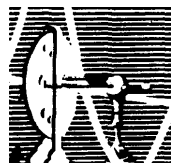


***Alessandra de Paiva Granato***

**Mecanismos de ativação endógena de  
células do sistema imune: explorando a  
participação dos sistemas caliceína-cinina  
e renina-angiotensina**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Mecanismos de ativação endógena de células do sistema imune: explorando a participação dos sistemas caliceína-cinina e renina-angiotensina

Alessandra de Paiva Granato

1 volume

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Imunobiologia da Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Biofísica).

Orientador: Dr. Julio Scharfstein

Rio de Janeiro

Junho de 2007

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Imunologia Molecular sob orientação do Professor Julio Scharfstein. O laboratório é integrante do programa de Imunobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. O trabalho foi desenvolvido na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## Ficha catalográfica:

Granato, Alessandra de Paiva

Mecanismos de ativação endógena de células do sistema imune: explorando a participação dos sistemas calicreína-cinina e renina-angiotensina – Alessandra de Paiva Granato. (Rio de Janeiro): UFRJ, IBCCF°, 2007.

xv 108f.: 23il.; 1,5 cm

Orientador: Julio Scharfstein.

Dissertação (Mestrado em ciências biológicas) – UFRJ, IBCCF°, Programa de Imunobiologia, 2007.

Referências bibliográficas: f. 92-107

1. Sistema Calicreína-cinina 2. Sistema Renina-angiotensina 3. Células dendríticas
- I. Scharfstein, Julio II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho III. Título

*Dedico esta dissertação ao meu querido avô Antônio Machado de Paiva*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guardar em todos os momentos, por iluminar os meus caminhos e me dar serenidade para enfrentar todos os obstáculos da vida. *“Há duas formas para viver a sua vida: Uma é acreditar que não existe milagre. A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.” Albert Einstein*

Ao meu orientador, Professor Julio Scharfstein, por dedicar-se na minha formação científica, acreditar plenamente no meu potencial e tentar me guiar pelo melhor caminho (mesmo que eu não tenha seguido). *“Um especialista em resolver problemas deve ser dotado de duas qualidades incompatíveis – uma imaginação inquieta e uma paciente obstinação.” Howard W. Eves*

A toda a minha família e, principalmente, aos meus pais, Jorge e Cátia, por estarem sempre do meu lado, por possibilitarem (e *patrocinarem*) todos os meus estudos, por terem paciência, pelos longos debates nos almoços de domingo, por acreditarem sempre! *“Ainda somos os mesmos e vivemos como nossos pais.” Elis Regina*

Ao Harri, por todo amor dedicado, pela compreensão, por me ouvir chorar, por me incentivar diariamente, por não me deixar desistir nunca. *“Você é assim, um sonho para mim” Tribalistas*

As minhas queridas amigas, Dé, Fabi, Pat, Maricota (primucha), Bel, Mari, Ju, Heidi (pamonhona), por entenderem minha ausência nesses últimos meses, pela força que representam para mim, pelos simples momentos não-científicos. *“A gente não faz amigos, reconhece-os.” Vinicius de Moraes*

Aos amigos do laboratório de Imunologia Molecular, Alda, Iracema, Juliana, Larissa, Ana Carolina, Gabriela, Rafaela, Ilka, Isabela, Susane, Vinicius, professor Erik, Aline, Daniela, pelo apoio durante os experimentos, pelas idéias, pelas risadas, pela convivência diária. *“A arte de viver é simplesmente a arte de conviver... simplesmente, disse eu? Mas como é difícil!” Mário Quintana*

As minhas amigas, Dani, Vevê, Leila, por ter encontrado em vocês uma grande amizade no laboratório, por todos os momentos de dificuldade, pelo futuro emprego de “Vevê’s personal life assistant”, pelos desabafos e incentivos diários. *“Pedras no caminho, guardo todas, um dia vou construir um castelo” Fernando Pessoa*

Às amigas do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Proteases, professora Ana Paula, Flavinha, Lú, Camila, Maíra, Marília, Tati, pelo apoio nos momentos em que precisei e pela diversão garantida.

Ao Professor Robson Santos, pela oportunidade de aprender um pouco desse interessante mundo do sistema renina-angiotensina, pela colaboração e disponibilidade de sempre, pela paciência e compreensão nos momentos de fracasso.

À Professora Vivian Rumjanek, por possibilitar os estudos com humanos, pela preocupação com a formação intelectual dos alunos, por mostrar-me novas visões na ciência, por apresentar-me “O último teorema de Fermat”, uma leitura espetacular que resgatou a minha

vontade de fazer ciência. *“Eu repartirei tudo [análises para problemas vários] com você quando você o desejar e o faço sem ambição, da qual eu sou mais livre e estou mais distante do que qualquer homem no mundo.” Pierre de Fermat*

À Clarissa, por me ensinar, discutir e estar comigo durante todo o projeto com células dendríticas humanas, por ter se tornado uma amiga e colaboradora, pelos conselhos científicos, profissionais e de vida. Obrigada por participar desta fase de mudanças na minha vida!

Ao Professor João Viola, pela colaboração no projeto dos efeitos das cininas na resposta secundária, pela ajuda sempre disponível, pela grande hospitalidade com que fui recebida no INCA.

Ao Leonardo, pela colaboração e amizade dedicada, por me ensinar tanto nestes últimos meses, por fazer parte ativamente da minha formação científica, pelas longas conversas sobre a vida na ciência, por representar o exemplo no qual devo me espelhar.

Ao Professor Bruno Diaz, por ter sido mais que um revisor, ajudando-me e esclarecendo-me todas as dúvidas.

Aos funcionários do IBCCF<sup>o</sup>, principalmente à Sandrinha, Diogo e Zezinho, por todo o apoio dedicado durante o meu mestrado.



“Está instaurada a dúvida  
A metódica dúvida epistemológica  
Neste mundo a terra não está no centro  
nenhum saber é saber completo  
Seja bem-vinda era da razão  
Não há que se temer a revisão  
Nada que se diga ou que foi dito  
merece estatuto de dogma irrestrito  
Cuidado com a verdade  
que se pretende  
maior que a realidade,  
pois, os fatos são os fatos  
e fluem diante de nós  
que estupefatos  
assistimos ao espetáculo”

Galileu Galilei

## RESUMO

Os sistemas calicreína-cinina e renina-angiotensina regulam o tônus vascular e têm como principais componentes os peptídeos, bradicinina (BK) e angiotensina II (Ang II). Enquanto que a Ang II é um peptídeo vasoconstritor, a BK é um potente vasodilatador. A BK é gerada a partir do cininogênio através da ação proteolítica das calicreínas, atuando sobre diversos tipos celulares através da ativação dos receptores B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) e B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R). Além de desempenharem funções importantes na homeostase vascular e inflamação, as cininas foram caracterizadas como sinais que induzem a maturação de células dendríticas (DC) murinas CD11c<sup>+</sup> através da ativação do receptor B<sub>2</sub>R. A fim de explorar o papel imunológico das cininas, analisamos se: (a) DCs derivadas de monócito são sensíveis ao estímulo com BK; (b) a adição de BK é capaz de modular respostas adaptativas durante respostas secundárias; (c) Ang-(1-7), um metabólito ativo do sistema renina-angiotensina, é capaz de ativar DCs imaturas. Demonstramos que a adição de BK modula positivamente a expressão de CD83 e a produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 em DCs humanas. Utilizando camundongos C57BL/6 e DO11.10 imunizados com CFA/OVA, observamos que a BK modula positivamente a produção de IFN- $\gamma$ . Além disso, reportamos que a adição de Ang-(1-7) induz a produção de IL-12 por DCs esplênicas murinas selvagens ou B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> através da ativação dos receptores AT1 e Mas. Nossos resultados sugerem que as cininas atuam na maturação de DCs humanas. Por fim, de modo independente do B<sub>2</sub>R, propusemos a Ang-(1-7) como um sinal de ativação de DCs murinas.

## ABSTRACT

The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems are master regulators of vascular tone. Angiotensin II (Ang II) is a vasoconstrictor peptide, whereas bradykinin (BK) is a potent vasodilator. BK is proteolytically liberated from kininogens by the action of kallikreins, activating cells via B<sub>2</sub>R or B<sub>1</sub>R receptors. In addition to their role in vascular homeostasis and inflammation, kinins were recently characterized as signals that induce maturation of mouse CD11c<sup>+</sup> dendritic cells (DCs) through activation of the B<sub>2</sub>R. Here we asked if BK could activate human monocyte-derived DCs *in vitro*. Our results showed BK upregulated CD83 expression and IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-12 production in human DCs. The effects of BK were dose-dependent and potentiated by captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor. Complementing the human studies, we turned to the mouse model to verify if kinins might modulate *in vitro* recall responses in draining lymph nodes of mice immunized with CFA/OVA. Our results revealed that BK upregulated IFN- $\gamma$  responses in C57BL/6 and DO11.10 mice strains through mechanisms that presumably involving activation of DCs. Finally, we asked if products of the angiotensin system could activate murine CD11c<sup>+</sup> DCs. Indeed, using IL-12 as a read-out for DC activation, we found that Ang-(1-7) peptides potently induced IL-12 by DCs from wild type or B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice through activation of AT1 and Mas receptors. In summary, the data presented support the concept that kinins may induce the maturation of human DCs. In addition, it suggests that Ang-(1-7) induce IL-12 by murine DCs independently of BK.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ang - angiotensina

APC – célula apresentadora de antígeno

AT1 – receptor de angiotensina do tipo 1

AT2 – receptor de angiotensina do tipo 2

B<sub>1</sub>R – receptor B<sub>1</sub> de cininas

B<sub>2</sub>R – receptor B<sub>2</sub> de cininas

BK - bradicinina

Cap – Captopril; inibidor da ECA

CARD – domínio de recrutamento de caspase

CFA – adjuvante completo de Freund

CRP – proteína C reativa

DC – célula dendrítica

des-Arg-BK – des-Arg-bradicinina

des-Arg-LBK – des-Arg-lisil-bradicinina

DNA – ácido desoxirribonucleico

ECA – enzima conversora de angiotensina

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

FLT3 – receptor tirosina quinase tipo FMS 3

GM-CSF – fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos

GPI – ancora de glicolipídios

GRK – quinase associada a receptor acoplado a proteína G

HK – cininogênio de alto peso molecular

Hsp – proteína do choque térmico

HUVEC – célula endotelial de veia de cordão umbilical humano

i.p. – intraperitoneal

ICAM – molécula de adesão intercelular 1

IFN - interferon

IL - interleucina

IP3 – inositol 1,4,5-trifosfato

LBK – lisil-bradicinina

LFA – antígeno 1 da função de linfócitos

LH-RH - hormônio liberador do hormônio luteinizante

Lis – Lisinopril; inibidor da ECA

LK – cininogênio de baixo peso molecular

LPS - lipopolissacarídeo

LRR – região rica em leucina

LTA – ácido lipoteicóico

MAPK – quinase ativada por mitógeno

MHC – complexo de histocompatibilidade principal

MIP-1 $\alpha$  - proteína inflamatória de macrófago 1 $\alpha$

MMP – metaloproteinase

NEP – neprilisina, endopeptidase neutra

NF- $\kappa$ B – fator nuclear  $\kappa$ B

NK – “natural killer”

NOD – domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeos

OVA – ovalbumina, albumina do ovo

PAMP – padrão molecular associado a patógenos

PAR – receptor ativado por protease

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>

PKC – proteína quinase C

PKR – proteína quinase R

PLA<sub>2</sub> – fosfolipase A<sub>2</sub>

PLCβ - fosfolipase C β

PRR – receptor de reconhecimento de padrão

RNA – ácido ribonucleico

s.c. – subcutâneo

SARS – síndrome respiratória aguda grave

SDF-1 – fator 1 derivado de estroma de medula óssea

STAT – transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição

TCR – receptor de célula T

TGF-β – fator β de crescimento transformante

tGPI-mucina – mucina ancorada por GPI de tripomastigotas de *T. cruzi*

T<sub>H</sub> – célula T *helper*

TipDC – células dendríticas produtoras de óxido nítrico e TNF

TLR – receptor de tipo Toll

TNF-α - fator α de necrose tumoral

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 A Imunidade Inata .....	1
1.1.1 As células dendríticas.....	2
1.1.2 Receptores da imunidade inata .....	7
1.2 Ativação da Imunidade Inata: O Início da Resposta Imune .....	10
1.2.1 A Inflamação .....	10
1.2.2 Ativação e maturação de células dendríticas.....	12
1.2.3 As células dendríticas nos órgãos linfóides secundários.....	15
1.3 Ativação da célula T .....	16
1.3.1 Resposta T Helper.....	18
1.4 Sistema Caliceína-cinina .....	24
1.4.1 Receptores de cininas .....	26
1.4.2 Interação com o sistema renina-angiotensina.....	29
1.4.3 Enzima Conversora de Angiotensina.....	31
1.4.4 As cininas e o sistema imune.....	34
2. Objetivos.....	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. Metodologia.....	38
3.1 Materiais .....	38
3.1.1 Meios de cultura.....	38
3.1.2 Heparina .....	38
3.1.3 Ficoll.....	39
3.1.4 Citocinas .....	39
3.1.5 Colagenase.....	39
3.1.6 DNase .....	39
3.1.7 Solução de lise de hemácias .....	39
3.1.8 Paraformaldeído – Sigma .....	39
3.1.9 Saponina – Sigma.....	39
3.1.10 Estímulos e antagonistas.....	39
3.1.11 Anticorpos .....	40
3.1.12 Micro-esferas magnéticas.....	40
3.1.13 Kit para separação magnética .....	41
3.1.14 Ovalbumina.....	41
3.1.15 Adjuvante completo de Freund (CFA).....	41
3.1.16 Kits de ELISA.....	41
3.2 Métodos.....	42
3.2.1 Obtenção de DCs humanas derivadas de monócitos.....	42
3.2.2 Determinação da expressão de CD83 nas DCs humanas.....	43
3.2.3 Camundongos .....	44
3.2.4 Obtenção de células CD11c <sup>+</sup> esplênicas murinas .....	44
3.2.5 Determinação da produção de IL-12 por citometria de fluxo .....	45
3.2.6 Obtenção das células dos linfonodos inflamatórios.....	46
3.2.7 Determinação das citocinas por ELISA .....	46
3.2.8 Análise da proliferação celular .....	47
3.2.9 Análises estatísticas.....	47
4. Resultados.....	48

4.1 Ativação de células dendríticas humanas pela bradicinina.....	48
4.2 Modulação da resposta T pelas cininas nos linfonodos inflamatórios .....	56
4.3 Células dendríticas e o sistema renina-angiotensina .....	67
5. Discussão .....	74
5.1 Ativação de DCs humanas pela bradicinina .....	74
5.2 Modulação da resposta imune induzida por CFA/OVA pelas cininas .....	80
5.3. Ativação de DCs esplênicas murinas pela Ang-(1-7).....	88
5. Conclusões.....	91
6. Referências .....	92
7. Lista de publicações e manuscritos.....	108



## 1. Introdução

### 1.1 A Imunidade Inata

A mitologia grega conta que Narciso foi um homem jovem punido pelos deuses por desprezar muitas mulheres que se apaixonaram por ele. Encontrando um rio de água límpida, Narciso viu seu próprio reflexo e acreditou que existia um espírito que vivia no rio. Admirando a beleza da própria face refletida em sua frente, Narciso, inconscientemente, apaixonou-se por si mesmo e morreu na futilidade da sua obsessão. A queda de Narciso, causada por sua inabilidade de identificar sua própria imagem, pode ser vista como uma metáfora da importância fundamental da distinção entre o próprio e o não-próprio em diversos aspectos da vida (SIMPSON & HINES, 2002).

A evolução do sistema imune ocorreu sob pressão seletiva imposta pelos microorganismos infecciosos. Assim, todos os organismos multicelulares adquiriram estratégias de defesa inatas variadas, que são iniciadas por uma infecção e protegem o organismo hospedeiro através da destruição dos patógenos e neutralização dos seus fatores de virulência. Esses mecanismos de defesa, denominados imunidade inata, são filogeneticamente antigos e utilizam uma variedade de moléculas que são capazes de reconhecer os agentes invasores (revisado por JANEWAY & MEDZHITOV, 2002).

O sistema imune inato é composto de diversos componentes. O primeiro deles é a barreira epitelial encontrada na pele e em diversos órgãos internos, como o intestino e o pulmão. Esses tecidos são, normalmente, povoados por microorganismos comensais, os quais podem causar patologias após danos no epitélio ou desequilíbrios na “flora” comensal. Além da barreira epitelial, outras células compõem o sistema imune inato, incluindo macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células “natural killers” (NK). Essas células são ativadas durante a resposta inflamatória e constituem o primeiro passo de uma

resposta imune contra agentes infecciosos. Nesse contexto, algumas células diferenciam-se rapidamente em células efectoras de meia-vida curta, que têm como papel combater a infecção. Além de valer-se da imunidade inata para reconhecer e combater patógenos, a evolução deu origem à imunidade adaptativa, mecanismo que se vale de uma grande variedade de receptores, sendo capaz de reconhecer de maneira específica uma ampla gama de antígenos e adquirir memória imunológica a infecções. A evolução da imunidade adaptativa permitiu que o organismo combatesse com maior rapidez e eficácia os microorganismos invasores. Como discutiremos mais adiante, o sistema imune inato também é responsável por instruir a imunidade adaptativa acerca da natureza do patógeno (revisado por JANEWAY & MEDZHITOV, 2002).

#### 1.1.1 As células dendríticas

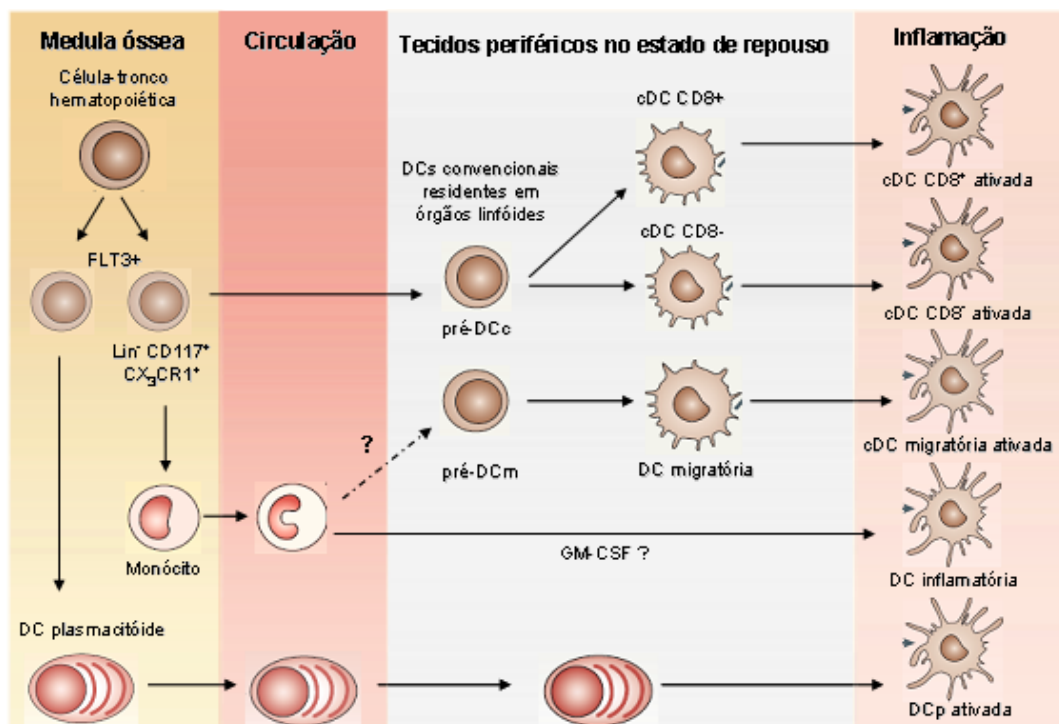
Na década de 70, os mecanismos envolvidos na ativação dos linfócitos ainda não haviam sido bem definidos quando Steinman & Cohn, estudando células ditas “acessórias” do baço, identificaram, entre os macrófagos, uma pequena população de células móveis, com prolongamentos extensos e ricas em mitocôndrias. Devido a sua morfologia única, essas células foram denominadas pelos autores células dendríticas (*dendritic cells* - DCs) (STEINMAN & COHN, 1973,1974). As DCs são células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells* - APCs) profissionais e possuem a capacidade de induzir respostas imunes primárias com o estabelecimento de memória imunológica (revisado por BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

Apesar de todas as populações de DCs serem capazes de capturar, processar e apresentar antígenos para as células T virgens, os subtipos de DCs diferem em sua origem, localização, vias migratórias e função imunológica. Segundo Shortman e Naik, as DCs são divididas em: DCs convencionais, as quais exibem forma e função de DC no estado de

repouso, e pré-DCs, as quais apresentam-se como precursores no estado de repouso, requerendo estímulos adicionais para sua diferenciação completa. Dentre as pré-DCs, podemos citar as DCs plasmacitóides, os precursores diretos da DCs residentes no baço e os monócitos (revisado por SHORTMAN & NAIK, 2007). As DCs convencionais podem ser agrupadas em DCs migratórias e DCs residentes em órgãos linfóides. As DCs migratórias (ex. células de Langerhans, DCs intersticiais) residem nos tecidos periféricos e agem como sentinelas, capturando antígenos e migrando, em resposta a sinais de perigo, para os órgãos linfóides secundários. É importante notar que essa migração ocorre, em baixos níveis, no estado de repouso, tendo grande importância nos mecanismos de tolerância (HUANG & MACPHERSON, 2001). Já as DCs residentes nos órgãos linfóides secundários não migram através da linfa, mas capturam e apresentam antígenos solúveis que são drenados para os órgãos linfóides. Esse subtipo celular compreende a maior parte das DCs presentes no timo (ARDAVIN, 1997) e no baço (VREMEC *et al.*, 2000). Já a população de DCs presente nos linfonodos apresenta, no estado de repouso, aproximadamente, 50% de DCs residentes (WILSON *et al.*, 2003). No modelo murino, as DCs residentes nos órgãos linfóides são classificadas, comumente, pela expressão do marcador CD8 $\alpha$ . As populações CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> e CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> possuem funções imunológicas distintas, incluindo o perfil de produção de citocinas (HOCHREIN *et al.*, 2001) e apresentação de antígenos via complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex* - MHC) classe I (den HAAN *et al.*, 2000).

Dada a heterogeneidade das populações de DCs, suas vias de desenvolvimento ainda não foram completamente detalhadas. Assim como todas as células sanguíneas, as DCs são originadas a partir de células tronco hematopoiéticas na medula óssea. Além de terem a capacidade de auto-renovação, as células-tronco hematopoiéticas, progressivamente, dão origem a células menos indiferenciadas e comprometidas com determinadas linhagens celulares. Os progenitores linfóides e mielóides são precursores iniciais na medula óssea,

sendo ambos capazes de originar populações de DCs. Evidências da origem mielóide das DCs são baseadas, principalmente, em estudos *in vitro* nos quais precursores mielóides originam tanto granulócitos/monócitos quanto DCs após estímulo com o fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor* - GM-CSF) (INABA *et al.*, 1992). Estudos com precursores linfóides purificados demonstraram que a transferência dessa população celular para camundongos hospedeiros irradiados resulta no desenvolvimento de células T, células B, células NK e DCs que expressam CD8 $\alpha$  (ARDAVIN *et al.*, 1993) (revisado por BANCHEREAU *et al.*, 2000). Apesar de comumente utilizar-se a expressão da molécula de superfície CD8 $\alpha$  para classificar DCs mielóides (CD8 $\alpha$ -) e linfóides (CD8 $\alpha$ +), trabalhos recentes indicam que tanto os precursores linfóides quanto os mielóides são capazes de originar todos os subtipos de DCs (TRAVER *et al.*, 2000; MANZ *et al.*, 2001).



**Figura 1** – Vias de desenvolvimento dos diversos subtipos de DCs. (adaptado de SHORTMAN & NAIK, 2007).

Em 2003, D'Amico e Wu demonstraram, no modelo murino, que o potencial de geração de DCs, no estado de repouso, está concentrado nos precursores (mielóides ou linfóides) que expressam o receptor tirosina-quinase FLT3 (*FMS-related tyrosine kinase 3*) (D'AMICO & WU, 2003). Recentemente, identificou-se, na medula óssea, um precursor comum de DCs, monócitos e macrófagos, mas não de granulócitos e DCs plasmacitóides (FOGG *et al.*, 2006). A transferência desse precursor ( $\text{Lin}^- \text{CD117}^+ \text{CX}_3\text{CR1}^+$ ) para hospedeiros irradiados (estado inflamatório) ou não (estado de repouso) é capaz de gerar DCs convencionais  $\text{CD8}\alpha^-$  e  $\text{CD8}\alpha^+$  no baço (FOGG *et al.*, 2006). Assim como as DCs convencionais residentes nos órgãos linfóides, as DCs migratórias possuem um estoque de precursores locais, de modo que a entrada de precursores através da corrente sanguínea é pouco freqüente (MERAD *et al.*, 2002). Esse cenário é alterado durante estados inflamatórios, onde monócitos circulantes são cruciais na repopulação dos precursores locais de diversas DCs migratórias, como as células de Langerhans (GINHOUX *et al.*, 2006) e DCs intersticiais (RANDOLPH *et al.*, 1999). Cabe ressaltar que evidências recentes sugerem que a geração de DCs migratórias intestinais ocorre a partir de monócitos circulantes no estado de repouso (YRLID *et al.*, 2006) (figura 1) (revisado por SHORTMAN & NAIK, 2007).

O subtipo de DCs inflamatórias requer estímulos inflamatórios, como produtos microbianos, para a sua diferenciação completa. O principal exemplo desse subtipo celular consiste na geração de DCs a partir de monócitos inflamatórios ( $\text{Gr1}^{\text{high}} \text{CX}_3\text{CR1}^{\text{low}} \text{CCR2}^+$ ) (GINHOUX *et al.*, 2006; VAROL *et al.*, 2007). No estado de repouso, a transferência intravenosa de monócitos inflamatórios murinos para um receptor saudável não é capaz de promover a geração de DCs nos órgãos linfóides (NAIK *et al.*, 2006). No entanto, quando transferidos para um receptor sujeito a estímulos inflamatórios intensos, esse subtipo de monócitos originam DCs em diversos sítios, incluindo a cavidade peritoneal e tecidos linfóides, como o baço (GEISSMANN *et al.*, 2003; NAIK *et al.*, 2006). Shortman e Naik

revelam que a geração de DCs a partir de monócitos inflamatórios é dependente da expressão do receptor de GM-CSF, sugerindo um papel essencial para essa citocina na geração de DCs inflamatórias. É importante notar que, no estado de repouso, os níveis de GM-CSF são baixos (CEBON *et al.*, 1994) e que animais nocautes para GM-CSF ou seu receptor apresentam níveis inalterados de DCs nos órgãos linfóides (VREMEC *et al.*, 1997). Cabe ressaltar que, nesse trabalho, as populações de DCs convencionais migratórias não foram avaliadas (revisado por SHORTMAN & NAIK, 2007).

