto é, com menos debris celulares do que as células que foram somente irradiadas (dados em anexo). Estes dados estão de acordo com dados da literatura que mostram o papel de CD14 como “scavenger” e reconhecedor de estruturas de debris e de células apoptóticas autólogas, (DEVITT *et al.*, 1998, LINGNAU *et al.*, 2007). Esta

hipótese e a implicação para a presença destas células na cultura serão discutidas melhor oportunamente.

5.3.3 48h após irradiação

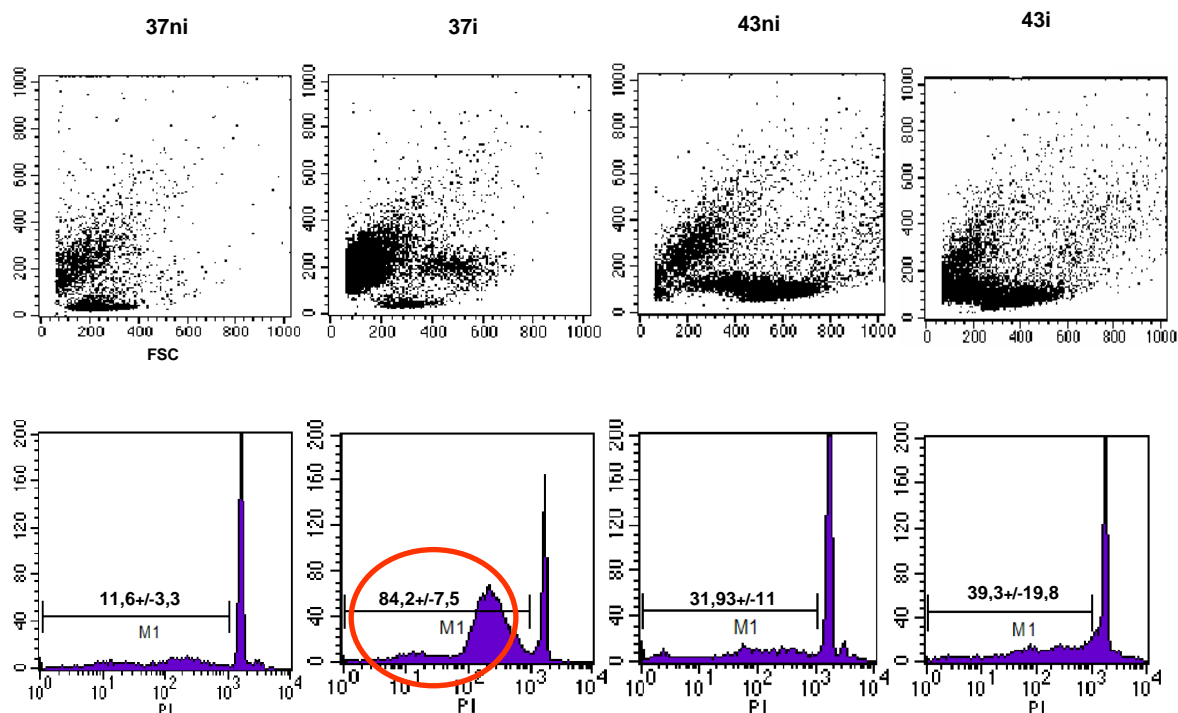


Fig. 5A. Padrão de distribuição de células não aderentes (CNAs) por FSC x SSC. **B.** Histogramas relativos aos gráficos anteriores. As CNAs foram cultivadas em frascos de cultura por 3 dias após aderência de PBMCs. No 3º dia, as CNAs foram removidas dos frascos e submetidas a diferentes modos de estresse celular, sendo coradas com PI 48h após irradiação para avaliação do conteúdo de DNA fragmentado, indicativo de morte celular por apoptose. Nomenclatura: 1 - 37ni: CNAs não irradiadas (controle), 2 - 37i (CNAs irradiadas), 3 - 43ni (CNAs aquecidas e não irradiadas), 4 - 43i (CNAs aquecidas e irradiadas).

Na figura 5, observa-se o padrão de distribuição das diferentes CNAs obtidas (37ni, 37i, 43ni e 43i) e respectiva porcentagem de morte celular (M1) 48h após a irradiação dos grupos 2 e 4. Os dados confirmam a tendência observada já em 24h após irradiação (Fig. 12). Assim, 48h após irradiação, o grupo 2 apresenta taxa de apoptose da ordem de 84,2%±7,5 (Fig. 5B), que pode ser correlacionada com a população mais densa, de pequeno tamanho e pouca granulosidade observada em 5A2, o que condiz com as características morfológicas de células apoptóticas (NICOLETTI *et al.*, 1991; GORCZYNSKA *et al.*, 2000; MIRAKIAN *et al.*, 2002; DARZYNKIEWICZ e HUANG, 2004; SCHILLER *et al.*, 2008).

Além disso, há uma tendência a aumento na taxa de apoptose entre os grupos de células aquecidas (43ni = 31,93%±11 vs 43i = 39,3%±18), e ambos os grupos, mais uma vez, diferem em relação ao grupo controle não aquecido e não irradiado

(37ni = 11,6%±3,3). Em relação aos parâmetros de FSCxSSC ainda é possível observar que os grupos 43ni e 43i continuam aumentando a quantidade de células com tamanho celular maior em relação aos respectivos controles não aquecidos (43ni vs 37ni e 43i vs 37i). Entretanto, o aspecto de FSCxSSC do grupo 43i é mais próximo do gráfico de 0h do que de 24h, indicando uma possível tendência para restabelecimento do equilíbrio homeostático, e que talvez o efeito da irradiação sobre as CNAs, na dose utilizada, não seja permanente, mas diferente o suficiente para ser utilizada numa cocultura com DCs.

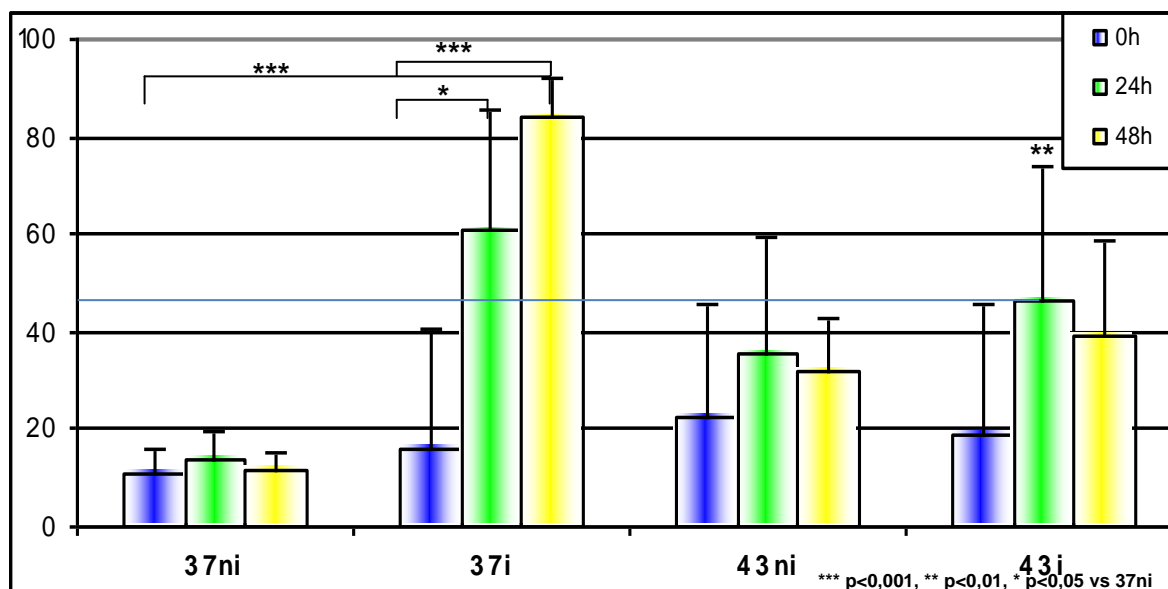
Vale notar que estes dados se apresentaram como uma surpresa para nós. A princípio, esperávamos que o calor e a irradiação se somassem como efeitos sinérgicos na indução de apoptose, pelo menos nas condições utilizadas. A análise dos dados das figuras 3, 4 e 5 nos mostra que, embora se pudesse supor que as células aquecidas e irradiadas tivessem morrido por necrose em cultura, não parece ter sido isto o que ocorreu, pois o número de células obtido ao final das 48h desta cultura não reflete este fenômeno (células que excluam trypan blue: Controle = $2,8 \times 10^6$; 37i = $2,1 \times 10^6$; 43ni = $2,6 \times 10^6$; 43i = $2,6 \times 10^6$. Total de células em cada grupo: 3×10^6), ou pelo menos, a quantidade de células necróticas era tão pequena, relativamente à quantidade absoluta de células, que não causou impacto muito grande, podendo ser eliminadas pelos fagócitos eventualmente presentes (células CD14⁺, dados em anexo).

Pode-se concluir desses dados que o calor parece ter protegido, pelo menos parcialmente, as células da morte celular induzida pela irradiação, o que condiz com o descrito por Massé *et al* (2004), que, utilizando modelo animal, também associaram este fenômeno a níveis aumentados de proteínas de choque térmico (HSPs) nas células aquecidas. A função descrita *in vivo* para estas moléculas é impedir a agregação de proteínas desnaturadas (como a que pode acontecer durante o aquecimento) e favorecer a degradação adequada de proteínas dirigindo-as para o proteassomo. Esta estrutura celular citoplasmática está associada à geração de peptídeos intracelulares que eventualmente possam ser expressos na superfície das células, no contexto de moléculas de MHC (NOESSNER *et al.*, 2002).

Um dado interessante foi a observação de que, em alguns experimentos, CNAs mantidas em cultura por 3 dias (o que chamamos de segunda etapa de aderência *in vitro*) após serem removidas do frasco para aquecimento, apresentaram um pequeno aumento na expressão de CD14 (dados em anexo). Acreditamos que essa população

reflita a presença de precursores no grupo de CNAs não comprometidas com a linhagem de linfócitos, e que, diante do estresse ambiental (aquecimento), passaram a expressar CD14 como resposta ao estresse e atuar como células “scavenger” de células apoptóticas e debris celulares, uma vez que precursores comprometidos com a linhagem monócito/macrófagos foram removidas (pelo menos parcialmente) durante o processo de aderência nas primeiras 2h de cultura (o que chamamos de primeira etapa de aderência *in vitro*), e estavam ausentes nos grupos não aquecidos. Entretanto, estes dados não foram observados em todos os experimentos, o que nos leva a crer que células de indivíduos diferentes possuem respostas adaptativas diferentes ao estresse. Além disso, como não foram investigados os mecanismos para esta hipótese, pode haver outros mecanismos responsáveis pela atividade “scavenger” observada, além de CD14, uma vez que DCs imaturas, que não apresentam este marcador, também possuem uma certa capacidade de fagocitar e eliminar células apoptóticas *in vitro* e *in vivo*.

5.3.4 Cinética de apoptose de CNAs submetidas a diferentes condições de estresse celular



ANOVA para Medidas repetidas seguido de Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett

Fig. 6A. Porcentagem de CNAs PI-positivas em relação ao tempo pós-irradiação. Após 2h de aderência de PBMCs, CNAs foram transferidas para garrafa de cultura. No 3º dia, CNAs foram submetidas a diferentes modos de estresse celular e coradas com PI 0, 24 ou 48h após irradiação e seu conteúdo de DNA fragmentado, indicativo de morte celular por apoptose, foi avaliado em FACS Calibur. Dados representativos de 20 experimentos. Nomenclatura: 1 - 37ni: CNAs não irradiadas (controle), 2 - 37i (CNAs irradiadas), 3 - 43ni (CNAs aquecidas e não irradiadas), 4 - 43i (CNAs aquecidas e irradiadas).

A ausência de significância estatística (Fig. 6) em alguns grupos após irradiação pode ser explicada pela variação individual, dado o desvio padrão ter sido muito grande, comparando-se os grupos 2 (37i), 3 (43ni) e 4 (43i) ao controle (grupo 1). Estes dados sugerem que linfócitos de indivíduos diferentes podem ter respostas adaptativas diferentes mesmo a pequenas situações de estresse *in vitro*, considerado aqui como pequenas variações ambientais (aquecimento ou irradiação ou ambos), sem excluir a possibilidade de variações genéticas individuais da população.

Em conjunto, estes dados nos levam a concluir que a metodologia utilizada foi adequada para a detecção de apoptose nos grupos de células irradiadas. Assim, de agora em diante, os termos APO e HAPO serão utilizados para substituir os termos 37i e 43i, respectivamente, pois nestes casos observamos porcentagem média de apoptose >80% e >40%. Foi interessante observar que mesmo em doses baixas, foi possível detectar alterações 48h após exposição a uma fonte radioativa, enquanto que normalmente leva-se anos para que pessoas expostas com frequência a radiação possam começar a sentir os efeitos da exposição, se radiossensíveis.

5.4 Fenótipo de superfície de CNAs submetidas a diferentes condições de estresse celular

Em seguida, uma vez padronizados os ensaios de apoptose, foi avaliado o fenótipo de superfície das diferentes CNAs obtidas. Como mencionado, as CNAs foram removidas após 2h de aderência das PBMCs e transferidas para frascos de cultura por 3 dias. No 3º dia, as CNAs foram submetidas aos diferentes procedimentos de estresse celular *in vitro* (Tabela 1, item Material e Métodos) e 48h depois, seu fenótipo de superfície foi avaliado quanto a marcadores específicos de linfócitos. Assim, até o momento em que foram adicionadas às culturas de DCs, as CNAs permaneceram em cultura por 5 dias, quando seu fenótipo foi avaliado.

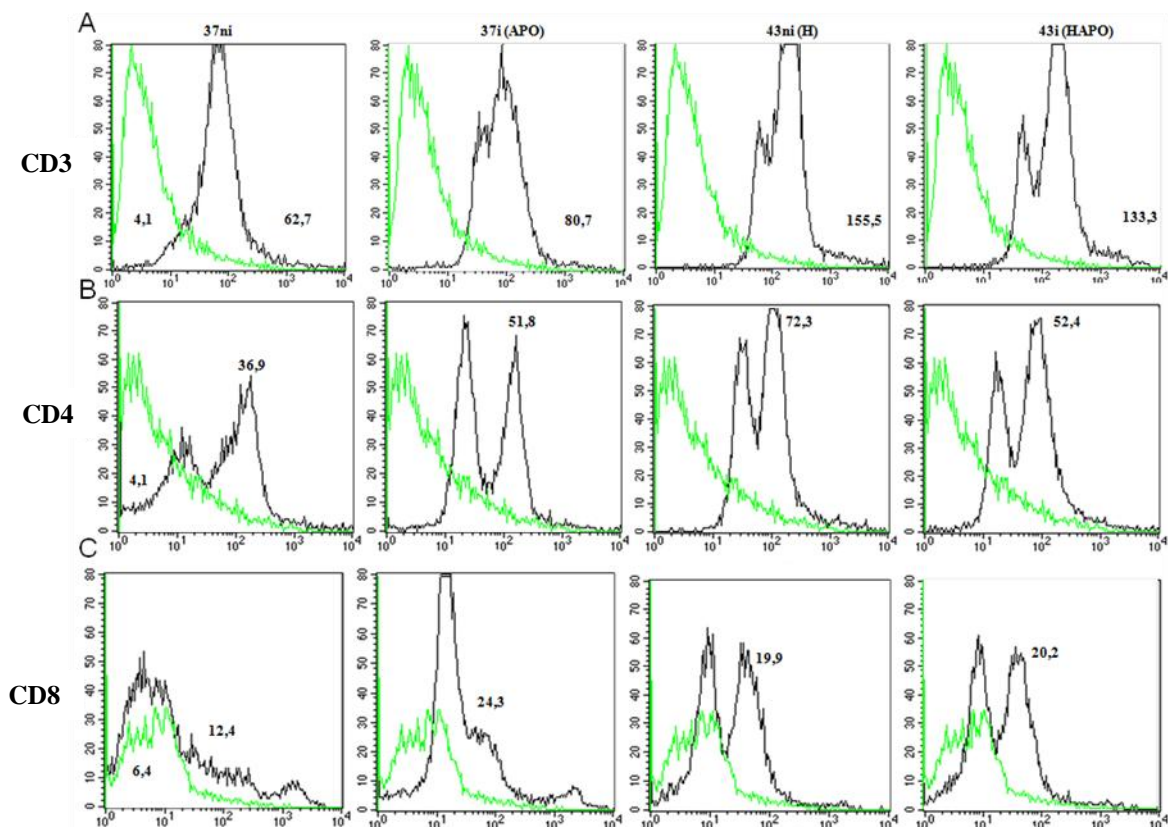


Fig. 7. Expressão de CD3 (A), CD4 (B) e CD8 (C) em CNAs submetidas a diferentes formas de estresse. Números ao lado da linha negra indicam valores de MFI (Intensidade Mediana de Fluorescência), ao passo que os valores abaixo da linha verde representam MFI do controle não marcado com anticorpo conjugado a fluorocromo. Dados representativos de 3 experimentos independentes realizados em duplicata e adquiridos em FACS Calibur no Departamento de Imunologia do ICB – USP, com resultados semelhantes.

Na figura 7A, observa-se que mais de 90% das CNAs controles não irradiadas (37ni) expressam o marcador CD3. Este dado demonstra que a maior parte das células presentes após 3 dias de cultura e por mais dois dias após procedimento de estresse celular *in vitro*, mantêm a característica de linhagem de linfócitos, quanto à expressão de CD3 (além dos parâmetros FSCxSSC mostrados anteriormente na Figura 3). Este dado permite que utilizemos o termo linfócitos para nos referir às CNAs intercambiavelmente, daqui em diante, ao longo deste trabalho, a menos que informação adicional seja expressa. O dado da expressão de CD3 no controle nos indicou também que o procedimento de separação de linfócitos T por formação de rosetas com eritrócitos de carneiro seria desnecessário, neste momento da experimentação, pois obtivemos um bom rendimento de linfócitos T (>90%) nesse grupo.

Entretanto, após serem submetidas aos diferentes tipos de indução de estresse, as CNAs apresentaram crescente diminuição (analisando-se os gráficos da esquerda para a direita e a tabela 3) na população $CD3^{+hi}$ (37ni >90%, 37i = 84,6%; 43ni = 80,3%), apresentando uma tendência a voltar a aumentar essa expressão novamente quando as CNAs foram aquecidas antes de serem irradiadas (43i = 81,8%). Este dado parece se correlacionar com o aumento de morte celular verificado no item 3, independentemente do tipo (apoptose ou necrose), o que sugere que, à medida que as células entram em processo de morte, elas diminuem a expressão de CD3 na superfície celular. Essa aparente “recuperação”, apesar de pequena, que se observa no grupo aquecido e irradiado parece reforçar o dado anterior de proteção da morte celular, induzida pela irradiação, na presença de calor.

Tabela 4: Porcentagens de células expressando marcadores específicos de linfócitos T, nas CNAs submetidas a diferentes condições *in vitro* de estresse celular

	1. 37ni		2. 37i (APO)		3. 43ni (H)		4. 43i (HAPO)	
	-	+	-	+	-	+	-	+
CD3	<10	>90	15,4	84,6	19,7	80,3	18,2	81,8
CD4	43,7	56,3	51,1	48,9	46,8	53,2	47,4	52,6
CD8	- low/dim +		- low/dim +		- low/dim +		- low/dim +	
	64,8	18,3 12,9	79,1	12,4 8,5	51,5	46,1 2,4	50,3	47,0 2,7
CD4⁺ ou CD8⁺ (CD3⁺*)	-	low/dim +	-	low/dim +	-	low/dim +	-	low/dim +
	<10	87,5	69,8		55,6		55,3	

*Somente células simples-positivas para CD4 e CD8. Pela tabela, sugere-se que haja um aumento da população $CD4^+CD8^-$.

Em relação à expressão de CD4 pelas CNAs, podemos observar que os 4 grupos apresentaram duas populações bem definidas, uma $CD4^+$, e a outra, $CD4^{-/low}$. Não foram observadas alterações significantes na porcentagem de células $CD4^+$ ou $CD4^{-/low}$ presentes nessas duas populações nos grupos 2, 3 e 4. Entretanto, em relação ao controle, a razão entre essas populações $CD4^+/CD4^-$ no grupo 2 de células estressadas (37i= 51,1% $CD4^-$ e 48,9% $CD4^+$) é a única que aparece invertida (<1), pois nos outros grupos (43ni = 46,8% $CD4^-$ e 53,2% $CD4^+$; 43i = 47,4% $CD4^-$ e 52,6% $CD4^+$, respectivamente), essa razão é ligeiramente maior que 1 (43ni = 1,14; 43i = 1,11).

Assim, os diferentes processos de estresse a que foram submetidas as CNAs parecem não alterar significativamente a proporção de células $CD4^+$. Apesar disso, há uma tendência a aumentar a quantidade de células $CD4^-$ no grupo de células irradiadas, o que poderia estar correlacionado ao aumento de morte celular verificada nesse grupo (Figura 5). Se confirmado, este dado nos sugere que, da mesma forma como interpretado anteriormente para $CD3$, à medida que as células entram em apoptose elas diminuem a expressão ou deixam, gradativamente, de expressar estes marcadores de linfócitos, embora este efeito seja mais visível para $CD3$ do que para $CD4$. O fato de que linfócitos T $CD4^+$ são obrigatoriamente $CD3^+$ ajudam a apoiar essa hipótese.

Uma interpretação, à primeira vista, que poderia surgir da análise desses dados seria um aumento na população $CD8^+$, pelo menos no grupo em que houve inversão da relação $CD4^+$ e $CD4^-$, uma vez que parte dessa população $CD4^-$ é também $CD8^+$. Entretanto, o que se observou foi exatamente o contrário, uma diminuição de células com alta expressão de $CD8^+$ na população de células irradiadas, e um aumento de células com baixa expressão de $CD8$ no grupo de células aquecidas (H), irradiadas (43i) ou não (43).

Em conjunto com os dados da figura 5, estes dados poderiam sugerir também uma maior sensibilidade à morte por irradiação dos linfócitos $CD3^+CD4^+$, do que monócitos, células que também expressam $CD4$. De fato, sendo menos sensíveis que linfócitos T à irradiação, linfócitos B e monócitos teriam sua sobrevivência relativamente aumentada, o que poderia explicar também porque em alguns experimentos observamos um pequeno aumento de células $CD14^+$ nos grupos de células aquecidas. Observamos também aumento de populações $CD19^+$ e $CD25^+$ (dados em anexo).

Como indicado no rodapé da tabela 3, não se pode descartar também a hipótese de aumento de populações $CD3^+CD4^-CD8^-$ ou ainda, de $CD3^+CD4^+CD8^+$, após irradiação, mesmo que em pequenas quantidades deste último subtipo. Uma vez que a presença desta subpopulação não é encontrada normalmente no sangue periférico de doadores saudáveis, a positividade desta população duplo-positiva no controle, menor que 2,5%, pode indicar duas possibilidades: erro de compensação durante aquisição no citômetro, podendo resultar em artefatos de calibração, ou

“background” devido à marcação inespecífica de células mortas na cultura ou os dois fatos, ambos interferindo no resultado, isoladamente ou não.

Esta possibilidade aumenta quando se observa que foram utilizados nestes experimentos fluorocromos CD4-PE e CD8-Per-CP, que apresentam uma superposição do espectro de fluorescência, dificultando a calibração do citômetro de fluxo e interferindo no resultado.

Assim, pode-se concluir, da análise conjunta das figuras 5, 6 e 7, que as condições de estresse celular (aquecimento e irradiação) a que as CNAs foram submetidas *in vitro* neste trabalho, simultâneas ou não, são capazes de interferir no fenótipo destas células, podendo ter consequências diversas, como a interferência no processo de morte celular de linfócitos; e a aparente proteção da apoptose induzida pela irradiação, conferida pelo processo de aquecimento das CNAs antes da irradiação.