Em 1994, Sallusto e Lanzavecchia estabeleceram uma metodologia de geração de DCs humanas a partir de células mononucleares isoladas do sangue periférico (figura 6). Os autores descreveram que a adição de GM-CSF e IL-4 às culturas de monócitos isolados de sangue induz a diferenciação dessas células em DCs imaturas, uma vez que perdem a expressão de CD14 e adquirem uma alta eficiência de captura de antígenos solúveis. Além disso, as células diferenciadas com GM-CSF e IL-4 são capazes de responder rapidamente ao estímulo com TNF- $\alpha$ , aumentando a expressão de MHC classe II e de moléculas de adesão (ICAM-1 e LFA-3) e co-estimulatórias (CD40 e CD80) (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994). Essa metodologia possibilitou inúmeros estudos com DCs de origem humana, permanecendo, até os dias de hoje, a mais utilizada para a geração de DCs imaturas em estudos com humanos.

Uma característica importante das DCs é sua mobilidade. O recrutamento de DCs e seus precursores para os tecidos é regido por diversas quimiocinas e seus receptores. As DCs imaturas respondem *in vitro* a uma variedade de quimiocinas, incluindo MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein 1 alpha*), RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted*), IL-8 (interleucina-8), SDF-1 (*stromal cell derived factor-1*). Vale lembrar que subtipos diferentes de DCs apresentam sensibilidades distintas a painéis de quimiocinas exclusivos. Além das quimiocinas, a expressão de moléculas de adesão e de

enzimas que degradam matriz extracelular é essencial para a mobilidade das DCs. A molécula de adesão E-cadherina é expressa, exclusivamente, pelas células de Langerhans e permite, através de interações homotípicas a manutenção dessas células na epiderme. A ativação das células de Langerhans induz o desaparecimento dessas moléculas da superfície, permitindo sua migração da pele para os órgãos linfóides secundários (TANG *et al.*, 1993) (revisado por BANCHEREAU *et al.*, 2000).

As DCs imaturas são muito eficientes na captura de antígenos, podendo usar vias distintas, como: (a) macropinocitose, (b) endocitose mediada por receptores do tipo lectina C (receptores de manose e DEC-205) ou receptores de Fc (CD64, CD32) e (c) fagocitose de partículas, células necróticas/apoptóticas e microorganismos. A internalização de peptídeos associados às proteínas do choque térmico (*heat shock protein* – Hsp) gp96 e Hsp70, através dos receptores “scavenger” CD91 e SR-A, também contribui para o processo de captura de antígenos (BASU *et al.*, 2001; BERWIN *et al.*, 2003) (revisado por BANCHEREAU *et al.*, 2000).

### 1.1.2 Receptores da imunidade inata

Para identificar microorganismos invasores, as células do sistema imune inato utilizam diversos receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptor* - PRRs) que podem ser expressos na superfície celular, em compartimentos intracelulares ou secretados nos tecidos e na corrente sanguínea. Os PRRs são ativados por padrões moleculares associados à patógenos (*pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs), induzindo mecanismos de defesa inatos, como a opsonização, ativação das cascatas de complemento e coagulação, fagocitose, ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias e indução de apoptose.

Macrófagos e DCs são células fagocíticas profissionais amplamente distribuídas pelo organismo, desempenhando um papel central na remoção de agentes invasores e células mortas/infectadas. Diversos PRRs estão presentes na superfície celular dessas células, sendo responsáveis pelo processo de fagocitose. O receptor de manose, DEC-205 e o receptor de  $\beta$ -glucana reconhecem diretamente ligantes na superfície de microorganismos, promovendo a sua rápida fagocitose. Já os receptores fagocíticos opsonizantes (receptores de Fc e do complemento) induzem a fagocitose através do reconhecimento partículas recobertas por anticorpos ou por moléculas do sistema complemento. Outro exemplo são os receptores “scavenger”, que reconhecem um amplo espectro de ligantes polianiônicos, incluindo RNA dupla fita, lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipoteicoico (*lipoteichoic acid* - LTA) (revisado por GORDON, 2002).

Além dos receptores que induzem a fagocitose, as APCs também expressam uma variedade de receptores do tipo Toll (*toll-like receptors* - TLR). Os TLRs são glicoproteínas integrais de membrana do tipo I que possuem dois domínios principais: um domínio citoplasmático conservado entre os receptores da superfamília da IL- 1 (domínio TIR) e um domínio extracelular rico em repetições de leucina (*leucine-rich repeat* - LRR). O domínio LRR está envolvido diretamente no reconhecimento dos PAMPs e, apesar de serem conservados entre os TLRs, são capazes de reconhecer ligantes distintos e estruturalmente não-relacionados. A localização celular dos TLRs está relacionada com a natureza do seu ligante. TLR1, TLR2 e TLR4, que reconhecem, respectivamente, triacilipeptídeos, lipoproteínas/ peptidoglicanas e LPS, encontram-se na superfície celular e são recrutados para os fagossomos após ativação. Enquanto que, TLR3, TLR7 e TLR9, envolvidos no reconhecimento de ácidos nucleicos, localizam-se no espaço intracelular. Após o reconhecimento de seu ligante, os TLRs disparam uma cascata de eventos intracelulares que induz a transcrição de diversos genes de defesa do hospedeiro. Dentre eles, podemos citar



citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, peptídeos antimicrobianos, moléculas coestimulatórias, moléculas de MHC, entre outras moléculas efetoras importantes na defesa contra patógenos invasores (revisado por KAWAI & AKIRA, 2007).

Além de sua presença na superfície celular, os PRRs podem ser secretados nos tecidos, como por exemplo a lectina ligadora de manana (*mannan-binding lectin* – MBL), a proteína C reativa (*C-reactive protein* – CRP) e a proteína amilóide do soro (*serum amyloid protein* – SAP). Essas moléculas são produzidas no fígado durante a resposta de fase aguda podendo funcionar como opsoninas, ativadoras da via clássica ou da lectina do sistema complemento (revisado por GORDON, 2002).

Os PRRs encontrados no citoplasma são responsáveis por detectar patógenos intracelulares e induzir respostas celulares que bloqueiem sua replicação. A proteína quinase R (*protein kinase R* – PKR) é ativada após ligação com RNA dupla-fita viral, induzindo o bloqueio da síntese protéica celular e viral através da inativação do fator iniciador da tradução eIF2 $\alpha$  (CLEMENS & ELIA, 1997). A família das proteínas do tipo NOD (*NOD like receptors* – NLR) (NODs e NALPs) apresenta um domínio CARD (*caspase recruitment domains*) e um domínio de ligação a nucleotídeos na porção amino-terminal e um domínio LRR na porção carboxi-terminal. Essa estrutura é característica da família NB-ARC, na qual além dos NODs, estão presentes uma classe de genes de resistência em plantas (genes R) responsáveis por detectar e induzir respostas protetoras à infecções. Os NODs estão envolvidos no reconhecimento de peptídeoglicanas bacterianas e sua ativação promove a indução das vias de sinalização do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e das proteínas quinases ativadas por mitógeno (*mitogen-activated protein kinases* - MAPK ). Já os NALPs podem ser ativados tanto por PAMPs, incluindo toxinas bacterianas, peptídeoglicanas e RNA bacteriano, quanto por sinais endógenos, como o ATP (através da redução dos níveis de potássio intracelular), cristais de ácido úrico e de diidrato de pirofosfato de cálcio. Os NALPs desempenham um papel

importante na ativação de caspases pró-inflamatórias e, conseqüente, secreção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 (revisado por MEYLAN *et al.*, 2006).

## 1.2 Ativação da Imunidade Inata: O Início da Resposta Imune

A ativação dos receptores presentes nas células da imunidade inata induz alterações rápidas na expressão de genes que codificam, principalmente, citocinas, quimiocinas e enzimas que agem no combate direto à infecção ou são capazes de liberar mediadores inflamatórios. O início de uma resposta imune pode ser disparado através da ativação de diferentes vias de sinalização, culminando na indução de processos inflamatórios.

### 1.2.1 A Inflamação

A inflamação constitui um processo básico pelos quais os tecidos do corpo respondem a qualquer injúria. A detecção de uma lesão ou organismo invasor no tecido desencadeia processos múltiplos que são responsáveis por retirar estruturas e células danificadas, matar e remover agentes invasores e promover o reparo das células e da matriz extracelular. Esses processos, geralmente, têm como conseqüência o reparo eficaz da estrutura e função do tecido, sendo um mecanismo crucial para a homeostase tecidual. No entanto, lesões muito extensas ou persistentes disparam respostas inflamatórias contínuas que resultam na substituição das estruturas danificadas por um tecido fibrótico através de mecanismos denominados fibrose, esclerose ou cicatrização (revisado por HENSON, 2005).

No contexto de uma resposta imune, a inflamação pode ser vista como um processo chave para a imunidade inata e adaptativa. A inflamação e as respostas da imunidade inata estão intimamente conectadas, sendo, muitas vezes, consideradas sinônimas. Enquanto que a

imunidade inata é responsável pelo reconhecimento de agentes invasores e células/tecidos danificados, a inflamação induzida por patógenos é o braço efetor do processo iniciado pela ativação da imunidade inata. Embora se atribua maior destaque às células de origem hematopoiética (como macrófagos, DCs e granulócitos), é importante notar que a maioria das células dos tecidos também são capazes de identificar organismos invasores ou tecidos danificados, iniciando um processo inflamatório, o qual também é o principal mecanismo efetor da imunidade inata (revisado por HENSON, 2005).

A inflamação é tradicionalmente definida pelas quatro palavras latinas *dor, rubor, calor e tumor*, significando dor, vermelhidão, calor e edema. Os passos principais do processo inflamatório consistem em: (a) vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular acompanhados do aumento do fluxo de sangue local e entrada de fluidos, responsáveis pelo calor, pela vermelhidão e pelo edema; (b) Adesão dos leucócitos ao endotélio vascular e sua migração para o sítio inflamatório; (c) remoção dos organismos invasores, restos celulares e células inflamatórias e (d) indução do reparo do tecido-alvo. Os principais tipos celulares encontrados no início de uma resposta inflamatória são os neutrófilos, os quais são recrutados rapidamente para o sítio de entrada do patógeno. O influxo de neutrófilos é seguido pelos monócitos que rapidamente se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos e neutrófilos constituem as principais células que englobam e destroem os microorganismos invasores. O processo inflamatório é muito bem orquestrado por mediadores inflamatórios endógenos, moléculas solúveis secretadas por células ou geradas a partir de moléculas presentes no plasma ou na matriz extracelular, capazes de induzir o processo inflamatório. Embora a geração e meia-vida dessas moléculas sejam estritamente controlados, sua liberação extensa pode induzir processos inflamatórios generalizados e doenças sistêmicas (JANEWAY *et al.*, 2001).

### 1.2.2 Ativação e maturação de células dendríticas

O conceito de maturação de DCs, proposto por Steinman e colaboradores, originou-se da capacidade das DCs de perceber e traduzir o microambiente do sítio inflamatório para as células T (STEINMAN, 1991). Esse conceito sugere que as DCs podem existir em dois estados funcionais, a DC imatura e DC madura, sendo apenas as DCs maduras capazes de iniciar uma resposta imune. Entretanto, o termo maturação vem sendo amplamente utilizado apenas como uma descrição fenotípica e não como uma descrição funcional. É importante ressaltar que DCs fenotípicamente maduras nem sempre são capazes de induzir a proliferação e diferenciação de células T, ou seja, serem imunogênicas (revisado por REIS e SOUSA, 2006).

O contato com o patógeno/antígeno ou seus produtos induz mudanças fenotípicas e funcionais nas DCs imaturas, culminando na transição completa de uma célula que captura antígenos com muita eficiência para uma célula apresentadora de antígenos e imunogênica. A maturação da DC é um processo contínuo iniciado nos sítios periféricos, após o encontro com estímulos de maturação, e completado mediante subsequente interação com as células T nos órgãos linfóides secundários (revisado por BANCHEREAU *et al.*, 2000).

O processo de maturação é um evento coordenado e envolve diversos passos, incluindo: (a) perda dos receptores endocíticos e fagocíticos (ex. receptores de manose, DEC-205, CD64, CD32), (b) regulação positiva de moléculas coestimulatórias e marcadores de maturação (ex. CD40, CD58, CD80, CD83, CD86), (c) alterações na morfologia da célula (ex. perda de estruturas adesivas, reorganização do citoesqueleto, aquisição de um fenótipo móvel), (d) mudanças nos compartimentos lisossomais com a regulação negativa de CD68 e positiva de proteínas de membrana de lisossomo (ex. DC-LAMP), (e) alterações nos compartimentos de MHC II e (f) secreção de padrões de citocinas (ex. IL-12, IL-4, IL-10) (figura 2) (revisado por BANCHEREAU *et al.*, 2000). Apesar do conceito de maturação

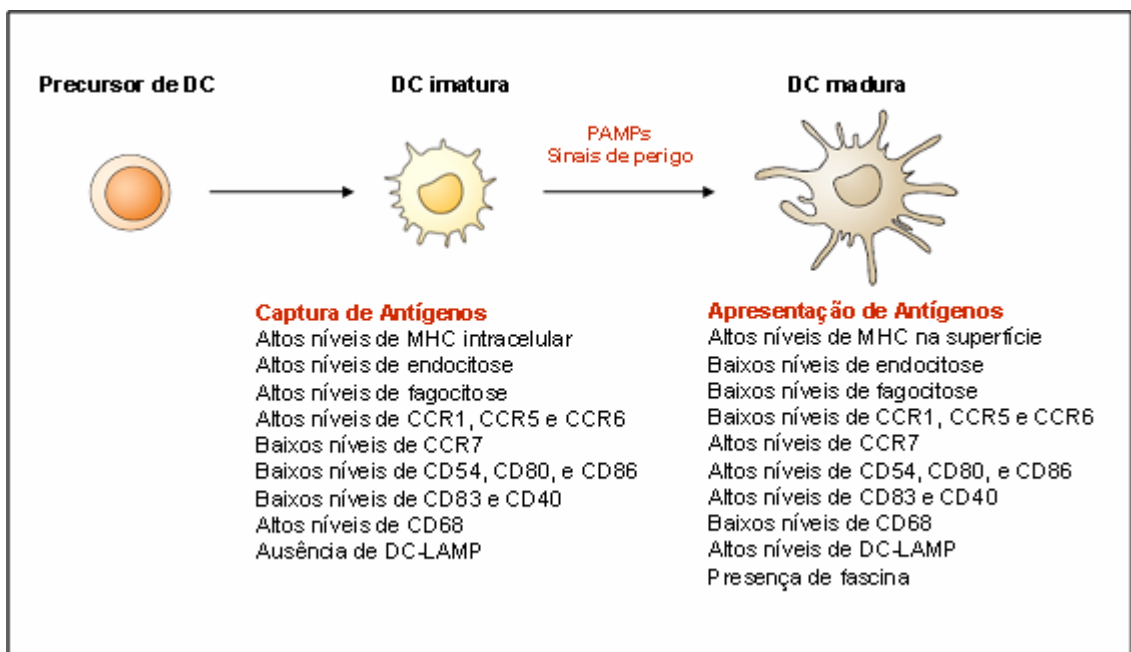
envolver a transição de um estado de captura antígenos para um estado de apresentação de antígenos, algumas observações recentes sugerem que as funções de captura e processamento antigênico das DCs imaturas são aumentadas transientemente por sinais de maturação, seguidas de uma rápida inibição dessas funções (revisado por REIS e SOUSA, 2006).

Dentre as alterações morfológicas que acompanham a maturação das DCs, podemos citar a perda de estruturas de adesão à matriz do sítio periférico, a reorganização do citoesqueleto e a aquisição de uma alta mobilidade celular. Uma molécula importante na reorganização do citoesqueleto e na capacidade móvel das DCs é a proteína fascina, a qual participa da organização de filamentos de actina (ADAMS, 2004).

Diversos fatores são capazes de induzir e/ou regular a maturação da DC, como: (a) PAMPs, como o LPS, DNA bacteriano e RNA dupla-fita, (b) o balanço entre sinais pró-inflamatórios e anti-inflamatórios no microambiente, como TNF, IL-6, IL-1, IL-10, TGF- $\beta$  e prostaglandinas e (c) sinais derivados da célula T (revisado por BANCHEREAU *et al.*, 2000). Segundo Galluci e Matzinger, os estímulos capazes de induzir a maturação de DCs constituem sinais de perigo para o sistema imune, podendo ser de origem endógena ou exógena. Os sinais de perigo, sugeridos em 1994, fazem parte de uma nova visão do sistema imune que sugere que a resposta imune pode ser iniciada por moléculas causadoras de dano ao organismo, contrapondo-se ao conceito de que o sistema imune responde, simplesmente, a agentes invasores. Esses sinais consistem de moléculas ou estruturas moleculares liberadas por células sob algum tipo de estresse que são percebidos por DCs, induzindo sua ativação/maturação (MATZINGER, 1994). Os sinais endógenos de perigo podem, em alguns casos, mimetizar PAMPs e atuar como ligantes de PRRs. Sugere-se que produtos de degradação do hialurano, fibronectina A, fibrinogênio, proteínas do choque térmico, defensinas- $\beta$  e heme (FIGUEIREDO *et al.*, 2007) atuem como ligantes endógenos de TLRs. Dentre os sinais de perigo endógenos que não atuam como ligantes de TLRs, podemos citar o

ATP, que é capaz de ativar DCs humanas via receptores purinérgicos (SCHNURR *et al.*, 2000), e a bradicinina, que induz a maturação de DCs murinas via receptores de bradicinina (BK) (ALIBERTI *et al.*, 2003).

As DCs, no estado de repouso/imaturas, induzem tolerância em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> periféricas através de mecanismos de deleção, anergia ou regulação. Esse processo, denominado tolerância periférica, constitui um importante processo fisiológico responsável por regular o repertório de células T periféricas auto-reativas que escaparam da deleção tímica (tolerância central) e poderiam ser ativadas por DCs maduras que apresentam ao mesmo tempo antígenos próprios e não-próprios (STEINMAN & NUSSENZWEIG, 2002). As DCs em repouso, denominadas imaturas ou tolerogênicas, são capazes de capturar, processar e apresentar antígenos próprios para as células T virgens, sugerindo que a indução de tolerância seja reflexo da interação DC-célula T em condições que não favorecem o co-estímulo. Ainda não foi esclarecido se um subtipo particular de DCs é responsável pela indução da tolerância periférica (revisado por REIS e SOUSA, 2006).



**Figura 2** – Maturação de células dendríticas (adaptado de BANCHEREAU *et al.*, 2000).

### 1.2.3 As células dendríticas nos órgãos linfóides secundários

Estudos realizados na década de 80 que demonstraram a migração das DCs ativadas a partir de sítios periféricos (sangue, pele e outros tecidos) para o baço levaram a elaboração do conceito de que as DCs imaturas residentes na periferia migram para os órgãos linfóides secundários em resposta a estímulos de maturação (AUSTYN *et al.*, 1988). Apesar desse conceito estar muito bem fundamentado, cabe ressaltar algumas considerações: A migração da DC não está associada, necessariamente, à maturação. Algumas DCs migram, continuamente, da periferia para os órgãos linfóides secundários trazendo fragmentos de células apoptóticas. Como discutido anteriormente, essas células são capazes de apresentar antígenos para as células T e induzir tolerância. É importante notar que nem todas as DCs presentes nos órgãos linfóides secundários são originadas da periferia. No estado de repouso, a maior parte das DCs no baço e nos linfonodos são residentes desses órgãos, sendo derivadas diretamente de precursores locais. Portanto, nem todas as DCs presentes nos órgãos linfóides secundários encontram-se maduras (a maioria das DCs, principalmente àquelas residentes, encontram-se imaturas). As DCs imaturas localizam-se, predominantemente, na zona marginal do baço e na polpa vermelha, mas são capazes de migrar para a zona de células T após estímulos de maturação (revisado por REIS e SOUSA, 2006).

A migração das DCs da periferia para a zona de células T dos órgãos linfóides secundários é coordenada por quimiocinas, sendo o CCR7 o principal receptor envolvido nesse processo. A maturação de DCs é, geralmente, acompanhada pela indução da expressão de CCR7 e regulação negativa de outros receptores envolvidos na manutenção das DCs no sítio periférico. Além da expressão de CCR7, sinais produzidos no sítio inflamatório, como os mediadores lipídicos, são requeridos para a ativação desse receptor pelos seus ligantes, CCL (*CC-chemokine ligand*) 19 e CCL21. As DCs CCR7<sup>+</sup> migram a favor de um gradiente de CCL19 e CCL21, produzido pelo endotélio dos vasos linfáticos e por células da zona de

células T dos órgãos linfóides secundários. Além das quimiocinas, foi demonstrado que duas enzimas que degradam matriz extracelular, as metaloproteinases de matriz (*matrix metalloproteinase* - MMP)-2 e MMP-9, desempenham um papel importante na migração das DCs (revisado por RANDOLPH *et al.*, 2005).

Em 2004, Lindquist e colaboradores descreveram, com base nos resultados obtidos através da técnica de microscopia multifotônica, a rede de DCs presente nos órgãos linfóides secundários (LINDQUIST *et al.*, 2004). No estado de repouso, as DCs formam redes densas de células e pequenos grupos coesos localizados entre os folículos de células B e as zonas ricas em células T. Os autores descrevem que tanto a rede quanto os pequenos grupos são dinâmicos, nos quais DCs maduras móveis (imigrantes) podem ser incorporadas. Os autores especulam que o freio da migração e a incorporação de DCs maduras na rede endógena seja crucial para uma apresentação de antígenos eficiente *in vivo*, uma vez que nas redes endógenas as DCs estariam melhor posicionadas para formar interações estáveis com células T antígeno-específicas, além de transferir antígenos para outras DCs presentes na rede através da liberação de exossomos ou corpos apoptóticos. Esse modelo proposto, diferente dos outros modelos em que as células T encontrariam DCs aleatoriamente, maximiza a probabilidade do encontro da célula T antígeno-específica com a DC carregando o antígeno cognato (LINDQUIST *et al.*, 2004).

### 1.3 Ativação da célula T

A ativação da célula T é iniciada nas zonas T dos órgãos linfóides secundários, local onde células T virgens encontram APCs ativadas, principalmente DCs, que carregam antígenos oriundos da periferia. O processo de ativação da célula T induz uma seqüência de



eventos intracelulares que culmina na transcrição de genes específicos, na entrada da célula T no ciclo celular e na diferenciação da célula T efetora (revisado por BROMLEY *et al.*, 2001).

As células T virgens circulantes apresentam-se no formato arredondado, são pouco móveis e possuem uma distribuição uniforme das moléculas presentes na superfície celular. Momentos antes da formação da sinapse imunológica, a ativação de receptores de quimiocinas nas células T induz uma rápida reorganização do citoesqueleto de actina que promove a redistribuição das moléculas na superfície da célula T, processo essencial para a sua ativação (revisado por DUSTIN & COOPER, 2000). A formação da sinapse imunológica é um processo complexo que se inicia com a adesão entre a célula T e a DC. Além da interação entre o TCR e o complexo MHC-antígeno, outras moléculas são requeridas para que o processo de adesão ocorra rapidamente. A adesão inicial é mediada por integrinas (ex. LFA-1 (célulaT) - ICAM-1 (DC)) e outras moléculas de adesão (ex. CD2 (célula T) - CD48 (DC), ICAM-3 (célula T) – DC-SIGN (DC)), as quais superam a barreira imposta pelas cargas negativas do glicocálix presentes nas superfícies celulares das células T e DCs (revisado por BROMLEY *et al.*, 2001).

Uma vez estabelecida a adesão, o destino da célula T virgem é determinado por três sinais mediados pelas DCs maduras. O reconhecimento do complexo MHC-antígeno pelo TCR constitui o primeiro sinal de ativação da célula T e determina a especificidade da resposta imune adaptativa a ser iniciada. Como discutido anteriormente, as DCs ativadas induzem o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias (ex. CD80, CD86) na superfície celular. A interação entre a molécula CD28 na superfície da célula T CD4<sup>+</sup> e as referidas moléculas co-estimulatórias nas DCs amplificam a sinalização disparada pela interação TCR-MHC/antígeno, constituindo, portanto, o segundo sinal requerido para a ativação da célula T CD4<sup>+</sup>. A ausência de co-estimulação induz o estado de anergia, fazendo com o que as células T sobrevivam, porém sem a capacidade de responder a antígenos. O

processo de anergia constitui um dos mecanismos responsáveis pela tolerância periférica (revisado por LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2000).

O terceiro sinal requerido para a completa ativação da célula T CD4<sup>+</sup> é mediado pelo perfil de citocinas secretado pelas DCs em resposta a sinais presentes no microambiente inflamatório. Esse sinal é determinante no direcionamento da resposta T *Helper* (T<sub>H</sub>). A maioria dos autores postula que o tipo de resposta efetora depende, essencialmente, do tipo de patógeno que será combatido. Postulou-se que parasitas intracelulares seriam capazes de ativar respostas imunes do tipo T<sub>H</sub>1, enquanto que parasitas extracelulares atuariam respostas imunes do tipo T<sub>H</sub>2. Além disso, a indução de respostas imunes do tipo T<sub>H</sub>3 ou T regulatórias poderiam ser ativadas por diversos tipos de patógenos, sendo responsáveis pelo controle de respostas imunes danosas ao organismo, ao mesmo tempo que favorecem a sobrevivência do parasita (revisado por KAPSENBERG, 2003). Uma visão diferente foi proposta por Polly Matzinger. A autora acredita que o controle acerca da natureza da resposta imune pode residir nos tecidos onde acontecerá a resposta imune efetora e não nos patógenos combatidos. Nessa visão, o microambiente, de alguma forma, educaria as DCs residentes a fim de que a resposta efetora desenvolvida não cause danos excessivos aos tecidos-alvos (MATZINGER, 2007).