Nesse sentido, os nossos dados até o momento parecem apontar para uma desregulação fenotípica e funcional induzida por irradiação *in vitro* de linfócitos T de doadores saudáveis, levando-os à apoptose *in vitro*. Deste modo, é possível que o nosso modelo de linfócitos apoptóticos poderia ser útil para simular o que ocorreria durante os processos de seleção positiva e negativa no timo. Este órgão é o responsável pela tolerância central, processo que gera linfócitos T maduros até uma certa idade, quando começa a regredir até ficar ausente em indivíduos adultos, o que torna o acesso a este órgão bastante dificultado para fins de pesquisa sobre mecanismos de tolerância *in vivo* (BOUNEAUD *et al.*, 2000; KIEWSKY e KLEIN, 2006).

Após ocorrência do processo de seleção negativa e positiva no timo, os linfócitos apoptóticos são fagocitados e eliminados, enquanto que aqueles que não foram eliminados e sobreviveram podem ser liberados à circulação para interagir com os tecidos periféricos. Caso estes linfócitos sejam autorreativos a Ags próprios periféricos, ausentes no timo, cria-se um risco para ocorrência de auto-imunidade. Por isso, se fazem necessários mecanismos de tolerância periférica a estes linfócitos que eventualmente tenham escapado dos mecanismos de tolerância no timo (LIU *et al.*, 2000; HAWIGER *et al.*, 2001; BOUNEAUD *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002; KIEWSKY e KLEIN, 2006).

5.4.1 Fenótipo de superfície de linfócitos após 48h de cocultura de iDCs com CNAs estressadas de diferentes maneiras

Antes de verificarmos o efeito de CNAs estressadas sobre o fenótipo de DCs, tivemos interesse em avaliar o efeito da cocultura sobre o fenótipo de linfócitos após 48h de cocultura. Estes experimentos foram importantes para decidir com que grupos experimentais seriam realizadas as coculturas, de forma que no início e no final não houvesse diferenças significantes entre os parâmetros observados sobre o fenótipo dos linfócitos. Isso seria importante para garantir que o fenótipo de superfície das CNAs fosse semelhante entre os diferentes grupos e os efeitos observados sobre as DCs pudessem ser devidos somente a alterações nas DCs e não nos linfócitos ou em ambos.

Uma preocupação que tivemos no experimento anterior (Figura 7) foi a possibilidade de artefatos de cultura e má compensação no citômetro de fluxo pudessem interferir no resultado obtido. Entretanto, como se verá a seguir (Figura 8), após cocultura com DCs e uma melhor compensação das amostras no citômetro, com anticorpos anti-CD3-PE, anti-CD4-FITC e anti-CD8-APC, que possuem menor sobreposição de espectros que no experimento anterior, a calibração e a compensação foram facilitadas.

Assim, para estudar o efeito da cocultura de DCs com CNAs apoptóticas, foram adicionados 10% de APO ou HAPO sobre as culturas de DCs, como descrito no item material e métodos. Os resultados mostrados a seguir referem-se ao fenótipo de linfócitos no gate R2, escolhido pelo tamanho característico da população de linfócitos não ativados utilizados como nossos controles (tamanho pequeno, FSC entre 240 e 520, aproximadamente). Como se pode observar, houve aumento relativo da população de linfócitos CD8⁺ no controle após 48h de cultura (37ni = 26,6%) e diminuição relativa da população CD4⁻CD8⁻ (29,73%), comparados ao grupo em que houve adição somente de meio (iDC), o total de linfócitos no gate R2 foi de 10,21% CD8⁺ e 49,52% CD4⁻CD8⁻.

Apesar da melhor calibração e compensação com fluorocromos diferentes do experimento anterior, compensação com amostras não marcadas e controles de isótipo, esta população duplo-positiva era bem menor que no experimento anterior (0,08%), provando que a nova estratégia de marcação com fluorocromos foi mais adequada. Entretanto, grupos de iDCs com CNAs irradiadas (iDC+37i e iDC+43i)

continuavam apresentando população duplo-positiva >1% e maior que a do controle que não recebeu quaisquer linfócitos adicionais.

Estes dados sugerem que, se eventualmente presentes, mesmo nos grupos em que supomos ter havido um aumento após irradiação, a quantidade de células duplo-positivas em relação ao total de linfócitos é menor do que antes da cocultura, indicando que parte delas também é eliminada durante a cocultura. Estes dados parecem sugerir também que os linfócitos apoptóticos porventura presentes na cocultura são eliminados pelas iDCs.

Nas nossas condições de cultura, células irradiadas mantidas após 48h de irradiação em estufa de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ parecem não exercer alterações significantes na viabilidade e na fagocitose das DCs. Entretanto, a dose utilizada é pequena para indução desses efeitos, se comparada a acidentes históricos, como o de Chernobyl e do Césio, em Goiânia, Goiás, ambos na década de 80, e a indivíduos que receberam altas doses de irradiação após o lançamento da bomba de Hiroshima, ou mesmo se comparadas a indivíduos que fazem radioterapia contra certos tipos de câncer (MARIN *et al.*, 2007). Entretanto, como citado, mesmo após 48h de exposição dos linfócitos a baixas doses de irradiação *in vitro*, foi possível observar alteração no fenótipo e viabilidade dessas células.

Nos outros grupos, sempre em relação ao grupo iDC, as alterações mais significantes foram as seguintes: aumento relativo da população CD8⁺ no grupo iDC+43ni (17,72%), embora menor que no grupo iDC+37ni; aumento relativo da população CD4⁺CD8⁻ nos grupos iDC+43i (58,27%) e iDC+65ni (58,81%). O grupo iDC+TNF pode ser comparado apenas ao grupo iDC, pois ambos não receberam linfócitos adicionais como cocultura com DCs.

Assim, este grupo iDC+TNF apresentou um aumento nas populações CD4⁺ e CD8⁺ simples, com diminuição na população CD4⁺CD8⁻, o que parece correlacionar com o efeito observado sobre a viabilidade das DCs (Figura 2), aumentando a sobrevivência ou diferenciação de precursores de uma maneira geral, não só sobre as DCs. Ou ainda, uma maior quantidade de DCs favorece também uma maior presença de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em nossas condições de cultura. Não houve diferenças na relação CD4⁺/CD8⁺ do grupo iDC+TNF (4,01) em relação ao grupo iDC (3,96). Entretanto, nos grupos não irradiados (37ni e 43ni), essa relação é <2, exceto no grupo iDC+65ni, cuja relação é 3,25.

Em conjunto, estes dados indicam que as populações de CNAs dos grupos iDC+37i, iDC+43i na cocultura com DCs ou iDC+TNF tendem a apresentar um padrão de expressão semelhante ao controle, não excedendo a 11,19% (iDC+TNF, próximo do controle, iDC, de 10,21%) do total de linfócitos quanto à presença de células CD8⁺, e mantendo a relação CD4⁺/CD8⁺ mais próxima de 4, como nos controles sem adição de linfócitos. Os grupos iDC+37ni e iDCs+43ni foram excluídos porque apresentaram aumento na população de células CD8⁺, indicando que o processo de cultura *in vitro* pode ter sido responsável pela alteração do fenótipo destas células.

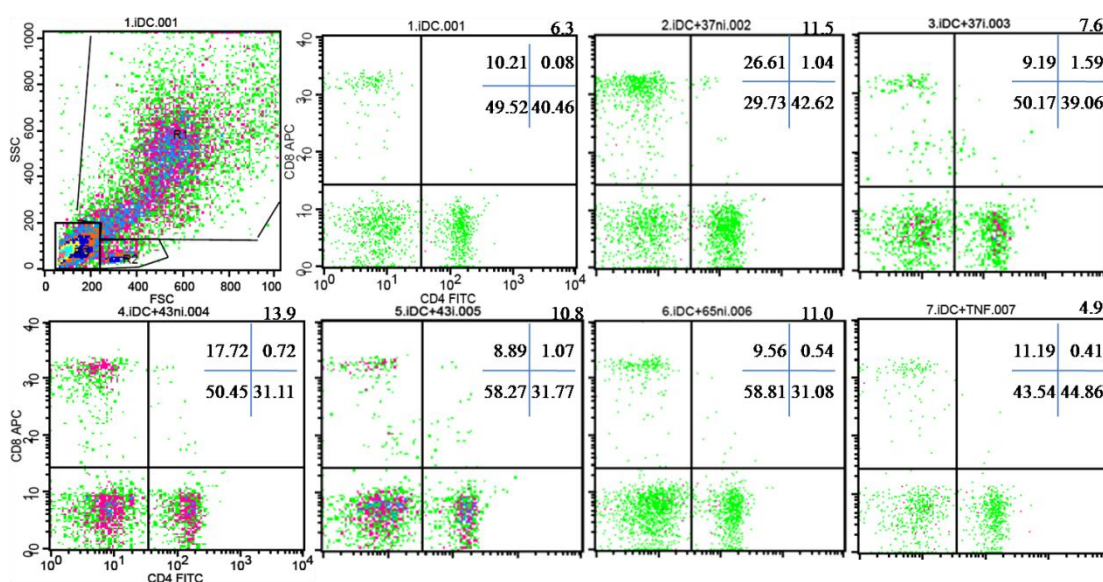


Fig. 8. Expressão de CD4 e CD8 em CNAs presentes após 48h de coculturas com DCs. Os valores no quadrante superior direito representam a porcentagem de expressão dos marcadores relativos aos respectivos quadrantes. R1 representa “gate” de DCs. Os valores fora dos quadrantes representam a porcentagem de linfócitos presentes no “gate” R1 em relação a população total. Dados representativos de 3 experimentos independentes realizados e adquiridos em FACS Calibur no Departamento de Imunologia do ICB – USP, com resultados semelhantes, e confirmados no FACS Calibur do Departamento de Dermatologia do Hospital Charité, Universidade Humboldt, Berlim. iDC = somente iDCs+meio. iDC+37ni=iDCs+linfócitos não irradiados. iDC+37i = iDCs+linfócitos irradiados. iDC+43ni = iDCs+linfócitos aquecidos e não irradiados. iDCs+43i = iDCs+linfócitos aquecidos e irradiados. iDCs+65ni = linfócitos aquecidos a 65 °C por 1h e não irradiados (controle de necrose). iDCs+TNF = iDCs+somente TNF (controle de maturação).

Como no experimento anterior (Figura 8) os dados desses dois grupos aumentariam a complexidade do sistema em estudo e poderiam interferir nos resultados dos próximos experimentos, dificultando uma interpretação mais cuidadosa

e detalhada dos dados e com a possibilidade de criação de artefatos de cultura ou de experimentação, utilizamos somente os grupos de linfócitos 37i e 43i, decidindo com base em dois critérios: 1. o padrão de apoptose apresentado por esses grupos celulares; 2. a manutenção da relação $CD4^+/CD8^+$ mais próxima dos controles em que não foram adicionados quaisquer linfócitos às coculturas, considerados por nós como controles de expressão de marcadores de linfócitos.

5.5 Efeito da cocultura CNAs estressadas/DCs sobre a viabilidade celular

Padronizados os experimentos de cinética de apoptose de linfócitos e verificadas alterações nos fenótipos dessas células, escolhemos o grupo onde foi detectada a maior taxa de apoptose (2. 37i ou APO, Figura 5) para verificar o nosso próximo objetivo, que foi avaliar o efeito dessas células apoptóticas sobre o processo de maturação das DCs, na presença ou ausência de $TNF-\alpha$.

Escolhemos também o grupo 4 (43i ou HAPO) porque estas células apresentaram, como mencionado, um comportamento surpreendente para nós, uma vez que a apoptose dessas células induzida pela irradiação foi inibida, embora parcialmente, pelo aquecimento prévio a 43°C por 30 minutos. A nossa hipótese parte do princípio de que tínhamos em mão um poderoso modelo de células próprias alteradas, que poderia mimetizar *in vitro* o previsto por Janeway (1992) e Matzinger (1994) em suas teorias sobre PAMPs e perigo, respectivamente, reforçadas hoje pelos conceitos de DAMPs propostos por Kono e Rock (2008), e que também ajudam a reforçar a nossa proposta. Este grupo seria interessante também porque forneceria um controle de quantidade de células apoptóticas presentes, uma vez que sua porcentagem foi praticamente a metade da obtida no grupo somente irradiado.

Assim, para estudar o efeito da cocultura de DCs com CNAs apoptóticas, foram adicionados 10% de APO ou HAPO sobre as culturas de DCs, como descrito no item material e métodos. Para comparar os diferentes grupos de DCs obtidas, o “gate” R1 foi utilizado em todas as análises. Os controles de células não irradiadas (37ni) ou somente aquecidas (43ni ou H) foram realizados em alguns experimentos e estão representados em anexo.

A figura 9A mostra a porcentagem de células viáveis recuperadas após 7 dias de cultura ou cocultura com APO/HAPO autólogas, na presença ou ausência de $TNF-\alpha$. Observou-se que a média da porcentagem de viabilidade de iDCs+APO não foi

diferente da observada nas culturas de iDCs somente, indicando que a presença de uma pequena quantidade de células irradiadas a partir do 5º dia de cultura de DCs não é suficiente para alterar a viabilidade das DCs. Entretanto, nas coculturas iDC+HAPO, a viabilidade das células recuperadas foi menor em relação a iDCs ($p < 0,05$), indicando que o tratamento de iDCs com células irradiadas pré-aquecidas é capaz de gerar uma forma de estresse diferente da irradiação somente, e que é capaz de alterar a viabilidade das células na cocultura com DCs.

Para excluir o efeito da autofluorescência das células apoptóticas sobre a marcação das DCs, realizamos alguns experimentos em que todas as células do grupo foram coradas com um marcador de morte celular, EMA (monoazida de etídio), que é lido em canal FL2 do citômetro de fluxo, mesmo canal de leitura de PI. As células também foram marcadas com CD14-PerCP para diminuir a interferência da fluorescência do canal FL3 sobre FL2, uma vez que esses dois canais apresentam superposição dos diferentes comprimentos de onda, o que poderia também interferir nos resultados. Assim, células CD14⁺ positivas e células mortas, EMA⁺, foram selecionadas em um novo gate, chamado “dump”, e foram excluídas de nossa análise (dados em anexo).

Os resultados demonstraram que não houve grandes alterações na viabilidade das DCs após as coculturas com CNAs, e que o risco de “background” causado pelas CNAs mortas que poderia interferir nos resultados foi reduzido com essa estratégia. Entretanto, esse tipo de análise só poderia ser feito em FACS com 6 cores ou mais, como o LSR II utilizado nesses experimentos na Alemanha. Assim, interpretamos que a alteração de viabilidade nas coculturas de DCs, apresentada na figura 9, é relativa somente às CNAs acrescentadas à cocultura, e não às DCs, como já sugerido por alguns gráficos da figura 8.

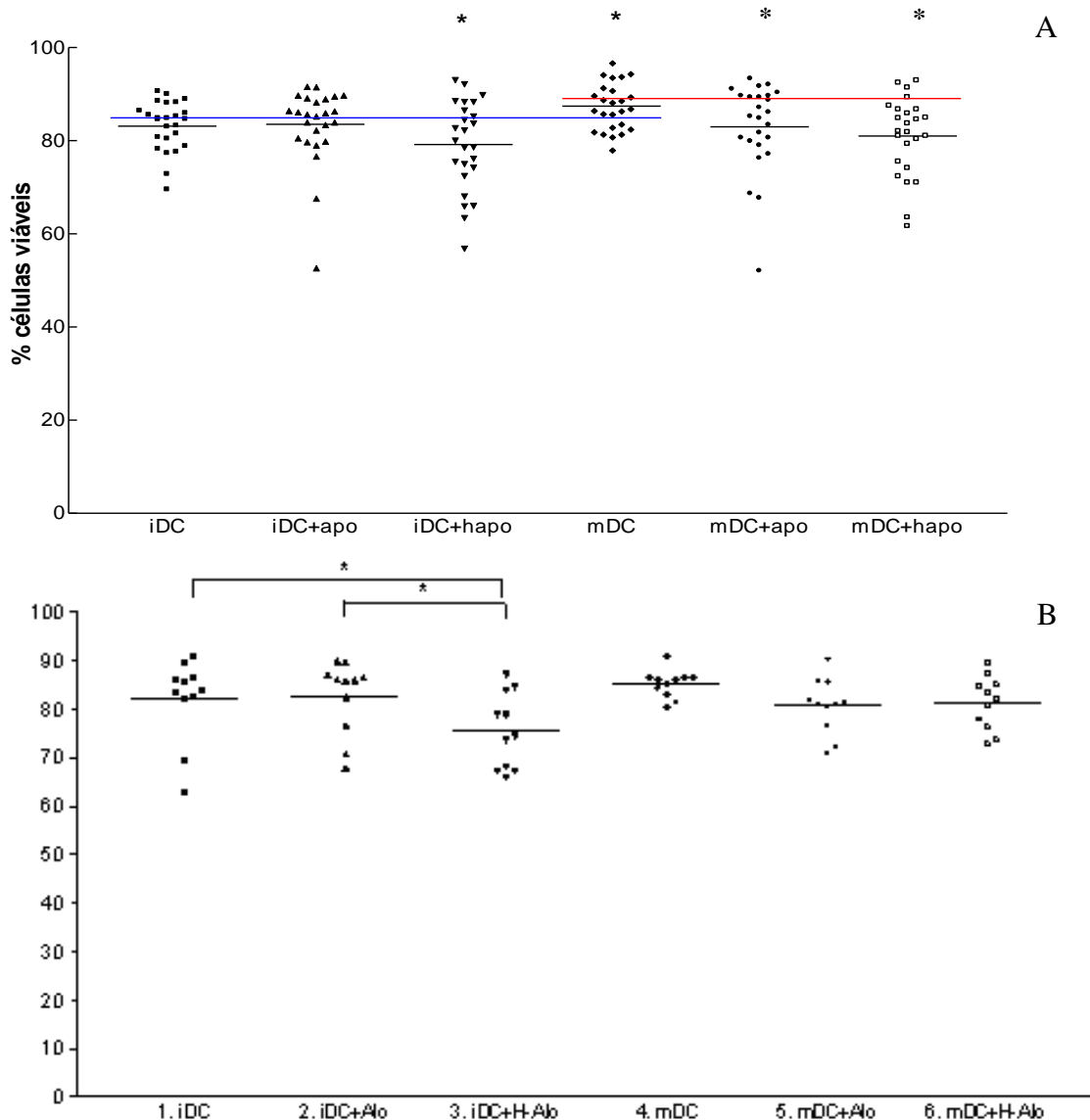


Fig. 9. Gráfico de dispersão da porcentagem de células viáveis presentes no 7º dia de culturas de iDCs e mDCs e respectivas co-culturas com APO ou HAPO autólogas (A) ou alogênicas (B). A viabilidade foi avaliada por contagem de células que excluíram trypan-blue, dividindo-se o número de células trypan-blue negativas pelo total de células. Linha e asteriscos à direita indicam comparação em relação a iDC (controle). Linha e asteriscos à esquerda indicam comparação em relação a mDC. Dados representativos de 25 experimentos independentes. $*=p<0,05$. ANOVA para Medidas Repetidas, seguido de Teste de Dunnett para Comparações Múltiplas

Em relação a mDCs, observou-se um aumento da viabilidade em relação a iDCs, confirmando dados de nossos experimentos anteriores e de outros trabalhos da literatura em que a presença de TNF- α correlacionou-se com maior recuperação de células das placas de cultura (SÁNCHEZ e SÁNCHEZ *et al.*, 2004). Já as coculturas de mDCs com APO ou HAPO não apresentaram diferenças de viabilidade em relação a iDCs. Entretanto, se compararmos este grupo de células ao grupo mDC, observamos que a viabilidade mDCs+HAPO também foi menor que o seu respectivo controle, de

maneira semelhante ao efeito de HAPO sobre iDCs, indicando haver células ou fatores solúveis presentes neste grupo que são diferentes dos controles não irradiados e do grupo APO, sendo ambos perceptíveis de maneiras diferentes pelas iDCs e mDCs.

Como houve menor taxa de apoptose neste grupo HAPO do que no grupo APO (Figura 5), sugerimos que após o processo de irradiação e no momento da contagem no 7º dia de cultura, algumas destas células HAPO podem ter passado durante as 48h de cocultura com DCs, para fase tardia de apoptose e, eventualmente, entrado em estágio de necrose secundária. Neste caso, com as células entrando em necrose secundária, a eliminação silenciosa pelas iDCs ficaria dificultada ou atrasada, facilitando a liberação de alguns fatores solúveis. Estes fatores, como os DAMPS, propostos por Kono e Rock (2008), poderiam tanto funcionar como adjuvantes endógenos, como HSPs, ácido úrico ou HMGB (KONO e ROCK, 2008) ou induzir morte celular *in vitro* nas células de alguns doadores (CHEN *et al.*, 2007).

Em relação ao grupo de iDCs cocultivadas com CNAs alogênicas, observamos comportamento semelhante ao descrito para CNAs autólogas. Entretanto, para o grupo de mDCs não observamos significância estatística, apesar do padrão de viabilidade celular ser semelhante em ambos os casos. Este dado indica pelo menos duas possibilidades. A primeira hipótese seria a de que as CNAs alogênicas aquecidas e irradiadas foram ativadas de forma que parte das que não foram mortas pelos processos de indução de apoptose não só sobreviveram como proliferaram a uma taxa desconhecida até que a quantidade de células viáveis fosse igual ao do controle (mDCs). A segunda possibilidade seria simplesmente o fato de que o tamanho amostral foi menor do que o grupo de CNAs autólogas, por isso não houve quantidade de repetições suficientes para se alcançar significância estatística.

5.6 Efeito da cocultura DCs/CNAs apoptóticas sobre a expressão de marcadores de superfície de DCs

5.6.1 Expressão de CD14 após cocultura com 37i (APO) ou 43i (HAPO)

Já foi visto anteriormente (Tabela 3) que a expressão de CD14 pôde ser correlacionada como fenótipo diferencial entre células aderentes (macrófagos CD14⁺) e células não aderentes (DCs CD14^{-low}). Investigamos então, a expressão de CD14

para avaliar o fenótipo das células de coculturas de DCs com CNAs autólogas ou alogênicas (APO ou HAPO) após 48h, dentro de R1 (considerando que a maioria (>90%) das células nesta região é HLA-DR⁺CD11c⁺, característica fenotípica de DCs. A figura 10 mostra dados de 4 experimentos realizados independentemente, tanto de culturas de DCs com células apoptóticas autólogas quanto alogênicas.

Esperávamos que as diferenças observadas no fenótipo de superfície das CNAs estudadas, apesar de significantes entre elas, não contribuíssem para alteração do fenótipo das DCs, uma vez que foram adicionadas às culturas de DCs quantidades de CNAs equivalentes somente a 10% da quantidade total esperada de DCs recuperadas no 7º dia de cultura.

Assim, como se pode observar na figura 10, tanto em culturas de DCs com CNAs autólogas quanto com alogênicas, houve diminuição na população de células CD14⁺ nos diferentes grupos, indicando que a diferenciação de monócitos em DCs foi efetiva, exceto no grupo de iDCs tratadas com células apoptóticas autólogas, onde essa tendência foi mais sutil, não alcançando significância estatística em relação aos outros grupos. Já no grupo de iDCs com APO alogênicas, a diferença é significativa, em relação a iDCs. Os outros grupos alogênicos permanecem com padrão de comportamento semelhante aos grupos autólogos.

A primeira impressão que estes gráficos nos dão, se levarmos em consideração que esta molécula é também um “scavenger” para células apoptóticas, além de ligante de LPS (DEVITT *et al.*, 1997), podemos sugerir que as iDCs com APO autólogas tendem a permanecer num estado mais imaturo, com diminuição na expressão de CD14 mais lenta do que nos outros grupos. Já no grupo de iDCs tratadas com APO alogênicas, parece que ocorre maturação das DCs mais significativa do que com APO autólogas. Em relação a mDCs, no grupo autólogo não houve diferenças significantes na porcentagem de células expressando CD14, enquanto que no grupo alogênico houve uma tendência a aumento de CD14. Estes dados parecem indicar uma regulação diferencial dependendo da fonte das CNAs, se autólogas ou alogênicas, e talvez dependente de diferenças no MHC.