### 1.3.1 Resposta T Helper

As células T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel central no desenvolvimento de respostas imunes. A antiga dicotomia entre imunidade humoral e celular foi, primeiramente, descrita por Elie Metchnikoff durante seu estudo sobre uma doença fúngica em dáfnias, em que descreveu o papel dos fagócitos na luta contra patógenos (METCHNIKOFF, 1884). Inicialmente, dois subtipos de células T CD4<sup>+</sup> foram descritos: um subtipo que participa da ativação células B, promovendo a imunidade humoral (T<sub>H</sub>2), e outro subtipo que amplifica a

ativação de macrófagos, promovendo a imunidade celular ( $T_H1$ ). Descobertas recentes levaram a revisão do paradigma  $T_H1$ - $T_H2$  devido a incorporação de novos componentes (células T regulatórias e  $T_H17$ ) no processo de decisão sobre o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (revisado por STEINMAN, 2007).

As células  $T_H1$  são caracterizadas pela produção de *interferon* (IFN)- $\gamma$ , uma potente citocina ativadora de macrófagos, sendo essenciais no combate a patógenos intracelulares e na indução da produção de anticorpos do subtipo IgG<sub>2a</sub> pelas células B. A diferenciação  $T_H1$  é iniciada através de sinais derivados da ativação do TCR e da via de sinalização de STAT1 (*Signal transducer activator of transcription 1*). Dentre as citocinas polarizantes capazes de ativar STAT1, podemos citar IFN do tipo I (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ ) e II (IFN $\gamma$ ) e IL-27, cujos receptores estão presentes nas células T CD4<sup>+</sup> virgens. A ativação de STAT1 induz a ativação do fator de transcrição T-bet, o principal regulador da diferenciação do subtipo  $T_H1$ . A translocação de T-bet para o núcleo promove a expressão dos genes de IFN $\gamma$ , da cadeia  $\beta 2$  do receptor de IL-12 (IL-12R $\beta 2$ ), entre outros genes. A expressão do receptor de IL-12 completo na superfície da célula T CD4<sup>+</sup> possibilita a ativação de STAT4 pela IL-12, potencializando a produção de IFN $\gamma$  e induzindo a expressão do receptor de IL-18 na célula  $T_H1$  diferenciada. Além de ativar mecanismos dependentes de STAT4, a produção de IL-12 pelas DCs é capaz de recrutar células NK produtoras de IFN $\gamma$ , essenciais para indução de T-bet nos estágios iniciais da diferenciação das células  $T_H1$  (figura 3) (revisado por MURPHY & REINER, 2002).

Como discutido anteriormente, de acordo com a natureza dos sinais de perigo liberados nos sítios inflamatórios, as DCs adquirem um determinado perfil de secreção de citocinas. Esse perfil de citocinas, ditas polarizantes, determinará o desenvolvimento da resposta imune efetora. A família da IL-12 é constituída de citocinas heterodiméricas, cujo seu protótipo, a citocina IL-12p70, é formado pelas subunidades IL-12p40 e IL-12p35. Além de associar-se com IL-12p35, a subunidade IL-12p40 pode formar dímeros com IL-12p19,

dando origem a citocina IL-23. A subunidade EBI3, homóloga a IL-12p40, associa-se a IL-12p28, formando o mais novo membro dessa família, denominado IL-27. As funções das citocinas IL-23 e IL-27 serão discutidas mais adiante. A família da IL-12 contém, ainda, as citocinas CLC-sCNTFR e CLC-CLF-1 (revisado por TRINCHIERI *et al.*, 2003). As DCs ativadas são a principal fonte da citocina IL-12, cuja produção é regulada pela natureza dos sinais de perigo liberados nos sítios inflamatórios. A produção de IL-12 pelas DCs imaturas pode ser induzida por diversos ligantes de TLRs presentes nos microorganismos, como LPS, RNA dupla-fita e motivos de DNA rico em CpG (revisado por KAPSENBERG, 2003), como também por sinais de perigo endógenos, como as proteínas de choque térmico (Hsp) (SINGH-JASUJA *et al.*, 2000; FLOHE *et al.*, 2003), citocinas (VIEIRA *et al.*, 2000; LUFT *et al.*, 2002), quimiocinas (ALIBERTI *et al.*, 2000) e bradicinina (ALIBERTI *et al.*, 2003). Após sua indução, a secreção de IL-12 pode ser potencializada pela produção de IFN- $\gamma$  e a interação com o ligante de CD40 (CD40L) (CELLA *et al.*, 1996) na superfície da célula T de memória. Enquanto que a geração de prostaglandina E<sub>2</sub> (KALINSKI *et al.*, 2001) e a liberação de lipoxina A<sub>4</sub> (ALIBERTI *et al.*, 2002) são capazes de suprimir a produção de IL-12 pelas DCs.

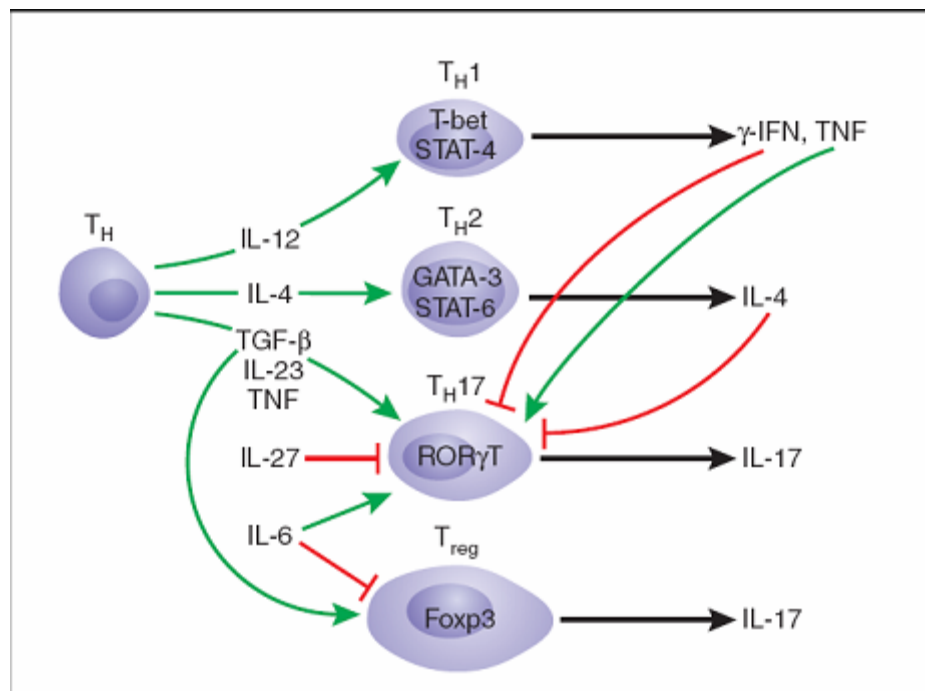
As células T<sub>H2</sub> são caracterizadas pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13, sendo responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos para os sítios inflamatórios e pela indução da produção de IgG<sub>1</sub> e IgE pelas células B. A diferenciação das células T<sub>H2</sub> é iniciada pela ativação do TCR em conjunto com a ativação da via de sinalização de STAT6, disparada pela citocina IL-4. Esses sinais são responsáveis por induzir baixos níveis da expressão de GATA-3, fator de transcrição essencial para diferenciação do subtipo T<sub>H2</sub>. A expressão de GATA-3 é capaz de modular positivamente sua própria expressão e direcionar alterações epigenéticas que possibilitam a expressão das citocinas T<sub>H2</sub> (IL-4, IL-5 e IL-13). A ativação de GATA-3 também suprime fatores críticos para a diferenciação T<sub>H1</sub>, incluindo STAT4 e a cadeia IL-

12R $\beta$ 2. Desse modo, a citocina polarizante IL-4 é responsável por iniciar vias autócrinas positivas e negativas que direcionam o comprometimento com o subtipo T<sub>H</sub>2 (figura 3) (revisado por MURPHY & REINER, 2002; STEINMAM, 2007).

A primeira evidência do subtipo T<sub>H</sub>17 originou-se de estudos *in vitro* sobre a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> na presença da bactéria *Borrelia burgdorferi*, causadora da doença de Lyme. Os autores identificaram, nesse trabalho, uma população de células T CD4<sup>+</sup> efectoras que apresentavam um padrão distinto de expressão gênica, incluindo aumento da produção da citocina IL-17, GM-CSF e TNF- $\alpha$ , enquanto que a produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 encontravam-se ausentes (INFANTE-DUARTE *et al.*, 2000). Inicialmente, sugeriu-se que as células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 originavam-se do subtipo T<sub>H</sub>1, tendo a IL-23 um papel chave na indução dessa população celular (BETTELLI & KUCHROO, 2005). Entretanto, dois grupos independentes revelaram que as células T<sub>H</sub>1 diferenciadas não são sensíveis ao estímulo com IL-23 e que a ativação das vias de sinalização de STAT1 (induzida por IFN do tipo I e II) e STAT6 (induzida por IL-4) inibe o desenvolvimento do subtipo T<sub>H</sub>17 *in vitro*, sugerindo uma via de desenvolvimento distinta para o subtipo T<sub>H</sub>17 (HARRINGTON *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005) (revisado por WEAVER *et al.*, 2007; STEINMAN, 2007). Diversos estudos indicam que o novo subtipo T<sub>H</sub>17 desempenha um papel central no desenvolvimento de doenças autoimunes inflamatórias e alérgicas (ex. encefalite autoimune (CUA *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2006; KOMIYAMA *et al.*, 2006), artrite induzida por colágeno (NAKAE *et al.*, 2003; MURPHY *et al.*, 2003; KOENDERS *et al.*, 2005), hipersensibilidade das vias aéreas (HELLINGS *et al.*, 2003)) e no controle de infecções causadas por microorganismos, incluindo *Klebsiella pneumoniae* (YE *et al.*, 2001), *Citrobacter rodentium* (MANGAN *et al.*, 2006) e *Borrelia burgdorferi* (INFANTE-DUARTE *et al.*, 2000) (revisado por WEAVER *et al.*, 2007; STEINMAN, 2007).

Trabalhos recentes identificaram que a polarização do subtipo  $T_H17$  é direcionada pelas citocinas IL-6 e TGF- $\beta$  (VELDHOEN *et al.*, 2006; MANGAN *et al.*, 2006; BETTELLI *et al.*, 2006), as quais induzem a expressão do fator de transcrição ROR $\gamma$ T (IVANOV *et al.*, 2006) e do receptor completo de IL-23 na superfície celular (VELDHOEN *et al.*, 2006; MANGAN *et al.*, 2006). A ativação de ROR $\gamma$ T induz a expressão de IL-17A e IL-17F nas células T CD4<sup>+</sup>, sendo o principal fator de transcrição na diferenciação  $T_H17$  (IVANOV *et al.*, 2006). Enquanto que as produções de IL-6 e TGF- $\beta$  são determinantes no comprometimento com o subtipo  $T_H17$ , sugere-se que a produção de IL-23 seja essencial na expansão e na manutenção da resposta  $T_H17$ , induzindo a produção de IL-17, IL-6 e TNF- $\alpha$  nas células diferenciadas (VELDHOEN *et al.*, 2006; MANGAN *et al.*, 2006; BETTELLI *et al.*, 2006). Cabe ressaltar que a produção somente de TGF- $\beta$  estimula a diferenciação de células T regulatórias, enquanto que a ativação dos receptores de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são capazes de potencializar a produção de IL-17 induzida por IL-23 (VELDHOEN *et al.*, 2006). Alguns mecanismos de supressão da diferenciação  $T_H17$  foram demonstrados. Park e colaboradores observaram que a adição de IL-4 e IFN- $\gamma$  reduzem a produção de IL-17 em células T CD4<sup>+</sup> de memória (PARK *et al.*, 2005). Recentemente, foi demonstrado que a produção de IL-27, citocina da família da IL-12 produzida por DCs e macrófagos ativados, é capaz de suprimir o desenvolvimento de células  $T_H17$  em modelos de encefalite autoimune (BATTEN *et al.*, 2006) e infecção cerebral por *Toxoplasma gondii* (STUMHOFER *et al.*, 2006). Assim como outros membros da família, o receptor da IL-27 é composto de duas subunidades, IL-27R $\alpha$ /WSX-1, expressa em células do sistema imune, e gp130, compartilhada com alguns receptores da família da IL-6, sendo expressa em diversos tipos celulares. Considerando que os dois componentes do receptor de IL-27 estão presentes na célula T CD4<sup>+</sup> virgem, sugere-se que a competição com a citocina polarizante IL-6 pelo recrutamento da subunidade gp130 constitua um dos mecanismos responsáveis pela supressão da diferenciação  $T_H17$  pela IL-27

(revisado por WEAVER *et al.*, 2007). A produção de IL-27 pelas DCs resulta na ativação das vias de sinalização de STAT1 e STAT3 nas células T CD4<sup>+</sup> virgens. Foi demonstrado que a ativação de STAT1 é crucial na supressão do subtipo T<sub>H</sub>17, ao mesmo tempo que é determinante na diferenciação T<sub>H</sub>1 (BATTEN *et al.*, 2006; STUMHOFER *et al.*, 2006) (figura 3).



**Figura 3** – Vias de diferenciação dos subtipos de células T CD4<sup>+</sup> efectoras (STEINMAN, 2007).

As células T regulatórias (Tregs) naturais ( $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ ), originadas no timo, e as células Tregs periféricas, induzidas na periferia a partir de células T  $CD4^+$  virgens, participam da regulação das respostas imunes induzidas em diferentes contextos. A tolerância imunológica (central e periférica) previne respostas imunes adaptativas excessivas e doenças autoimunes, ao mesmo tempo que pode beneficiar a sobrevivência de patógenos no organismo. Dentre as Tregs periféricas, três populações distintas foram identificadas: (a) Tregs  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  originadas a partir de células T  $CD4^+ CD25^-$  através de uma via independente do timo, (b) Tregs  $CD4^+ CD25^- Foxp3^+$  produtoras de TGF- $\beta$  (também denominadas  $T_H3$ ) encontradas após exposição de antígenos orais, sendo dependente de TGF- $\beta$  para a sua diferenciação e (c) Tregs  $CD4^+ CD25^- Foxp3^-$  produtoras de IL-10 (também denominadas Tr1) diferenciadas na presença de IL-10 sob estimulação antigênica crônica (figura 3) (revisado por LOHR *et al.*, 2006).

#### 1.4 Sistema Caliceína-cinina

As cininas pertencem a um grupo de peptídeos vasoativos de 9 a 11 aminoácidos que inclui a bradicinina (BK), lisil-bradicinina (LBK) e seus metabólitos ativos, as des-Argininas (des-Arg-BK/LBK). Os peptídeos do sistema caliceína-cinina exercem diversas funções fisiológicas e patológicas, tais como regulação da homeostase vascular, renal e cardíaca, tendo também implicações na patogênese da hipertensão e inflamação (revisado por BHOOLA *et al.*, 1992).

As cininas são liberadas de proteínas precursoras, os cininogênios de alto e baixo peso molecular (HK e LK), mediante clivagem proteolítica pelas caliceínas (figura 4). O sítio primário da biosíntese de cininogênio é o fígado, podendo também ser expresso, em menor grau, em outros tecidos (KAUFMANN *et al.*, 1993). As caliceínas são serino-proteases



presentes no plasma (plasmática) ou nos tecidos (teciduais), participando de diversos processos como a coagulação, fibrinólise, geração de cininas, inflamação e câncer (HEIMARK *et al.*, 1980; MOTTA *et al.*, 1992; PALIOURAS & DIAMANDIS, 2006). A caliceína plasmática é sintetizada e secretada em sua forma precursora, a pré-caliceína plasmática, por hepatócitos, formando um complexo com HK e circulando no plasma aderido à superfície externa da membrana de neutrófilos (MANDLE *et al.*, 1976; HENDERSON *et al.*, 1992, HENDERSON *et al.*, 1994). A ativação do sistema caliceína-cinina é, tradicionalmente, investigada em modelos artificiais utilizando superfícies negativamente carregadas (caulim, dextran sulfato, fosfolípidios) através da ligação e auto-ativação do fator XII, o qual é capaz de ativar a pré-caliceína a caliceína ativa, que, por sua vez, cliva e ativa o fator XII, amplificando a ativação do sistema. Entretanto, em células endoteliais e outros tipos celulares, a ativação da pré-caliceína plasmática não depende criticamente do fator XII, sendo clivada pela serino-protease proilcarboxipeptidase (PCRP) presente na superfície dessas células. Esse processo é regulado pela ligação de HK na superfície celular e pela presença de  $Zn^{2+}$  livre. A caliceína plasmática, então, gerada na superfície da célula endotelial cliva seu substrato nativo, o HK, liberando a BK (ROJKJAER & SCHMAIER, 1999; SHARIAT-MADAR *et al.*, 2002). As caliceínas tissulares são serino-proteases que possuem alta especificidade por cininogênios plasmáticos. Essas enzimas liberam LBK a partir dos precursores HK ou LK (DRINKWATER *et al.*, 1987; MACDONALD *et al.*, 1988). Durante estados inflamatórios, as cininas podem ser geradas através da ação conjunta das enzimas elastase de leucócitos e triptase de mastócitos sobre o HK oxidado (revisado por IMAMURA *et al.*, 2004).

As cininas são rapidamente degradadas por metalopeptidases encontradas em tecidos e fluidos biológicos. Entre as principais enzimas cininogénicas podemos citar a cininase I (carboxipeptidase N/M), que se notabiliza por remover o resíduo de arginina da porção

carboxi-terminal das cininas, dando origem aos metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-BK ou des-Arg<sup>10</sup>-LBK. Em contraste com a cininase I, as cininases II (ex. ECA e NEP) removem o dipeptídeo Phe-Arg da porção carboxi-terminal das cininas, gerando um metabólito (LBK/BK-(1-5)) incapaz de ativar os receptores B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R (figura 4) (revisado por BHOOLA *et al.*, 1992). Apesar da LBK/BK-(1-5) ou RPPGF não induzir os efeitos clássicos mediados pelas cininas, esse metabólito é altamente estável, sendo capaz de inibir efeitos mediados pela  $\alpha$ -trombina através de sua ligação ao sítio de trombina nos receptores PAR-1 e PAR-4 (HASAN *et al.*, 1996; PRIETO *et al.*, 2002; MURPHEY *et al.*, 2006).

#### 1.4.1 Receptores de cininas

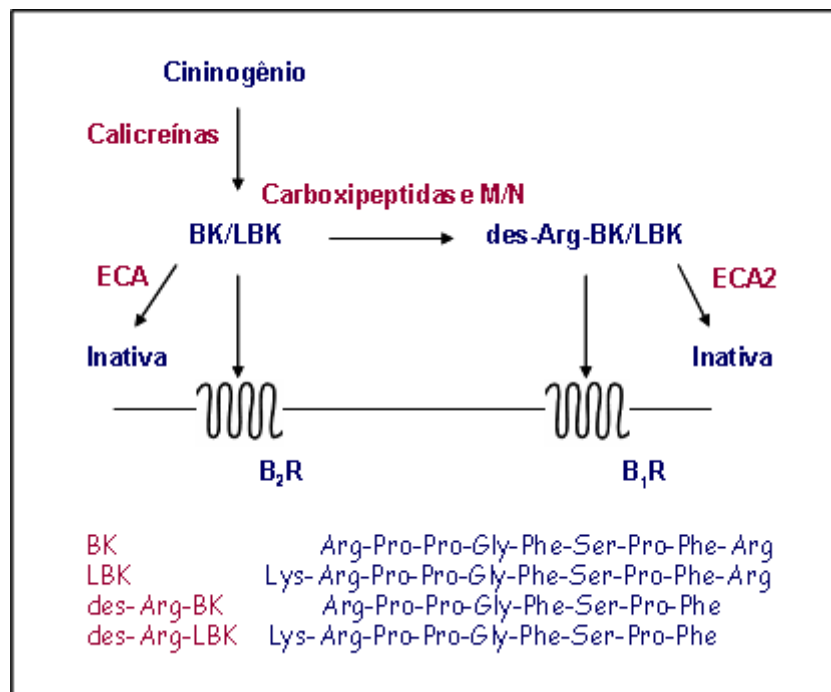
Os efeitos biológicos das cininas são mediados por dois receptores distintos acoplados a proteína G, os receptores B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R. Os receptores B<sub>2</sub>R são expressos constitutivamente na superfície de células musculares, endoteliais, epiteliais, fibroblastos e células neuronais (revisado por HALL, 1997). A ativação do receptor B<sub>2</sub>R pelos seus agonistas, BK e LBK, promovem, entre outros efeitos, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e dor (revisado por MARCEAU & BACHVAROV, 1998; PRADO *et al.*, 2002). Em contraste, os receptores B<sub>1</sub>R possuem uma baixa expressão em tecidos normais, sendo induzidos sob condições fisiopatológicas, como injúria, infecção ou inflamação crônica. Os agonistas dos receptores B<sub>1</sub>R, des-Arg-BK/LBK, são gerados através da ação proteolítica da carboxipeptidase M/N. Além dos efeitos clássicos mediados pelo receptor B<sub>2</sub>R, a ativação do receptor B<sub>1</sub>R está associada a processos como angiogênese, fibrose e hiperalgesia. Durante o curso da inflamação, a regulação positiva da expressão do receptor B<sub>1</sub>R ocorre através da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) ou de MAPK induzidos por citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) ou produtos microbianos (ex. LPS, tGPI-mucina (ANDRADE, 2003)) (revisado por MARCEAU, 1998).

Vários mecanismos de transdução de sinal têm sido descritos para os receptores de cininas. Na maioria dos casos, os receptores de cinina sinalizam através da ativação das proteínas  $G\alpha_q$ , porém podendo interagir com as proteínas  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_s$  e  $G\alpha_{12/13}$  (revisado por LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005). A indução da sinalização da proteína  $G\alpha_q$  pelas cininas promove a ativação da fosfolipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), geração de inositol-trifosfato (IP3) e aumento dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Além da via de sinalização clássica, o estímulo com BK/des-Arg-BK é capaz de induzir a liberação de ácido araquidônico e, conseqüentemente prostanóides (ex. PGE<sub>2</sub>), através da ativação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), bem como ativar a fosfolipase D, diversas isoformas da proteína quinase C (PKC  $\alpha$ ,  $\epsilon$  e  $\zeta$ ) e as vias de sinalização de MAPK e STAT3 (revisado por LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005). Dentre os genes regulados pela ativação dos receptores de cininas, podemos citar as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, a enzima óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) e o receptor B<sub>1</sub>R (revisado por LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005).

A ativação do receptor B<sub>2</sub>R pelos seus agonistas (BK, LBK) promove sua rápida desensibilização e internalização, induzida pela fosforilação da cauda carboxi-terminal do receptor mediada por quinases associadas a receptores acoplados a proteína G (ex. GRK4 $\alpha$  e GRK3) (BLAUKAT *et al.*, 2001, BLAUKAT, 2003) Além da fosforilação, a palmitoilação da porção carboxi-terminal do receptor B<sub>2</sub>R é capaz de alterar a dinâmica do receptor, modificando a eficácia e o comportamento de seus agonistas e antagonistas (PIZARD *et al.*, 2001). Os receptores B<sub>1</sub>R não sofrem regulação mediada pelos agonistas. A ausência de desensibilização desses receptores contribui para os seus efeitos persistentes (revisado por LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005).

O composto [Leu<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-BK foi o primeiro antagonista descrito para os receptores de cininas. Esse antagonista foi desenvolvido em 1977 por Regoli e colaboradores, apresentando alta especificidade para o receptor B<sub>1</sub>R (REGOLI *et al.*, 1977). Entretanto, o uso

de [Leu<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-BK em modelos *in vivo* apresentou uma baixa eficácia, podendo também exibir atividade de agonista parcial. As dificuldades mencionadas acima levaram os pesquisadores ao desenvolvimento de novos antagonistas para o receptor B<sub>1</sub>R. Os compostos des-Arg-HOE-140 (RHALEB *et al.*, 1992) e B9858 (GERA *et al.*, 1996; GOBEIL *et al.*, 1999) apresentam maior eficácia *in vivo* (maior resistência à degradação por peptidases), bem como não exibem atividade de agonistas parciais. O composto HOE-140 (Icatibant) constitui o antagonista do receptor B<sub>2</sub>R mais utilizado pelos pesquisadores, uma vez que não apresenta atividade agonística, exibe alta afinidade para o receptor B<sub>2</sub>R e maior resistência à degradação por peptidases quando comparado aos compostos anteriores (HOCK *et al.*, 1991). O desenvolvimento posterior do composto B9430 (STEWART *et al.*, 1996) permitiu o bloqueio simultâneo dos receptores B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R em diversos modelos de estudo (revisado por LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005).