Entretanto, a interpretação destes dados deve ser mais cuidadosa. Se observarmos que mDCs de grupos “autólogos” e “alogênicos” também apresentaram diferenças, quando comparadas entre si, podemos sugerir a possibilidade de artefato das culturas, uma vez que a esses grupos não foram acrescentados quaisquer CNAs

autólogas ou alogênicas. Uma melhor análise seria beneficiada com o aumento do tamanho amostral.

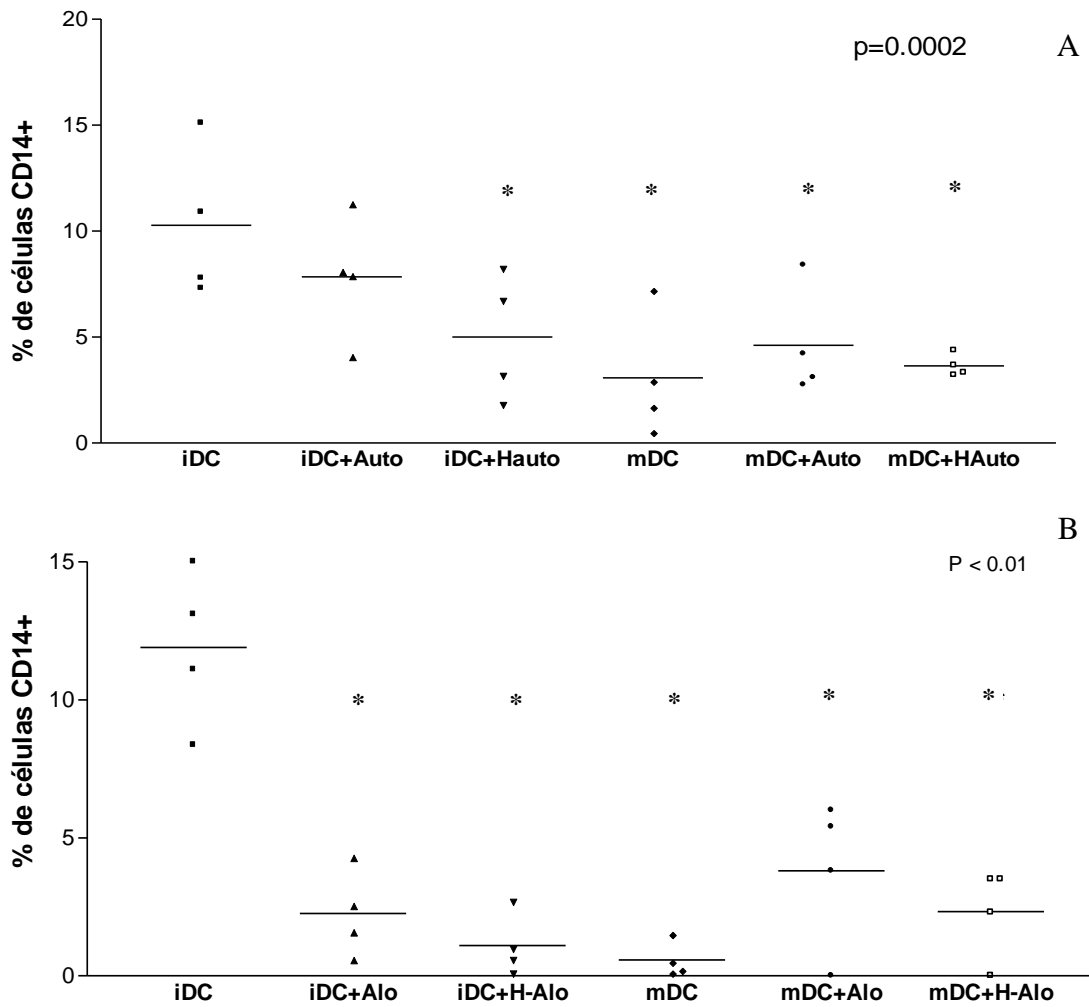


Fig. 10. Gráficos de dispersão da porcentagem de células CD14⁺ presentes no 7º dia de culturas de iDCs e mDCs e respectivas co-culturas com APO ou HAPO autólogas (A) ou alogênicas (B). Linhas indicam comparação em relação a iDC (ANOVA para Medidas Repetidas, Teste de Dunnett para comparações múltiplas). *= $p < 0,05$ em B.

5.6.2 Expressão de CD86 após cocultura de DCs com 37i (APO) ou 43i (HAPO)

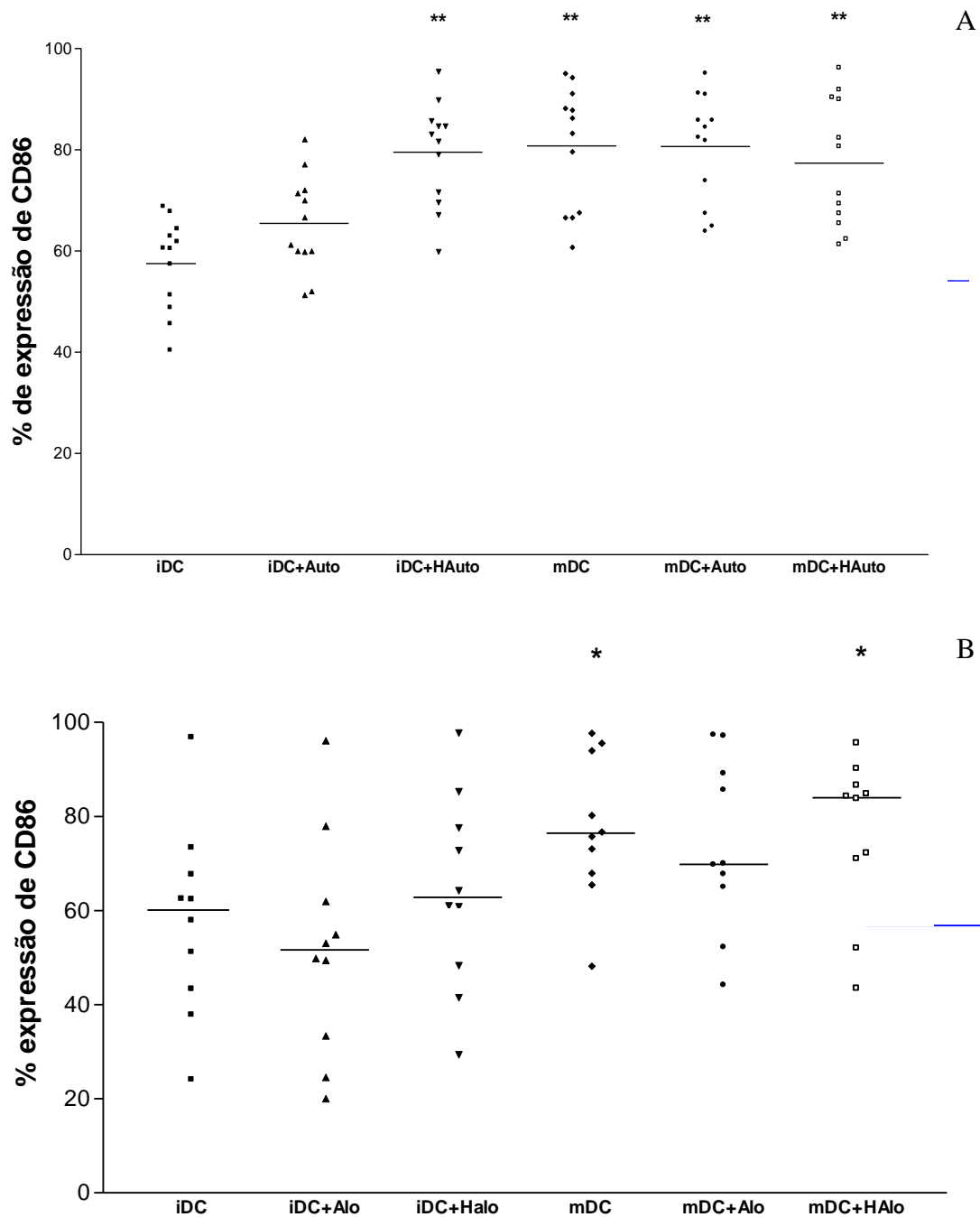


Fig. 11. Gráficos de dispersão da porcentagem de células CD86⁺ presentes na região R1 de análise por citometria de fluxo de culturas de 7 dias de iDCs e mDCs e respectivas coculturas com APO ou HAPO autólogas (A) ou allogênicas (B). Linhas indicam comparação em relação a iDC (ANOVA para Medidas Repetidas, Teste de Dunnett para comparações múltiplas). **= $p < 0,01$ em A ou $p < 0,05$ em B. *= $p < 0,05$; ***= $p < 0,001$. ANOVA para Medidas Repetidas, seguido de Teste de Dunnett para Comparações Múltiplas.

A figura 11 mostra a porcentagem de expressão de CD86, molécula na superfície de DCs e outras APCs com função co-estimuladora de linfócitos T. Pode-se observar, em relação a células autólogas, que há aumento na porcentagem de células expressando CD86 em todos os grupos, exceto no grupo tratado com APO, o que parece correlacionar com os dados de CD14, mostrados anteriormente.

Em relação aos experimentos com CNAs alogênicas, esse padrão não é observado, apesar de haver uma tendência para aumento na expressão de CD86, exceto no grupo tratado com APO. Há aumento significativo de células expressando CD86 somente no grupo de DCs tratadas com TNF na presença de HAPO, com mDC+APO apresentando padrão semelhante ao de iDCs+APO, embora esta observação não seja significativa. Este dado parece sugerir que mesmo em DCs maduras (tratadas com TNF- α), a adição de células irradiadas (37i ou APO), na ausência de aquecimento prévio (43i ou HAPO), é capaz de inibir o processo de maturação, o que não acontece quando a quantidade células irradiadas é menor, ou na presença de fatores solúveis endógenos, como o que pode ter acontecido na presença de HAPO.

5.6.3 Expressão de CD1a após cocultura de DCs com 37i (APO) ou 43i (HAPO) autólogas

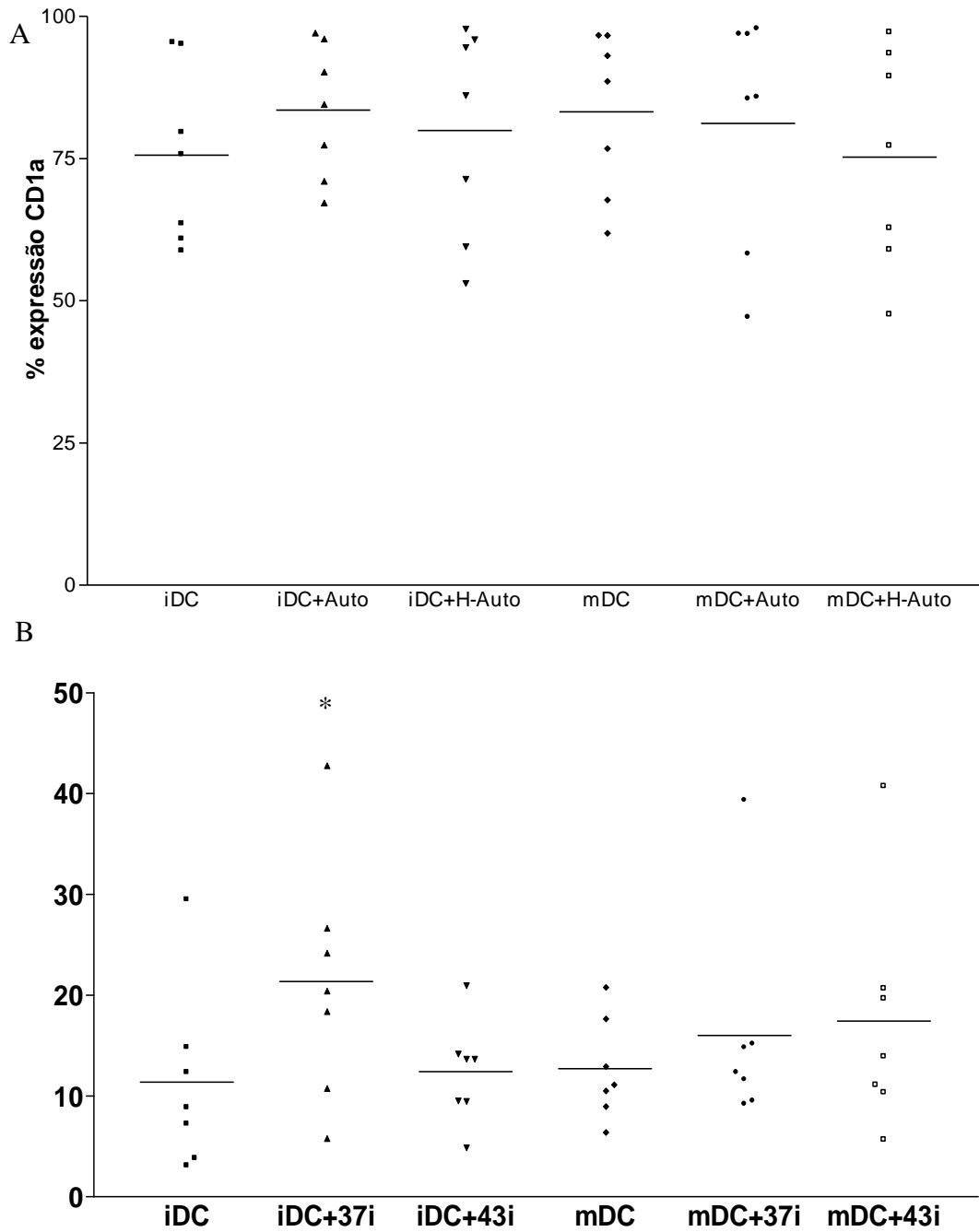


Fig. 12. Gráficos de dispersão da porcentagem (A) e MFI (B) de células CD1a⁺ presentes na região R1 de análise por citometria de fluxo de culturas de 7 dias de iDCs e mDCs e respectivas co-culturas com 37i ou 43i autólogas. (ANOVA para Medidas Repetidas, seguido de Teste de Dunett para comparações múltiplas, seguido de teste de Bonferroni para comparação iDC+APO vs iDC). $p < 0,05$.

5.6.4 Expressão de CD1a após cocultura de DCs com 37i (APO) ou 43i (HAPO) alogênicas

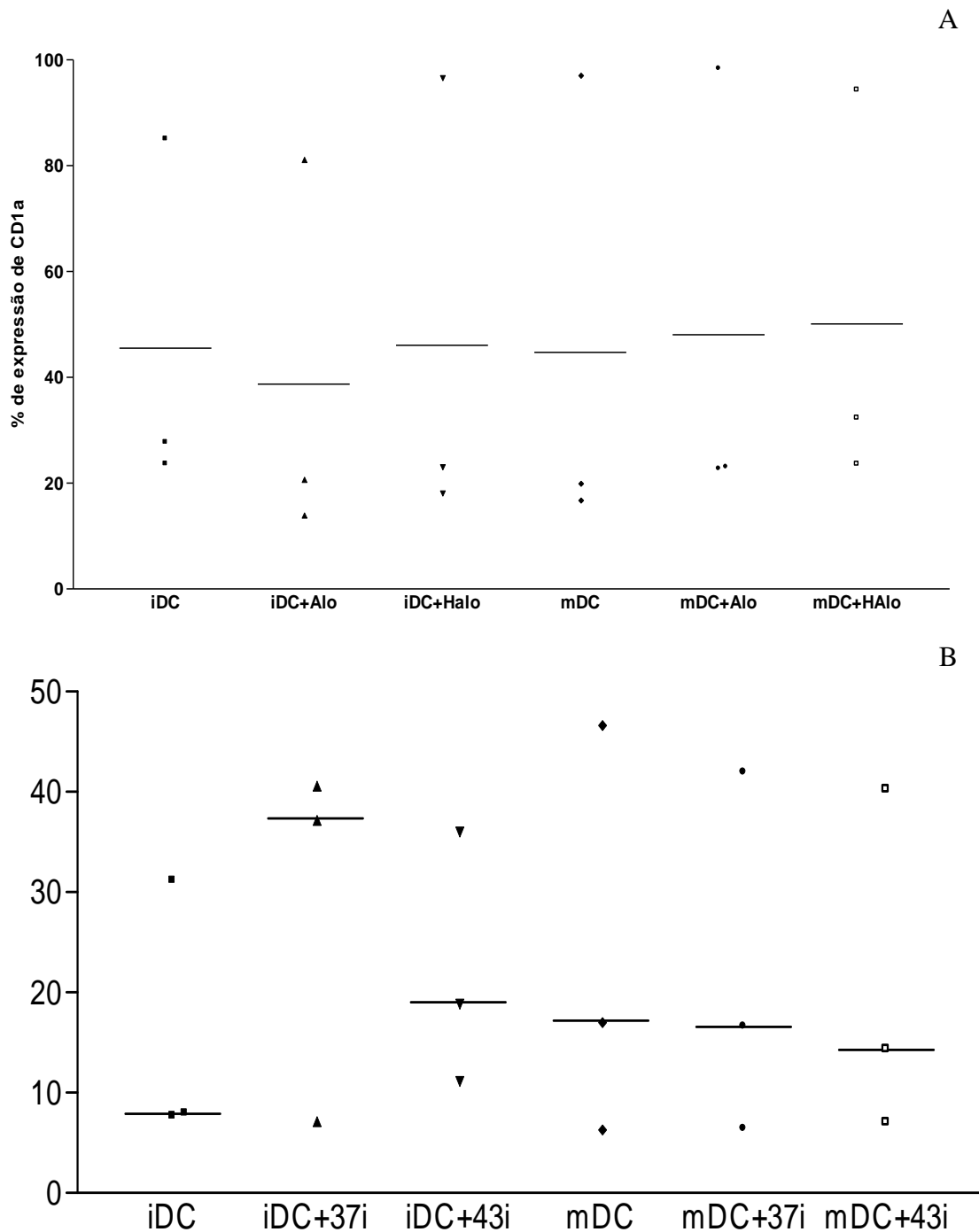


Fig. 13. Gráficos de dispersão da porcentagem (A) e MFI (B) de células CD1a⁺ presentes na região R1 de análise por citometria de fluxo de culturas de 7 dias de iDCs e mDCs e respectivas co-culturas com 37i ou 43i alogênicas. (ANOVA para Medidas Repetidas, seguido de Teste de Dunett para comparações múltiplas, seguido de teste de Bonferroni para comparação iDC+37i vs iDC). $p < 0,05$.

Em nossa abordagem experimental, utilizamos a molécula HLA-DR como marcador de APC, função que a DC desempenha muito bem. Tivemos interesse

também em investigar outros marcadores associados à apresentação de antígenos, como as moléculas CD1. Apesar das moléculas CD1 terem sido as primeiras a serem descritas no sistema de nomenclatura de CDs em 1982, ainda se sabe pouco sobre os seus papéis funcionais. Essas moléculas foram identificadas como uma família de moléculas MHC-não clássicas associadas à apresentação antigênica, tendo considerável homologia estrutural com moléculas de MHC de classe I e II, e estão envolvidas na ativação e regulação de respostas de linfócitos T a lipídios e glicolipídios microbianos (COVENTRY e HEINZEL, 2004; MOODY *et al.*, 2005; BURDIN e KRONENBERG, 1999; PORCELLI e MODLIN, 1999).

Em humanos, 4 proteínas CD1 (CD1a-d) foram identificadas, enquanto que em camundongos somente CD1d foi identificada até o momento (BANCHEREAU *et al.*, 2000; COVENTRY e HEINZEL, 2004). CD1a é expressa predominantemente por DCs e por poucos outros tipos celulares. A densidade de DCs CD1a⁺ tem sido diretamente associada com resultado clínico em vários tumores. Este fato é intrigante e sugere uma possível associação entre expressão de CD1a e a capacidade para apresentação de moléculas associadas a tumores. Também levanta a possibilidade de inibição específica da expressão de CD1a por fatores derivados de tumores como mecanismo potencial para a incompetência da resposta imune antitumoral (COVENTRY e HEINZEL, 2004; BRIGL e BRENNER, 2004; MOODY *et al.*, 2005). Tanto lipídios endógenos quanto exógenos podem ser apresentados por esta via, que pode contribuir não só para as respostas antitumorais como também para as respostas auto-ímmunes e contra transplantes.

Neste contexto, avaliamos a expressão de CD1a nas diferentes coculturas autólogas e alogênicas, representadas na figura 11, onde podemos observar que não há diferenças significantes na porcentagem de expressão de CD1a nos diferentes grupos de DCs estudados, tanto de coculturas de DCs com CNAs autólogas quanto com CNAs alogênicas. Entretanto, quando analisamos a intensidade de fluorescência (MFI) das células avaliadas, observamos que houve um aumento na MFI somente no grupo de iDCs tratadas com APO autólogas, em relação a iDCs, indicando que a remoção de células apoptóticas na cultura, feita principalmente por células CD14⁺ e por DCs imaturas, pode ter alguma relação com o aumento da expressão de CD1a. Nos outros grupos não houve diferenças significantes, em relação ao controle.

Sobre os dados de coculturas de DCs com APO e HAPO alogênicas não podemos tirar maiores conclusões porque o tamanho amostral é muito pequeno, embora o padrão de intensidade de fluorescência de CD1a seja semelhante ao de DCs cultivadas com APO e HAPO autólogas.

É interessante observar que estes dados foram confirmados em experimentos realizados na Alemanha (dados em anexo). Na ocasião, observamos diminuição da população CD1a⁺ e aumento da população CD1a⁻, embora não houvesse perda total da expressão deste marcador, à medida em que as células foram tratadas com coquetel de citocinas para maturação (JONULEIT *et al.*, 2001; FEUERSTEIN *et al.*, 2000), utilizado em protocolos de vacinação de pacientes com carcinoma renal e melanoma.

Outros dados da literatura também parecem indicar diminuição da população CD1a⁺ quando tratadas com LPS, mas os resultados variam dependendo da espécie de bactéria utilizada. Embora se pudesse pensar que células maturadas com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano aumentassem a expressão de CD1a pelas DCs, pela própria natureza lipídica do LPS, o oposto foi observado (dados em anexo; HOREWICZ *et al.*, 2008, manuscrito em preparação). Assim, a ativação com LPS diminuiu a expressão de CD1a, aumentando a maturação das DCs *in vitro*, de maneira semelhante aos nossos dados.

Estudos recentes (MOLENKAMP *et al.*, 2005) relataram aumento de migração preferencial de células CD1a⁺ maduras (com expressão menor de CD1a que as imaturas) para os linfonodos de pacientes com melanoma, correlacionado com aumento de expressão de CCR7, semelhante aos nossos dados de expressão de CCR7 (Figura 1). Enquanto isso, MIRANDA *et al.* (2007) demonstraram que DCs CD1a⁺ se acumulam no local das lesões provocadas por *Mycobacterium leprae* na derme e epiderme. Estes trabalhos sugerem que células CD1a⁺ podem ter destinos, funções e respostas diferentes, dependendo da fonte do estímulo lipídico, se próprios, no caso do melanoma, ou não-próprios, como no caso do *M. leprae* e outras micobactérias.

É interessante ressaltar que a molécula CD1a está relacionada a apresentação de antígenos lipídicos, tendo homologia funcional com as moléculas do complexo MHC, que apresentam antígenos peptídicos para linfócitos T; e estrutural por compartilhar a cadeia β2-microglobulina, que é codificada por um gene não relacionado ao MHC e, portanto, é não-polimórfica. Esta é uma das principais características que diferem a molécula CD1a das moléculas do MHC. As moléculas

do complexo gênico do MHC são altamente polimórficas, característica que está relacionada à própria sobrevivência da espécie humana, uma vez que diferentes haplótipos de MHC estão mais ou menos relacionados a susceptibilidade ou resistência a diversas doenças auto-imunes, infecciosas e, mais recentemente, determinados tipos de câncer (WALKER *et al.*, 2002; ROBBINS *et al.*, 2003; CASTELLI *et al.*, 2008).

De modo contrastante com essa idéia, as moléculas da família CD1 de maneira geral apresentam reduzida variabilidade, o que talvez possa refletir a menor variação de moléculas lipídicas, comparando-se a variedade de proteínas e peptídeos que podem ser gerados e associados a moléculas do MHC. Se por um lado, seria possível imaginar que as variações individuais observadas no fenótipo de membrana de diferentes indivíduos fossem devidas a esses polimorfismos, e portanto, refletindo alterações genéticas, o que se observa é que, diferente das moléculas do MHC que conferem resistência ou susceptibilidade a determinadas doenças, as moléculas da família CD1a apresentam baixa frequência de polimorfismos nas populações estudadas (MOODY *et al.*, 2005).

Nossa hipótese é apoiada pela visão recente de Moody *et al.* (2005). Por causa de crescentes evidências de que as proteínas CD1 estão envolvidas no resultado de doenças infecciosas e auto-imunes, energia considerável tem sido devotada para o entendimento das funções precisas da regulação imune restrita a CD1. A maioria dos modelos propõe que linfócitos T CD1-restritos, especialmente células NKT CD1-d restritas atuem como “guardiões” durante os estágios iniciais da resposta imune, controlando a subsequente maturação das DCs, a ativação de células NK e a polarização restrita ao MHC (MOODY *et al.*, 2005). Em contraste, a literatura sobre linfócitos T CD1a-restritos é escassa.

Moody *et al.* (2005) propõem um modelo em que há um aparecimento de proteínas do grupo 1 de CD1, depois do grupo 2 e depois as proteínas de MHC de classe II sobre as DCs. CD1d é expresso constitutivamente sobre precursores de monócitos, mas essa expressão é influenciada por estímulos locais. Em contraste, a transição de monócitos para DCs imaturas envolve uma mudança “nada-para-tudo” na expressão de CD1 do grupo 1 na superfície. Enquanto a expressão de MHC de classe II na superfície é substancialmente regulada pelo tráfego redirecionado de proteínas preformadas para a superfície celular, a expressão de proteínas do grupo 1 ocorre através de nova tradução. Este modelo idealizado e a maioria dos modelos de cinética

de expressão baseiam-se na ativação com altas doses de GM-CSF e IL-4, mas outros estudos investigaram que estímulos mais fracos, mas naturais, podem regular a função de CD1 *in vivo*. Já a capacidade de DCs ativarem linfócitos T restritos a MHC de classe II é regulada por transições funcionais envolvendo captura do antígeno bem como a presença de moléculas co-estimuladoras (BANCHEREAU *et al.*, 2000; STEINMAN *et al.*, 2003; MELLMAN *et al.*, 2005).

5.7 Efeitos linfoestimulador e linfoinibidor de DCs

5.7.1 DCs estimuladas com APO ou HAPO autólogas na relação 1:10 e reestimuladas com linfócitos autólogos viáveis na relação 1:5

Nesse sentido, o nosso próximo objetivo foi verificar se as DCs geradas de diferentes maneiras, na presença ou ausência de APO ou HAPO autólogas seriam capazes de modular a resposta proliferativa de linfócitos T autólogos.

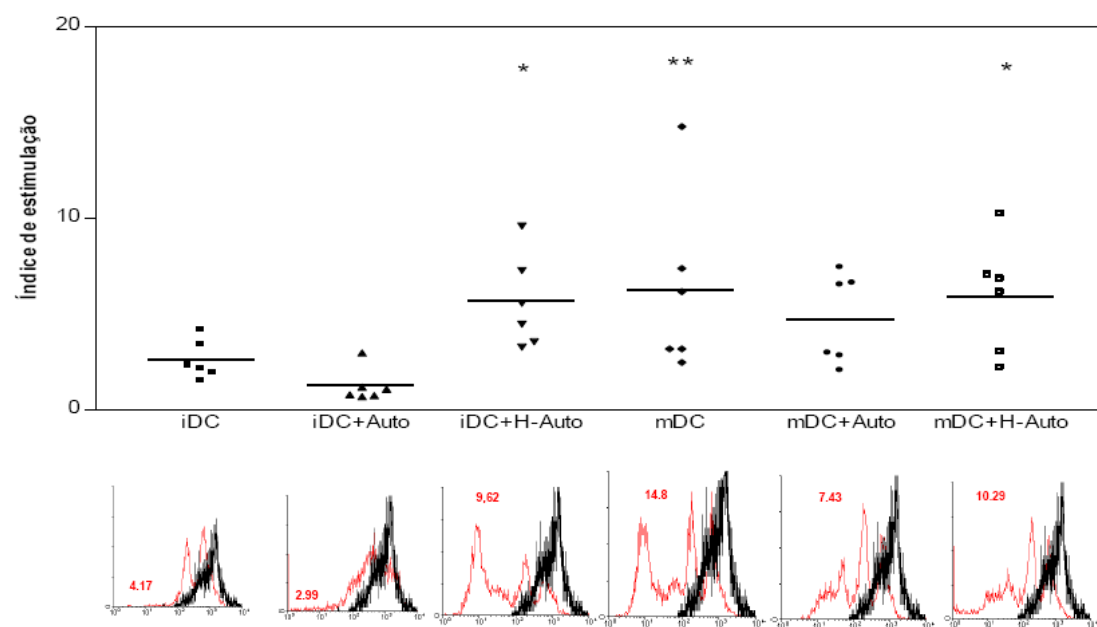


Fig. 14. Histogramas representativos de MLR autólogas. DCs foram estimuladas com APO ou HAPO por 48h, irradiadas por 1250 rads e estimuladas com linfócitos autólogos. (ANOVA para Medidas Repetidas, seguido de Teste de Dunett para comparações múltiplas). $p < 0,01$, $p < 0,05$.

Como mostra a figura 12, DCs não tratadas com TNF mas tratadas com APO (iDCs+APO) não induzem aumento do índice de proliferação de linfócitos T autólogos na relação 1:5. Na verdade, o que parece ocorrer é uma inibição dessa resposta, comparada ao controle. Já o grupo iDC tratadas com HAPO induzem

resposta semelhante ao grupo mDC. Estes dados parecem apresentar uma correlação inversa com as médias de intensidade de fluorescência de CD1a apresentadas na figura 11, indicando talvez que antígenos lipídicos de células apoptóticas estão sendo apresentados para linfócitos T e tendo participação ativa no mecanismo de inibição da resposta proliferativa apresentada.

Em relação a DCs tratadas com TNF, há significância estatística apenas para os grupos mDC e mDC+HAPO, o que também correlaciona com os menores níveis de CD1a, em relação ao controle iDC. Mesmo não tendo significância estatística, observa-se uma tendência para o grupo mDC+APO, comparado ao seu respectivo controle, mDC, de ter um perfil de resposta semelhante ao de iDC+APO comparado ao seu controle respectivo, iDC. Este resultado parece ser uma evidência indireta de que, mesmo durante o processo de maturação com TNF, antígenos lipídicos provenientes de células apoptóticas, apresentados por CD1a para linfócitos T, são capazes de mediar a inibição de proliferação desses linfócitos T, comparada à proliferação induzida por DCs tratadas com TNF, embora essa inibição seja menor que a induzida pelo tratamento de iDC com APO na ausência de TNF. Além disso, as médias dos índices de proliferação dos diferentes grupos sugerem que a capacidade proliferativa de linfócitos T induzida por mDC+APO seja intermediária a de ambos os controles, iDC e mDC.

Por outro lado, tanto iDCs quanto mDCs tratadas com HAPO apresentaram médias de índices de proliferação próximos aos de mDC, indicando que iDCs não tratadas com TNF sofrem maturação na presença de HAPO e essa resposta parece correlacionar com o aumento de CD86 observado nos grupos de células mDC e mDC+HAPO. Esses dados parecem confirmar também a nossa hipótese de que células estressadas por calor, liberando DAMPS como fatores solúveis ou através de interação de superfície com as DCs ou outras células em cultura são capazes de induzir a maturação das DCs.

É importante ressaltar que tínhamos observado apenas um pequeno aumento na expressão de HLA-DR (MFI) ou de células expressando HLA-DR (%) quando tratadas com TNF, uma vez que as DCs apresentam este marcador constitutivamente, o que foi confirmado em nossos experimentos (Figura 1 e Anexos). Dessa forma, como sugerido também por MOODY *et al.* (2005), a densidade de superfície de MHC de classe II nem sempre correlaciona com a habilidade de primar linfócitos T.

A aquisição de propriedades ativadoras de linfócitos T ocorre cedo na diferenciação das DCs, e para a expressão de CD1 do grupo 1, pode correlacionar no tempo com o primeiro aparecimento destas proteínas na superfície (MOODY *et al.*, 2005), como demonstramos para o aparecimento de CD1a na superfície das DCs na presença de células apoptóticas.

5.7.2 DCs estimuladas com APO ou HAPO autólogas na relação 1:10 e reestimuladas com linfócitos alogênicos viáveis na relação 1:30

Avaliamos em seguida, a capacidade linfoestimuladora ou linfoinibidora alogênica das DCs geradas de diferentes maneiras, na presença ou ausência de APO ou HAPO autólogas. Foram feitas padronizações com várias relações (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:60). Diferente das MLRs autólogas, a melhor relação em que se observou reprodutibilidade dos resultados foi utilizando a relação 1(DC):30(linfócitos T).

Como observado na figura 15 a seguir, houve aumento significativo do índice de proliferação de linfócitos cocultivados com DCs somente no grupo mDCs+43i (mDC+Alo), embora todos os índices observados fossem maiores que os observados nas coculturas autólogas de 7 dias. Em um experimento representado na figura 15, houve aumento de proliferação em todos os grupos em relação a iDC, embora estes dados não se repetissem nos outros indivíduos analisados. Estes dados sugerem que o comportamento de linfócitos alogênicos seja diferente ao de linfócitos autólogos na cocultura com DCs, o que poderia ter implicações importantes numa resposta alogênica *in vivo*.

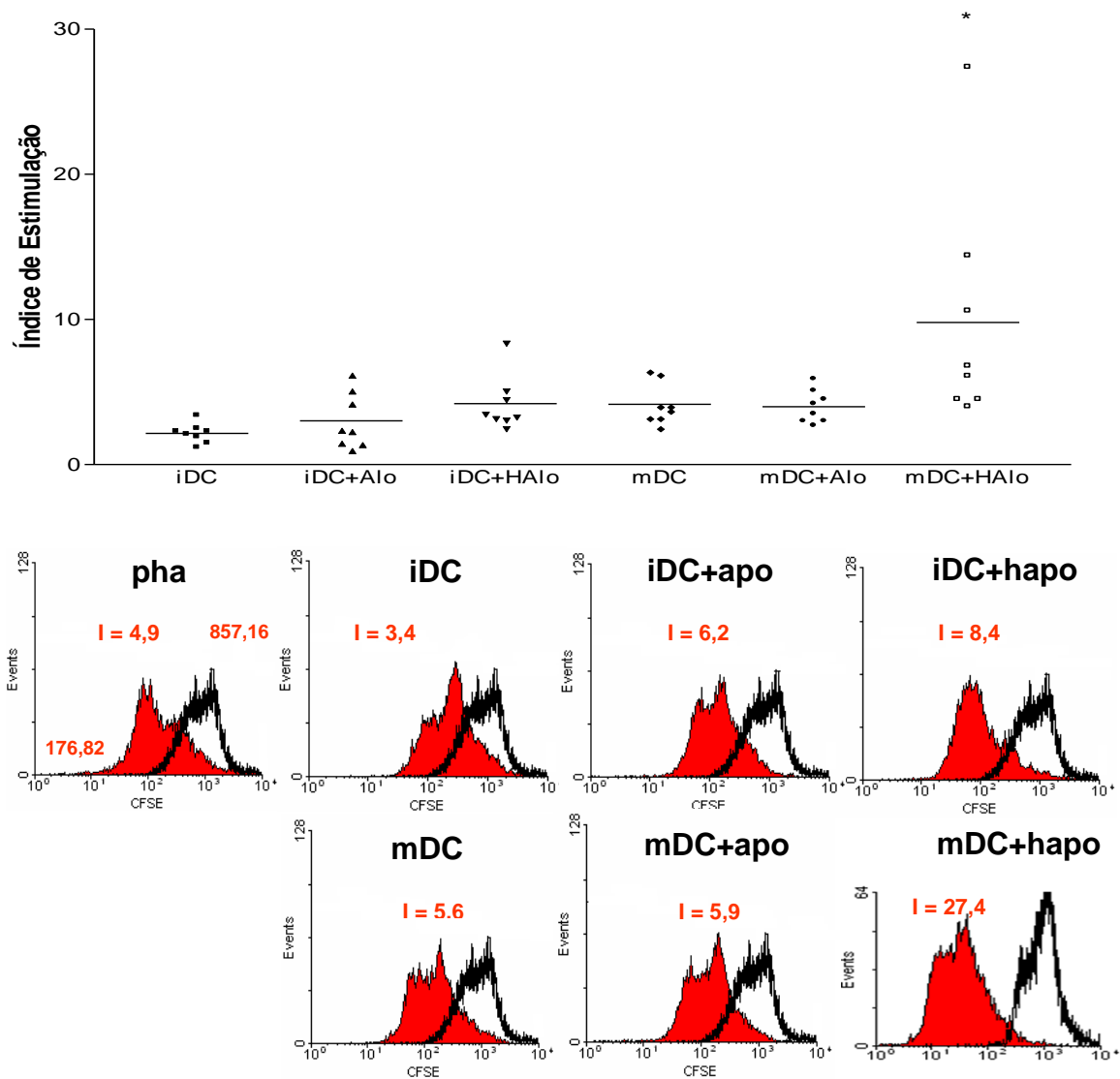


Fig. 15. Histogramas representativos de MLR alôgenas. DCs foram estimuladas com APO ou HAPO por 48h, irradiadas por 1250 rads e estimuladas com linfócitos autólogos. de células CD1a⁺ presentes na região R1 de análise por citometria de fluxo de culturas de 7 dias de iDCs e mDCs e respectivas co-culturas com APO ou HAPO autólogas ou alôgenas. (ANOVA para Medidas Repetidas, seguido de Teste de Dunett para comparações múltiplas). p<0,01, p<0,05.

5.8 Presença de IL-12p70 no sobrenadante das culturas de DCs com diferentes estímulos.

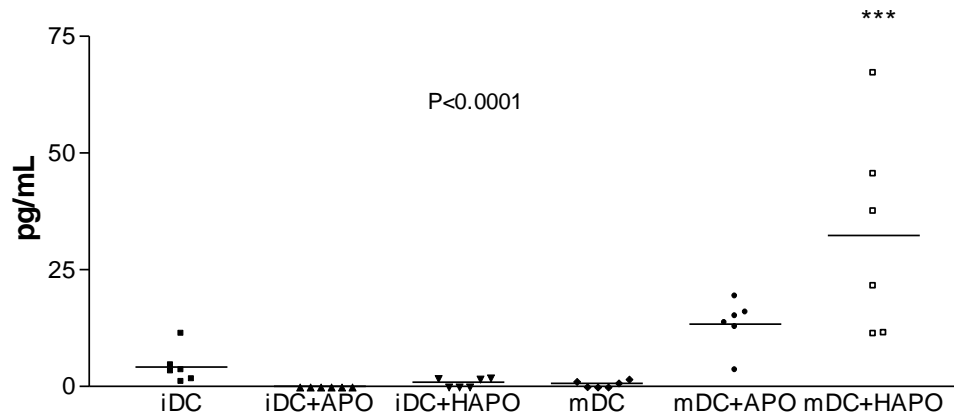


Fig. 16. Gráfico de dispersão individual da produção de IL-12p70 no sobrenadante de células dendríticas derivadas *in vitro* de monócitos de doadores saudáveis na presença de 37i ou 43i autólogas por 48h (ANOVA para Medidas Repetidas, seguido de Teste de Dunett para comparações múltiplas vs iDC). $p < 0,01$, $p < 0,05$.

5.9 Presença de IL-10 no sobrenadante das culturas de DCs com diferentes estímulos.

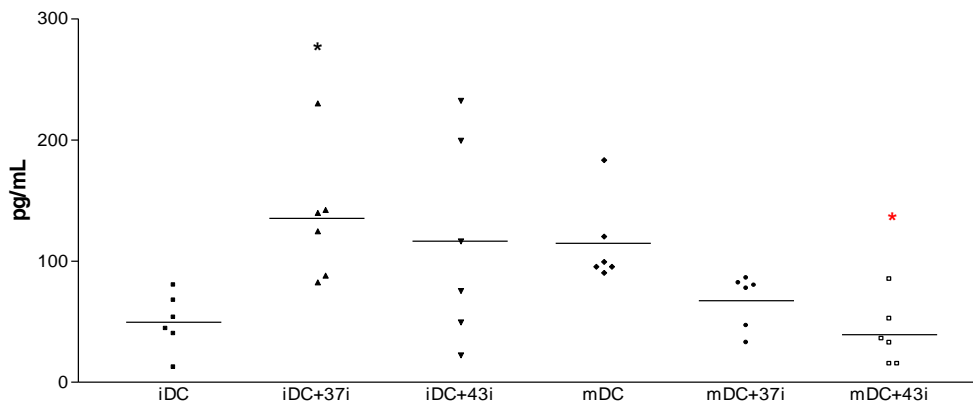


Fig. 17. Gráfico de dispersão individual da produção de IL-10 no sobrenadante de células dendríticas derivadas *in vitro* de monócitos de doadores saudáveis na presença de 37i ou 43i autólogas por 48h (ANOVA para Medidas Repetidas, seguido de Teste de Dunett para comparações múltiplas vs iDC). $p < 0,01$ vs iDC ou vs mDC.

O nosso próximo objetivo foi analisar se as DCs poderiam ser moduladas diferentemente nas coculturas com 37i ou 43i, através da produção de citocinas moduladoras, como a IL-10 ou pró-inflamatórias, como a IL-12. Como se pode observar na figura 16, houve um aumento significativo da produção de IL-12p70 no grupo de mDCs+HAPO, havendo uma tendência para presença dessa citocina no grupo mDC+APO, que no entanto, não se revelou estatisticamente significativo. Em

contraste, quando se analisou o sobrenadante das mesmas culturas para a presença de IL-10, observou-se que houve predominância dessa citocina nos grupos não tratados com TNF ou tratados somente com TNF, sugerindo uma correlação inversa com os níveis de IL-12p70 presentes no sobrenadante dessas coculturas. É interessante notar que os níveis significativamente elevados de IL-10 no grupo iDC+37i correlacionaram-se com os níveis aumentados de CD1a e baixos níveis de IL-12p70.

Em conjunto, os resultados de expressão de moléculas de superfície e de produção de citocinas são uma evidência indireta de que houve eliminação de células apoptóticas do meio, provavelmente por fagocitose. A menor expressão de CD14 nas diversas culturas de DCs apresentadas indica que a remoção dessas células apoptóticas pode ter ocorrido por mecanismos independentes da expressão de CD14. Como será discutido posteriormente, há vários receptores “scavenger” que poderiam estar envolvidos nesse processo. Os resultados sugerem também que, mesmo com uma taxa de apoptose das HAPO (<40%) menor do que APO (>80%), a quantidade de linfócitos apoptóticos acrescentados, em torno de 10%, não interferiu com a capacidade das iDCs de eliminarem essas células apoptóticas da cultura.

Entretanto, quando as DCs foram tratadas com TNF- α , as células apoptóticas aquecidas presentes não foram capazes de impedir a produção de IL-12 no meio, sugerindo que o processo de fagocitose e eliminação destas células teria ficado prejudicado na presença de DCs maduras, uma vez que estas células têm menor capacidade fagocitária que as imaturas (BANCHEREAU *et al.*, 2000; STEINMAN *et al.*, 2003; MELLMAN *et al.*, 2005). Sugerimos que esse efeito poderia ser correlacionado à própria alteração fenotípica e de membrana das CNAs aquecidas e irradiadas (Figuras 5, 6 e 7), o que faria com que elas fossem detectadas de maneira diferente das CNAs somente irradiadas. Entretanto, mesmo na presença de TNF, estas células apoptóticas pareceram capazes de modular a diferenciação de DCs induzindo proliferação dos linfócitos T, porém, induzindo liberação de níveis menores de IL-12 que o grupo mDC+HAPO, o que parece correlacionar com os níveis de IL-10 presentes nos sobrenadantes no 7º dia de cultura.

Outra hipótese alternativa para explicar estes dados poderia ser simplesmente a quantidade de células apoptóticas presentes nesse grupo, equivalente a cerca de 50% das células apoptóticas presentes no grupo APO, indicando haver um limiar de fagocitose de células apoptóticas para que as DCs possam “decidir” se maturar em

resposta a estímulos pró-inflamatórios (TNF- α , ou outros liberados no meio pelas células aquecidas que eventualmente possam se romper) ou manter-se imaturas, pelo menos temporariamente, para continuar a função de limpeza do ambiente pela eliminação de células apoptóticas por fagocitose. Contribui para esta hipótese o fato de que detectamos TNF na cocultura iDCs+HAPO, não verificada nos grupos iDC ou iDC+APO, uma vez que nestes grupos não houve adição de TNF para maturação, enquanto que nos grupos em que adicionamos TNF, a presença desta citocina foi detectada (dados em Anexo).

Não podemos descartar também a hipótese de que ambos os fatores, diferentes alterações fenotípicas de CNAs estressadas de diferentes maneiras e quantidades diferentes de células apoptóticas presentes nesses dois grupos, possam estar associados e tenham efeito sinérgico sobre a maturação das DCs.

Os diferentes resultados mostrados (fenótipo de superfície, expressão de CCR7, indução de proliferação e secreção de citocinas) parecem indicar que DCs continuam apresentando características de maturação mesmo na presença de células apoptóticas, mas que essa maturação fornece características fenotípicas e funcionais diferentes dependendo do grupo em questão. Estes resultados refletem a heterogeneidade fenotípica das DCs, a diversidade de subpopulações presentes e a plasticidade das DCs de responder diferencialmente aos diversos estímulos no microambiente de cultura e, provavelmente, também no microambiente tecidual *in vivo*, como proposto e já bastante estabelecido na literatura para DCs humanas em modelos de infecção e câncer e respectivos protocolos imunoterapêuticos (BANCHEREAU *et al.*, 2000; STEINMAN *et al.*, 2003). Agora, mais recentemente, estes dados são reforçados cada vez mais claramente pelas evidências de que estruturas próprias alteradas podem influir na resposta imune, na ausência de um agente patogênico conhecido, como demonstramos aqui, e como relatado por Kono e Rock (2008).

Como já mencionado e será melhor discutido adiante, defeitos na eliminação de células apoptóticas, sugeridos por nossos experimentos, já foram demonstrados por HUNDT *et al.*, (2002), que estudaram pacientes com Síndrome Linfoproliferativa Auto-imune (ALPS). Esses defeitos, associados à nossa detecção de aumento na produção de IL-12, por sua vez associada à presença de DCs (NAKAMURA *et al.*, 2004), estão relacionados ao desencadeamento de doenças auto-imunes, como Lúpus

Eritematoso Sistêmico (LES; HERRMANN *et al.*, 1998) e tireoidite auto-imune (NAKAMURA *et al.*, 2004), e imunodeficiências, como ALPS.

É possível que as moléculas CD1a estejam participando ativamente deste processo de regulação ou modulação, mas a baixa frequência de polimorfismos desta molécula sugere que boa parte das variações observadas sejam moduladas pela variação ambiental, como por exemplo, pela composição dos lipídios da dieta individual, do soro ou do meio de cultura.