**Figura 4** – Componentes do sistema calicreína-cinina.

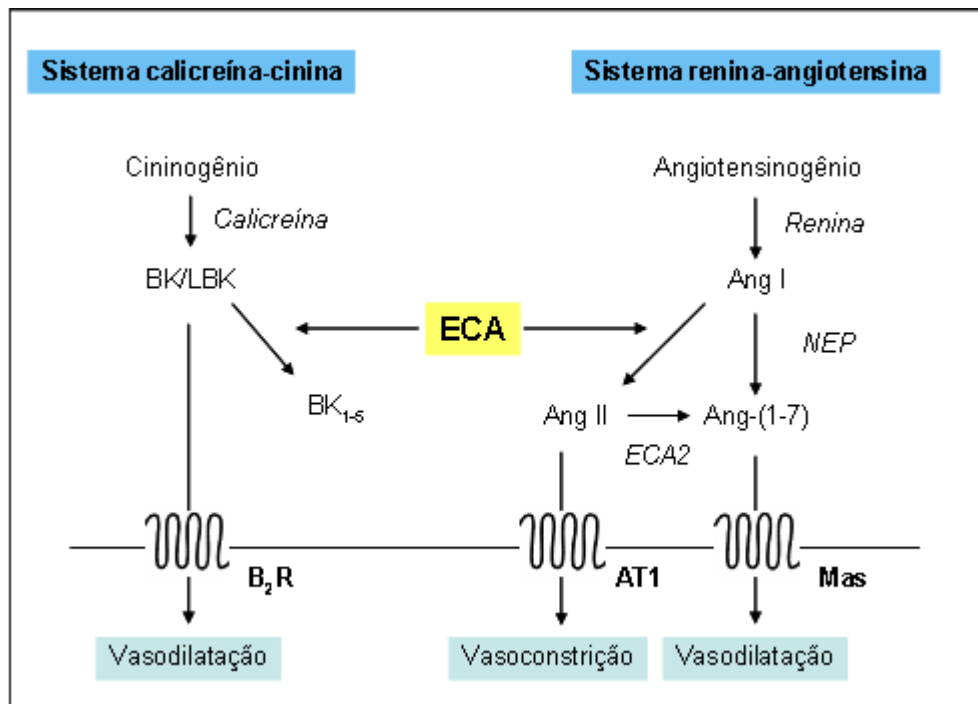
#### 1.4.2 Interação com o sistema renina-angiotensina

Os sistemas calicreína-cinina e renina-angiotensina interagem de diversas maneiras (figura 5). As calicreínas plasmáticas e tissulares foram identificadas como um dos fatores capazes de ativar a pró-renina a renina, enzima responsável por gerar Ang I. Nesse cenário, a ECA possui um papel dualístico, ora gerando Ang II a partir de Ang I, ora degradando BK/LBK. A enzima PRCP, responsável pela ativação da calicreína plasmática na superfície de células endoteliais, cliva Ang II ao heptapeptídeo Ang-(1-7) (revisor por SCHMAIER, 2003). O peptídeo Ang-(1-7) é capaz de potencializar diversos efeitos mediados pela BK. A administração de Ang-(1-7) aumenta o efeito hipotensor da BK em diversos estudos nos modelos humano e murino (PAULA *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 1997). Cabe ressaltar que os peptídeos Ang-(1-7) e BK podem interagir negativamente. Em modelos com células renais, a adição de Ang-(1-7) estimula a atividade da enzima Na<sup>+</sup> ATPase, enquanto que o estímulo com BK inibe a atividade dessa enzima, revertendo os efeitos induzidos pela Ang-(1-7) (CARUSO-NEVES *et al.*, 2003).

O sistema renina-angiotensina compreende um complexo sistema hormonal parácrino, cujo componente central, a Ang II, é um potente vasoconstritor que participa ativamente da manutenção da homeostase hidroeletrólítica e vascular (revisado por DOSTAL & BAKER, 1999). Assim como o sistema calicreína-cinina, o sistema renina-angiotensina é considerado um sistema endócrino, cuja substância ativa Ang II é produzida por clivagens enzimáticas seqüenciais a partir do angiotensinogênio de origem hepática. Na circulação sangüínea, o angiotensinogênio circulante é convertido em Ang I pela ação da enzima renina. A renina é produzida, principalmente, nos rins em resposta a desequilíbrios na pressão arterial renal, alterações de sal na dieta e variações da intensidade da estimulação simpática nos rins. Como apresentado anteriormente, a Ang I é, finalmente, convertida em Ang II pela ação da ECA (figura 5) (revisado por DOSTAL & BAKER, 1999). Além da ativação do sistema renina-

angiotensina sistêmica, diversos trabalhos apontam para a existência de um sistema renina-angiotensina local em diversos tecidos (ex. coração, vasos sanguíneos, tecido adiposo, cérebro e rins) (revisado por KURDI *et al.*, 2005).

Diversos efeitos importantes são atribuídos a Ang II, incluindo aumento da pressão arterial, estimulação dos centros de sede no cérebro, indução da liberação da aldosterona (levando ao aumento das taxas de retenção de sódio e fluido nos rins), liberação de hormônio antidiurético (aumento da retenção de fluidos), aumento do tônus simpático e indução do remodelamento cardíaco (revisado por DOSTAL & BAKER, 1999). As ações mencionadas acima são, na maioria das vezes, mediadas pelo receptor de Ang II do tipo 1 (AT1), sendo contra-reguladas pelo receptor de Ang II do tipo 2 (AT2) (revisado por DOSTAL & BAKER, 1999). Cabe ressaltar que a ativação do receptor AT2 pela Ang II é capaz de promover a produção de BK e óxido nítrico em células renais, evidenciando mais uma via de interação entre esses sistemas (SIRAGY *et al.*, 1996; SIRAGY *et al.*, 1997).



**Figura 5** – Interação entre os sistemas caliceína-cinina e renina-angiotensina (adaptado de SCHMAIER, 2003).

Recentemente, a interação física entre os receptores dos sistemas calicreína-cinina e renina-angiotensina foi demonstrada. Os receptores B<sub>2</sub>R e AT1 podem formar heterodímeros estáveis na superfície celular de células musculares lisas, plaquetas e vasos omentais (ABDALLA *et al.*, 2000; ABDALLA *et al.*, 2001). Essa interação induz o aumento da resposta a Ang II, enquanto que diminui a eficácia e potencia da sinalização através do receptor B<sub>2</sub>R. A heterodimerização entre B<sub>2</sub>R e AT1 também é capaz de alterar as vias de dessensibilização desses receptores (ABDALLA *et al.*, 2000; ABDALLA *et al.*, 2001). Recentemente, a formação de heterodímeros entre os receptores B<sub>2</sub>R e AT2 foi demonstrada em células PC12W. A interação entre esses receptores promove o aumento da produção de GMPc e óxido nítrico (ABADIR *et al.*, 2006). Já o receptor de Ang-(1-7), Mas, pode interagir fisicamente com o receptor AT1, diminuindo a mobilização dos estoques de Ca<sup>+2</sup> intracelulares e a produção de inositol fosfato induzidos por Ang II (KOSTENIS *et al.*, 2005). Além do mais, camundongos nocautes para o receptor Mas apresentam aumento da vasoconstrição de vasos mesentéricos quando comparados aos animais selvagens, sugerindo que o receptor Mas atue como antagonista fisiológico do receptor AT1 (KOSTENIS *et al.*, 2005) (revisado por SCHMAIER, 2003). Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa sugerem a cooperação entre os receptores Mas e B<sub>2</sub>R durante a invasão de tripomastigotas de *T. cruzi* em células endoteliais humanas (ANDRADE, tese de doutorado, em andamento).

#### 1.4.3 Enzima Conversora de Angiotensina

A enzima conversora de angiotensina (ECA, cininase II ou CD143) pertence à família M2 das metaloproteases dependentes de zinco e catalisa a hidrólise de dipeptídeos da extremidade carboxi-terminal de uma variedade de substratos. Entre os substratos fisiológicos mais conhecidos dessa enzima destacam-se: (i) a angiotensina I (Ang I), precursora do

peptídeo vasoconstritor angiotensina II (Ang II), que é gerada pela remoção do dipeptídeo His-Leu do C-terminal; (ii) a BK, peptídeo inativado através da clivagem da ligação Pro-Phe. Outros substratos da ECA incluem o hormônio liberador do hormônio luteinizante (LH-RH) substância P,  $\beta$ -neoendorfina<sub>1-9</sub> e neurotensina (revisado por ERIKSSON *et al.*, 2002). O heptapeptídeo angiotensina-(1-7), produto de degradação da Ang I ou Ang II, pode atuar tanto como substrato (CHAPPELL *et al.*, 1998) ou inibidor da ECA (DEDDISH *et al.*, 1998). Recentemente, identificou-se que a ECA é capaz de clivar âncoras de GPI, liberando diversas proteínas ancoradas a membrana. A atividade GPIase é encontrada em um domínio distinto daquele com ação peptidásica, apresentando-se, portanto, insensível à inibição por inibidores de ECA clássicos (KONDOH *et al.*, 2005).

A ECA é encontrada em duas formas principais: a ECA somática e testicular (tECA). As duas formas da ECA são sintetizadas como proteínas ancoradas à membrana, porém podendo ocorrer na forma solúvel (ou plasmática) após subsequente clivagem proteolítica por metaloproteases do tipo secretase. A principal fonte de ECA plasmática é o endotélio vascular. A ECA associada à membrana ocorre em diversos tecidos, como no endotélio vascular, cérebro, placenta, intestino e nos túbulos renais. Os pulmões e testículos, órgãos altamente vascularizados, constituem as fontes mais abundantes dessa enzima (revisado por IGIC & BEHNIA, 2003). A ECA também é encontrada em células do sistema imune, incluindo DCs (LAPTEVA *et al.*, 2001; KRAMERS *et al.*, 2001; DANILOV *et al.*, 2003), monócitos (ROHRBACH, 1984) e linfócitos T (COSTEROUSSE *et al.*, 1993). É importante ressaltar que a ação proteolítica da ECA é capaz de aumentar a eficiência da apresentação de peptídeos específicos pelo MHC classe I (KOZLOWSKI *et al.*, 1992, EISENLOHR *et al.*, 1992). A ECA testicular é capaz de liberar as proteínas TESPS e PH-20 da superfície do espermatozóide, contribuindo para a fertilidade em humanos (KONDOH *et al.*, 2005; FUCHS *et al.*, 2005). Camundongos mutantes para a ECA desenvolvem hipotensão espontânea,



infertilidade masculina parcial e malformações renais (KREGGE *et al.*, 1995; ESTHER *et al.*, 1997).

Os inibidores da ECA são amplamente utilizados na clínica, melhorando o prognóstico de pacientes após infarto do miocárdio, bem como o de portadores de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, diabetes e disfunção renal (revisado por REMUZZI & RUGGENENTI, 2006). O captopril foi o primeiro inibidor da ECA administrado terapêuticamente (1ª geração), seguido do desenvolvimento de novos compostos, incluindo o ramipril, enalapril e lisinopril (revisado por MENARD & PATCHETT, 2001). Além de prevenir a geração de Ang II, a inibição da ECA bloqueia a degradação da BK/LBK, tendo sido amplamente utilizada com esse propósito nos ensaios realizados nesta dissertação.

Em 2000, uma proteína homóloga a ECA, a ECA2, foi descrita em humanos, ratos e camundongos (TIPNIS *et al.*, 2000; DONOGHUE *et al.*, 2000; CRACKOWER *et al.*, 2002). Apesar da alta similaridade com a ECA, a ECA2 é uma carboxipeptidase que apresenta uma preferência por substratos distinta, atuando, exclusivamente, na remoção de apenas um único aminoácido da porção carboxi-terminal de peptídeos. Portanto, a ECA2 não é capaz de converter Ang I em Ang II, tampouco inativar a bradicinina (revisado por ERIKSSON *et al.*, 2002). É importante lembrar que a ECA2 é capaz de clivar des-Arg-BK/LBK em metabólitos inativos, regulando, assim, a ativação do receptor B<sub>1</sub>R (DONOGHUE *et al.*, 2000). Um importante papel atribuído a ECA2 constitui na geração de Ang-(1-7) a partir da Ang II. O heptapeptídeo Ang-(1-7) exerce diversos efeitos contrários aos efeitos mediados pela Ang II (vasodilatação e inibição da proliferação celular), sugerindo que a ECA2 atue como um regulador interno opondo-se aos efeitos mediados pela ECA (figura 5). Consistente com essa hipótese, camundongos nocautes para ECA2 apresentam defeitos na contractilidade cardíaca, enquanto que camundongos nocautes simultaneamente para ECA e ECA2 não apresentam tais defeitos (CRACKOWER *et al.*, 2002). Além dos efeitos no sistema

cardiovascular, a ECA2 foi identificada como um receptor funcional para a infecção celular do vírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS) (LI *et al.*, 2003).

Como apresentado anteriormente, a Ang-(1-7) é um metabólito ativo do sistema renina-angiotensina que atua na regulação interna das ações mediadas pela Ang II. Duas vias principais de geração de Ang-(1-7) foram descritas: (a) a partir da clivagem proteolítica da Ang I por neprilisinases (NEP, circulação e endotélio vascular), endopeptidases (produção local) ou prolil-oligopeptidases (produção local) e (b) a partir da Ang II através da ação de ECA2 ou prolilendopeptidases (figura 5) (revisado por FERRARIO & CHAPPEL, 2004). Em condições normais, os níveis de Ang-(1-7) são baixos (faixa de picomolar), sendo elevados durante o bloqueio da ECA (CAMPBELL *et al.*, 1993) através do favorecimento da clivagem de Ang I pela NEP, bem como da diminuição da degradação de Ang-(1-7) pela ECA (YAMADA *et al.*, 1998). Em 2003, o grupo de pesquisa liderado pelo professor Robson Santos da UFMG demonstrou que o peptídeo Ang-(1-7) age sobre um receptor específico acoplado a proteína G regulatória, denominado Mas (SANTOS *et al.*, 2003). A maioria dos efeitos mediados pela Ang-(1-7) favorece a diminuição da pressão sanguínea em condições de altos níveis de Ang II. A liberação de Ang-(1-7) induz a produção de vasopressina, prostaglandinas e óxido nítrico (revisado por FERRARIO & IYIER, 1998). Além desses efeitos, a Ang-(1-7) é capaz de inibir a proliferação em células musculares (TALLANT *et al.*, 1999; TALLANT & CLARK, 2003) e tumorais (GALLAGHER & TALLANT, 2004).

#### 1.4.4 As cininas e o sistema imune

As cininas são rapidamente geradas durante respostas inflamatórias agudas e crônicas, induzindo processos como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, migração celular e dor. Além desses efeitos, as cininas estão associadas à inflamação neurogênica, uma vez que participam da ativação de fibras nervosas e

da produção de substância P e peptídeos relacionados ao gene da calcitonina (revisado por CALIXTO *et al.*, 2000). Além de serem geradas endogenamente, as cininas podem ser liberadas durante infecções por patógenos munidos de enzimas cininogénicas, como por exemplo, as bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Staphylococcus aureus* (revisado por IMAMURA *et al.*, 2004) e o protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (TODOROV *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2006).

O conceito de que as cininas são capazes de modular respostas imunes inatas e adaptativas originou-se de observações do nosso grupo de pesquisa. Utilizando BK exógena, foi demonstrado que DCs esplênicas ativadas através do receptor B<sub>2</sub>R são capazes de modular positivamente a produção de IL-12 e a expressão de CD80 e CD86 após estímulo com LBK exógena (ALIBERTI *et al.*, 2003). No mesmo trabalho, foi demonstrado que embora a ECA regule negativamente a produção de IL-12 induzida pela LBK exógena, sua inibição em culturas mantidas sem estímulo inflamatório, ou seja, apenas na presença do soro, é capaz de estimular a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 pelas DCs (ALIBERTI *et al.*, 2003). Além de induzir um fenótipo maduro nas DCs, a LBK exógena promove a polarização da resposta T<sub>H</sub>1 no modelo de imunização Al (OH)<sub>3</sub>/OVA (T<sub>H</sub>2 dependente) em camundongos selvagens, não tendo efeito em animais nocautes para IL-12p40 (ALIBERTI *et al.*, 2003). Esses dados sugeriram que as cininas podem atuar como sinais de perigo endógenos, promovendo a integração entre a resposta inata e adaptativa através da indução de IL-12 por uma via dependente do receptor B<sub>2</sub>R.

Estudos posteriores, realizados no modelo de infecção s.c. com *T.cruzi*, revelaram que a resposta inflamatória inicial disparada pela forma infectiva tripomastigota e a subsequente resposta T<sub>H</sub>1 dependem da cooperatividade entre os receptores TLR2 e B<sub>2</sub>R (MONTEIRO *et al.*, 2006). Estudos adicionais revelaram que a maturação *in vitro* das DCs induzida por tripomastigotas de *T.cruzi* depende, predominantemente, da ativação dos receptores B<sub>2</sub>R e não

da via TLR/MyD88. Nessas condições, a cruzipaina, cisteíno-protease majoritária do *T.cruzi*, libera cininas a partir do cininogênio presente no soro ou adsorvidos na superfície das DCs (MONTEIRO *et al.*, em preparação). No modelo experimental com *T.cruzi*, a disponibilidade de cininas nos sítios de infecção é responsável pela maturação de DCs imaturas, governando a indução da imunidade adaptativa (revisado por SCHARFSTEIN *et al.*, submetido). De modo semelhante, no modelo de infecção por *P.gingivalis*, observou-se que a administração conjunta de gingipaina, cisteíno-protease liberadora de cininas, e *P.gingivalis* LPS, ligante de TLR2, induz respostas inflamatórias e adaptativas ( $T_H1$  intensas) dependentes dos receptores TLR2/B<sub>2</sub>R (RAPOSO, tese de mestrado, em andamento).

Estudos em andamento no nosso laboratório avaliam o emprego da BK sintética como adjuvante na vacinação contra a infecção pelo *T.cruzi* (MONTEIRO *et al.*, em preparação). Utilizando o modelo de infecção letal pelo *T.cruzi*, observa-se que o uso de BK como adjuvante foi capaz de proteger 100% dos animais infectados. Essa proteção está associada a uma vigorosa resposta  $T_H1$  e a geração de células T CD8<sup>+</sup> protetoras (MONTEIRO *et al.*, em preparação).

Impulsionados por esses dados, nos propusemos a investigar a função imunológica dos sistemas caliceína-cinina e renina-angiotensina, avaliando os efeitos dos hormônios peptídicos, BK e Ang-(1-7), em DCs humanas e murinas e os efeitos das cininas durante a resposta imune secundária.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Explorar o papel dos sistemas caliceína-cinina e renina-angiotensina na ativação e regulação de células dendríticas humanas e murinas.

### 2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar o impacto da adição de BK na ativação de DCs humanas derivadas de monócitos;
- 2) Verificar se a adição de BK é capaz de modular a produção de IFN- $\gamma$  durante respostas secundárias;
- 3) Investigar se o peptídeo Ang-(1-7) é capaz de induzir a produção de IL-12 em DCs CD11c<sup>+</sup> esplênicas murinas.

### 3. Metodologia

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Meios de cultura

Tipo Celular	Descrição do meio de cultura
Células dendríticas humanas	RPMI-1640 (Sigma) suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (SFBi) e 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina (Sigma)
Células dendríticas esplênicas murinas	RPMI-1640 suplementado com 10 % SFB fresco e 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina
Células totais dos linfonodos	DMEM (Gibco) suplementado com 2 mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina, 0,1 mM aminoácidos essenciais e não-essenciais, 1mM piruvato de sódio, vitaminas e 0,05 mM β-mercaptoetanol (todos os reagentes da Gibco)

##### 3.1.2 Heparina

Liquemine (heparina sódica) – Roche

### 3.1.3 Ficoll

Ficoll-paque plus (densidade 1.077 mg/mL) - GE Healthcare lifesciences do Brasil Ltda.

### 3.1.4 Citocinas

GM-CSF recombinante humano – R&D systems

IL-4 recombinante humano – PeproTech

TNF $\alpha$  recombinante humano - R&D systems

### 3.1.5 Colagenase

Colagenase D – Sigma

### 3.1.6 DNase

DNase I fração IX – Sigma

### 3.1.7 Solução de lise de hemácias

0,17 M Tris-HCl, 0,16 M cloreto de amônio pH 7.2

### 3.1.8 Paraformaldeído – Sigma

### 3.1.9 Saponina – Sigma

### 3.1.10 Estímulos e antagonistas

- Bradicinina (BK) – Calbiochem
- des-Arg-bradicinina (DABK) – Sigma

- Angiotensina II (Ang II) – Bachem, gentilmente cedido pelo Dr. Robson Santos, UFMG
- Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) – Bachem, gentilmente cedido pelo Dr. Robson Santos, UFMG
- Captopril (Cap) – Sigma
- Lisinopril (Lis) – Sigma
- HOE-140 (Antagonista do receptor B<sub>2</sub>R) – Sigma
- [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK (Antagonista do receptor B<sub>1</sub>R) – Sigma
- Losartan (Antagonista do receptor AT1) – Biossintética
- PD123319 (Antagonista do receptor AT2) – Sigma, gentilmente cedido pelo Dr. Marcelo Einicker-Lamas
- A779 (Antagonista do receptor Mas) – Bachem, gentilmente cedido pelo Dr. Robson Santos, UFMG (SANTOS *et al.*, 2003).

### 3.1.11 Anticorpos

- anti-CD14 humano–FITC, clone M5E2– BD Pharmigen
- anti-CD83 humano–PE, clone HB15e – BD Pharmigen
- anti-CD11c murino-FITC, clone HL3 – BD Pharmigen
- anti-IL-12p40/70 murino-PE, clone C15.6 – BD Pharmigen
- anti-CD16/CD32 murino (receptor de Fcγ III/II), clone 2.4G2 – BD Pharmigen

### 3.1.12 Micro-esferas magnéticas

Micro-esferas magnéticas anti-CD11c murino (N418) – Miltenyi Biotec



### 3.1.13 Kit para separação magnética

Kit para coluna MACS MS – Myltenyi Biotec

### 3.1.14 Ovalbumina

Utilizamos na imunização: OVA grau III – Sigma

Utilizamos no re-estímulo *in vitro*: OVA grau V – Sigma

### 3.1.15 Adjuvante completo de Freund (CFA)

Adjuvante completo de Freund contendo *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177) inativada por calor – Sigma

### 3.1.16 Kits de ELISA

IL-6 humano – R&D systems

TNF- $\alpha$  humano – R&D systems

IL-12p40 humano – PeproTech

IFN- $\gamma$  murino – R&D systems

## 3.2 Métodos

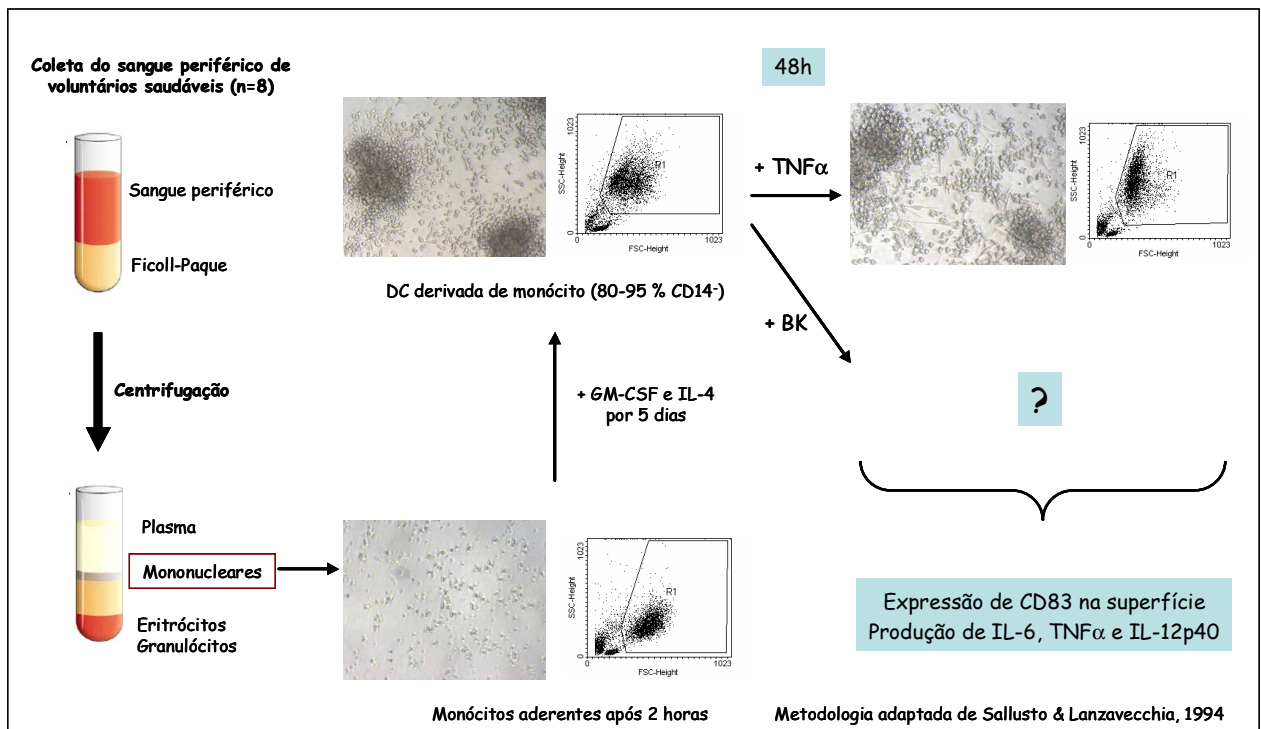
### 3.2.1 Obtenção de DCs humanas derivadas de monócitos

Os experimentos com DCs humanas foram realizados em colaboração com a Dr. Vivian M. Rumjanek, fazendo parte da tese de doutorado da estudante Clarissa Nascimento e de um projeto mais amplo sobre o estudo *in vitro* da diferenciação e maturação de células dendríticas humanas. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (INCA).

Para a realização dos experimentos com DCs humanas, foram coletados 40-60 mL de sangue periférico de voluntários sadios em seringas contendo heparina sódica na concentração final de 250 U/mL. Em seguida, as células mononucleares foram obtidas através de centrifugação (400g por 30 min) em gradiente de densidade com Ficoll-paque e plaquetas em RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (SFBi) e 100 U/mL penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina na densidade celular de  $5 \times 10^6$  células/mL em placas de 24 poços. Após duas horas de incubação a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub>, as células não-aderentes foram descartadas e os monócitos aderidos a placa, cultivados por cinco dias em RPMI 10% SFBi suplementado ou não com as citocinas GM-CSF (50 ng/mL) e IL-4 (50 ng/ml) para a diferenciação em DCs. No terceiro e no quinto dia de cultivo, 50 % do meio de cultura foi descartado e um meio de cultura novo contendo GM-CSF e IL-4 foi readicionado, mantendo-se as condições de cultivo iniciais. No quinto dia de cultura os seguintes estímulos de maturação foram adicionados em RPMI 10% SFBi suplementado com GM-CSF e IL-4: TNF- $\alpha$  (50 ng/mL), BK (1, 10 e 100 nM) ou Ang-(1-7) (10 nM) na presença ou ausência de Captopril (25 µM), HOE-140 (100 nM), [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK (100 nM). Os estímulos foram mantidos em cultura por 48h a 37°C 5% CO<sub>2</sub> (figura 6).

### 3.2.2 Determinação da expressão de CD83 nas DCs humanas

Após o período de 48h de estímulo, as culturas de DCs foram centrifugadas e os sobrenadantes recolhidos e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de citocinas. As células foram recolhidas em PBS gelado e transferidas para tubos novos. Em seguida, as células foram lavadas em PBS 5% SFBi e incubadas com os anticorpos anti-CD83-PE ( $20\ \mu\text{l}/10^6$  células) e anti-CD14-FITC ( $5\ \mu\text{l}/10^6$  células) no volume final de  $50\ \mu\text{l}$  por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  protegidas da luz. Após o período de incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS 5% SFBi e analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (UFRJ - Instituto de Microbiologia Professor Carlos Góes). Os dados foram analisados no programa WinMDI.