Em resumo, nossos resultados sobre a correlação inversa de IL-10 com os outros parâmetros medidos, associados a dados de literatura sobre alterações no fenótipo e na presença de linfócitos T reguladores (HUNDT *et al.*, 2002; NAKAMURA *et al.*, 2004), reforçam e apóiam a nossa proposta de desenvolvimento de um modelo de auto-imunidade humana *in vitro*.

6 DISCUSSÃO GERAL

O objetivo deste trabalho foi, inicialmente, avaliar a cinética de apoptose de linfócitos induzida por irradiação; o efeito do pré-aquecimento desses linfócitos sobre a apoptose induzida pela irradiação e em, seguida, o efeito das diferentes subpopulações celulares obtidas sobre os processos de diferenciação e maturação de células dendríticas derivadas *in vitro* de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis.

Resumidamente, observamos que, após análise dos resultados de ensaio de incorporação de PI, realizado 0, 24 e 48h após irradiação de linfócitos em fonte de ^{137}Cs , os linfócitos apresentaram uma porcentagem média de apoptose acima de 80%, e ao contrário do que esperávamos, quando estes linfócitos foram pré-aquecidos *in vitro* na temperatura de 43°C, apresentaram uma redução na porcentagem de apoptose observada, cuja média (39,3% \pm 19,8, figura 4) ainda permaneceu maior do que a observada nos controles (11,6 \pm 3,3), após o período de 48h. Estes resultados foram validados e confirmados por experimentos realizados nos laboratórios do Departamento de Dermatologia do Hospital Charité da Universidade Humboldt (Berlim, Alemanha), pela marcação intracelular com caspase-3 (dados em anexo). Esta é uma enzima importante nos eventos iniciais de desencadeamento da cascata de apoptose e, sua presença pôde ser correlacionada com a marcação de PI utilizada em nossa metodologia. Consideramos assim, nossas células em estágio inicial de apoptose após 48h de irradiação *in vitro*.

Assim, podemos concluir, em relação aos experimentos sobre a cinética de apoptose, que a metodologia escolhida foi útil para detectar apoptose, como avaliado também por Nicoletti *et al.*, 1991; Gorczyca *et al.*, 1997; Mirakian *et al.*, 2002, Darzynkiewicz e Huang, 2004; Franz *et al.*, 2007, Schiller *et al.*, 2008. Nosso trabalho, entretanto, é o único, ao nosso conhecimento, pelo fato de ter sido o primeiro a avaliar o efeito da irradiação γ ionizante de origem em fonte ^{137}Cs sobre linfócitos do sangue periférico humano, enquanto que a maioria dos trabalhos citados avaliou os efeitos da radiação ionizante ultravioleta (UVA e UVB) (SCHILLER *et al.*, 2008) ou radiação X sobre linfócitos (FRANZ *et al.*, 2007), neutrófilos (FRANZ *et al.*, 2007), tímócitos (NICOLETTI *et al.*, 1991), tireócitos (MIRAKIAN *et al.*, 2002) ou células de animais (MASSÉ *et al.*, 2004).

As alterações celulares provocadas pela irradiação e os mecanismos responsáveis são descritos a seguir. Seja direta ou indireta, a interação entre a radiação ionizante e o DNA provoca perda de bases e danos a essas moléculas, quebra em um ou ambos os esqueletos de pentose-fosfato da hélice do DNA, dentre outros mecanismos. A radiação ionizante também interage com outras estruturas celulares, em geral interferindo em vias metabólicas de lipídeos e proteínas, prejudicando seriamente a célula. Um exemplo ocorre na membrana plasmática: a radiação ionizante ativa a enzima esfingomielinase, que como o nome sugere, provoca a quebra do lipídio esfingomielina de membrana de neurônios, sendo portanto, um importante mensageiro de estresse e que promove a morte celular (MONTENEGRO e FRANCO, 1999; ROBBINS *et al.*, 2003; MARIN *et al.*, 2007).

Os danos causados no nível molecular alertam a célula para ativar sua maquinaria de reparo, uma vez que essas alterações podem comprometer seu funcionamento normal e a integridade do organismo. Em resposta imediata à radiação, a célula, portanto, escolhe um dentre três destinos. Dependendo do tipo de célula, do seu estado, do nível de dano e das condições do meio ela pode: (1) interromper temporariamente o ciclo celular para tentar reparar os danos; (2) interrompê-lo definitivamente sem, no entanto, morrer; ou (3) entrar em apoptose (MARIN *et al.*, 2007).

Logo após a incidência de radiação, há células que entram em apoptose imediata. No caso de células de tecidos normais, isso ocorre com timócitos, esplenócitos, progenitores hematopoiéticos, células do folículo capilar e células da parede do intestino delgado. Outro grupo de células opta por interromper temporariamente o ciclo celular, com o intuito de reparar os danos moleculares. Caso essa tentativa seja bem sucedida, a célula volta a funcionar normalmente. Caso o dano seja irreparável, a célula pode tanto (1) ficar com o ciclo celular permanentemente interrompido (ou seja, ela não se divide mais) ou (2) tentar dividir-se mesmo com os danos. Nessa tentativa de divisão, quando os danos irreparáveis não são letais, a célula continua a multiplicar-se, acumulando mutações, o que aumenta o risco de desenvolvimento de câncer. Já quando os danos são muito graves, a célula realiza uma mitose mal-sucedida, entra em catástrofe mitótica e morre. Ainda quando está com o ciclo celular temporariamente interrompido e o dano é irreparável e letal, a

célula pode entrar em apoptose, mas não se sabe ao certo se isso pode ocorrer sem que haja uma divisão (MARIN *et al.*, 2007).

Em meio a todas essas decisões que a célula pode tomar, muitos mecanismos de resposta ao estresse genotóxico são ativados. Uma molécula-chave, que participa de grande parte dessas vias de resposta, é a proteína p53. A participação da p53 começa quando os danos no DNA induzidos pela radiação ionizante ativam uma série de proteínas quinases, que, por sua vez, fosforilam, ativam e acumulam a p53. Após a incidência de radiação, a p53 é quem direciona a célula para os diferentes caminhos mencionados acima. Quando expostas à radiação ionizante, células hematopoiéticas e embrionárias quase sempre respondem com apoptose. Por outro lado, os fibroblastos, mesmo quando as doses de radiação são muito altas, quase sempre respondem com a interrupção do ciclo celular (MARIN *et al.*, 2007).

O sucesso do reparo depende de alguns fatores, somados com a influência da p53 para a interrupção do ciclo celular, mencionada no item anterior. Um dos mais importantes é o estágio do ciclo celular em que a célula se encontra no momento que é irradiada. A mitose é o período em que as células estão mais sensíveis. Isso porque, nesse momento, a cromatina está mais sujeita a um grande estresse de torção e quase não há chance de reparo do DNA (até que as cromátides se separem na anáfase). O momento de máxima resistência à radiação varia de acordo com o tipo celular, mas em geral é na fase S da interfase. Isso ocorre, provavelmente, porque o reparo do DNA acontece, de maneira geral, quando a maquinaria de replicação do DNA está ativa (MARIN *et al.*, 2007).

Além da fase do ciclo celular em que a célula se encontra, o sucesso de reparação das lesões do DNA depende também, do grau do dano, do tipo celular, de se a célula terá tempo suficiente para garantir um reparo efetivo e da taxa de proliferação. Por exemplo, quebras cromossômicas irreparáveis que seriam letais para células em constante divisão seriam toleráveis para as células que não se dividem por longos períodos, como os neurônios. Ainda não está muito claro se a decisão de interromper o ciclo celular, provocada pela incidência de radiação, é tomada imediatamente após a danificação do DNA (ou seja, juntamente com a decisão por apoptose) ou depois de várias tentativas de reparo frustradas (MARIN *et al.*, 2007).

Em outros estudos, pesquisadores começaram a perceber que células tumorais tratadas com quimioterapia e radioterapia sofriam apoptose mediada pela p53 apenas

quando as células dos tecidos de origem normalmente já eram susceptíveis à esse tipo de apoptose. Isso é o caso de tecidos hematopoiéticos e tecidos reprodutivos (MARIN *et al.*, 2007).

Então, tendo em vista todos esses resultados, pesquisadores concluíram que a apoptose pode ser um fator importante para a susceptibilidade dos tumores em estágios iniciais, mas que tem um papel muito pequeno para a maioria dos tumores quanto à sensibilidade ao tratamento - já que durante o desenvolvimento, as células perdem seus mecanismos pró-apoptóticos. As células que não são sensíveis à apoptose, serão selecionadas, uma vez que as que fazem a apoptose serão eliminadas por esse processo (MARIN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2007; ROCK e KONO, 2008).

Quando o tratamento é baseado na emissão de doses fracionadas de radiação ionizante, ele explora todas essas diferenças de controle do metabolismo entre as células normais e cancerosas do corpo do paciente. Sob essas condições, o dano de cada uma das doses é relativamente baixo para as células normais, uma vez que é potencialmente curável pelo seu sistema de reparo. Na nossa abordagem experimental, não observamos situações características de câncer, por exemplo, células CD4⁺CD8⁺ que são comuns em alguns tipos de linfomas, porque a presença de DCs parece ter sido suficiente para eliminar células com esse fenótipo (<2%, Fig. 8) eventualmente apoptóticas ou com mecanismo de reparo desregulado. Já as células cancerosas, que não possuem esse mecanismo de reparo em bom funcionamento, ficam susceptíveis à morte mitótica. É nesse princípio que se baseia a maioria dos tratamentos com radioterapia anticâncer, que envolvem múltiplas doses fracionadas com 24 horas de intervalo entre elas (MARIN *et al.*, 2007).

Já está bem estabelecido que a eliminação de células apoptóticas e debris celulares provenientes de células tumorais, células infectadas, ou ainda, por células irradiadas; por fagócitos representa um meio evolutivamente conservado de prevenir a exposição do tecido circundante aos conteúdos celulares potencialmente citotóxicos, imunogênicos ou inflamatórios. A resolução da inflamação depende não só da remoção efetiva de células apoptóticas bem como da supressão ativa da produção de mediadores inflamatórios (HERRMANN *et al.*, 1998; ROCK e KONO, 2008). Estes e vários outros dados da literatura corroboram a nossa hipótese a partir dos dados em que detectamos produção de IL-10 e supressão ativa da produção de IL-12, que foram correlacionados com expressão de CD1a e inibição de proliferação nas culturas de

DCs com células apoptóticas. Nossos dados sugerem que as APO foram eliminadas de maneira eficiente, mesmo que parcial, pelos processos de reparo feito por iDCs.

Por outro lado, aberrações nestes mecanismos estão associadas com condições inflamatórias crônicas e doenças auto-imunes. Estudos em modelos animais tem começado a investigar algumas moléculas importantes na eliminação de material potencialmente antigênico da circulação, como DNase I (NAPIREI *et al.*, 2000), componente amilóide sérico P (SAP) (BICKERSTAFF *et al.*, 1999) e proteína C-reativa (CRP, DU CLOS *et al.*, 1994). Neste contexto, já foi relatada a fagocitose prejudicada de células apoptóticas por macrófagos no lúpus eritematoso sistêmico humano (LES) (HERRMANN *et al.*, 1998). Essa eliminação prejudicada de células apoptóticas, resultando num acúmulo de células em estágio tardio de apoptose ou necrose secundária, incluindo oligossomos e debris celulares, poderiam levar a uma ativação de linfócitos T autorreativos (VOLL *et al.*, 1997).

O processo de remoção de células é executado por uma ampla variedade de tipos celulares e envolve múltiplos receptores, incluindo receptores “scavenger”, receptores de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (ox-LDL), CD14, CD68, CD36, receptor de vitronectina, receptores de complemento, e receptor de fosfatidilserina (PSR), que interage com seus ligantes, como a fosfatidilserina (PS), expressa em células apoptóticas (SAVILL e FADOK, 2000).

Neste contexto, as células que estão passando pelo processo de apoptose, em uma fase inicial, expõem o lipídio fosfatidilserina (PS), em sua face externa e são opsonizadas por vários ligantes de PS que medeiam a captação dessas células “marcadas” para fagocitose pela interação com receptores de fagócitos através de suas integrinas e outros receptores “scavenger” (MAITI *et al.*, 2008, FRANZ *et al.*, 2007). Este processo de eliminação suprime as respostas inflamatórias e as reações imunes.

Se as células apoptóticas escapam da eliminação imediata, elas começam a formar pequenas protuberâncias (“blebs”), que eventualmente evoluem para corpúsculos apoptóticos e concomitantemente reduzem o volume celular. As células encolhidas ligam-se a ligantes adicionais como C1q ou outras proteínas adaptadoras, que medeiam uma segunda onda de eliminação para estas células que escaparam da fagocitose dependente de PS e ajudam a evitar a entrada de células apoptóticas em necrose secundária (BASU *et al.*, 2000; SOMERSAN *et al.*, 2001; FRANZ *et al.*, 2007).

As opsoninas ligadas às células apoptóticas são então reconhecidas por receptores de fagócitos como FcγRIIA, C1qR, CR1, CD91 e calreticulina. Células que morrem após grave impacto e células apoptóticas que não são eliminadas imediatamente sofrem necrose primária e secundária, respectivamente. Em contraste à apoptose, a necrose, especialmente a necrose primária, é pro-inflamatória e consequentemente, imunoestimuladora (FRANZ *et al.*, 2007).

Nosso modelo parece apontar para tipos de morte celular modulando diferencialmente o reconhecimento por DCs, levando a ativação ou modulação destas células. Assim, como as maneiras de se induzir apoptose também variam, seja pela indução de estresse por calor ou irradiação ou ambos, elas podem provocar a expressão de diferentes padrões moleculares nos corpos apoptóticos, padrões esses referidos como DAMPS por Kono e Rock (2008), em contraposição aos PAMPS de Janeway (1992), já citados. No modelo de Matzinger (1994), o evento crucial que controla o início de uma resposta imune não é infecção, mas a produção de sinais de perigo (DAMPS) de células estressadas, danificadas e/ou em processo de morte no tecido local. Assim, a presença de DAMPs ou PAMPS seriam as responsáveis pela ativação das DCs em nosso modelo, com aumento da produção de IL-12 e inibição de IL-10, fatores correlacionados com indução de linfoproliferação.

Já foi relatado um acúmulo de DCs e macrófagos infiltrantes na tireóide de pacientes com tireoidite auto-imune (NAKAMURA *et al.*, 2004). Entretanto, os autores não discutem o fenótipo destas DCs, se imaturas ou maduras. A presença de macrófagos sugere a imaturidade das células presentes. Entretanto, há uma enormidade de trabalhos que associam a presença de DCs a doenças auto-imunes (TRINCHIERI *et al.*, 1995; VOLL *et al.*, 1997; MANOUSSAKIS *et al.*, 2007).

Os nossos dados em que observamos um pequeno aumento da população CD4⁺CD8⁻ (Tabela 3 e Figuras 7 e 8) 48h após irradiação das CNAs em nosso modelo de estresse celular *in vitro*, se tornam particularmente interessantes quando se observa na literatura relatos de acúmulos de populações de linfócitos T duplo-negativos para CD4 e CD8 presentes no sangue periférico de pacientes portadores de Síndrome Auto-imune Linfoproliferativa (ALPS), aos quais está associada também uma deficiência na eliminação de células apoptóticas (Apud HUNDT *et al.*, 2002). Já foi relatada também presença de populações de linfócitos CD4⁺CD8^{+dim} no sítio tumoral de pacientes com síndrome de Sézary, um tipo raro de linfoma T (BAGOT *et al.*,

1998), e de macrófagos/DCs $CD4^+CD8^{+dim}$. No nosso modelo experimental, essas células estiveram presentes em baixa quantidade (<2%, fig. 8), mas sugerimos que, numa situação *in vivo*, em que as DCs sejam moduladas positivamente de forma que não tenham mais a capacidade de fagocitose, a eliminação desses linfócitos ficaria prejudicada, favorecendo a ocorrência de auto-imunidade ou o aparecimento de linfomas.

Em ambos os casos, a presença destes subtipos populacionais de linfócitos T aparentemente anormais, com fenótipo imaturo ou alterado, no sangue periférico de pacientes, indicam alterações no processo de regulação desses linfócitos T, seja por falha nos sistemas de eliminação durante o processo de seleção negativa no timo dos pacientes, no caso de pacientes com doenças auto-imunes ou imunodeficiências, no primeiro caso (HUNDT *et al.*, 2002) ou linfomas (BAGOT *et al.*, 1998). Dessa forma, essas alterações poderiam refletir um defeito *in vivo* nos processos de tolerância central, no primeiro caso; ou por interação de linfócitos T com o ambiente tumoral, no segundo caso (BAGOT *et al.*, 1998), refletindo deficiências nos mecanismos de tolerância periférica. É interessante observar que neste estudo (BAGOT *et al.*, 1998), os linfócitos T $CD4^+$ e $CD4^+CD8^+$ presentes no infiltrado cutâneo tumoral apresentaram também atividade citotóxica restrita à classe I do MHC, em contraste ao relatado na maioria dos trabalhos, em que a atividade citotóxica é restrita a MHC de classe I a células $CD8^+$ simples (BEVAN, 1976; ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1979; CRESSWELL, 1996; ; ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1997; CRESSWELL *et al.*, 1999; HEATH e CARBONE, 2001; ACKERMAN *et al.*, 2005).

Nakamura *et al.*, (2004), por sua vez, utilizaram amostras de pacientes com tireoidite auto-imune, demonstrando que a maioria dos monócitos/DCs sanguíneos são somente $CD4^+$, enquanto que nas biópsias de tireóide auto-imune, tanto na doença de Gravis quanto na tireoidite de Hashimoto, cerca de 60% dessas células mononucleares infiltrantes eram macrófagos/DCs, sem alteração na população $CD8^+$ simples. Estes dados indicam que, dependendo do tecido em que se encontram, células com mesmo fenótipo podem ter implicações e comportamentos diferentes, sugerindo que a interação dos linfócitos com o microambiente tecidual fora do timo, seja por interação com citocinas ou com outras células, como as tumorais, outros linfócitos ou com as próprias DCs, também é importante para o desenvolvimento de auto-reatividade ou tolerância periférica.

Mais do que isso, Manoussakis *et al.* (2007) recentemente correlacionaram a presença de IL-12, avaliada por imunohistoquímica, em glândulas salivares de pacientes de Síndrome de Sjögren, com a presença de macrófagos/DCs, aumento da glândula e risco de desenvolvimento de linfoma, confirmando nossos achados em que houve aumento de IL-12 nas coculturas de DCs maduras com linfócitos irradiados ou aquecidos e irradiados (Figura 20), e a possível presença de linfócitos CD4⁺CD8⁺ nas culturas de CNAs aquecidas e irradiadas (Figura 7).

Assim, nossos resultados sobre a alteração fenotípica e funcional de linfócitos *in vitro* poderiam fornecer uma explicação mecanística para doenças auto-imunes em que há um defeito na eliminação de células apoptóticas ou funcionalmente desreguladas. O favorecimento da maturação das DCs nesse caso, nem sempre poderia ser benéfica ao hospedeiro, sendo desejável a modulação, por exemplo, com células apoptóticas, como a que realizamos em nossos experimentos, para a obtenção de uma resposta menos inflamatória e, numa situação *in vivo*, provavelmente menos deletéria, ocorrendo no sentido de restabelecer um equilíbrio homeostático, o que se deseja que ocorra em situações de transplante e doenças auto-imunes, por exemplo.

No sentido de buscar uma explicação mecanística para os resultados obtidos, como já foi citado, procuramos detectar algumas citocinas que possuem importantes papéis na etiologia e patogênese de muitas doenças auto-imunes. A IL-12, por exemplo, sendo produzida primariamente por macrófagos e DCs, é uma citocina chave que liga as respostas imunes inatas às adaptativas, e também as respostas humorais às celulares de defesa imunológica do hospedeiro (TRINCHIERI *et al.*, 1995). Acredita-se que a captura de células apoptóticas por macrófagos, DCs e outros fagócitos suprima o desenvolvimento de respostas imunes através da liberação de IL-10, TGF- β , PAF e PGE-2, e inibição da produção de TNF- α , GM-CSF, IL-12, IL-1 β e IL-18 (VOLL *et al.*, 1997). Nossos achados estão de acordo com esses dados, em que houve produção de IL-10 e inibição de IL-12p70 na cocultura com células apoptóticas.

Entretanto, nossos resultados sugerem que esta inibição ocorra somente quando as DCs encontram-se num estado imaturo, uma vez que quando as DCs foram cocultivadas com HAPO simultaneamente à adição de TNF- α (portanto, consideradas maduras em nosso modelo), houve aumento significativo na produção de IL-12p70, e também foi observada uma tendência para produção dessa citocina no grupo de mDCs

tratadas com células somente irradiadas. Desse modo, propomos que o nosso sistema utilizando DCs maduras cocultivadas com linfócitos T autólogos aquecidos e irradiados pode ser um importante modelo para estudo de doenças auto-imunes humanas *in vitro*, como já relatado por Trembleau *et al.* (1995a e 1995b) e Leonard *et al.* (1997) em camundongos, nos quais a citocina IL-12 foi uma importante mediadora de auto-imunidade induzida por linfócitos T.

Especificamente, a administração de IL-12 exacerba os fenômenos auto-imunes induzindo a diferenciação de linfócitos T autorreativos (LEONARD *et al.*, 1997), onde a ausência de IL-12p40 nos camundongos geneticamente deficientes ou tratados com anticorpo anti-IL12 interrompeu doenças em modelos experimentais de auto-imunidade, como a diabetes dependente de insulina (IDDM) em camundongos NOD (ROTHER *et al.*, 1997), encefalite alérgica experimental (EAE) (LEONARD *et al.*, 1995), uveíte auto-imune experimental (EAU) (YOKOI *et al.*, 1997) e artrite induzida por colágeno (CIA) (McINTYRE *et al.*, 1996). Níveis aberrantes de IL-12 são produzidos por macrófagos isolados de camundongos jovens susceptíveis a LES (MRL e NZB/W) (LIU e BELLER, 2002). Em pacientes humanos com SLE, níveis elevados de IL-12 (ou IL-12p40) e IL-18 são observados (WONG *et al.*, 2000) e níveis séricos mais elevados de IL-12 estão correlacionados com febre, mas não com doenças renais (SPADARO *et al.*, 2002).

A modulação da resposta funcional induzida pelas DCs, verificada em nossas análises pelos ensaios de linfoproliferação autóloga e alogênica, parece estar correlacionada diretamente com a produção de citocinas detectadas em nossos ensaios, no 7º dia de cultura de DCs com os linfócitos estressados de diferentes maneiras. Assim, onde houve maior linfoproliferação, também foi detectado um aumento de IL-12p70 antes da realização do ensaio, sugerindo, de maneira semelhante ao demonstrado por Leonard *et al.* (1997), em seu modelo murino, que a presença de IL-12 é importante para a exacerbação da resposta de linfócitos T autorreativos. Propomos, com esses dados, que a citocina IL-12 seja utilizada como parâmetro de autorreatividade pela interação intercelular. Entretanto, os mecanismos intracelulares responsáveis pela aumento na produção e atuação da IL-12 ainda estão por ser elucidados.

Nesse sentido, Kim *et al.* (2004) verificaram elegantemente que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos inibiu a transcrição dos genes p35 e p40 de IL-

12 e investigaram os mecanismos pelos quais a interação entre fagócitos e células apoptóticas tiveram impacto na expressão desses genes. Eles demonstraram que o contato celular com células apoptóticas foi suficiente para induzir profunda inibição na produção de IL-12 por macrófagos ativados. Os autores sugeriram ainda que o lipídio fosfatidilserina (PS) poderia mimetizar o efeito inibitório, que não envolveu ações parácrinas ou autócrinas de IL-10 ou TGF- β . Adicionalmente, eles relataram a identificação, purificação e clonagem de um novo fator nuclear dedo de zinco, chamado por eles de proteína ligadora de GC (GC-BP), que foi induzido em seguida à fagocitose de células apoptóticas por macrófagos ou por tratamento com PS. GC-BP inibiu seletivamente a transcrição do gene p35 de IL-12 ligando-se ao seu promotor *in vivo* e *in vitro*, diminuindo assim a produção de IL-12. O bloqueio de GC-BP por RNA de interferência restaurou a transcrição de IL-12p35 e a secreção de IL-12p70. Além disso, GC-BP sofreu significativa autodesfosforilação de tirosina em resposta a células apoptóticas.

Nos experimentos em que houve inibição da resposta proliferativa na presença de DCs tratadas com células apoptóticas, alguns mecanismos poderiam ser sugeridos, como a indução de morte de linfócitos pelas DCs, a geração de linfócitos T reguladores ou simplesmente a indução de anergia, todas formas reconhecidas como indutoras de tolerância ou DCs tolerogênicas (SHEVACH, 2002; STEINMAN *et al.*, 2003; DAVIDSON *et al.*, 2007). Entretanto, mesmo nos grupos em que houve aumento de proliferação, embora não significativa, é possível especular que houvesse geração *in vitro* de linfócitos T reguladores, uma vez que nem todos os linfócitos proliferaram com a mesma intensidade, como se pôde verificar nos gráficos das figuras 14 e 15. Estes linfócitos reguladores são caracterizados pela expressão do fator de transcrição FOXP3 (FONTENOT *et al.*, 2003).

As principais aplicações de FOXP3 na imunologia humana requerem o uso de reagentes marcados diretamente. Estes têm estado disponíveis comercialmente por um tempo limitado, e os usuários têm experimentado dificuldades em aplicá-los consistentemente, levando a variações interlaboratoriais nos resultados (ZOLLA *et al.*, 2007). Bons reagentes estão agora disponíveis a partir de vários fornecedores, embora o uso cuidadoso dos protocolos ainda seja importante. No caso de FOXP3, a abordagem alternativa para identificar Tregs é a amplamente utilizada co-expressão de CD25 com CD4. Entretanto, a expressão de CD25 é induzida por vários estímulos

(ROBB *et al.*, 1981) e é portanto, não restrita a Tregs. A expressão de CD25 detectada em linfócitos T não estimulados provenientes do sangue periférico varia com o protocolo de marcação e o anticorpo utilizado (ZOLA *et al.*, 1989a; JACKSON *et al.*, 1990). CD127 apresenta sua expressão diminuída em Tregs (LIU *et al.*, 2006; SEDDIKI *et al.*, 2006), fornecendo um marcador para melhor identificação e isolamento de Treg (BANHAM, 2006). De maneira interessante, a citocina IL-7 também tem sido descrita como um fator de sobrevivência para Tregs em um modelo murino (HARNAHA *et al.*, 2006), o que torna a situação provavelmente mais complexa.

Considerando-se que a maioria dos tumores aparece na idade senil, quando há um acúmulo de lesões oxidativas causado por acúmulo de radicais livres nos meios intra- e -extracelular, nossos dados se juntam ao crescente número de trabalhos na literatura científica relacionados com o envelhecimento celular e imunossupressão sistêmica causada por tumores. Basta observar com atenção a extensa literatura sobre indivíduos que foram expostos à irradiação por tempo consideravelmente prolongado, ou a altas doses, como os indivíduos envolvidos no acidente com a cápsula de ^{137}Cs , em Goiânia, Go (1987), os indivíduos no acidente radioativo de Chernobil ou os japoneses e descendentes que sofreram diretamente os efeitos nocivos da bomba de Hiroshima.

Assim, cremos que com a irradiação *in vitro* conseguimos adiantar muitos dos processos ultramicroscópicos de envelhecimento celular, cujos efeitos seriam observados somente com o passar dos anos de vida, quando os efeitos seriam visíveis somente em nível macroscópico, o que dificultaria (e dificulta) nosso trabalho, pois nesse momento, poderia já ser tarde demais para uma tentativa de intervenção imunológica.

O aumento de CD1a pelas DCs, observado em nossas condições de estresse por irradiação, faria com que as iDCs permanecessem mais tempo em seu estado imaturo, gerando uma maior quantidade ou funcionalidade de células reguladoras (linfócitos Treg $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$), com conseqüente aumento de secreção de IL-10 no microambiente, que ajudariam a regular a resposta e os excessos prejudiciais de uma lesão oxidativa extensa. Entretanto, esse limite desconhecido a que nos referimos anteriormente pode ser tênue a ponto de alterar o padrão de resposta, uma vez superado. Com a conseqüente subversão da resposta, atingido esse limiar de ativação

e o aumento de maturação das DCs na presença de estímulos pró-inflamatórios, como as citocinas TNF- α e IL-12, concomitante à presença de outros sinais de perigo autólogos não infecciosos como os DAMPs, as DCs teriam impedido o aumento da expressão de CD1a em sua superfície, induzindo um padrão de resposta mais destrutivo que protetor. Em outras palavras, o padrão de resposta destrutivo seria interessante quando se pensa em uma célula infectada por qualquer espécie de patógeno, ou quando se tem uma célula tumoral, que também pode expor antígenos próprios, porém alterados. Nenhum dos dois casos é interessante para o restante do grupo de células. Entretanto, qual seria esse o limite? O que faz com que as células de um mesmo indivíduo expostas a suas próprias células, em um determinado momento são ignoradas, em outro momento passam a responder de forma destrutiva contra suas companheiras?

Se estamos próximos ou longe de alcançar este limite desconhecido, não sabemos. Isso, contudo, não nos desanima. Sabemos, entretanto, que precisamos continuar investigando e procurando o “cálice sagrado” (The Holy Grail) se não para satisfazer nossa curiosidade científica, ao menos, interpretá-lo corretamente, e entendê-lo, de forma a contribuir num futuro, quiçá breve, para a diminuição do sofrimento humano.

Os modelos de doenças auto-imunes (Lúpus Eritematoso Sistêmico, tireoidite auto-imune), Imunodeficiências (ALPS) e câncer (Síndrome de Sézary ou linfoma T) aqui discutidos fornecem bases para o desenvolvimento de métodos para o estudo dos mecanismos envolvidos na etiopatogênese dessas doenças na ausência de um agente infeccioso conhecido.

Este trabalho parece apontar também para um mecanismo comum entre esses diversos tipos de doenças, o que pode suscitar mudanças ou no mínimo revisão de nossos “pré-conceitos” dogmáticos sobre a Fisiologia do Sistema Imune e Imunopatologia.

Os resultados deste trabalho poderiam fornecer também uma alternativa ao estudo de pacientes sem que haja comprometimento destes, em caso de dificuldade de retirada de sangue ou de timo de pacientes hospitalizados, por exemplo, abrindo novos horizontes para pesquisa e desenvolvimento de novas imunoterapias neste campo tão desafiador e instigante.

Em relação aos mecanismos, ressaltamos e propomos que pode haver um mecanismo comum, até então desconhecido, de desregulação do sistema imune, particularmente dos linfócitos T, que poderia ser mediado por metabolismo oxidativo alterado ou em excesso (induzido por irradiação, por exemplo), e que simularia o acúmulo de radicais livres que acontece na senescência, quando o surgimento de tumores é favorecido na maior parte da população idosa.

Há vários candidatos possíveis para esse mecanismo, mas todos, em maior ou menor grau, parecem envolver alterações no sistema de reparo, realizado principalmente pela proteína p53, de mutações e/ou outras alterações de DNA (como as induzidas com a metodologia que utilizamos). Concomitantemente às alterações no sistema de reparo de DNA, outras moléculas também poderiam estar sujeitas a deficiências no reparo subcelular. Lipídios de membrana plasmática, nuclear ou de retículo endoplasmático, por exemplo, podem sofrer peroxidação lipídica (alteração celular difícil de ser reparada e que pode levar à morte celular) com conseqüente exposição de conteúdo lipídico, como a fosfatidilserina, de forma anormal na membrana externa. O aumento de lipídios próprios na superfície de linfócitos apoptóticos, até um certo limite desconhecido, mas considerado homeostático, poderia sinalizar as células dendríticas imaturas para reconhecimento e fagocitose dessas células apoptóticas, favorecendo a manutenção da integridade do sistema.

Se por um lado, a proteína p53 é considerada uma proteína “supressora” de tumores ou de reparo celular, podemos sugerir, pelos resultados apresentados, que as DCs também atuam como um mecanismo de reparo intercelular, pelo contato com outras células como os linfócitos, e até extracelular, pela produção de citocinas que atuam nas células-alvo vizinhas ou à distância, patrulhando o organismo ou o ambiente tecidual em que se encontra, para a detecção de perigo, seja ele endógeno ou exógeno, e desencadeamento de mecanismos para eliminação dessa ameaça em potencial. A busca por lipídios que poderiam estar envolvidos nesta resposta, induzindo uma resposta tolerogênica pela interação de DCs CD1a⁺ com linfócitos T CD1-restritos, além de PS utilizada para detecção de células apoptóticas, merece uma investigação mais detalhada.

7 CONCLUSÕES

- Populações de linfócitos irradiados *in vitro* (37i) apresentaram taxa média de apoptose > 80%, enquanto que as populações de linfócitos aquecidos e irradiados *in vitro* (43i), apresentaram taxa média de apoptose equivalente à metade da apresentada pelas 37i, aproximadamente 40%;

- O fenótipo de iDCs HLA-DR⁺CD11c⁺CD14⁻ derivadas de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis foi caracterizado pela expressão de baixos níveis de CD86, CD83 e CD80, ao passo que o fenótipo de mDCs HLA-DR⁺CD11c⁺CD14⁻ derivadas de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis foi caracterizado pela expressão de níveis elevados de CD86, CD83 e CD80.

- Linfócitos 37i, com características de células apoptóticas, induzem fenótipo modulador em iDCs, induzindo aumento de IL-10 e inibição de IL-12p70 na cocultura com iDCs e inibição de linfoproliferação na cocultura com linfócitos autólogos viáveis, ao passo que linfócitos 43i, com características de células apoptóticas estressadas, induzem aumento de IL-12p70 na cocultura com mDCs e linfoestimulação na cocultura com linfócitos autólogos e alogênicos viáveis.

- Todas as DCs estudadas, na presença ou ausência dos diferentes estímulos (TNF- α , 37i/APO ou 43i/HAPO) expressaram CD1a, que foi diferencialmente modulada por esses estímulos.

- iDCs tratadas com 37i/APO apresentaram níveis mais elevados de CD1a do que os outros grupos, correlacionados com níveis elevados de IL-10 e inibição de linfoproliferação, enquanto que mDCs tratadas com 43i/HAPO apresentaram níveis elevados de CD86, correlacionados com níveis elevados de IL-12p70 e alta linfoestimulação alogênica.

- Nossos dados sugerem um modelo diferencial de modulação funcional e fenotípica de DCs imaturas e maduras na presença de linfócitos aquecidos e ou irradiados *in vitro*, mediada por uma complexa rede de moléculas de superfície e secretadas, que parece ser dependente da interação com lipídios próprios de membrana e independente de um agente infeccioso conhecido. Assim, este trabalho fornece contribuições para estudos mecanísticos, da interação dessas células com outras *in vitro*, podendo ser eventualmente manipuladas para a regulação positiva ou

negativa da resposta imune *in vitro*, com aplicações potenciais *in vivo*, na saúde e na doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ACKERMAN, A. L.; KYRITSI, C.; TAMPE, R.; CRESSWELL, P. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 107-113, 2005.

AMIOT, M.; DASTOT, H.; SCHMID, M.; BERNARD, A.; BOUMSELL, L. Analysis of CD1 molecules on thymus cells and leukemic T lymphoblasts identifies discrete phenotypes and reveals that CD1 intermolecular complexes are observed only on normal cells. **Blood**, v. 70, 3, p. 676-85, 1987.

BAGOT, M.; ECHCHAKIR, H.; MAMI-CHOUAIB, F.; DELFAU-LARUE, M. H.; CHARUE, D.; BERNHEIM, A.; CHOUAIB, S.; BOUMSELL, L.; BENSUSSAN, A. Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4⁺ and CD4⁺CD8^{dim+} T-cell clones infiltrating a cutaneous T-cell lymphoma. **Blood**, v. 1;91(11), p. 4331-4341, 1998.

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

BANHAM, A. H. Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3⁺ regulatory T cells. **Trends Immunol.**, v. 27, p. 541-5, 2006.

BARBUTO, J. A. M.; ENSINA, L. F.; NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; MARQUES, R.; LEITE, K. R. M.; CÂMARA-LOPES, L. H.; BUZAID, A. C. Dendritic-tumor hybrid cell therapeutic vaccination for metastatic melanoma and renal cell carcinoma patients. **Canc Det & Prev online**. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PREDICTIVE ONCOLOGY AND INTERVENTION STRATEGIES, Feb 2002, Paris, France. Disponível em: <<http://www.cancerprev.org/Journal/Issues/26/101/1011/4579>>. Acesso em: 06 ago. 2003.

BARBUTO, J. A.; ENSINA, L. F. C; NEVES, A. R; BERGAMI-SANTOS, P. C.; LEITE, K. R.; MARQUES, R.; COSTA, F.; MARTINS, S. C.; CÂMARA-LOPES, L. H.; BUZAID, A. C. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, 12, p. 1111-8, 2004.

BASU, S.; BINDER, R. J.; SUTO, R.; ANDERSON, K. M.; SRIVASTAVA, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. **Int. Immunol.**, v. 12, p. 1539-1546, 2000.

BEVAN, M. J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. **J. Exp. Med.**, v. 143, p. 1283-88, 1976.

*De acordo com:

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

- BICKERSTAFF, M. C.; BOTTO M.; HUTCHINSON, W. L.; HERBERT, J.; TENNENT, G. A.; BYBEE, A.; MITCHELL, D. A.; COOK, H. T.; BUTLER, P. J.; WALPORT, M. J.; PEPYS, M. B. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. **Nat Med.**, v. 5(6), p. 694-697, 1999.
- BIRBECK, M. S.; BREATHNACH, A. S.; EVERALL, J. D. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. **J. Invest. Dermatol.**, v. 37, p. 51-63, 1961.
- BONIFAZ, L.; BONYWAY, D.; MANHKE, K.; RIVERA, M.; NUSSENZWEIG, M. C.; STEINMAN, R. M. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 1627-38, 2002.
- BOUNEAUD, C.; KOURISKY, P.; BOUSSO, P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. **Immunity**, v. 13, p. 829-40, 2000.
- BURDIN, N; KRONENBERG, M. CD1-mediated immune responses to glycolipids. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 326-311, 1999.
- BRIGL, M; BRENNER, B. M. CD1: Antigen presentation and T cell function. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 817-90, 2004.
- BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Prog. Exp. Tumor Res.**, v. 13, p. 1-27, 1970.
- CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR C, T.; CAMARGO J. L. V.; DONADI, E. A. HLA-G polymorphism and transitional cell carcinoma of the bladder in a Brazilian population. **Tissue Antigens**, v. 72(2), p. 149-157, 2008.
- CHAPUIS, F.; ROSENZWAJG, M.; YAGELLO, M.; EKMAN, M.; BIBERFELD, P.; GLUCKMAN, J. C. Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*. **Eur. J. Immunol.**, v. 27, p. 431-441, 1997.
- CHEN, B. G.; SHI, Y; SMITH, J. D.; CHOI, D; GEIGER, J. D.; MULÉ J. J. The role of tumor necrosis factor α in modulating the quantity of peripheral blood-derived, cytokine-driven human dendritic cells and its role in enhancing the quality of dendritic cell function in presenting soluble antigens to CD4⁺ T cells *in vitro*. **Blood**, v. 91, p. 4652-61, 1998.
- CHEN, C. J.; KONO H.; GOLENBOCK D.; REED G.; AKIRA S.; ROCK K. L. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. **Nat. Med.**, v. 13(7), p. 851-856, 2007.
- COVENTRY, B.; HEINZEL, S. CD1a in human cancers: a new role for an old molecule. **Trends Immunol.**, v. 25, 5, p. 242-48, 2004.
- CRESSWELL, P.; BANGIA, N.; DICK, T.; DIEDRICH, G. The nature of the MHC class I peptide complex. **Immunol. Rev.**, v. 172, p. 21-28, 1999.
- CRESSWELL, P. Invariant chain structure and MHC class II function. **Cell**, v. 84, p. 505-7, 1996.

DARZYNKIEWICZ, Z.; HUANG, X. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. **Curr. Protoc. Immunol.**, v. 5, p. 5-7, 2004.

DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry**, v. 27(1), p. 1-20, 1997. Revisão.

DAVIDSON, T. S.; DiPAOLO, R. J.; ANDERSSON, J.; SHEVACH, E. M. Cutting edge: IL-2 is essential for TGF- β -mediated induction of Foxp3⁺ T regulatory cells. **J. Immunol.**, v. 178, p. 4022-4026, 2007.

DEL PRETE, A.; ZACCAGNINO, P.; DI PAOLA, M.; SALTARELLA, M.; CELIS, C. O.; NICO, B.; SANTORO, G.; LORUSSO, M. Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 44, p. 1443-1451, 2008.

DEVITT, A.; MOFFATT, O. D.; RAYKUNDALIA, C.; CAPRA, J. D.; SIMMONS, D. L.; GREGORY, C. D. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. **Nature**, v. 392, p. 505-509, 1998.

DU CLOS, T. W.; ZLOCK, L. T.; HICKS, P. S.; MOLD, C. Decreased autoantibody levels and enhanced survival of (NZB x NZW) F1 mice treated with C-reactive protein. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 70(1), p. 22-27, 1994.

ENGERING, A.; GEIJTENBEEK, T. B.; VAN KOOYK, Y. Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 480-485, 2002.

ENGERING, A.; GEIJTENBEEK, T. B.; VAN VLIET, S. J.; WIJERS, M.; VAN LIEMPT, E.; DEMAUREX, N.; LANZAVECCHIA, A.; FRANSEN, J.; FIGDOR, C. G.; PIGUET, V.; VAN KOOYK, Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. **J. Immunol.**, v. 168, p. 2118-2126, 2002.

ENGERING, A.; VAN VLIET, S. J.; GEIJTENBEEK, T. B.; VAN KOOYK, Y. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. **Blood**, v. 100, p. 1780-1786, 2002.

FENG, H.; ZENG, Y.; GRANER, M. W.; KATSANIS, E. Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. **Blood**, v. 97, p. 3505-3512, 2001.

FENG, H.; ZENG, Y.; GRANER, M. W.; KATSANIS, E. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. **Blood**, v. 100, p. 4108-15, 2002.

FENG, H.; ZENG, Y.; GRANER, M. W.; KATSANIS, E.; LIKHACHEVA, M.; KATSANIS, E. Exogenous stress proteins enhance the immunogenicity of apoptotic tumor cells and stimulate antitumor immunity. **Blood**, v. 101, p. 245-52, 2003.

FEURSTEIN, B.; BERGER, T. G.; MACZEK, C.; RODER, C.; SCHEINER, D.; HIRSCH, U.; HAENDLE, I.; LEISGANG, W.; GLASER, A.; KUSS, O.; DIEPGEN, T. L.; SCHULER, G.; SCHULER-THURNER, B. A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use. **J. Immunol. Methods.**, v. 245, p. 15-29.

FINKELMAN, F. D.; LEES, A.; BIRNBAUM, R.; GAUSE, W. C.; MORRIS, S. C. Dendritic cells can present Ag *in vivo* in a tolerogenic or immunogenic form. **J. Immunol.**, v. 157, p. 1406-14, 1996.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 330-336, 2003.

FRANZ, S.; HERRMANN, K.; FÜRNRÖHR, B. G.; SHERIFF, A.; FREY, B.; GAUPL, U. S.; VOLL, R. E.; KALDEN, J. R.; JÄCK, H. M.; HERRMANN, M. After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. **Cell Death Differ.**, v. 14, 4, p. 733-42, 2007.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B. P.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; MELLO, F. G.; dos REIS, G. A.; LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v. 403, p. 199-203, 2000.

GALLUCCI, S.; LOLKEMA, M.; MATZINGER, P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 5(11), p. 1249-55, 1999.

GALLUCCI, S.; MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, p. 114-9, 2001.

EGINAT, J.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 1711-1719, 2001.

GEISSMANN, F.; PROST, C.; MONNET, J. P.; DY, M.; BROUSSE, N.; HERMINE, O. Transforming growth factor beta 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 961-966, 1998.

GORCZYCA, W.; MELAMED, M. R.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of Apoptosis by Flow Cytometry. In: JAROSSESKI, M. J.; HELLER, R. **Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols**. Totwa, NJ: Ed. Humana Press, 1997. v. 91, p. 217-237.

GORCZYCA, W. Cytometric analyses to distinguish death processes. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 6(1), 17-19, 1999. Revisão.

GROUARD, G.; RISSOAN, M.C.; FILGUEIRA, L.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J.; LIU, Y.J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 1101-1111, 1997.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 621-67, 2002.

HARNAHA, J.; MACHEN, J.; WRIGHT, M.; LAKOMY, R.; STYCHE, A.; TRUCCO, M.; MAKAROUN, S.; GIANNOUKAKIS, N. Interleukin-7 is a survival factor for CD4+CD25+ T cells and is expressed by diabetes-suppressive dendritic cells. **Diabetes**, v. 55, p. 158-164, 2006.

HAWIGER, D.; INABA, K.; GUO, M.; MAHNKE, K.; RIVERA, M.; RAVETCH, J. V.; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. DCs induce peripheral T cells

unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 769-79, 2001.

HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 47-69, 2001.

HERRMANN, M.; VOLL, R. E.; ZOLLER, O. M.; HAGENHOFER, M.; PONNER, B. B.; KALDEN, J. R. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v.41(7), p. 1241-1250, 1998.

HO, L.; GREENE, C. L.; SCHMIDT, A. W.; HUANG, L. H. Cultivation of HEK 293 cell line and production of a member of the superfamily of G-protein coupled receptors for drug discovery applications using a highly efficient novel bioreactor. **Cytotechnology**, v. 45, p. 117-123, 2004.

HOREWICZ, V.; CARMO, J. P. M.; BARBUTO, J. A. M.; CURY, P. R. The effect of *Prevotella intermedia* lysates on dendritic cell phenotype and function *in vitro*. **J. Periodontal Res**, 2008. In press.

HUNDT, M.; POSOVSZKY, C.; SCHMIDT, R. E. A new disorder of lymphocyte apoptosis: combination of autoimmunity, infectious lymphadenopathy, double negative T cells, and impaired activation-induced cell death. **Immunobiology**, v. 206, 5, p. 514-8, 2002.

IP, W.; LAU, Y. Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases. **J. Immunol.**, v. 173, p. 189-196, 2004.

JACKSON, A. L.; MATSUMOTO, H.; JANSZEN, M.; MAINO, V.; BLIDY, A.; SHYE, S.; Restricted expression of p55 interleukin 2 receptor (CD25) on normal T cells. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 54, p. 126-132, 1990.

JANEWAY, C. A. JR. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Imunol Today**, v. 13, p. 11-16, 1992.

JANEWAY, C. A. JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197-216, 2002. Revisão.

JARROSSAY, D.; NAPOLITANI, G.; COLONNA, M.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 3388-3393, 2001.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; STEINBRIK, K.; ENK, A. H. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. **Trends Immunol.**, v. 22, p. 394-400, 2001.

KADOWAKI, N. Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. **Allerg. Int.**, v. 56, p. 193-199, 2007.

KAMATH, A. T.; POOLEY, J.; O'KEEFE, M. A. The development, maturation and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. **J. Immunol.**, v. 165, p. 6762-70, 2000.

KASHIHARA, M.; UEDA, M.; HORIGUCHI, M.; FURUKAWA, F.; HANAOKA, M.; IMAMURA, S. A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 87, p. 602-607, 1986.