**Figura 6** – Esquema ilustrativo da metodologia de obtenção e ativação de células dendríticas humanas imaturas.

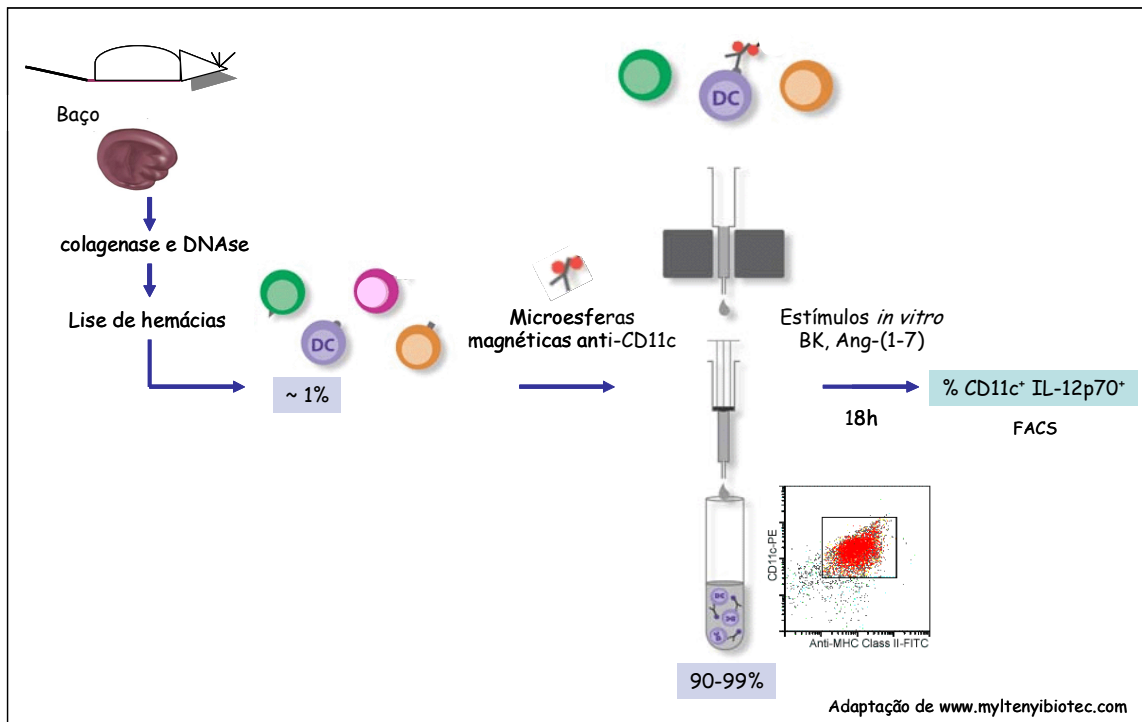
### 3.2.3 Camundongos

Para a realização dos experimentos no modelo murino foram utilizados camundongos das linhagens, C57BL/6 e DO11.10 (gentilmente cedidos pelo Dr. João Viola, INCA, RJ) e BALB/c machos e fêmeas (25-35g) com idades entre 8 a 12 semanas. Os animais foram mantidos no Biotério do Programa de Imunobiologia (IBCCF, UFRJ) ou no Biotério do Centro de Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer (INCA, RJ) em temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12 horas com livre acesso à água e ração. Também foram utilizados camundongos das linhagens J129 Sv/Ev ( $\text{B}_2\text{R}^{+/+}$ ) e  $\text{B}_2\text{R}^{-/-}$ , gentilmente cedidos pelo Dr. João Bosco Pesquero (Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo).

### 3.2.4 Obtenção de células $\text{CD11c}^+$ esplênicas murinas

Baços de camundongos saudáveis BALB/c, J129 ou  $\text{B}_2\text{R}^{-/-}$  foram retirados, cortados em pequenos pedaços e tratados com RPMI suplementado com 1 mg/mL de colagenase D, 100  $\mu\text{g/mL}$  de DNaseI e 0,5 mM de EDTA por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após o período de incubação, as hemácias da suspensão celular foram lisadas com solução de lise de hemácias por 5 min à temperatura ambiente. As células foram lavadas, contadas e incubadas com micro-esferas magnéticas anti-CD11c em PBS 5% SFB por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  conforme as recomendações do fabricante. A suspensão celular foi lavada, ressuspendida em PBS 5% SFB e submetida à coluna magnética. As células  $\text{CD11c}^+$  foram separadas através de seleção positiva em coluna MS acoplada a um separador magnético (Miltenyi Biotec) conforme o protocolo do fabricante. As células  $\text{CD11c}^+$  purificadas foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade celular de  $10^6$  células/mL em RPMI suplementado com 10% SFB fresco e 100 U/mL penicilina-estreptomicina. Em seguida, os seguintes estímulos foram adicionados: BK (10 nM) + Lisinopril (25  $\mu\text{M}$ ) ou Ang-(1-7) (0,1, 1, 10 e 100 nM) na presença ou ausência de

Losartan (1  $\mu$ M), A779 (1  $\mu$ M) e PD123319 (1  $\mu$ M). Os estímulos foram mantidos em cultura por 18 h a 37°C 5% CO<sub>2</sub> (figura 7).



**Figura 7** – Esquema ilustrativo da metodologia de obtenção e ativação de células dendríticas esplênicas murinas CD11c<sup>+</sup>.

### 3.2.5 Determinação da produção de IL-12 por citometria de fluxo

Após o período de 18 h de estímulo *in vitro*, adicionou-se Brefeldina A (10  $\mu$ g/mL) às culturas de DCs murinas por 4 h, a fim de paralisar a secreção de citocinas através do complexo de Golgi, acumulando-as no meio intracelular. As células foram recuperadas e transferidas para tubos novos. As células foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo bloqueador do receptor de Fc (1  $\mu$ g/10<sup>6</sup> células) por 20 min a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo de superfície anti-CD11c-FITC (1  $\mu$ g/10 células) por 30 min a 4°C. As células foram lavadas em PBS 0,1% SFB e fixadas com 2% de paraformaldeído por 5 min a temperatura ambiente. As células foram lavadas duas vezes em PBS 1% SFB e

incubadas com o anticorpo anti-IL-12p40/70-PE ( $1\mu\text{g}/10^6$  células) em PBS 0,1% SFB 0,5% saponina por 30 min a  $4^\circ\text{C}$ . As células foram lavadas e ressuspensas em PBS para leitura no citômetro de fluxo. As células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (UFRJ - Instituto de Microbiologia Professor Carlos Góes) e os dados analisados no programa WinMDI.

### 3.2.6 Obtenção das células dos linfonodos inflamatórios

Camundongos C57BL/6 ou DO11.10 saudáveis foram imunizados pela via subcutânea (s.c.) na pata com  $100\mu\text{g}$  de OVA em CFA (1:1) no volume final de  $50\mu\text{l}$  por pata. Quando indicado, os camundongos foram tratados previamente s.c. com HOE-140 ( $200\mu\text{g}/\text{kg}$ , 1 hora antes e 5 horas após a imunização) ou B9858 ( $200\mu\text{g}/\text{kg}$ , 2 horas antes e 5 horas após a imunização). Após 12 dias, os animais foram sacrificados e os linfonodos drenantes (poplíteos e inguinais) foram retirados e macerados em DMEM completo suplementado com 10% SFBi. A suspensão celular foi lavada e o número de células avaliado. As células totais dos linfonodos foram re-estimuladas com 50, 200 ou  $500\mu\text{g}/\text{mL}$  de OVA na presença ou ausência de BK (100 nM), Captopril ( $25\mu\text{M}$ ), HOE-140 ( $1\mu\text{M}$ ), [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK ( $1\mu\text{M}$ ), A779 ( $1\mu\text{M}$ ). Em seguida, as células foram plaqueadas na densidade celular de  $10^6$  células/mL e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  5% $\text{CO}_2$  por 72h.

### 3.2.7 Determinação das citocinas por ELISA

Após o período de 48h ou 72h de incubação, os sobrenadantes das culturas celulares foram recolhidos, centrifugados para excluir contaminações celulares e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$ .

A quantificação das citocinas IL-6, TNF $\alpha$ , IL-12p40, IFN $\gamma$  e IL-17A nos sobrenadantes foi realizada através do método de ELISA de captura conforme recomendações do fabricante.

### 3.2.8 Análise da proliferação celular

As células totais dos linfonodos drenantes foram plaqueadas na densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço em placas de 96 poços fundo chato. As culturas celulares foram reestimuladas com 50 ou 500  $\mu\text{g/mL}$  de OVA na presença ou ausência de BK (100 nM), Captopril (25  $\mu\text{M}$ ), HOE-140 (1  $\mu\text{M}$ ) e [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK (1  $\mu\text{M}$ ) por 62h a 37°C 5%CO<sub>2</sub>. Adicionou-se, então, timidina-H<sup>3</sup> na concentração de 5 $\mu\text{Ci/mL}$  por 10 h. As culturas celulares foram congeladas e, posteriormente, recolhidas e transferidas para papel de lã de vidro no coletor CellHarvest. Os papéis foram transferidos para tubos do cintilador e incubados por 18 h para secagem. Em seguida, adicionou-se 1mL de líquido de cintilação por tubo e a incorporação de timidina-H<sup>3</sup> foi determinada no contador de partículas  $\beta$  modelo Beckman LS 6000 LL.

### 3.2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prisma. Os dados foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA) pareada (estudos com humanos) ou não-pareada (modelo murino), seguida do pós-teste de Tukey. Adotou-se o nível de significância mínimo de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 4. Resultados

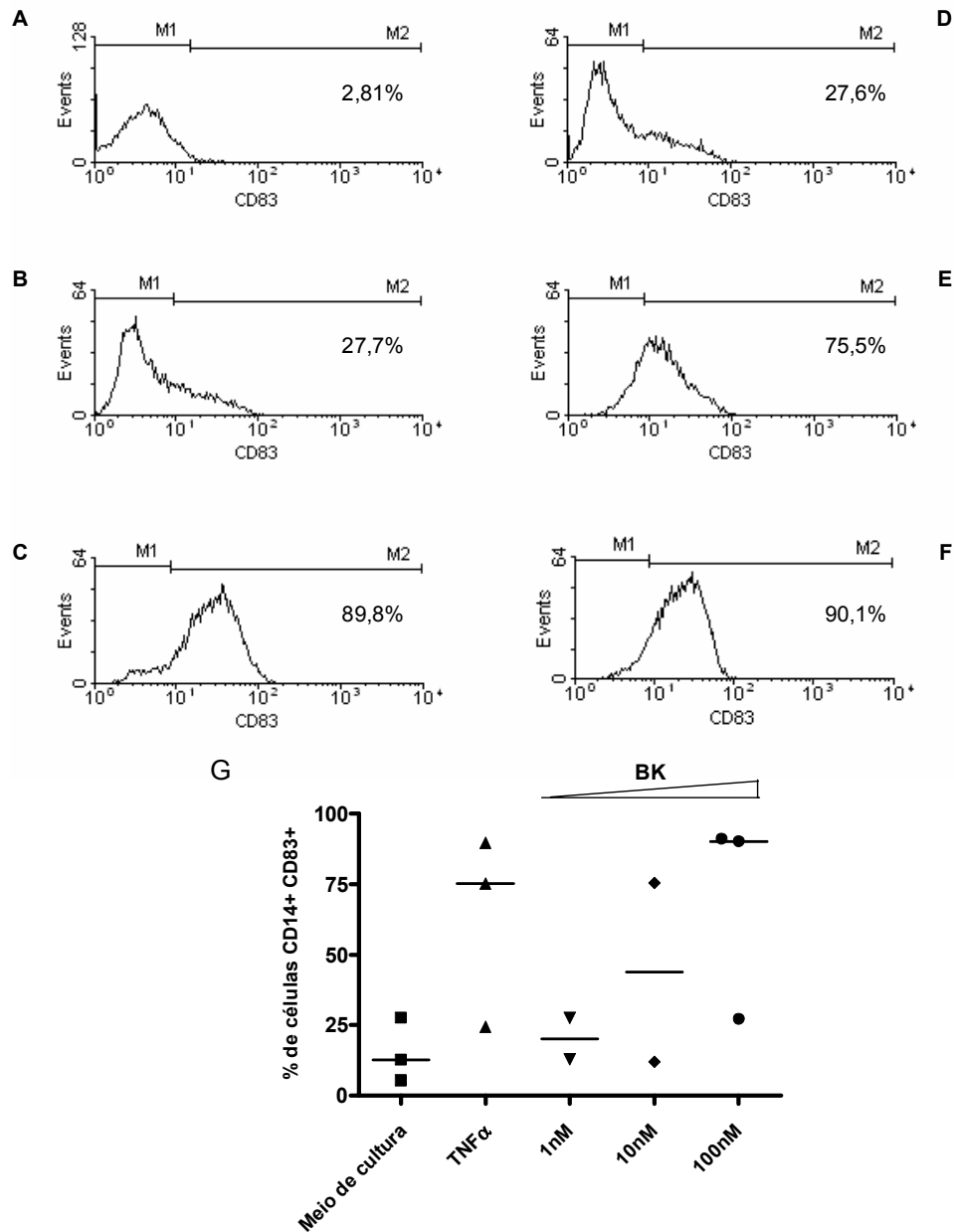
### 4.1 Ativação de células dendríticas humanas pela bradicinina

Nos estudos com humanos, isolamos monócitos de sangue periférico de oito doadores saudáveis e, utilizando a metodologia descrita por Sallusto e Lanzavecchia, em 1994, obtivemos e estimulamos DCs humanas derivadas de monócitos com concentrações distintas de BK (1, 10, 100 nM), as quais foram baseadas nos estudos sobre a maturação de DCs murinas induzida por cininas (ALIBERTI *et al.*, 2003). Após 48 horas de incubação em meio completo, analisamos a expressão do marcador de maturação, CD83, por citometria de fluxo. A adição de TNF- $\alpha$  às culturas de DCs imaturas foi utilizada como controle positivo de ativação das DCs humanas. Como observado na figura 1, a adição de BK nas concentrações de 10 nM e 100 nM foi capaz de aumentar a expressão de CD83 na superfície das DCs de modo dependente da concentração (aumento de, respectivamente, 2,7 e 3,2 vezes) e em níveis semelhantes ao TNF- $\alpha$  (aumento de 3,2 vezes) (figura 8). Observamos que entre os oito doadores analisados, seis (75 % da população avaliada) apresentaram DCs derivadas de monócitos responsivas a BK.

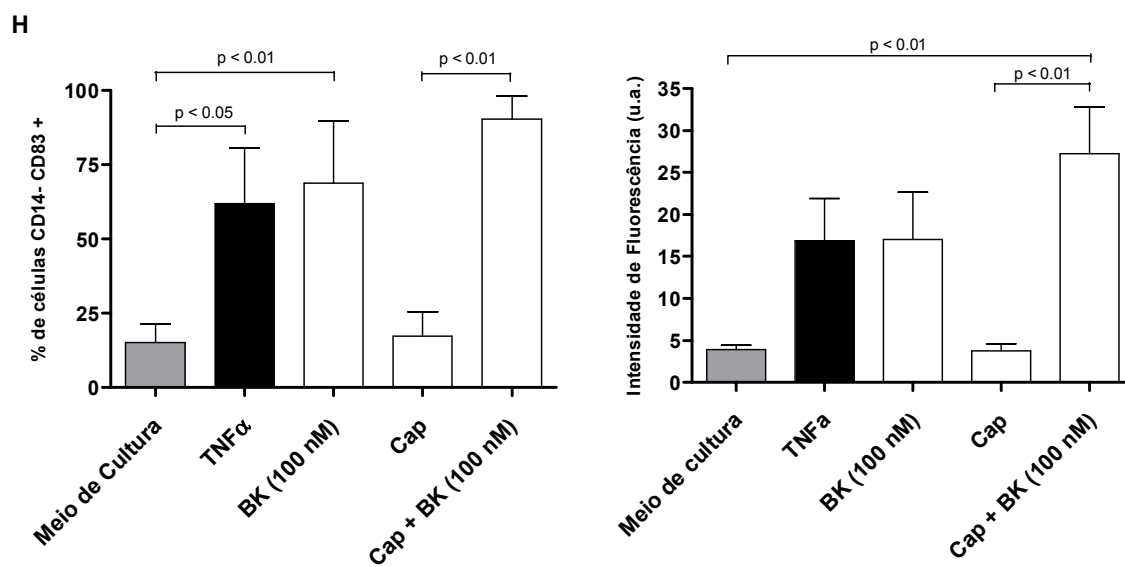
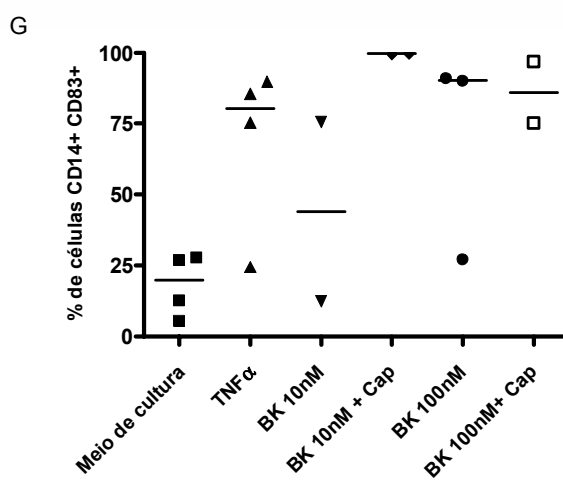
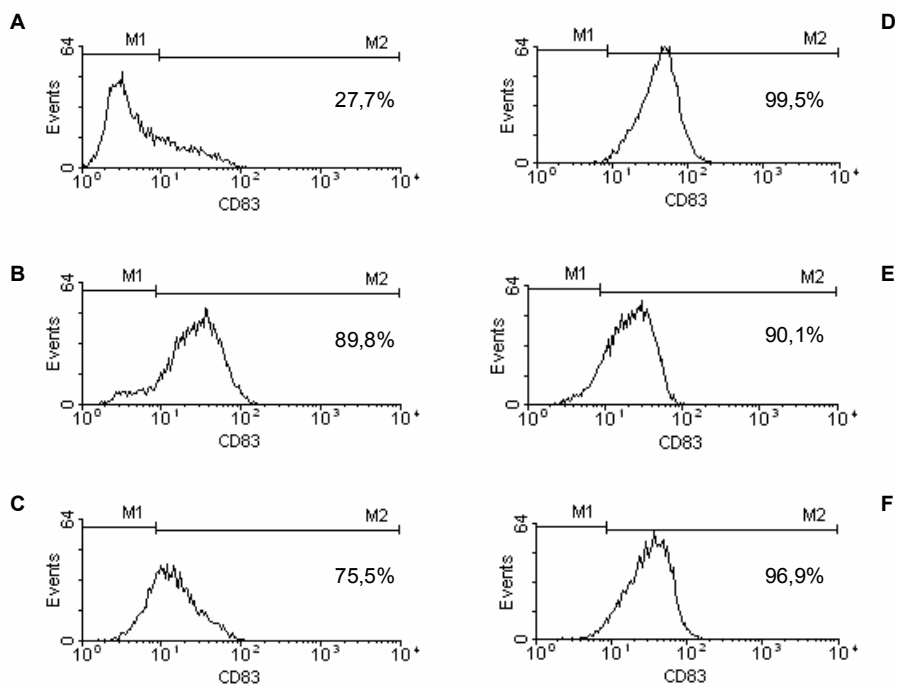
Como discutido na introdução, a ECA/cininase II (CD143) é encontrada tanto na superfície celular de DCs humanas (LAPTEVA *et al.*, 2001; KRAMERS *et al.*, 2001), quanto nos soros comerciais utilizados no meio de cultura (BRAMUCCI *et al.*, 1999), constituindo a principal enzima degradadora de cininas nos estudos *in vitro*. A adição de 10 nM de BK em meio suplementado com o inibidor da ECA, captopril (Cap), potencializou o aumento da expressão de CD83 induzido pela BK nas DCs humanas (aumento de 1,3 vezes em relação ao estímulo com apenas BK). Já na concentração de 100 nM de BK não observamos efeito potencializador, nem tampouco efeito negativo do captopril (Figura 9). O percentual de



células expressando CD83 (entre 90 a 96% de células CD83<sup>+</sup>) e a ausência de efeitos potencializadores do captopril sugerem que foram alcançados os níveis máximos de expressão desse marcador.

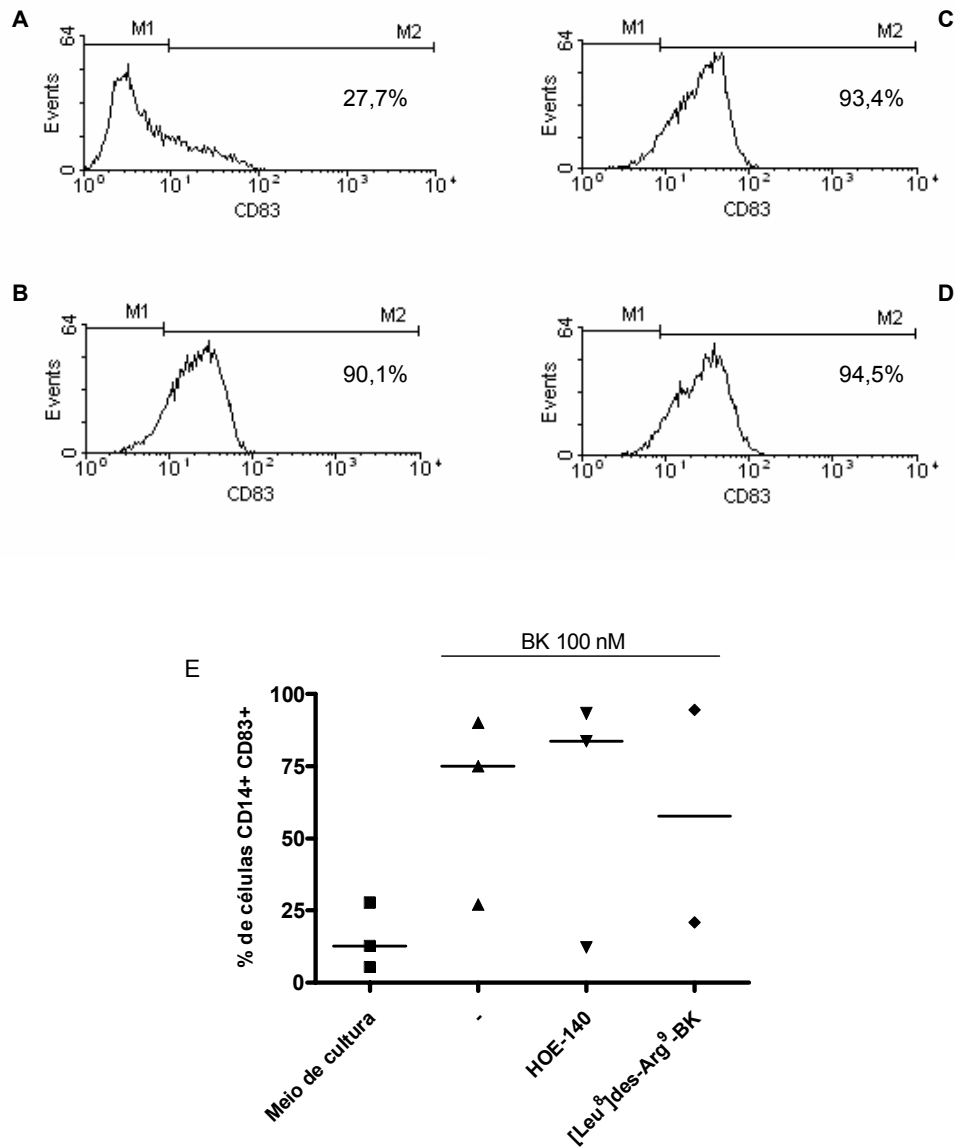


**Figura 8** – Ativação das células dendríticas humanas pela bradicinina. Monócitos obtidos do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis foram cultivados em RPMI suplementado com 10% SFB, na ausência (A) ou presença de IL-4 (50 ng/mL) e GM-CSF (50 ng/mL) por 5 dias (B-F). No quinto dia foram adicionados: (B) meio de cultura, (C) TNF-α (50ng/mL), (D) BK 1 nM, (E) BK 10 nM, (F) BK 100 nM. Após 48 h, as células foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-CD14 FITC e anti-CD83 PE. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisadas no programa WinMDI. Os histogramas apresentam a expressão de CD83 e o percentual de células CD83<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> de um experimento representativo de pelo menos dois doadores. O gráfico (G) representa a dispersão dos dados de cada doador.



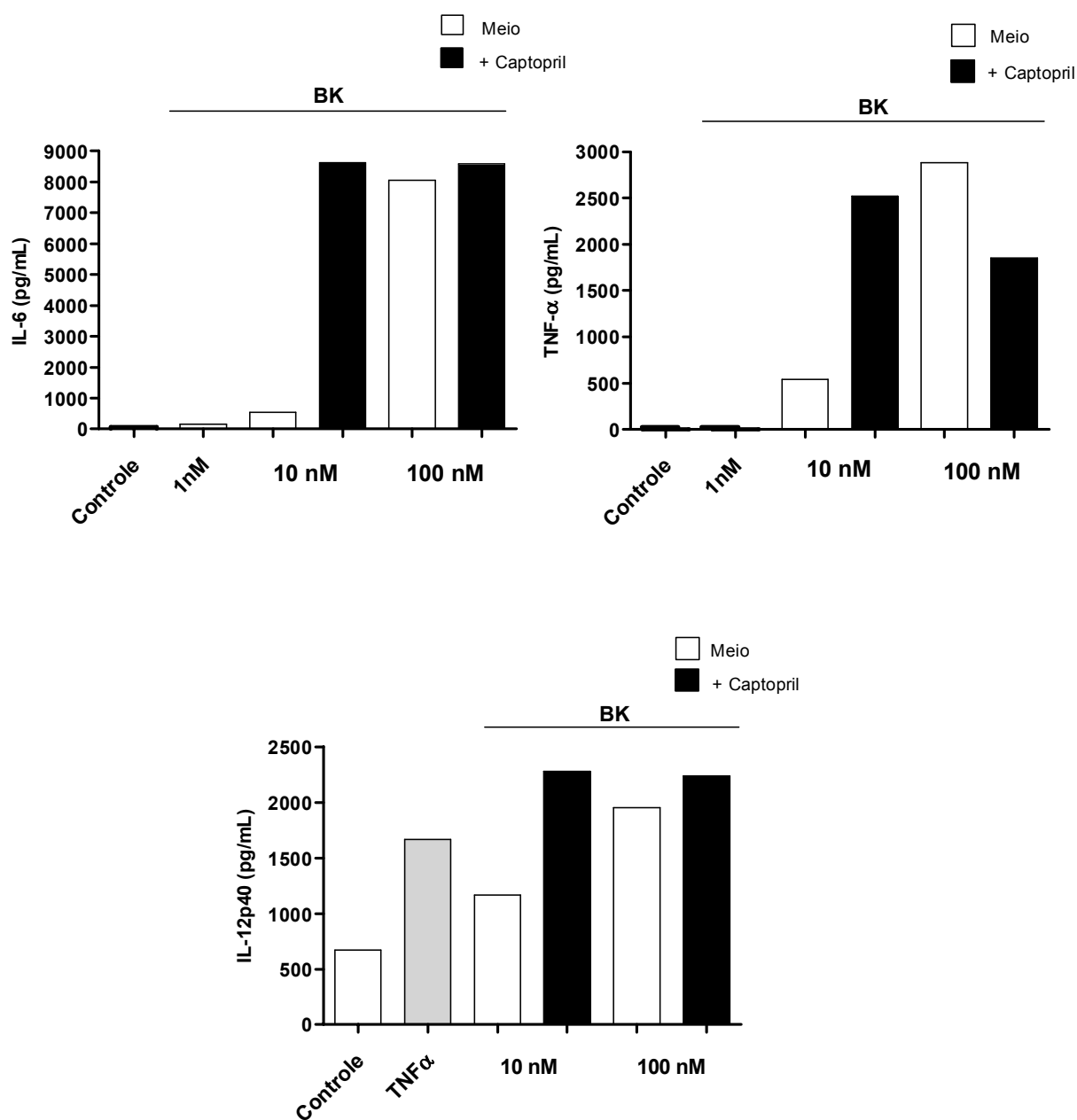
**Figura 9** – Ativação das células dendríticas humanas pela bradicinina. Monócitos obtidos do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis foram cultivados em RPMI suplementado com 10% SFB na presença de IL-4 (50 ng/mL) e GM-CSF (50 ng/mL) por 5 dias. No quinto dia foram adicionados: (A) meio de cultura, (B) TNF- $\alpha$  (50 ng/mL), (C) BK 10 nM, (D) BK 10 nM + Cap (25  $\mu$ M), (E) BK 100 nM, (F) BK 100 nM + Cap (25  $\mu$ M). Após 48 h, as células foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-CD14 FITC e anti-CD83 PE. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisadas no programa WinMDI. Os histogramas representam a expressão de CD83 e o percentual de células CD83<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> de um experimento representativo de pelo menos dois doadores. O gráfico (G) representa a dispersão dos dados de cada doador. Os gráficos (H) representam a média e o erro padrão de quatro experimentos independentes. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA pareada, seguido de pós-teste de Tukey. Adotou-se o nível de significância mínimo de 5%.

Conforme descrito na introdução, dois tipos de receptores de cininas distintos foram definidos: o receptor de expressão constitutiva, B<sub>2</sub>R, e o receptor B<sub>1</sub>R, induzido após injúria tecidual (revisado por LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005). Para investigar a natureza dos mecanismos envolvidos na ativação das DCs humanas pela BK, adicionamos os antagonistas peptídicos HOE-140 (antagonista de B<sub>2</sub>R) e [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK (antagonista de B<sub>1</sub>R) imediatamente antes do estímulo de DCs humanas com BK. Surpreendentemente, a adição desses antagonistas não bloqueou o aumento da expressão de CD83 nas DCs humanas (Figura 10), não obstante o fato desses compostos apresentarem eficácia comprovada em estudos rotineiros do nosso grupo de pesquisa utilizando DCs e macrófagos murinos, células endoteliais e músculo liso humanos.



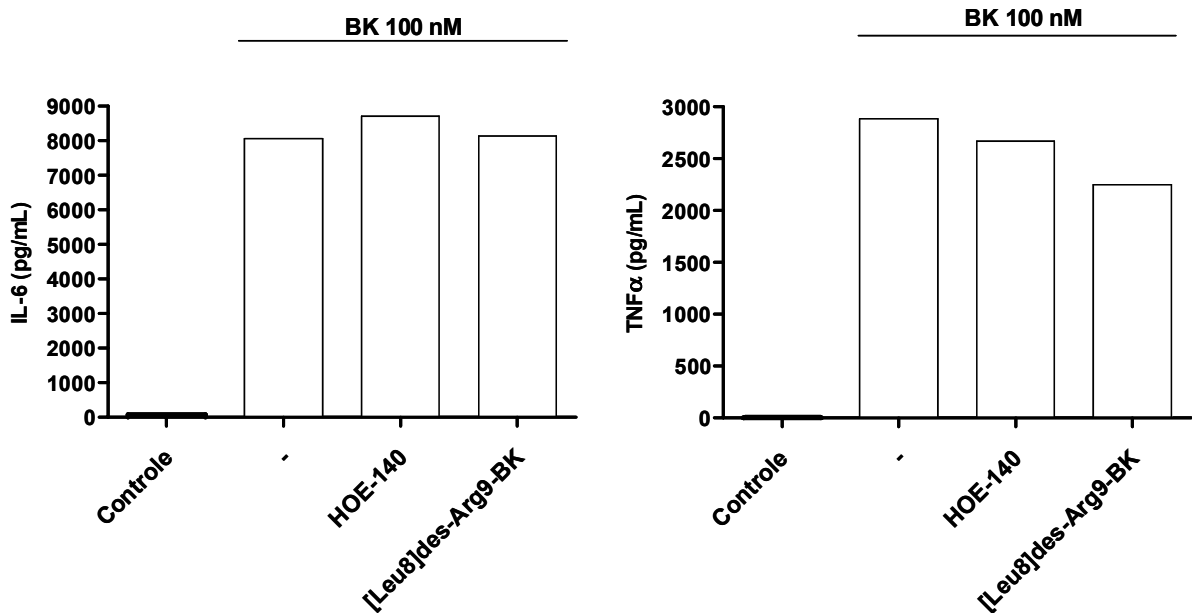
**Figura 10** – Participação dos receptores de cininas na ativação de DCs humanas induzida pela BK. Monócitos obtidos do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis foram cultivados em RPMI suplementado com 10% SFB na presença de IL-4 (50 ng/mL) e GM-CSF (50 ng/mL) por 5 dias. No quinto dia foram adicionados: (A) meio de cultura, (B) BK 100 nM, (C) BK 100 nM + HOE-140 (100 nM), (D) BK 100nM + [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK (100 nM). Após 48 h, as células foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-CD14 FITC e anti-CD83 PE. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisadas no programa WinMDI. Os histogramas apresentam a expressão de CD83 e o percentual de células CD83<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> de um experimento representativo de pelo menos dois doadores. O gráfico (E) representa a dispersão dos dados de cada doador.

Citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas DCs ativadas, como por exemplo, IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-6, são essenciais no processo de diferenciação de células T durante o desenvolvimento de respostas imunes. Consistente com os dados descritos para CD83, observamos que a adição de BK foi capaz de aumentar a produção de IL-6 (em torno de 2 a 120 vezes) e TNF- $\alpha$  (em torno de 500 a 2000 vezes), além de aumentar a produção de IL-12p40 (em torno de 1,5 a 3 vezes), de modo dependente da concentração (Figura 11). Tal como observado anteriormente, o estímulo com BK (10 nM) em meio suplementado com captopril foi capaz de potencializar a produção de IL-6 (em, aproximadamente, 15 vezes), TNF- $\alpha$  (em, aproximadamente, 5 vezes) e IL-12p40 (em, aproximadamente, 2 vezes) (Figura 11). A adição de captopril às culturas estimuladas com 100 nM de BK não alterou os níveis de IL-6 e IL-12p40, porém promoveu efeito negativo na produção de TNF- $\alpha$  (Figura 4).



**Figura 11** – Produção de citocinas pró-inflamatórias induzida pela BK nas DCs humanas. Monócitos obtidos do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis foram cultivados em meio suplementado com 10% SFB na presença de IL-4 (50 ng/mL) e GM-CSF (50 ng/mL) por 5 dias. No quinto dia foram adicionados à cultura TNF- $\alpha$  (50 ng/mL), BK (nas concentrações de 1 nM, 10 nM ou 100 nM) na presença ou ausência de captopril (25  $\mu$ M). Após 48 h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e a produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12p40 foi analisada por ELISA. Os gráficos representam um experimento representativo (n=3).

Em seguida, verificamos se os antagonistas dos receptores de cininas ( $B_2R$  e  $B_1R$ ) eram capazes de bloquear a indução das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  pela BK nas DCs humanas. Tal como observado na expressão de CD83 na superfície das DCs humanas, os antagonistas dos receptores  $B_2R$  e  $B_1R$  não foram capazes de bloquear o aumento da produção das citocinas analisadas induzida pela BK (Figura 12).



**Figura 12** – Participação dos receptores de cininas na produção de citocinas pró-inflamatórias induzida pela BK em DCs humanas. Monócitos obtidos do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis foram cultivados em RPMI suplementado com 10% SFB na presença de IL-4 (50 ng/mL) e GM-CSF (50 ng/mL) por 5 dias. No quinto dia foram adicionados à cultura BK (100 nM) na presença ou ausência do antagonista de  $B_2R$  (HOE-140, 100 nM) ou de  $B_1R$  ([Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK, 100 nM). Após 48 h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  foi analisada por ELISA. Os gráficos representam um experimento representativo (n=2).

## 4.2 Modulação da resposta T pelas cininas nos linfonodos inflamatórios

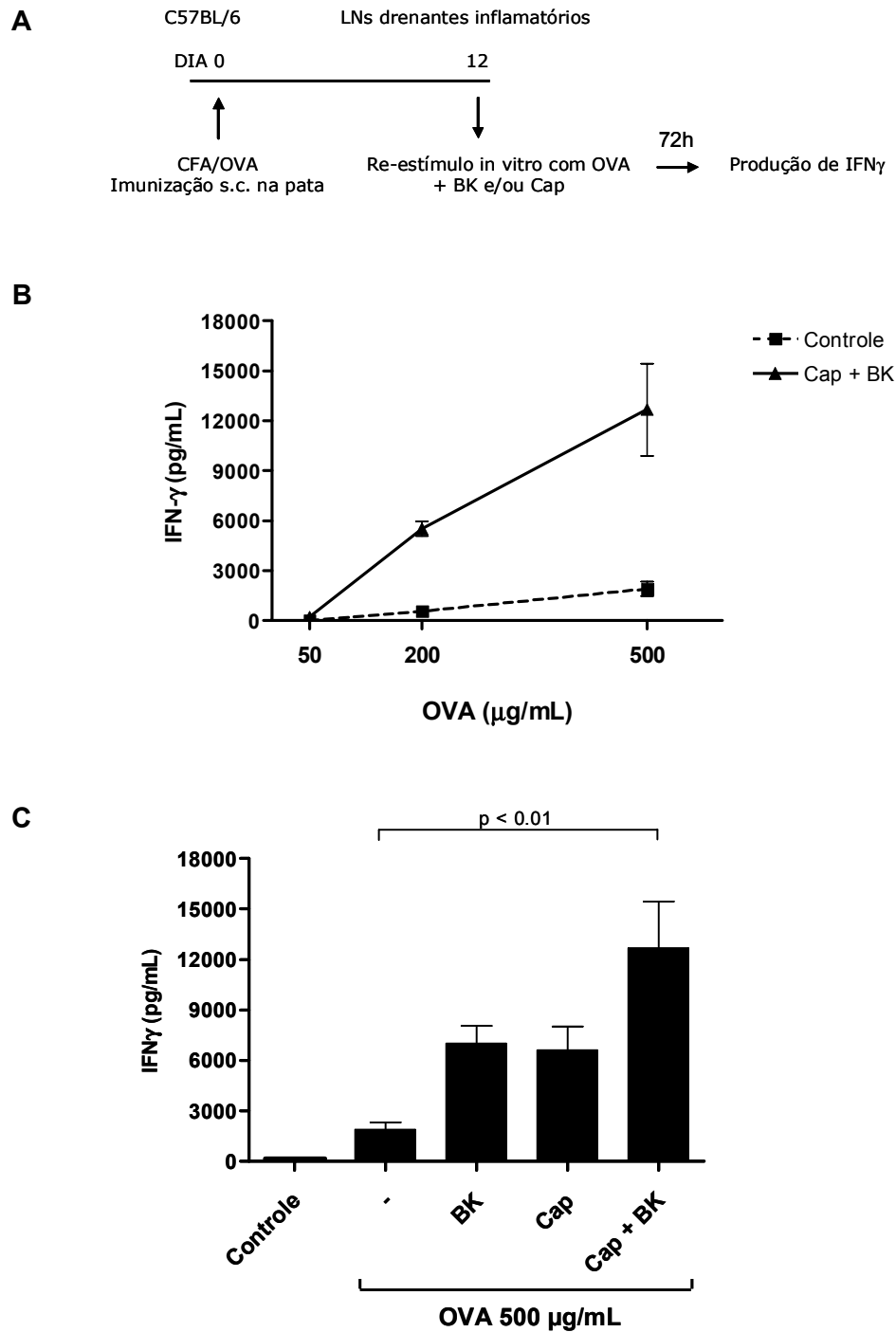
Na seção anterior, investigamos os efeitos das cininas na ativação de DCs humanas derivadas de monócitos. O conceito de que as cininas são capazes de induzir respostas imunes foi, recentemente, confirmado em estudos realizados em camundongos infectados com patógenos munidos de enzimas liberadoras de cininas, como o protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (MONTEIRO *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, em preparação) e a bactéria *Porphyromonas gingivalis* (RAPOSO, em preparação). Um segundo ponto importante vem de estudos de vacinação em andamento no nosso laboratório que observam que a BK sintética constitui um potente adjuvante capaz de conferir imunidade protetora a camundongos desafiados com doses letais de *T. cruzi*, uma vez que é capaz de induzir respostas imunes do tipo T<sub>H</sub>1 intensas e da ativação das populações efetora e de memória de células T CD8<sup>+</sup> (MONTEIRO *et al.*, em preparação). Esses resultados estimularam-nos a questionar se além de serem capazes de iniciar respostas imunes, as cininas estariam atuando em respostas tardias/secundárias.

Considerando que os linfonodos também estão sujeitos a estímulos pró-inflamatórios de natureza endógena drenados pela linfa, resolvemos investigar se cininas podem ter impacto na resposta secundária *in vitro*. Com esse propósito, utilizamos um modelo clássico de indução de resposta do tipo T<sub>H</sub>1, a imunização de camundongos com ovalbumina (OVA) em adjuvante completo de Freund (CFA) pela via subcutânea, no qual injetamos s.c. CFA/OVA na pata de camundongos C57BL/6 e, após 12 dias, sacrificamos os animais e retiramos os linfonodos drenantes poplíteo e inguinal (Figura 13A). A imunização com CFA/OVA induz uma inflamação intensa e de longa duração nos sítios injetados e nos linfonodos drenantes. Alguns autores descrevem tais linfonodos como linfonodos inflamatórios, já que ocorrem alterações drásticas em sua dinâmica e seus componentes, incluindo aumento do fluxo



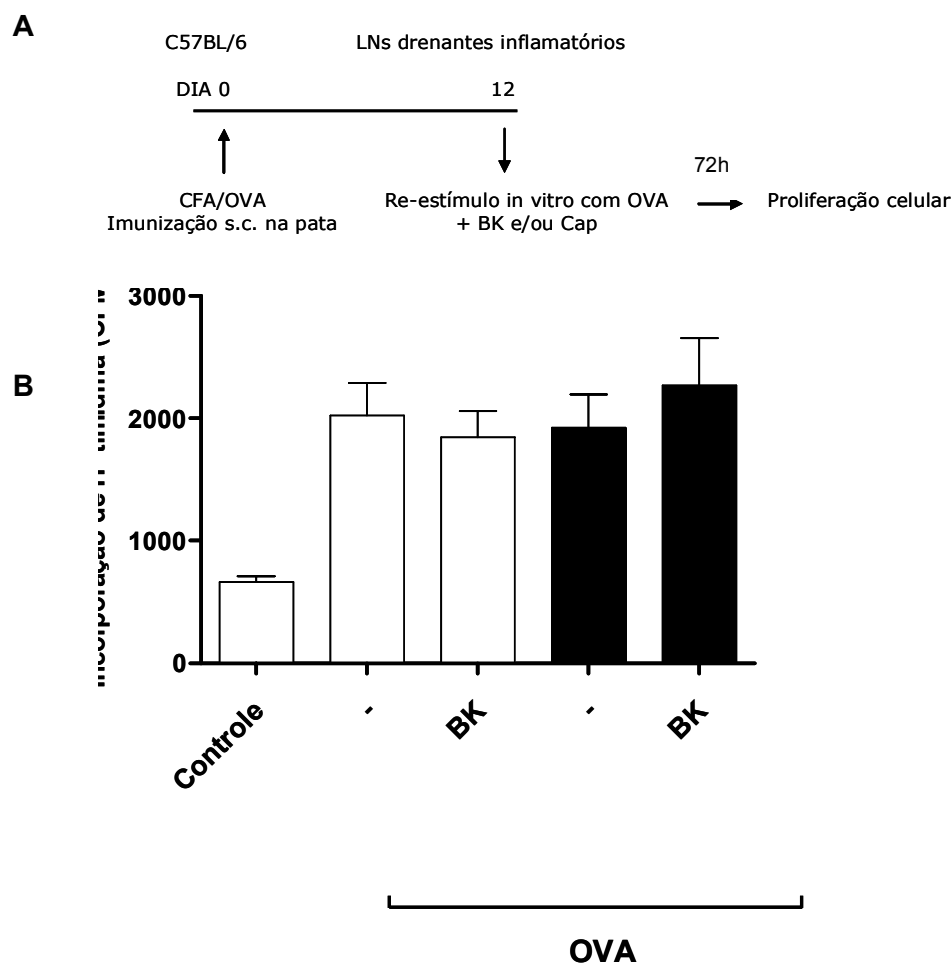
linfático e sangüíneo, imigração de linfócitos, DCs e células NK e reorganização da rede reticular do linfonodo (revisado por DRAYTON *et al.*, 2006).

As células totais dos linfonodos drenantes foram colocadas em cultura, re-estimuladas com OVA (50, 200, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na presença ou ausência de BK (100 nM) e, após 72 h, a produção de IFN- $\gamma$  foi analisada (Figura 13A). Observamos que a adição de BK, na presença do inibidor da ECA/cinínase II, captopril, às culturas re-estimuladas com OVA foi capaz de modular positivamente a produção de IFN- $\gamma$  pelas células dos linfonodos drenantes inflamatórios (Figura 13B). É importante notar que o aumento na produção de IFN- $\gamma$  induzido por BK + Cap ocorreu quando o re-estímulo foi realizado com 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de antígeno (OVA) (Figura 13B). Os efeitos dos estímulos apenas com BK ou Cap revelam uma tendência ao aumento da produção de IFN- $\gamma$ , apesar de não atingir significância estatística (Figura 13C). Vale ressaltar que a adição de BK, na presença ou ausência de Cap, às culturas que não foram re-estimuladas com OVA não foi capaz de aumentar a produção de IFN $\gamma$  pelas células dos linfonodos inflamatórios (dados não mostrados).



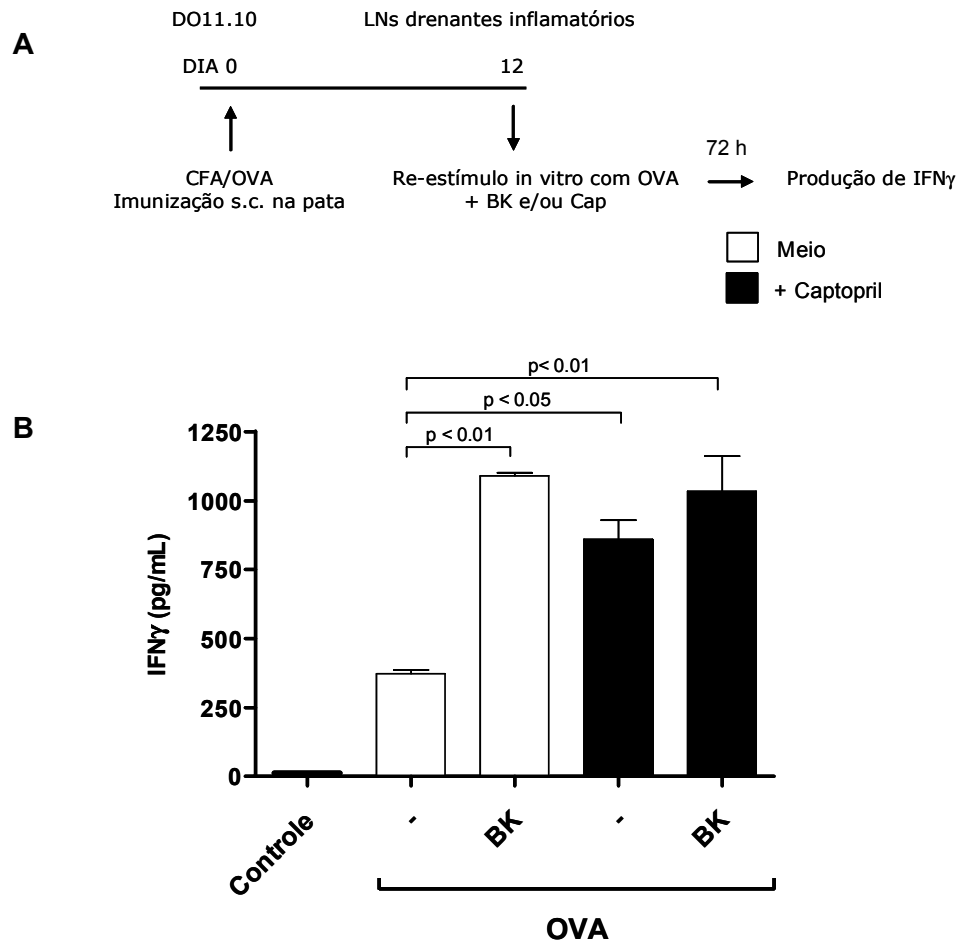
**Figura 13** – Modulação da produção antígeno-específica de IFN- $\gamma$  induzida pela BK exógena nos linfonodos inflamatórios de camundongos C57BL/6. Camundongos machos C57BL/6 ( $n=3$ ) foram imunizados s.c. com CFA/OVA (100  $\mu\text{g/pata}$ ) e, após 12 dias, as células dos linfonodos poplíteos e inguinais foram recuperadas e estimuladas *in vitro* com OVA, nas doses de 50, 200 ou 500  $\mu\text{g/mL}$ , na presença ou ausência de BK (100 nM) e/ou captopril (Cap, 25  $\mu\text{M}$ ). Após 72 horas, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e a produção de IFN- $\gamma$  foi determinada por ELISA. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. Adotou-se o nível de significância mínima de 5%. Os gráficos indicam as médias e os erros padrões de um experimento representativo ( $n=3$ ).

Além da produção de IFN- $\gamma$ , analisamos a proliferação celular induzida pelo re-estímulo com OVA na presença ou ausência de BK (Figura 14A). Observamos que a adição de OVA induz um aumento na proliferação das células nos linfonodos de camundongos C57BL/6. No entanto, mediante o re-estímulo com OVA na presença de BK, Cap ou Cap + BK não observamos aumento na proliferação celular quando comparamos com os perfis proliferativos das culturas que receberam apenas o antígeno (Figura 14B).



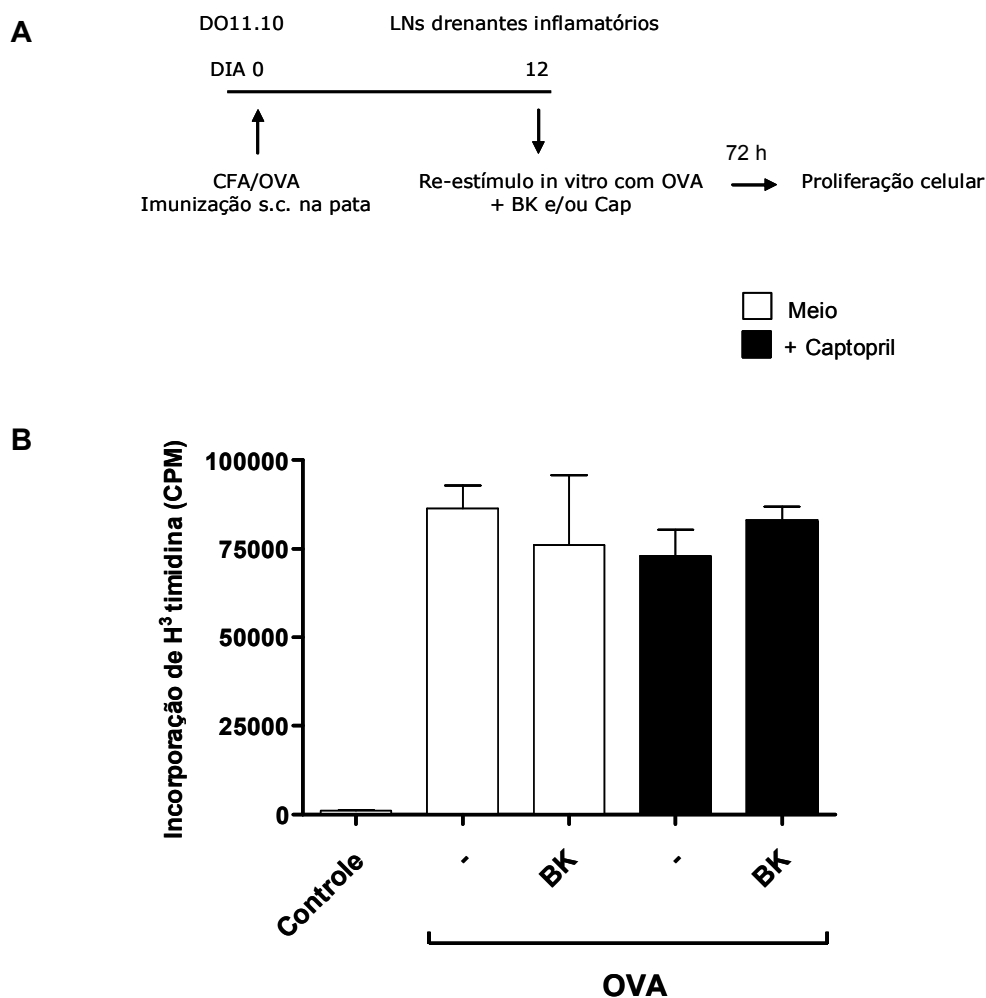
**Figura 14** – Modulação da proliferação celular induzida pela BK exógena nos linfonodos inflamatórios de camundongos C57BL/6. Camundongos machos C57BL/6 (n=3) foram imunizados s.c. com CFA/OVA (100  $\mu$ g/pata) e, após 12 dias, as células dos linfonodos poplíteos e inguinais foram recuperadas e estimuladas *in vitro* com OVA (500  $\mu$ g/mL) na presença ou ausência de bradicinina (BK, 100 nM) e/ou captopril (Cap, 25  $\mu$ M). Após 62 horas, foi adicionada H<sup>3</sup> timidina às culturas celulares por 10 horas. As células foram, então, recuperadas e a incorporação de H<sup>3</sup> timidina foi quantificada em um contador de partículas  $\beta$  modelo Beckman LS 6000 LL. O gráfico indica as médias e os erros padrões de um experimento representativo (n=2).