KAWASHIMA, T.; NOROSE, Y.; WATANABE, Y.; ENOMOTO, Y.; NAROZAKI, H.; WATARI, E.; TANAKA, S.; TAKAHASHI, H.; YANO, I.; BRENNER, M. B.; SUGITA, M. Cutting edge: major CD8 T cell response in live bacillus Calmette-Guérin is mediated by CD1 molecules. **J. Immunol.**, v. 170, p. 5345-8, 2003.

KIEWSKY, B.; KLEIN, L. A central role for central tolerance. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 571-606, 2006. Revisão.

KIM, S.; ELKON, K. B.; MA, X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. **Immunity.**, v. 21(5), p. 643-653, 2004.

KONO, H.; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 279-289, 2008. Revisão.

KRUISBEEK, V. J.; AMSEN, D. Mechanisms underlying T cell tolerance. **Curr. Opin. Immunol.**; v. 6, p. 348-54, 1996.

LANGENKAMP A.; MESSI M.; LANZAVECCHIA A.; SALLUSTO F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nat. Immunol.**, v. 1(4), p. 311-316, 2000.

LANGERHANS, P. Uber die Nerven der menschlichen Haut. **Virchows Arch. Pathol. Anat. Histol.**, v. 44, p. 325-338, 1868.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, v. 1, 179 4, p. 1109-18, 1994.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Regulation of T cell Immunity by dendritic cells. **Cell**, v. 106, p. 263-266, 2001a.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineage, plasticity and kinetics. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, p. 291-8, 2001b.

LEONARD, J. P.; WALDBURGER, K. E.; GOLDMAN, S. J. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. **J. Exp. Med.**, v. 1;181(1), p. 381-386, 1995.

LEONARD, J. P.; WALDBURGER, K. E.; SCHAUB, R. G.; SMITH, T.; HEWSON, A. K.; CUZNER, M. L.; GOLDMAN, S. J. Regulation of the inflammatory response in animal models of multiple sclerosis by interleukin-12. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 17(5-6), p. 545-553, 1997.

LINGNAU, M.; HÖFLICH, C.; VOLK, HD.; SABAT, R.; DÖCKE, W. D. Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes. **Hum. Immunol.**, v. 68, 9, p. 730-8, 2007.

LIU, J.; BELLER, D. Aberrant production of IL-12 by macrophages from several autoimmune-prone mouse strains is characterized by intrinsic and unique patterns of NF-

kappa B expression and binding to the IL-12 p40 promoter. **J. Immunol.**, v. 1;169(1), p. 581-586, 2002.

LIU, K.; IYODA, T.; SATERNUS, M.; KIMURA, Y.; INABA, K.; STEINMAN, R. M. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells *in situ*. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 1091-97, 2002.

LIU, Y. J.; KANZLER, H.; SOUMELIS, V.; GILLIET, M. Dendritic cells lineage, plasticity and cross-regulation. **Nature**, v. 196, p. 1091-97, 2001.

LIU, W.; PUTNAM, A. L.; XU-YU, Z.; SZOT, G. L.; LEE, M. R.; ZHU, S.; GOTTLIEB, P. A.; KAPRANOV, P.; GINGERAS, T. R.; de St GROTH, B. F.; CLAYBERGER, C.; SOPER, D. M.; ZIEGLER, S. F.; BLUESTONE, J. A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 1701-1708, 2006.

LUTZ, M.; SCHULER, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? **Trends Immunol.**, v. 23, 9, p. 445-449, 2002.

MACKENSEN, A.; HERBST, B.; KÖHLER, G.; WOLFF-VORBECK, G.; ROSENTHAL, F. M.; VEELKEN, H.; KULMBURG, P.; SCHAEFER, H. E.; MERTELSMANN, R.; LINDEMANN, A. Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitor cells *in vitro*. **Blood**, v. 86(7), p. 2699-2707, 1995.

MAHNKE, K.; SHMITT, E.; BONIFAZ, L.; HENK, A.; JONULEIT, H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. **Immunol. Cell Biol.**, v. 80, p. 477-83, 2002.

MAITI, S. N.; BALASUBRAMANIAN, K.; RAMOTH, J. A.; SCHROIT, A. J. Beta-2-glycoprotein 1-dependent macrophage uptake of apoptotic cells. Binding to lipoprotein-receptor-related protein receptor family members. **J. Biol. Chem.**, v. 283, 7, p. 3761-6, 2008.

MANOUSSAKIS, M. N.; BOIU, S.; KORKOLOPOULOU, P.; KAPSOGEOURGOU, E. K.; KAVANTZAS, N.; ZIAKAS, P.; PATSOURIS, E.; MOUTSOPOULOS, H. M. Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjögren's syndrome: correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development. **Arthritis Rheum.**, v. 56(12), p. 3977-3988, 2007.

MARIN, C.; HILLESHEIM, E.; ECCO, G.; MONTEIRO, P.; GRANUCCI, N. **Radioterapia**. Disponível em: <<http://www.biofisica.ufsc.br/index.jsp?page=arquivos/radioterapia.htm>>. Acesso em: 21 mar. 2007.

MARTIN, E.; O'SULLIVAN, B.; LOW, P.; THOMAS, R. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting Interleukin-10. **Immunity**, v. 18, p. 155-67, 2003.

MASSÉ, D.; EBSTEIN, F.; BOUGRAS, G.; HARB, J.; MEFLAH, K.; GRÉGOIRE M. Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy. **Int. J. Cancer**, v. 111, p. 575-83, 2004.

MASON, D. e POWRIE, F. Control of immune pathology by regulatory T cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, p. 649-55, 2001.

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

McINTYRE, K. W.; SHUSTER, D. J.; GILLOOLY, K. M.; WARRIER, R. R.; CONNAUGHTON, S. E.; HALL, L. B.; ARP, L. H.; GATELY, M. K.; MAGRAM, J. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 26(12), p. 2933-2938, 1996.

MEDAWAR, P. B. **Memoirs of a Thinking Radish: An Autobiography**. Oxford University Press, Oxford, 1986.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. JR. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296(5566), p. 298-300, 2002.

MELLMAN, I. Antigen processing and presentation by dendritic cells: cell biological mechanisms. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 560, p. 63-67, 2005.

MIRAKIAN, R.; NYE, K.; PALAZZO, F. F.; GOODE, A. W.; HAMMOND, L. J. Methods for detecting apoptosis in thyroid diseases. **J. Immunol. Methods**, v. 265, p. 161-175, 2002.

MIRANDA, A.; AMADEU, T. P.; SCHUELER, G.; ALVARENGA, F. B.; DUPPRÉ, N.; FERREIRA, H.; NERY, J. A.; SARNO, E. N. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. **Histopathology**, v. 51, 5, p. 649-56, 2007.

MOHAMADZADEH, M.; BERARD, F.; ESSERT, G. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 1013-1020, 2001.

MOLENKAMP, B. G.; VUYLSTEKE, R. J.; VAN LEEUWEN, P. A.; MEIJER, S.; VOS W.; WIJNANDS, P. G.; SCHEPER, R. J.; DE GRUIJL, T. D. Matched skin and sentinel lymph node samples of melanoma patients reveal exclusive migration of mature dendritic cells. **Am. J. Pathol.**, v. 167(5), p. 1301-1307, 2005.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 4ª Ed. Editora Atheneu, São Paulo, SP, 1999.

MOODY, D. B.; ZAJONC, D. M.; WILSON, I. A. Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 387-400, 2005.

MORRISON, III R. S.; CRUSE, J. M.; WANG, H.; LEWIS, R. E. Dendritic cell differentiation and proliferation: enhancement by tumor necrosis factor- α . **Exp. Mol. Pathol.**, v. 75, p. 228-237, 2003.

MURAILLE, E.; LEO, O. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. **Scand. J. Immunol.**, v. 47, 1, p. 1-9, 1998.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, M.; MATSUZUKA, F.; MARUOKA, H.; MIYAUCHI, A.; IWATANI, Y. Intrathyroidal CD4⁺ T lymphocytes express high levels of Fas and CD4⁺ CD8⁺ macrophages/dendritic cells express Fas ligand in autoimmune thyroid disease. **Thyroid**, v. 14(10), p. 819-824, 2004.

NAPIREI, M.; KARSUNKY, H.; ZEVNIK, B.; STEPHAN, H.; MANNHERZ, H. G.; MÖRÖY, T. Features of systemic lupus erythematosus in DNase1-deficient mice. **Nat. Genet.**, v. 25(2), p. 177-181, 2000.

NEVES, A. R. **Estudo da diferenciação *in vitro* de células dendríticas derivadas de monócitos sanguíneos: análise dos efeitos de diferentes condições de cultura na geração e no fenótipo funcional imunestimulador destas células.** Dissertação - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NEVES A. R.; ENSINA L. F. C; ANSELMO L. B.; LEITE K. R. M; CÂMARA-LOPES L. H.; BARBUTO J. A. M. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumour cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 54, 1, p. 61-6, 2005.

NICOLETTI I.; MIGLIORATI G.; PAGLIACCI A.; GRIGNANI F.; RICCARDI C. A rapid and single method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v. 139, p. 271-279, 1991.

NOESSNER E.; GASTPAR R.; MILANI V.; BRANDL A.; HUTZLER P. J.; KUPPNER M. C.; ROOS M.; KREMMER E.; ASEA A.; CALDERWWOD S. K.; ISSELS R. D. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 169, 10, p. 5424-32, 2002.

NORBURY C. C.; CHAMBERS B. J.; PRESCOTT A. R.; LJUNGGREN H. G.; WATTS C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble Ag by bone-marrow derived dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 27, 280-88, 1997.

O'DOHERTY, U.; PENG, M., GEZELTER, S., SWIGGARD, W. J., BETJES, M., BHARDWAJ N., STEINMAN R. M. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. **Immunol.**, v. 82, p. 487-493, 1994.

OHASHI P. S.; OEHEN S.; BUERKI K.; PIRCHER H.; OHASHI C. T. Ablation of T cell "tolerance" and induction of diabetes by viral infection in viral antigen transgenic mice. **Cell**, v.65, p. 305-317, 1991.

OHL, L.; MOHAUPT, M.; CZELOTH, N.; HINTZEN, G.; KIAFARD, Z.; ZWIRNER, J.; BLANKENSTEIN, T.; HENNING, G.; FORSTER, R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity**, v. 21, p. 279-288, 2004.

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

PENN, I. Principles of tumor immunity: immunocompetence and cancer. In: **Biologic therapy of cancer**. Ed De Vita VT Jr, Hellman S & Rosenberg ST. Philadelphia. p. 53-66, 1991.

PORCELLI, S. A.; MODLIN, R. L. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 297-329, 1999.
Revisão.

POZAROWSKI P.; DARZYNKIEWICZ Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods Mol. Biol.**, v. 281, p. 301-11, 2004.

ROBB R. J.; MUNCK A.; SMITH K. A. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity and biological relevance. **J. Exp. Med.**, v. 154, p. 1455-1461, 1981.

ROBBINS, S. L.; FAUSTO, N. V.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. 580p., 2003.

ROBINSON, S. P.; PATTERSON, S.; ENGLISH, N.; DAVIES, D.; KNIGHT, S. C.; REID, C. D. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 2769-78, 1999.

ROCK, K. L.; KONO, H. The Inflammatory Response to Cell Death. **Annu. Rev. Pathol.: Mechanisms of Disease**, v. 3, p. 99-126, 2008.

RONCAROLO, M. G.; LEVINGS, M. K.; TRAVERSARI, C. Differentiation of T regulatory cells by immature DCs. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 5-9, 2000.

RONCHETTI, A.; ROVERE, P.; IEZZI, G.; GALATI, G.; HELTAI, S.; PROTTI, M. P.; GARANCINI, M. P.; MANFREDI, A. A.; RUGARLI, C.; BELLONE, M. Immunogenicity of apoptotic cells *in vivo*: role of antigen load, antigen presenting cells and cytokines. **J. Immunol.**, v. 163, p. 130-36, 1999.

ROTHER, H.; O'HARA, R. M. JR.; MARTIN, S.; KOLB, H. Suppression of cyclophosphamide induced diabetes development and pancreatic Th1 reactivity in NOD mice treated with the interleukin (IL)-12 antagonist IL-12(p40)2. **Diabetologia**, v. 40(6), p. 641-646, 1997.

SALLUSTO, F.; CELLA, M.; DANIELI, C.; LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 389-400, 1994.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. **Immunol. Rev.**, v. 177, p. 134-140, 2000.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Exploring pathways for memory T cell generation. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 805-6, 2001.

SALLUSTO, F.; PALERMO, B.; LENIG, D.; MIETTINEN, M.; MATIKAINEN, S.; JULKUNEN, I. *et al.*. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 1617-1625, 1999.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, N.; RIOL-BLANCO, L.; DE LA ROSA, G.; MARTIN, D.; LONGO, N.; CUADRADO, A.; CABAÑAS, C.; CORBÍ, AL.; SÁNCHEZ-MATEOS, P.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J. L. Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. **Blood**, v. 104, p. 619-625, 2004.

SANTINI, S. M.; LAPENTA, C.; LOGOZZI, M.; PARLATO, S.; SPADA, M.; DI PUCCHIO, T.; BELARDELLI F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity *in vitro* and in Hu-PBL-SCID mice. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 1777-1788, 2000.

SAUTER, B.; ALBERT, M. L.; FRANCISCO, L.; LARSSON, M.; SOMERSON, S.; BHARDWAJ, N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cell, but not to

primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory DCs. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 423-33, 2000.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 12;407(6805), p. 784-788, 2000. Revisão.

SAXON, A.; FELDHAUS, J.; ROBINS, R. A. Single step separation of human T and B cells using AET-treated SRBC rosettes. **J. Immunol. Methods**, v. 12, 3-4, p. 285-8, 1976.

SCHEINECKER, C.; MCHUGH, R.; SHEVACH, E. M.; GERMAIN, R. N. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 1079-90, 2002.

SCHILLER, M.; FRANZ, S.; HEYDER, P.; VOLL, R. E.; GAIPL, U. S.; LORENZ, H. M.; KALDEN, J. R.; HERRMANN, M. Hypothesis: human serum-borne albumin bound lipids promote cellular survival after apoptosis induction by a variety of stimuli. **Apoptosis**, v. 13, p. 319-28, 2008.

SEDDIKI, N.; SANTNER-NANAN, B.; MARTINSON, J.; ZAUNDERS, J.; SASSON, S.; LANDAY, A.; SOLOMON, M.; SELBY, W.; ALEXANDER, S. I.; NANAN, R.; KELLEHER A.; de St GROTH B. F. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 1693-1702, 2006.

SHEVACH, E. M. CD4+CD25+ Suppressor T cells: more question than answers. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 389-97, 2002.

SOMERSAN. S; LARSSON, M.; FONTENEAU, J. F.; BASU, S.; SRIVASTAVA P.; BHARDWAJ N. Primary tumor lysates are enriched in heat shock proteins and induce maturation of human dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 167, p. 4844-52.

SPADARO, A.; RINALDI, T.; RICCIERI, V.; VALESINI, G.; TACCARI, E. Interleukin 13 in synovial fluid and serum of patients with psoriatic arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 61(2), p. 174-176, 2002.

STEINMAN, R. M.; ADAMS, J. C.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. **J. Exp. Med.**, v. 141, 4, p. 804-820, 1975.

STEINMAN, R. M. e COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.**, v. 137, 5, p. 1142-1162, 1973.

STEINMAN, R. M. e COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties *in vitro*. **J. Exp. Med.**, v. 139, 2, p. 380-397, 1974.

STEINMAN, R. M.; KAPLAN, G.; WITMER, M. D.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance *in vitro*. **J. Exp. Med.**, v. 149, 1, p. 1-16, 1979.

STEINMAN, R. M.; LUSTIG, D. S.; e COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties *in vivo*. **J. Exp. Med.**, v. 139, 6, p. 1431-1445, 1974

- STEINMAN, R. M. e WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 75, 10, p. 5132-5136, 1978.
- STEINMAN, M. R.; TURLEY, S.; MELLMAN, I.; INABA, K. The induction of tolerance by DCs that have captured apoptotic cells. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 411-16, 2000.
- STEINMAN, M. R.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**; v. 21, p. 685-711, 2003.
- STEPHENS, L. A.; MOTTET, C.; MASON, D.; POWRIE, F. Human CD4+CD25+ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity *in vitro*. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, 4, p. 1247-54, 2001.
- SUSS, G.; SHORTMAN, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 1789-96, 1996.
- TAYLOR, P. R.; CARUGATI, A.; FADOK, V. A.; COOK, H. T.; ANDREWS, M.; CARROLL M. C.; SAVILL, J. S.; HENSON, P. M.; BOTTO, M.; WALPORT M, J. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells *in vivo*. **J. Exp. Med.**, v. 7;192(3), p. 359-366 2000.
- TREMBLEAU, S.; GERMANN, T.; GATELY, M. K.; ADORINI, L. The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. **Immunol. Today.**, v. 16(8), p. 383-386, 1995a.
- TREMBLEAU, S.; PENNA, G.; BOSI, E.; MORTARA, A.; GATELY, M. K.; ADORINI, L. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. **J. Exp. Med.**, v. 1;181(2), p. 817-821, 1995b.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and interferon-gamma. Do they always go together? **Am. J Pathol.**, v. 147(6), p. 1534-1538, 1995.
- TROMBETTA M.; MELLMAN, I. Cell biology of antigen presentation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 975-1028, 2005.
- THOMSOM, AW. Designer dendritic cells for transplant tolerance. **Transp. Proc.**, v. 34, p. 2727-28, 2002.
- VERMAELEN, K.; PAUWELS, R. Pulmonary dendritic cells. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 172, p. 530-551, 2005
- VOLL, R. E.; ROTH, E. A.; GIRKONTAITE, I.; FEHR, H.; HERRMANN, M.; LORENZ, H. M.; KALDEN, J. R. Histone-specific Th0 and Th1 clones derived from systemic lupus erythematosus patients induce double-stranded DNA antibody production. **Arthritis Rheum.**, v. 40(12), p. 2162-2171, 1997.
- VOLL, R. E.; HERRMANN, M.; ROTH, E. A.; STACH, C.; KALDEN, J. R.; GIRKONTAITE, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. **Nature**, v. 390(6658):350-351, 1997.
- VORUP-JENSEN, T.; OSTERMEIER, C.; SHIMAOKA, M.; HOMMEL, U.; SPRINGER, T. A. Structure and allosteric regulation of the α X β 2 integrin I domain. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 100, 4, p. 1873-78, 2003.

WALKER, L. S.; AUSUBEL, L. J.; CHODOS, A.; BEKARIAN, N.; ABBAS, A. K. CTLA-4 differentially regulates T cell responses to endogenous tissue protein versus exogenous immunogen. **J Immunol.** V. 169(11), p. 6202-6209, 2002.

WONG, C. K.; HO, C. Y.; LI, E. K.; LAM, C. W. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 9(8), p. 589-593, 2000.

YOKOI, H.; KATO, K.; KEZUKA, T.; SAKAI, J.; USUI, M.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by monoclonal antibody to interleukin-12. **Eur. J. Immunol.**, v. 27(3):641-661, 1997.

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

ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. The discovery of MHC restriction. **Immunol. Today**, v. 18(1), p. 14-17, 1997.

ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function and responsiveness. **Adv. Immunol.**, v. 27, p. 51-177, 1979.

ZOLA, H.; SWART, B.; BANHAM, A.; BARRY, S.; BEARE, A.; BENSUSSAN, A.; BOUMSELL, L.; BUCKLEY, C. D.; BÜHRING, H. J.; CLARK, G.; ENGEL, P.; FOX, D.; JIN, B. Q.; MACARDLE, P. J.; MALAVASI, F.; MASON, D.; STOCKINGER, H.; YANG, X. CD molecules 2006 – Human cell differentiation molecules. **J. Immunol. Methods**, v. 319, p. 1-5, 2007.

ZOLA, H.; NEOH, S. H. Monoclonal antibody purification: choice of method and assessment of purity and yield. **Biotechniques**, v. 7(8):802, 804-808, 1989a. Revisão.

ZOLA, H.; MANTZIORIS B. X.; WEBSTER J.; KETTE F. E. Circulating human T and B lymphocytes express the p55 interleukin-2 receptor molecule (TAC, CD25). **Immunol. Cell. Biol.**, v. 67, p. 233-239, 1989b.

ZOU, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 263-74, 2005.

ANEXOS

1. Estratégias alternativas de “gating” para DCs.

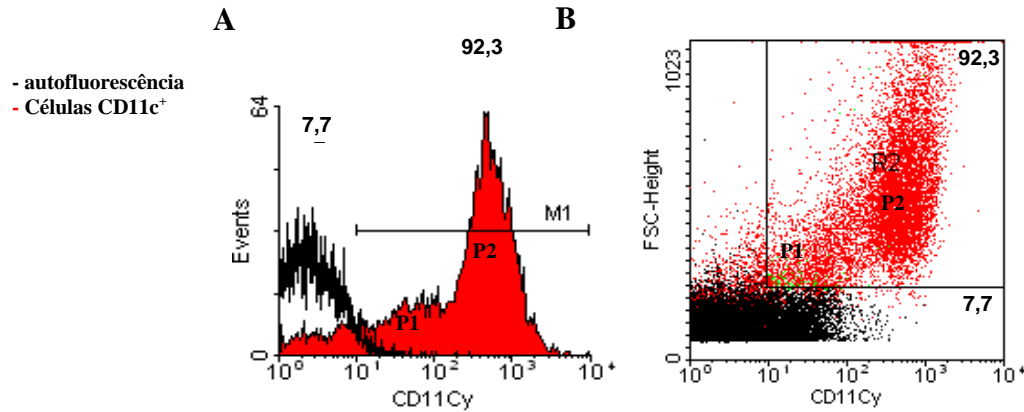


Fig. 1. Histograma representativo da expressão de CD11c (FL-3 Cy) por PBMCs tratadas com GM-CSF e IL-4 durante 7 dias de cultura. B. Gráfico (“dot-plot”) de CD11c por tamanho celular.

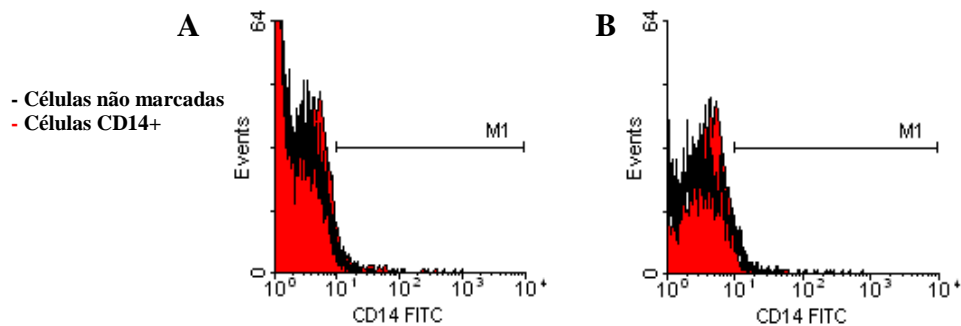


Fig. 2. Histogramas representativos da expressão de CD14 (FL-1 FITC) por PBMCs tratadas com GM-CSF e IL-4 durante 7 dias de cultura. A. iDCs B. mDCs.

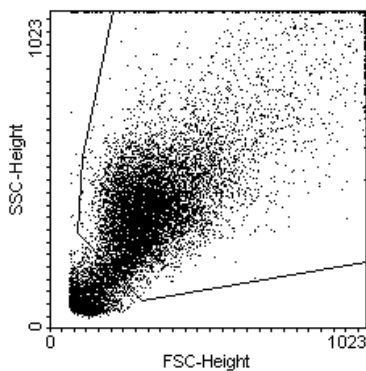


Fig. 3. Aspecto morfológico do produto de cultura de DCs geradas *in vitro* a partir de PBMCs aderentes de doadores saudáveis, na presença de GM-CSF e IL-4 por 7 dias e TNF- α nos dois últimos dias de cultura. Neste experimento foram adquiridas 12401 células, das quais 84,2% (10437) foram consideradas morfológicamente como DCs (“gate” R1).