Com o intuito de aumentar a sensibilidade de nossos ensaios, utilizamos o mesmo protocolo de imunização em camundongos transgênicos DO11.10 (cujas células T CD4<sup>+</sup> possuem TCR específico para OVA, sendo todas portanto responsivas à OVA). Após 12 dias, recuperamos as células dos linfonodos drenantes poplíteo e inguinal, re-estimulamos com OVA na presença ou ausência de BK e, após 72 h, a produção de IFN- $\gamma$  foi analisada (Figura 15A). Os dados mostrados na figura 15 revelam que a adição de BK, Cap ou Cap + BK às culturas re-estimuladas com OVA foi capaz de modular positivamente a produção de IFN- $\gamma$  pelas células dos linfonodos drenantes inflamatórios dos camundongos transgênicos DO11.10 (Figura 15B). Vale ressaltar que a adição de BK, na presença ou ausência de Cap, às culturas que não foram re-estimuladas com OVA não foi capaz de aumentar a produção de IFN- $\gamma$  pelas células dos linfonodos inflamatórios (dados não mostrados).



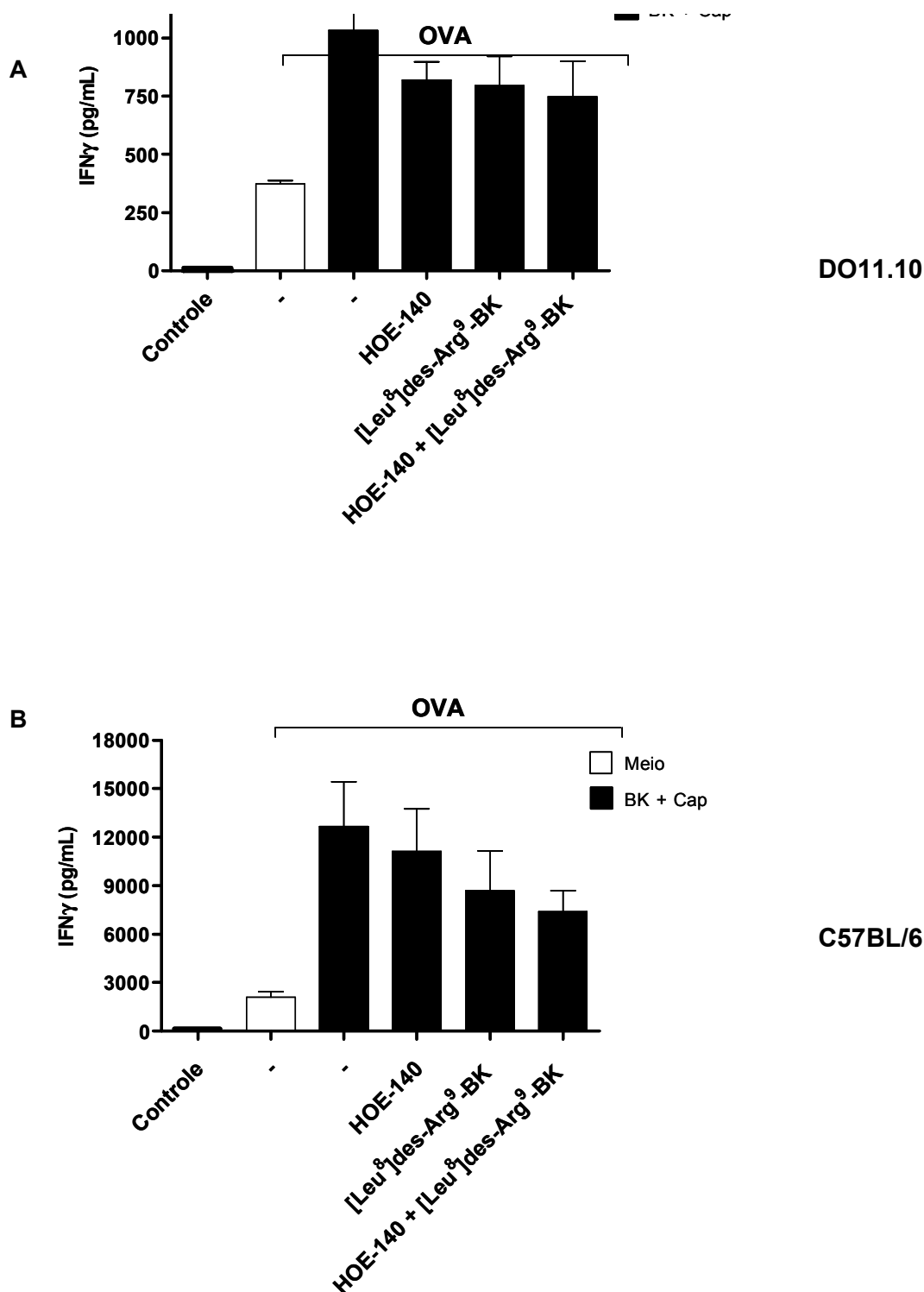
**Figura 15** – Modulação da produção antígeno-específica de IFN- $\gamma$  induzida pela BK nos linfonodos inflamatórios de camundongos DO11.10. Camundongos machos DO11.10 (n=3) foram imunizados s.c. com CFA/OVA (100  $\mu$ g/pata) e, após 12 dias, as células dos linfonodos poplíteos e inguinais foram recuperadas e estimuladas *in vitro* com OVA (50  $\mu$ g/mL) na presença ou ausência de BK (100 nM) e/ou Cap (25  $\mu$ M). Após 72 h, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e a produção de IFN- $\gamma$  foi determinada por ELISA. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. Adotou-se o nível de significância mínima de 5%. O gráfico indica as médias e os erros padrões de um experimento representativo (n=3).

Além da produção de IFN- $\gamma$ , analisamos a proliferação celular induzida pelo re-estímulo com OVA na presença ou ausência de BK (Figura 16A). Consistente com os dados obtidos no modelo com C57BL/6, a adição de BK, Cap ou Cap + BK não alterou a proliferação celular quando comparamos com os perfis proliferativos das culturas que receberam apenas o antígeno OVA (Figura 16B).



**Figura 16** – Modulação da proliferação celular induzida pela BK exógena nos linfonodos inflamatórios de camundongos DO11.10. Camundongos machos DO11.10 (n=3) foram imunizados s.c. com CFA/OVA (100  $\mu$ g/pata) e, após 12 dias, as células dos linfonodos poplíteos e inguinais foram recuperadas e estimuladas *in vitro* com OVA (50  $\mu$ g/mL) na presença ou ausência de BK (100 nM) e/ou Cap (25  $\mu$ M). Após 62 horas, foi adicionada H<sup>3</sup> timidina (5  $\mu$ Ci/mL) às culturas celulares por 10 horas. As células foram, então, recuperadas e a incorporação de H<sup>3</sup> timidina foi quantificada em um contador de partículas  $\beta$  modelo Beckman LS 6000 LL. O gráfico indica as médias e os erros padrões de um experimento representativo (n=2).

Para avaliar a participação dos receptores de cininas nos efeitos modulatórios da BK nos linfonodos inflamatórios, adicionamos os antagonistas peptídicos HOE-140 (antagonista de B<sub>2</sub>R) e/ou [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK (antagonista de B<sub>1</sub>R) no momento do re-estímulo. Observamos que a adição desses antagonistas, isolados ou em conjunto, não foi capaz de bloquear o aumento na produção de IFN- $\gamma$  induzido pela BK nos linfonodos inflamatórios de camundongos DO11.10 ou C57BL/6 (Figura 17).

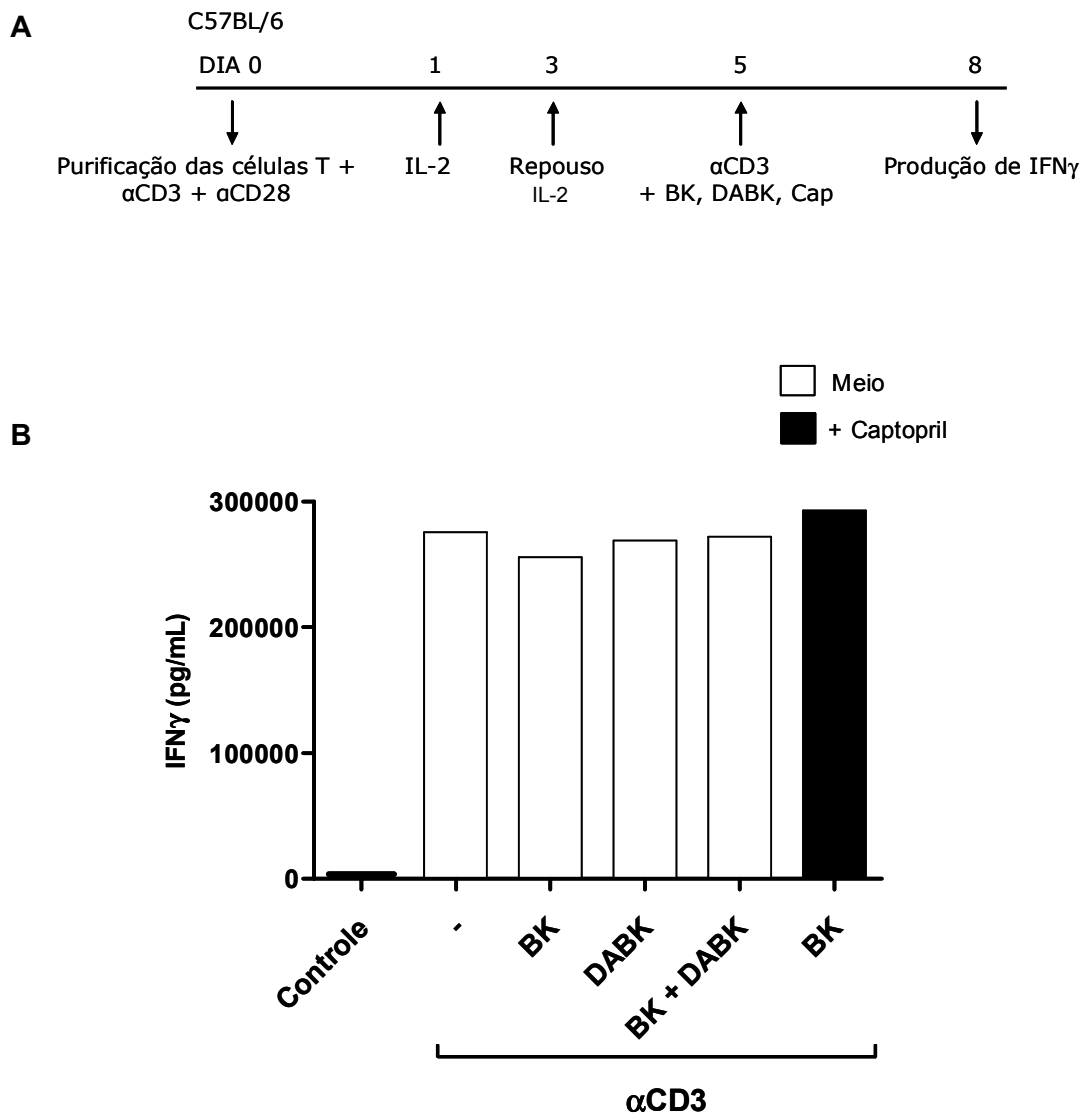


**Figura 17** – Participação dos receptores de cininas na produção de IFN- $\gamma$  induzida pela BK exógena em linfonodos inflamatórios. Camundongos machos DO11.10 (n=3) (A) ou C57BL/6 (n=3) (B) foram imunizados s.c. com CFA/OVA (100  $\mu$ g/pata). Após 12 dias, as células dos linfonodos poplíteos e inguinais foram recuperadas e re-estimuladas *in vitro* com OVA, nas concentrações de 50 (A) ou 500  $\mu$ g/mL (B). Conforme indicado na figura, algumas culturas foram suplementadas com BK (100 nM) e Cap (25  $\mu$ M), na presença ou ausência de HOE-140 (1  $\mu$ M) ou [Leu <sup>$\delta$</sup> ]des-Arg<sup>9</sup>-BK (1  $\mu$ M). Após 72 h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e a produção de IFN- $\gamma$  foi determinada por ELISA. Os gráficos indicam as médias e os erros padrões de um experimento representativo (n=3).



Tendo em vista que existem poucos relatos na literatura sobre os efeitos das cininas na migração de linfócitos humanos (PAEGELOW & LANGE, 1982; MCFADDEN & VICKERS, 1989; PRAT *et al.*, 1999; PRAT *et al.*, 2005), secreção de citocinas por linfócitos murinos (PAEGELOW & WERNER, 1986), aumento dos níveis de AMPc em linfócitos (KIMURA *et al.*, 1979), verificamos se o aumento da produção de IFN- $\gamma$  observado nos ensaios de re-estímulo dos linfonodos inflamatórios com OVA poderia ser decorrente, ao menos em parte, da ação direta da BK sobre os linfócitos. Essa questão foi abordada da seguinte forma: isolamos células T de linfonodos de camundongos C57BL/6 saudáveis e estimulamos *in vitro* com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 na presença de IL-2. No terceiro dia, as células foram recuperadas e colocadas em repouso por 48h na presença de IL-2. Após esse período, as células foram re-estimuladas com anti-CD3 na presença ou ausência de BK (100 nM) e/ou Cap (25  $\mu$ M). Após 72 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e a produção de IFN- $\gamma$  foi analisada (figura 18A). Os resultados indicam que a adição de BK exógena não alterou a produção de IFN- $\gamma$  induzida, exclusivamente, por anti-CD3 nos linfócitos purificados (figura 18B).

O receptor B<sub>1</sub>R foi o único receptor de cininas identificado em linfócitos (PRAT *et al.*, 1999). Considerando que a BK adicionada às culturas de células dos linfonodos inflamatórios pode estar sendo convertida a des-Arg-BK, agonista do receptor B<sub>1</sub>R, através de carboxipeptidases presentes no soro ou secretadas por células, verificamos se a adição de des-Arg-BK (DABK, 100 nM) às culturas de linfócitos isolados no momento do re-estímulo seria capaz de modular a produção de IFN- $\gamma$  induzida por anti-CD3. Observamos que, assim como a BK, a adição de DABK não foi capaz de aumentar a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos ativados com anti-CD3 (figura 18B), o que sugere que as cininas não estão agindo diretamente sobre os linfócitos.



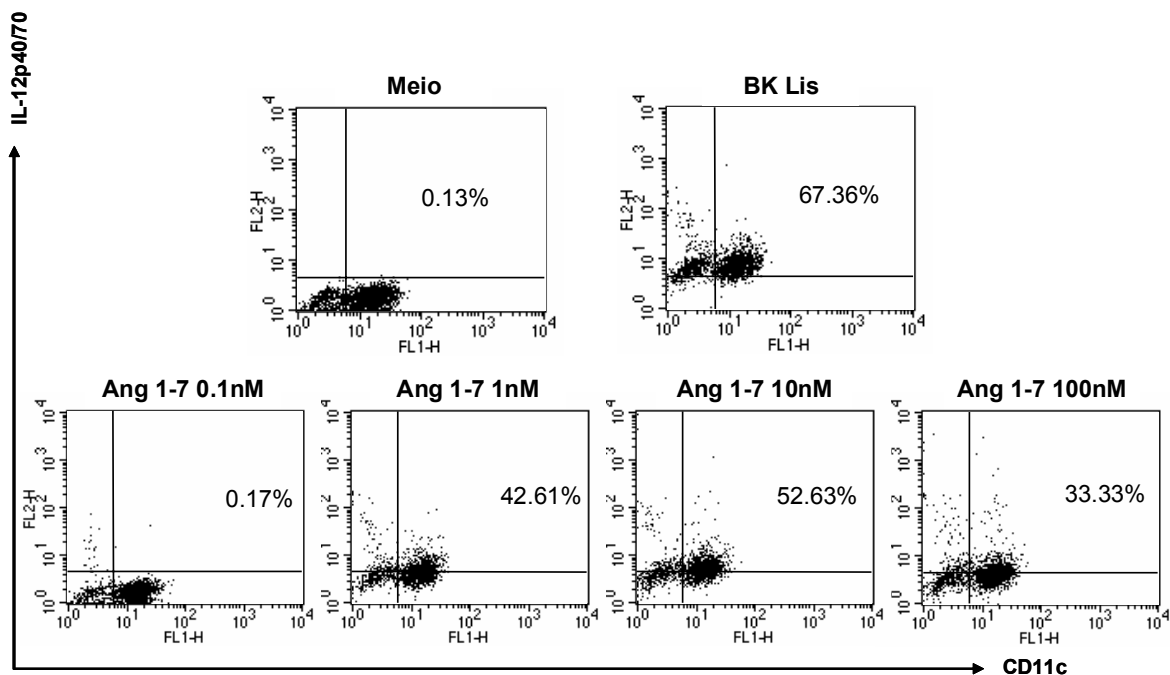
**Figura 18** – Modulação da produção de IFN- $\gamma$  induzida pela BK exógena em células T isoladas. Células T de linfonodos de camundongos machos C57BL/6 (n=3) foram purificadas utilizando microesferas magnéticas de acordo com o protocolo do fabricante (Micro Beads, MACS technology). As células T isoladas (95 % de células T CD3<sup>+</sup>) foram estimuladas *in vitro* com os anticorpos anti-CD3 (1  $\mu$ g/mL) e anti-CD28 (1  $\mu$ g/mL) por 72 h. Após, 24 h, foi adicionada IL-2 às culturas. No terceiro dia, as células foram recuperadas, lavadas e colocadas em cultura por 48 h na presença de IL-2. Após o período de repouso, as células foram estimuladas com anti-CD3 (1  $\mu$ g/mL) na presença ou ausência de BK (100 nM) e/ou Cap (25  $\mu$ M) e/ou DABK (100 nM). Após 72 h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e a produção de IFN- $\gamma$  foi determinada por ELISA. O gráfico representa um experimento preliminar (n=1).

### 4.3 Células dendríticas e o sistema renina-angiotensina

Em 2001, Lapteva e colaboradores demonstraram que os genes do sistema renina-angiotensina são modulados durante a diferenciação e maturação de DCs humanas derivadas de monócitos (LAPTEVA *et al.*, 2001). Os autores descreveram que os genes da enzima conversora de angiotensina (ECA), do angiotensinogênio e da proteína ligadora de renina são expressos tanto nas DCs imaturas quanto nas DCs maduras (LAPTEVA *et al.*, 2001). No trabalho seguinte, os autores relataram que o estímulo de DCs humanas imaturas com Ang II é capaz de induzir a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  (LAPTEVA *et al.*, 2002). Curiosamente, os autores também observaram que a adição de captopril, inibidor da geração de Ang II pela ECA, diminuía a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS, sugerindo um papel para Ang II/ECA no processo de maturação de DCs humanas induzida por TLRs (LAPTEVA *et al.*, 2002). Considerando que, em diversos sistemas biológicos, foram descritos efeitos cooperativos entre BK e Ang-(1-7), resolvemos investigar os efeitos do estímulo com Ang-(1-7) no processo de ativação de DCs CD11c<sup>+</sup> esplênicas murinas.

Com esse propósito, células CD11c<sup>+</sup> foram isoladas de baços de camundongos BALB/c utilizando anticorpos anti-CD11c acoplados a micro-esferas magnéticas (figura 19). Em seguida, as DCs isoladas foram estimuladas em meio completo na presença de concentrações crescentes de Ang-(1-7). Após 18 h de estímulo, analisamos o percentual de células produtoras de IL-12p40/70 por citometria de fluxo. Como controle positivo, as DCs foram estimuladas com BK na presença de lisinopril (MONTEIRO *et al.*, em preparação), inibidor seletivo da ECA. Nessas condições, observamos que a adição de Ang-(1-7), nas concentrações de 1, 10 e 100 nM, foi capaz de aumentar o percentual de células produtoras de IL-12p40/70 (em torno de 42, 52 e 33 vezes, respectivamente). Na concentração de 100 nM, o estímulo com Ang-(1-7) induziu um menor percentual de células produtoras de IL12p70

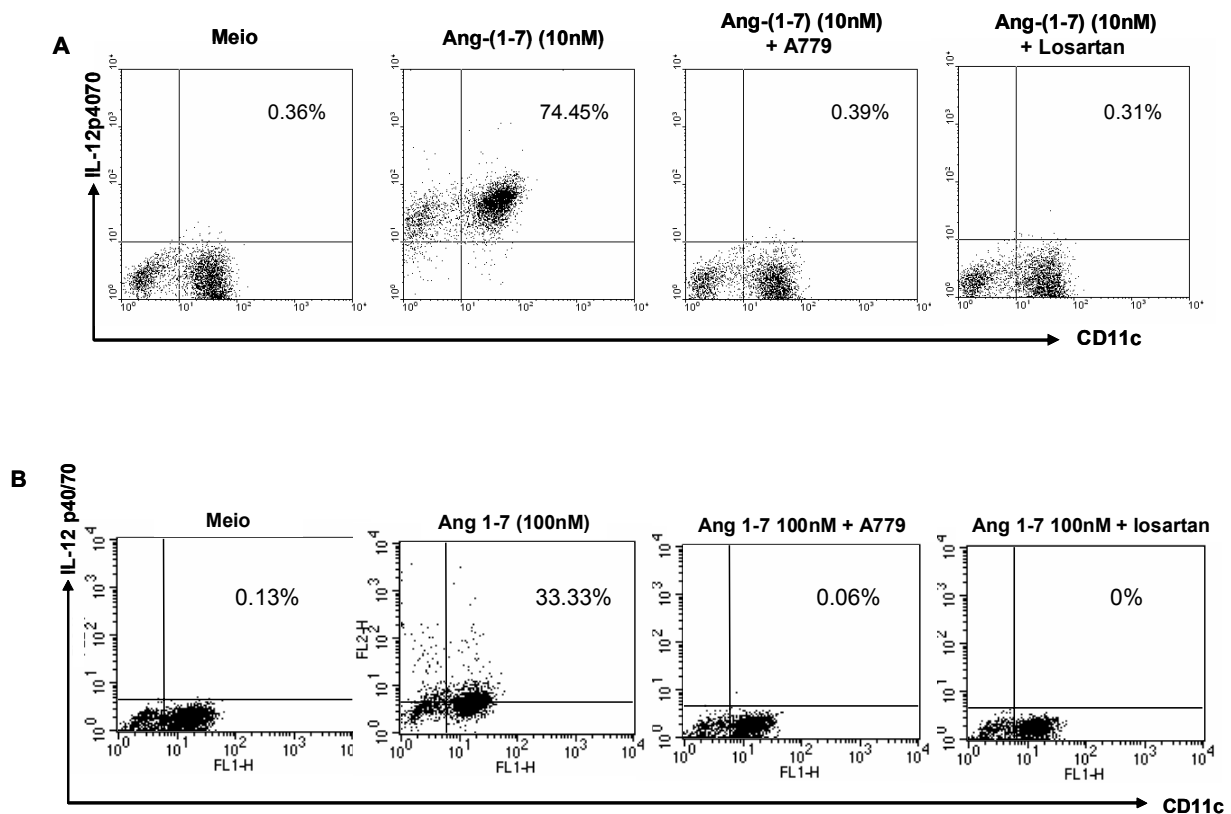
(33,33 % de células CD11c<sup>+</sup>/IL-12p40/70<sup>+</sup>) em relação ao percentual obtido com o estímulo com 10 nM de Ang-(1-7) (52,63 % de células CD11c<sup>+</sup>/IL-12p40/70<sup>+</sup>) (Figura 19). O perfil sinoidal de resposta observado é característico de receptores acoplados a proteína G heterotrimérica sujeitos à dessensibilização em altas concentrações de agonistas (Figura 19).



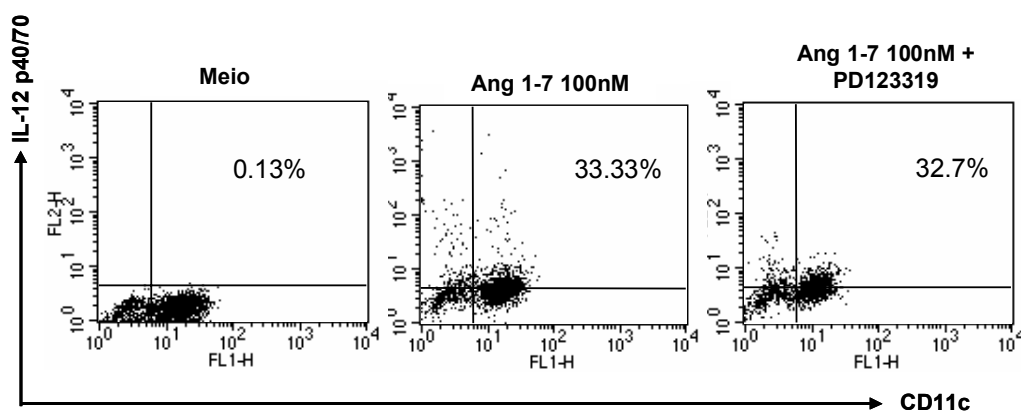
**Figura 19** – Ativação de DCs esplênicas murinas pela Ang-(1-7). Células CD11c<sup>+</sup> foram isoladas de baços de camundongos machos BALB/c saudáveis e estimuladas com BK (10 nM) na presença de lisinopril (Lis, 25 µM) ou Ang-(1-7), nas concentrações de 0.1 nM, 1 nM, 10 nM e 100 nM, em meio suplementado com 10% SFB a 37°C. Após 18 h de estímulo, foi adicionada Brefeldina A (10 µg/mL) às culturas e 4 h depois as células foram lavadas, fixadas com paraformaldeído 2% e incubadas com o anticorpo anti-CD11c FITC. As células foram, então, permeabilizadas com 0,5 % de saponina e incubadas com o anticorpo anti-IL12p70 PE. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisadas no programa WinMDI. Os gráficos indicam o percentual de células CD11c<sup>+</sup> produtoras de IL-12p40/70 em um experimento representativo (n=2).