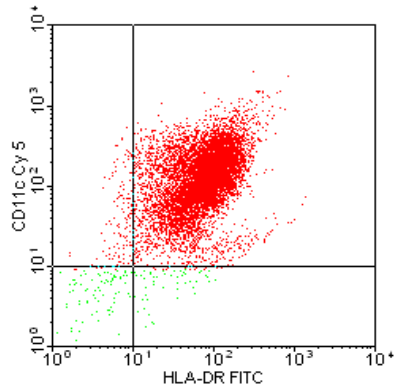


Fig. 4. Gráfico (“dot-plot”) de FL-1 (Anti-HLA-DR FITC) por FL-3 (CD11 Cy-5) de PBMCs tratadas com GM-CSF e IL-4 durante 7 dias de cultura e estimuladas com TNF- α nos dois últimos dias de cultura. Foi utilizado para análise “gate” semelhante ao da figura 1. 8575 (97% das células consideradas como DCs em R1) são HLA-DR⁺CD11c⁺ (69,2% do total).

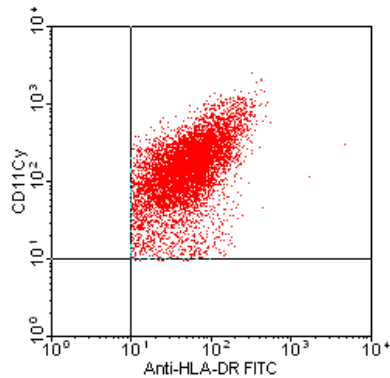


Fig. 5. Gráfico (“dot-plot”) de FL-1 (Anti-HLA-DR FITC) por FL-3 (CD11 Cy-5) de PBMCs tratadas com GM-CSF e IL-4 durante 7 dias de cultura e estimuladas com TNF- α nos dois últimos dias de cultura. Foi utilizado para análise “gate” R1. B. Histograma representativo da expressão de CD14 (PE) pelas células HLA-DR⁺CD11c⁺ (Figura 8A). Foram consideradas como positivas (%) as células dentro do marcador M1.

iDCs+LPS: Controle Positivo

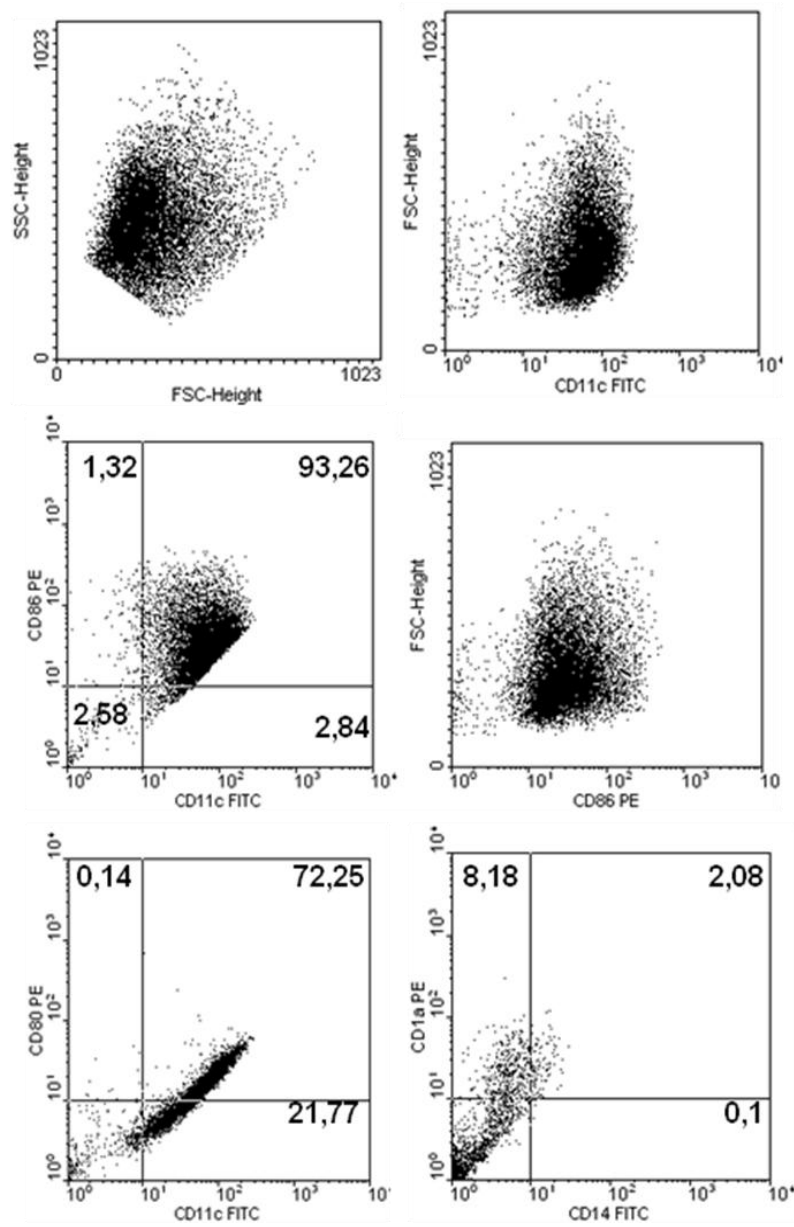


Fig. 6. DCs tratadas com LPS apresentaram alta expressão de CD11c, CD86 e CD80, com simultânea e baixa expressão de CD14, e, apesar de presente, relativamente baixa expressão de CD1a.

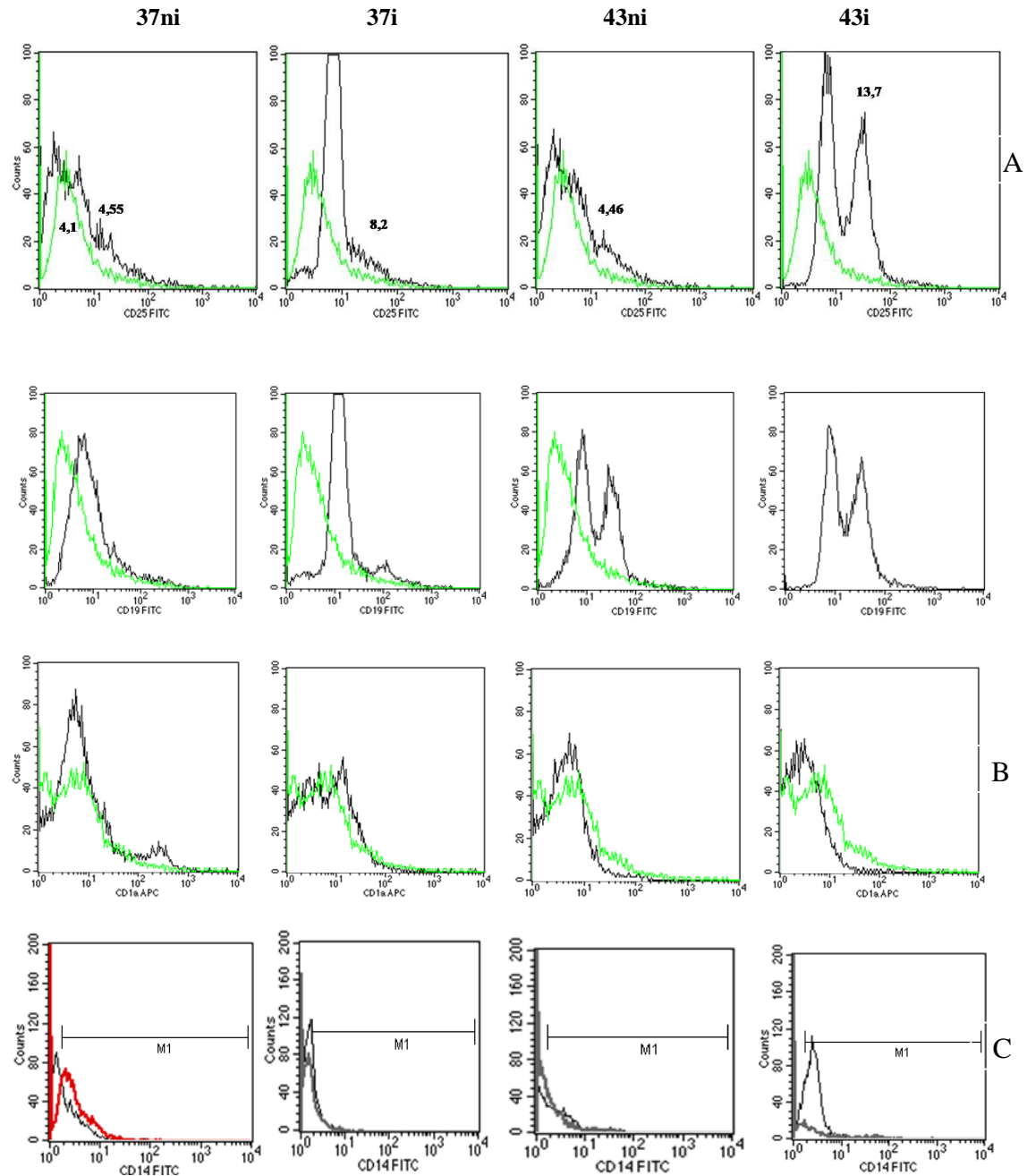


Fig. 7. Expressão de CD25 (A), CD19 (B) e CD14 (C) em CNAs submetidas a diferentes formas de estresse. Números ao lado da linha negra indicam valores de MFI (Intensidade Mediana de Fluorescência), ao passo que os valores abaixo da linha verde representam MFI do controle não marcado com anticorpo conjugado a fluorocromo. Dados representativos de 3 experimentos independentes realizados em duplicata e adquiridos em FACS Calibur no Departamento de Imunologia do ICB – USP, com resultados semelhantes.

Atividade de Caspase-3 aumentada em CNAs somente irradiadas (37i) e pré-aquecidas (43i)

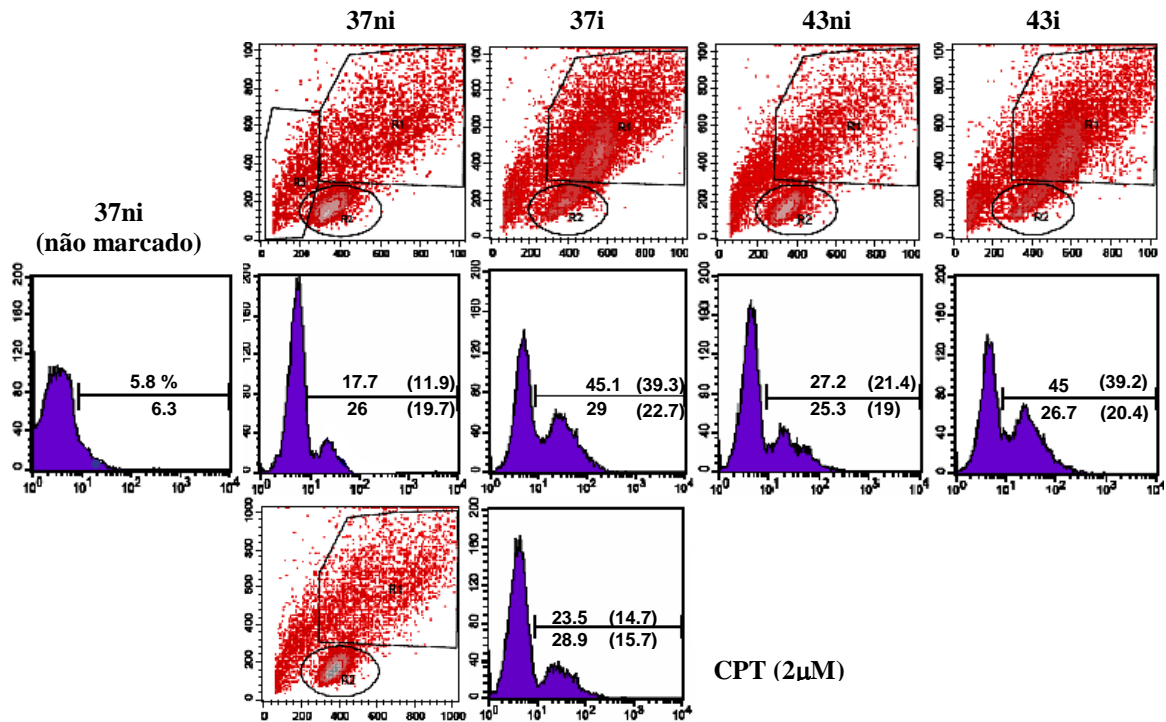


Fig. 8. “Dot-plots” e histogramas de CNAs submetidas a diferentes formas de estresse e avaliadas quanto à atividade de caspase-3, indicativa de células em apoptose. Após 2h de aderência de PBMCs, CNAs foram removidas e no 3º dia de cultura de DCs, CNAs foram submetidas a diferentes modos de estresse celular e coradas com caspase-3 48h após irradiação (3300 rads) para avaliação de morte celular por apoptose. Dados representativos de 3 experimentos, adquiridos em FACS Calibur no Departamento de Imunologia do ICB.

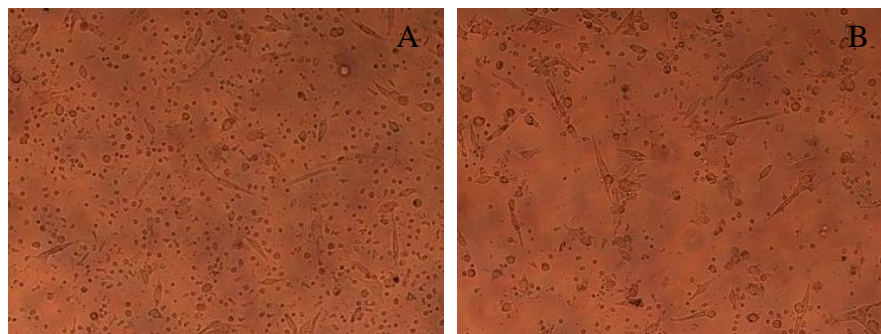


Fig. 9. Microfotografias de culturas de iDC+37i (A) e iDC+43i (B). As culturas tratadas com células aquecidas (HAPO, B) apresentaram um aspecto mais “limpo” do que as culturas tratadas somente com células apoptóticas (APO, A). Sugerimos que o aumento de expressão de HSPs, que têm como receptor o “scavenger” de células apoptóticas, CD14, poderia ser um mecanismo envolvido nessa resposta.

Fenótipo de DCs tratadas de diferentes maneiras. Aquisição no LSR II.

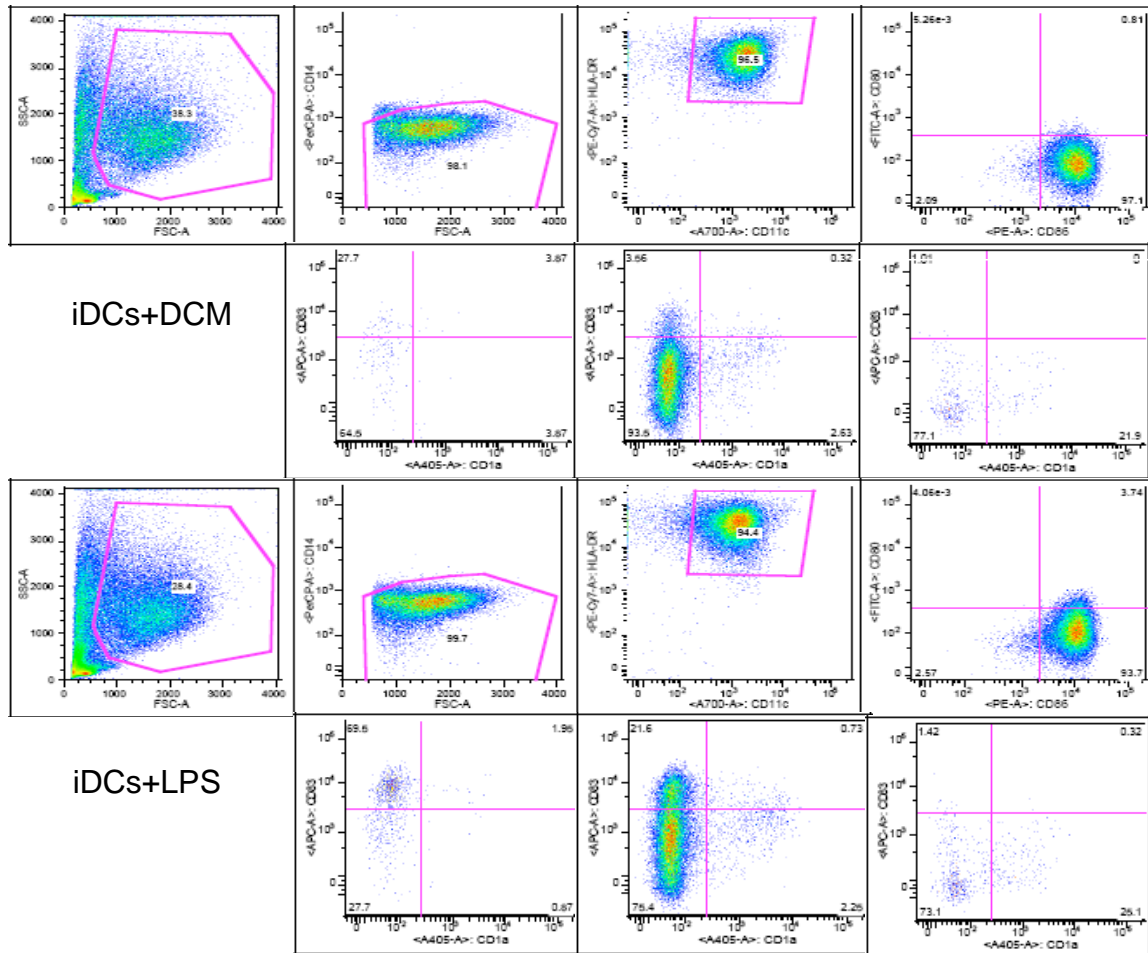


Fig. 10. Fenótipo de DCs adquiridas em Citômetro de Fluxo LSR II no Centro Alemão de Pesquisas Reumatológicas (DRFZ – Deutsch Rheuma Forschung Zentrum), Core Facility do Instituto Max Planck, Hospital Charité, Humboldt University, Berlim, Alemanha. Nomenclatura: DCM: Dendritic Cell Media (iDC tratada somente com meio). iDC+LPS: iDC maturada com LPS, adicionado à cultura no 5º dia.

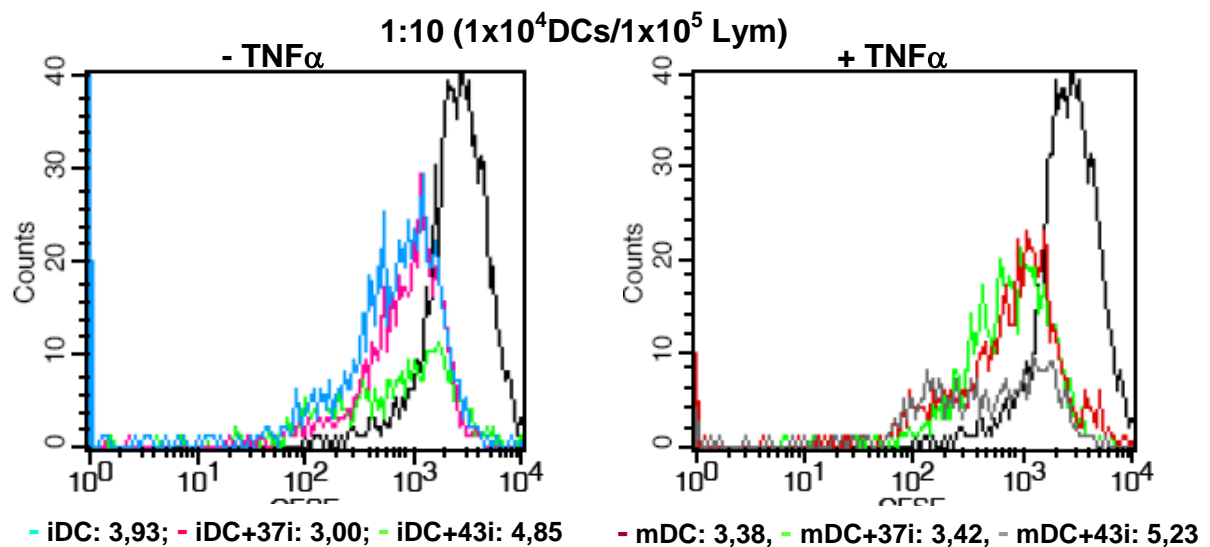


Fig. 11. iDCs ou mDCs tratadas com CNAs 37i (APO) ou 43i (HAPO) são capazes de induzir proliferação de linfócitos T autólogos CD3⁺ pré-estimulados com anti-CD3/CD28, na relação 1:10, independentemente da presença de TNF- α .

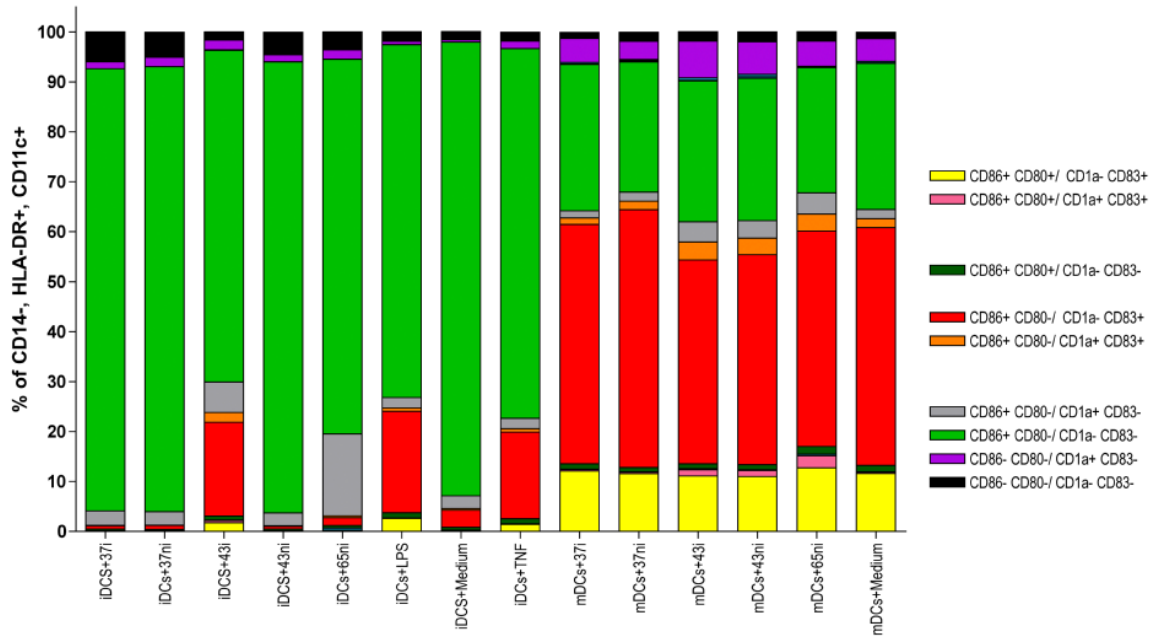


Fig. 12. Gráfico das % de DCs positivas para diferentes marcadores, avaliados por citometria de fluxo no LSR II. As legendas referem-se às diferentes combinações de marcadores para diferentes grupos de células. As barras amarelas indicam células CD1a-. O gráfico sugere que o tratamento com coquetel de citocinas (m= TNF+IL-6+IL-1+PGE2) aumenta a quantidade de células dendríticas CD1a-, além de aumentar a população CD86+CD83+ (barras vermelhas). Nos grupos não tratados com o coquetel, observa-se ativação das iDCs na presença de 43i, semelhante ao tratamento com LPS ou TNF, confirmando os dados dos experimentos realizados no Brasil.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)