Como apresentado na introdução, o receptor órfão Mas foi identificado como o receptor natural para a Ang-(1-7) (SANTOS *et al.*, 2003), sendo altamente expresso no tecido

cerebral, nos testículos (BUNNEMANN *et al.*, 1990; XU *et al.*, 2007), no tecido cardíaco (TALLANT *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2005), no endotélio vascular (SANTOS *et al.*, 2003; FARIA-SILVA *et al.*, 2005; SAMPAIO *et al.*, 2007) e nos rins (SANTOS *et al.*, 2003). Recentemente, alguns trabalhos descreveram que o receptor Mas pode interagir fisicamente com os receptores de angiotensina, AT1 e AT2, modulando positivamente ou negativamente os efeitos mediados pela Ang-(1-7) (KOSTENIS *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2005). Para caracterizar a participação dos receptores de Ang-(1-7), Mas, e de angiotensina II, AT1 e AT2 na produção de IL-12p40/70 induzida pela Ang-(1-7), adicionamos os respectivos antagonistas às culturas imediatamente antes do estímulo das DCs CD11c<sup>+</sup> esplênicas com Ang-(1-7). Nessas condições, observamos que o aumento no percentual de células produtoras de IL-12p40/70 induzido pelo estímulo com 10 nM (Figura 20A) e 100 nM (Figura 20B) de Ang-(1-7) foi bloqueado tanto na presença do antagonista do receptor Mas (A779), quanto na presença do antagonista do receptor AT1 (losartan) (Figura 20A,B). Contrastando com os efeitos desses compostos, o tratamento das culturas com o antagonista do receptor AT2 (PD123319) não alterou a indução de IL-12p40/70 pela adição de 100 nM de Ang-(1-7) (Figura 21).



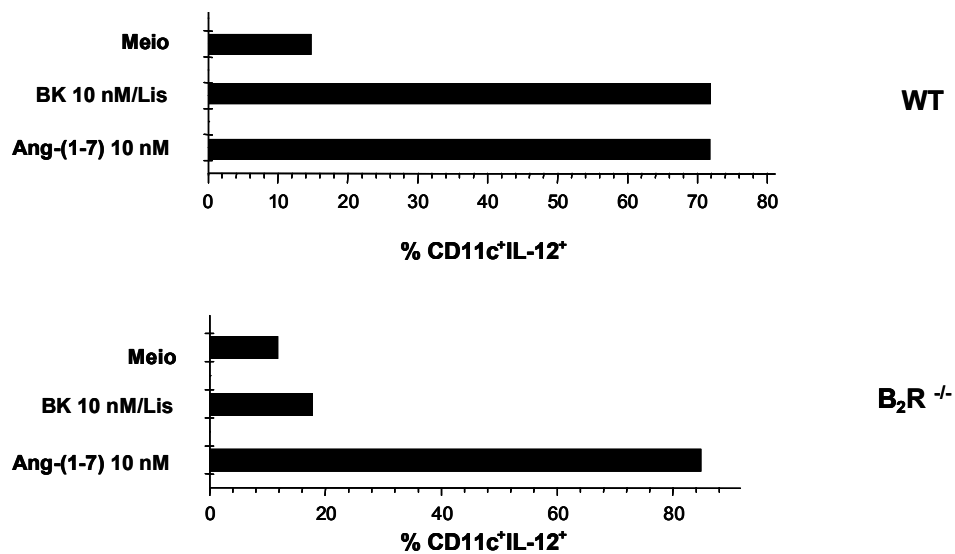
**Figura 20** – Participação dos receptores de angiotensina na ativação de DCs murinas pela Ang-(1-7). Células CD11c<sup>+</sup> foram isoladas de baços de camundongos machos BALB/c saudáveis e estimuladas com Ang-(1-7), nas concentrações de 10 nM ou 100 nM, na presença ou ausência dos antagonistas dos receptores Mas (A779, 1 $\mu$ M) ou AT1 (losartan, 1 $\mu$ M) em meio suplementado com 10% SFB a 37°C. Após 18 h de estímulo, foi adicionada Brefeldina A (10 $\mu$ g/mL) às culturas e 4h depois as células foram lavadas, fixadas com paraformaldeído 2% e incubadas com o anticorpo anti-CD11c FITC. As células foram, então, permeabilizadas com 0,5 % de saponina e incubadas com o anticorpo anti-IL12p40/70 PE. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisadas no programa WinMDI. Os gráficos indicam o percentual de células CD11c<sup>+</sup> produtoras de IL-12p40/70 em um experimento representativo (n=2).



**Figura 21** – Participação dos receptores de angiotensina na ativação de DCs murinas pela Ang-(1-7). Células CD11c<sup>+</sup> foram isoladas de baços de camundongos machos BALB/c saudáveis e estimuladas com Ang-(1-7) (100 nM), na presença ou ausência do antagonista do receptor AT2 (PD123319, 1 $\mu$ M) em meio suplementado com 10% SFB a 37°C. Após 18 h de estímulo, foi adicionada Brefeldina A (10 $\mu$ g/mL) às culturas e 4h depois as células foram lavadas, fixadas com paraformaldeído 2% e incubadas com o anticorpo anti-CD11c FITC. As células foram, então, permeabilizadas com 0,5 % de saponina e incubadas com o anticorpo anti-IL-12p40/70 PE. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisadas no programa WinMDI. Os gráficos indicam o percentual de células CD11c<sup>+</sup> produtoras de IL-12p40/70 em um experimento representativo (n=2).

AbdAlla e colaboradores demonstraram que os receptores AT1 e B<sub>2</sub>R podem interagir fisicamente, formando heterodímeros na superfície celular. Essa interação resulta no aumento da eficácia e da potência da sinalização pela Ang II e em alterações na dinâmica de internalização desses receptores (ABDALLA *et al.*, 2000). Considerando que a Ang-(1-7) induz a produção de IL-12p40/70 em DCs CD11c<sup>+</sup> esplênicas murinas através de uma via interdependente dos receptores Mas e AT1 (Figura 9), resolvemos determinar se essa resposta poderia ser reflexo da cooperatividade entre os receptores Mas e/ou AT1 e B<sub>2</sub>R. Com essa finalidade, isolamos células CD11c<sup>+</sup> de baços de animais selvagens J129 (WT) e deficientes para o receptor B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) e estimulamos com BK na presença do lisinopril ou Ang-(1-7). Consistente com os dados previamente publicados, observamos que a BK é capaz de aumentar o percentual de células produtoras de IL-12p40/70 em DCs selvagens, mas não em DCs que não possuem o receptor B<sub>2</sub>R (ALIBERTI *et al.*, 2003). Entretanto, observamos que o estímulo com Ang-(1-7) é capaz de induzir aumento no percentual de células produtoras de IL-12p40/70 em células isoladas de animais selvagens e deficientes para o receptor B<sub>2</sub>R (Figura 22). Esses resultados sugerem que o receptor B<sub>2</sub>R não está envolvido na sinalização por Ang-(1-7) em DCs. Em síntese, nossos dados sugerem que Ang-(1-7) é capaz de estimular a produção de IL-12p40/70 por DCs convencionais imaturas isoladas de baço, mediante sinalização dos receptores Mas e AT1, sem indícios do engajamento cooperativo de B<sub>2</sub>R ou AT2.





**Figura 22** - Angiotensina-(1-7) é capaz de induzir a produção de IL-12p40/70 em DCs murinas através de uma sinalização independente do receptor B<sub>2</sub>R. Células CD11c<sup>+</sup> foram isoladas de baços de camundongos machos J129 (WT) ou B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> saudáveis e estimuladas com BK na presença de lisinopril ou Ang-(1-7) (10 nM) em meio suplementado com 10% SFB a 37°C. Após 18 h de estímulo, foi adicionada Brefeldina A (10µg/mL) às culturas e 4 h depois as células foram lavadas, fixadas com paraformaldeído 2% e incubadas com o anticorpo anti-CD11c FITC. As células foram, então, permeabilizadas com 0,5 % de saponina e incubadas com o anticorpo anti-IL12p40/70 PE. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisadas no programa WinMDI. Os gráficos representam o percentual de células CD11c<sup>+</sup> produtoras de IL-12p40/70 em um experimento preliminar.

## 5. Discussão

Nesta dissertação, utilizamos diversas abordagens para estudar o impacto de produtos de ativação dos sistemas caliceína-cinina e renina-angiotensina sobre a função de células dendríticas. Para facilitar a discussão, os temas apresentados serão tratados separadamente. Na primeira parte, discutiremos os resultados dos estudos realizados com células dendríticas humanas. Na segunda parte, discutiremos os efeitos modulatórios das cininas sobre a resposta secundária antígeno-específica *in vitro* em modelos que utilizam animais transgênicos (DO11.10) e selvagens (C57BL/6). No terceiro bloco, trataremos de fazer considerações a respeito do possível papel do heptapéptido Ang-(1-7) na ativação de DCs murinas.

### 5.1 Ativação de DCs humanas pela bradicinina

Os estudos em humanos foram inicialmente concebidos com a finalidade de investigar o papel da BK na maturação de DCs humanas. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa avaliaram o papel da BK na maturação de DCs murinas residentes no baço (ALIBERTI *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, em preparação). Estudos recentes indicam que as populações de DCs esplênicas possuem origem independente da linhagem monocítica no estado de repouso, renovando-se a partir da diferenciação de precursores locais (NAIK *et al.*, 2006; VAROL *et al.*, 2007). Nos estudos com humanos, o principal modelo de geração de DCs imaturas utilizado é a diferenciação *in vitro* de monócitos de sangue periférico com GM-CSF e IL-4 (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994). Alguns trabalhos sugerem que o subtipo celular obtido nesse modelo de diferenciação represente populações de DCs inflamatórias, derivadas de monócitos circulantes (monócitos inflamatórios - Gr1<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>int</sup> CCR2<sup>+</sup>) recrutados para sítios periféricos inflamados como intestino, pulmão e epiderme (GINHOUX *et al.*, 2006; VAROL *et al.*, 2007). Alguns autores

sugerem que as DCs produtoras de TNF e óxido nítrico (*TNF and iNOS producing DC – TipDC*), recrutadas para o baço durante a infecção murina com *Listeria monocytogenes*, sejam equivalentes ao subtipo de DCs inflamatórias derivadas de monócitos no modelo humano (revisado por SHORTMAN & NAIK, 2007).

Nessa dissertação, demonstramos que DCs humanas derivadas de monócitos são capazes de modular positivamente a expressão do marcador de maturação, CD83, na superfície celular após estímulo com BK (Figura 8 e 9). Consistente com o fenótipo de DCs ativadas, observamos que o estímulo com BK induz a produção de grandes quantidades das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 pelas DCs humanas (Figura 11).

Ainda que a amostragem no nosso estudo ainda seja limitada (8 doadores), cabe salientar que as respostas induzidas pela BK foram detectadas em 75% dos indivíduos testados. Em princípio, não sabemos se a heterogeneidade da resposta é reflexo de variações genéticas entre os doadores ou se outros fatores (endócrinos ou emocionais) podem influenciar a susceptibilidade das DCs ao estímulo com BK. Alterações nos níveis de expressão de ECA, principal enzima reguladora dos sistemas caliceína-cinina e renina-angiotensina, poderiam explicar diferenças na sensibilidade à BK entre indivíduos. O gene da ECA apresenta polimorfismos que envolvem a inserção (I) e/ou deleção (D) de uma seqüência gênica de 287 pares de bases no intron 16. Indivíduos que carregam o genótipo DD apresentam o dobro da atividade enzimática da ECA (plasmática e tecidual) quando comparados aos portadores do genótipo II. Indivíduos portadores do genótipo ID apresentam níveis intermediários da expressão dessa enzima (revisado por SAYED-TABATABAEI *et al.*, 2006). Além disso, diversos trabalhos apontam que a expressão do gene da ECA é regulada negativamente pelo hormônio feminino estrogênio, sugerindo que os níveis reduzidos de ECA nas mulheres (antes da menopausa) podem explicar a menor incidência de doenças cardiovasculares nessa população (GALLAGUER *et al.*, 1999; BROSNIHAN *et al.*, 1999;

XU *et al.*, 2006). Sob essa perspectiva, podemos sugerir que indivíduos que apresentam baixos níveis de expressão da ECA (genótipo II ou mulheres jovens) podem ser mais sensíveis aos efeitos da BK quando comparados a indivíduos que apresentam níveis altos (genótipo DD, homens ou mulheres após a menopausa) ou intermediários (genótipo ID).

Analisando os doadores responsivos, verificamos que a BK (testada na faixa de concentração 1 a 100 nM) induziu a expressão de CD83 na superfície das DCs de modo dependente da concentração (Figura 8). Além das alterações nos níveis de expressão desse marcador de superfície, verificamos que a BK estimulou, de modo significativo, o aumento da produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 nas DCs humanas (Figura 11). Esses resultados remetem a trabalhos anteriormente descritos que mostram que a BK é capaz de estimular a produção de IL-6 em fibroblastos pulmonares humanos (HAYASHI *et al.*, 2000), células musculares de vias aéreas humanas (HUANG *et al.*, 2003) e astrócitos murinos (SCHWANINGER *et al.*, 1999). Curiosamente, Khan e colaboradores, em 2006, demonstraram que o cininogênio de alto peso molecular, mas não a BK exógena induz a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em células mononucleares humanas isoladas do sangue periférico. Consistente com esses dados, experimentos preliminares realizados durante essa dissertação indicaram que a BK de fato não induz a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  por monócitos humanos, nem modula a diferenciação desses em DCs (dados não mostrados). Recentemente, Bertram e colaboradores, em 2007, observaram que os genes que codificam os receptores de cininas, B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R são transcritos em monócitos, porém não expressos na superfície dessas células.

Tendo em vista que a expressão da ECA na superfície de DCs é drasticamente aumentada (1500 vezes maior) durante o curso de sua diferenciação a partir de monócitos de sangue periférico (DANILOV *et al.*, 2003), foi surpreendente constatar que os efeitos estimulatórios da BK (nas concentrações de 10 e 100 nM) ocorreram em culturas desprovidas de inibidores de ECA/cininase II (Figura 8, 9 e 11). Todavia, vale ressaltar que a

adição do inibidor da ECA, captopril, promoveu a potencialização das respostas biológicas analisadas (expressão de CD83 e produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12) induzidas pelas concentrações de 10 nM de BK. Essa observação pode ser explicada pelo aumento da meia vida da BK nas culturas, resultante da inibição da ECA presente na superfície das DCs (LAPTEVA *et al.*, 2001; DANILOV *et al.*, 2003) ou, alternativamente, bloqueando a atividade da ECA disponível no soro fetal bovino inativado (BRAMUCCI *et al.*, 1999). O tratamento com captopril também potencializa a produção de IL-12 no soro de camundongos tratados com LBK (ALIBERTI *et al.*, 2003) e em DCs isoladas de camundongos infectados com *T. cruzi* (MONTEIRO *et al.*, 2006), reforçando o potencial papel da ECA na regulação dos efeitos imunoestimulatórios da BK.

A ativação de DCs humanas pela BK (e/ou des-Arg-BK eventualmente geradas endogenamente) não foi bloqueada pelos antagonistas dos receptores B<sub>2</sub>R (HOE-140) e B<sub>1</sub>R ([Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK) (figura 10 e 12). Esses resultados surpreenderam-nos visto que esses antagonistas são utilizados rotineiramente em nosso laboratório com sucesso e mostraram-se eficazes no bloqueio da sinalização mediada pelos referidos receptores em ensaios realizados com células endoteliais humanas (HUVEC) (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000), músculo liso humano estimulado com LPS (ANDRADE, tese de doutorado, em preparação), cardiomiócitos murinos (TODOROV *et al.*, 2003). Vale mencionar que a administração de captopril uma hora antes da infecção s.c. de camundongos com *T. cruzi* promove a migração de DCs CD11c<sup>+</sup> produtoras de IL-12 para os linfonodos drenantes, sendo esse efeito bloqueado pelo tratamento prévio com HOE-140 (MONTEIRO *et al.*, 2006). Finalmente, sabemos que o antagonista HOE-140 bloqueia eficientemente a maturação *in vitro* de DCs esplênicas induzida por LBK (ALIBERTI *et al.*, 2003), BK ou até mesmo por tripomastigotas de *T. cruzi* (MONTEIRO *et al.*, em preparação).

A possibilidade de contaminação com endotoxina nas culturas estimuladas com preparações de BK nos parece remota, dado os seguintes motivos: (a) o inibidor da ECA, captopril, foi capaz de potencializar as respostas mediadas pela BK (Figura 9 e 11). Caso a endotoxina fosse, de fato, responsável pelos efeitos da BK observados, a adição de captopril deveria ter promovido o efeito oposto, isto é, inibindo a produção de citocinas, uma vez que Lapteva e colaboradores demonstraram que a inibição da ECA bloqueia as respostas mediadas por LPS nas DCs derivadas de monócitos (LAPTEVA *et al.*, 2002); (b) alíquotas provenientes do mesmo estoque de BK são capazes de ativar com a mesma eficiência DCs esplênicas isoladas de camundongos C3H/HeJ (deficiente no receptor TLR4) e C3H/HePas (selvagens) (MONTEIRO *et al.*, em preparação); (c) dados não apresentados nessa dissertação indicam que o estímulo com BK não é capaz de induzir a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  em monócitos humanos isolados de sangue periférico. Ainda que não seja impossível que o limiar de ativação de TLR4 presente em DCs humanas seja de fato menor do que em monócitos, o conjunto de argumentos apresentados acima nos leva a acreditar que o efeito potencializador do captopril sobre BK não seja reflexo da presença de LPS contaminante. De todo modo, ensaios adicionais utilizando polimixina B serão necessários para excluir formalmente a participação de endotoxina contaminante nos efeitos estimulatórios da BK nas DCs humanas.

Bertram e colaboradores, em 2007, identificaram a expressão dos receptores B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R na superfície celular de DCs humanas imaturas derivadas de monócitos. Nesse trabalho, os autores demonstraram que o estímulo das DCs humanas com BK (10  $\mu$ M, portanto empregada em concentrações bem acima das utilizadas em nossos resultados) foi capaz de induzir aumento nos níveis intracelulares de Ca<sup>+2</sup> (a partir de 30 min), associado ao aumento da migração celular no período de 24 h (BERTRAM *et al.*, 2007). Diferentemente das respostas de ativação que relatamos nessa dissertação, os efeitos estimulatórios da BK sobre a migração das DCs foram prevenidos pela adição de HOE-140 (10  $\mu$ M) às culturas

(BERTRAM *et al.*, 2007). Vale mencionar, entretanto, que o estímulo com o agonista do receptor B<sub>1</sub>R, Lys-des-Arg-BK (10 µM), induziu um aumento tardio nos níveis intracelulares de Ca<sup>+2</sup> (a partir de 3 h), não sendo capaz de induzir o aumento na migração das DCs humanas no período de 24 h (BERTRAM *et al.*, 2007). Os autores observaram que não houve alterações na expressão de CD80, CD86 e HLA-DR na superfície celular e tampouco na produção de IL-12 e PGE<sub>2</sub> em resposta à BK, levando-os a descartar a possibilidade de as cininas atuarem na maturação de DCs humanas (BERTRAM *et al.*, 2007). Cabe destacar que as condições de trabalho utilizadas pelos autores são distintas daquelas utilizadas em nosso trabalho, incluindo o curto período de estímulo (24 h) e as concentrações dos agonistas (BK - 10 µM e Lys-des-Arg-BK - 10 µM) e dos antagonistas (HOE-140 - 10 µM e Lys-[desArg<sup>9</sup>]-Leu<sup>8</sup>-BK - 10 µM) de 100 a 1000 vezes superiores àquelas utilizadas em nossos ensaios.

Um possível argumento que poderia explicar a ausência de efeitos inibitórios dos antagonistas de cininas seria a ocorrência de mecanismos compensatórios entre os receptores B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R (ambos presentes na superfície das DCs), sendo assim, quando bloqueamos um receptor de cininas, o outro atua na mesma direção, compensando a inibição do primeiro. Ensaios adicionais utilizando os antagonistas dos dois receptores em conjunto ou o antagonista duplo dos receptores de cininas (B9430 - STEWART *et al.*, 1996) no momento do estímulo das DCs humanas com BK poderiam esclarecer essa hipótese. Outro ponto importante consiste na evidência de um novo receptor de cininas, denominado GPR100 (BOELS & SCHALLER, 2003). O GPR100 está presente em humanos e camundongos, apresentando apenas 27% de identidade com a seqüência do receptor B<sub>2</sub>R e tendo como agonistas os peptídeos BK, Lys-BK e relaxina-3 (BOELS & SCHALLER, 2003). A participação do GPR100 em nosso modelo é vista com ressalvas, uma vez que o antagonista HOE-140 é capaz de bloquear os efeitos da BK mediados por esse receptor (MEINI *et al.*, 2004).

Em busca de precedentes de mecanismo alternativos na literatura, encontramos evidências de que as cininas (BK, Lys-BK, des-Arg-BK), bem como seus antagonistas, podem induzir uma rápida liberação de histamina em mastócitos de modo independente dos receptores de cininas, B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R (DEVILLIER *et al.*, 1985; BUEB *et al.*, 1990; REISSMANN *et al.*, 2000). Esses autores postularam que as cininas, assim como os referidos antagonistas, interagem com resíduos de ácido siálico na superfície celular de mastócitos, levando a alterações mediadas por carga e induzindo a ativação de fosfolipase C e o aumento dos níveis intracelulares de cálcio (DEVILLIER *et al.*, 1985; BUEB *et al.*, 1990; REISSMANN *et al.*, 2000). Ainda que alterações no potencial elétrico da superfície celular de DCs não tenham sido exploradas, podemos especular que esse mecanismo possa contribuir no processo de ativação das DCs pela BK. Tendo em vista as diversas limitações das abordagens farmacológicas, a utilização de métodos de silenciamento gênico (ex. interferência de RNA) permitiria-nos um maior detalhamento das vias de sinalização envolvidas na ativação das DCs humanas pelas cininas.

Apesar de desconhecermos os mecanismos envolvidos, os resultados apresentados, nessa dissertação, sugerem que as cininas, exógenas ou geradas durante uma resposta inflamatória, são capazes de induzir e regular a ativação de DCs humanas presentes nos sítios inflamatórios.

## 5.2 Modulação da resposta imune induzida por CFA/OVA pelas cininas

Enquanto desenvolvíamos os trabalhos acima relatados, o nosso grupo de pesquisa obteve progressos na investigação das propriedades da BK como adjuvante em vacinas. Após estabelecer condições ótimas de imunização e reforço utilizando formulações vacinais preparadas com BK sintética e antígenos de *T. cruzi*, Monteiro e colaboradores observaram



que a resposta imunoprotetora induzida pela vacina “otimizada” é dependente da geração de células T efetoras e de memória produtoras de IFN- $\gamma$  (MONTEIRO *et al.*, em preparação). Nesse cenário, o subtipo de células T CD8<sup>+</sup> efetoras e de memória desempenha um papel crítico (MONTEIRO *et al.*, em preparação), assim como relatado em outros modelos de vacinação contra infecção chagásica (revisado por MARTIN & TARLETON, 2004). Um ponto importante desse estudo que nos chamou a atenção foi que a vacina perde a sua eficácia imunoprotetora caso a etapa de reforço não favoreça “plenamente” a via BK/B<sub>2</sub>R (MONTEIRO *et al.*, em preparação). Esses estudos levaram-nos a questionar se os efeitos imuno-estimulatórios da via BK/B<sub>2</sub>R se restringem apenas ao efeito da BK sobre a maturação de DCs residentes na periferia (ALIBERTI *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2006). Em face desses resultados, nos perguntamos: “Será que a produção endógena de cininas no estroma de linfonodos drenantes inflamatórios é capaz de modular a ativação de células T efetoras e de memória?”. Em busca de modelos simplificados que nos fornecessem pistas sobre a natureza desses processos, optamos por estudar o efeito da BK na resposta secundária *in vitro* de células T contra o antígeno OVA em camundongos C57BL/6 e DO11.10 imunizados com CFA/OVA. Os resultados descritos nessa dissertação demonstram que a adição de BK, quando associada ao antígeno OVA, promove um aumento significativo da produção de IFN- $\gamma$  pelas células dos linfonodos drenantes de camundongos C57BL/6 e DO11.10 (Figuras 13 e 15).

Nos estudos realizados com a linhagem C57BL/6, a adição de BK na presença do inibidor da ECA captopril induziu aumento da produção de IFN- $\gamma$  (aproximadamente de 4 vezes) pelas células dos linfonodos inflamatórios estimuladas com OVA (Figura 13). Cabe ressaltar que esse efeito ocorreu nas concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}$  e 500  $\mu\text{g/mL}$  de OVA utilizada no re-estímulo (Figura 13). É importante notar, que nesse modelo, a adição de BK ou captopril isoladamente às culturas não foi capaz de induzir um aumento significativo na

produção de IFN- $\gamma$  induzida no re-estímulo (Figura 13). A fim de aumentar a sensibilidade do sistema, utilizamos camundongos transgênicos DO11.10, os quais possuem células T CD4<sup>+</sup> específicas para OVA. Nesse modelo, observamos que a adição de BK, na presença ou ausência de captopril, foi capaz de induzir um aumento de, aproximadamente, quatro vezes na produção de IFN- $\gamma$  (figura 15). Além disso, a adição independente de captopril foi capaz de aumentar a produção de IFN- $\gamma$  em torno de três vezes (figura 15). Tendo em vista que o bloqueio da ECA inibe a degradação das cininas geradas no meio de cultura, o efeito estimulatório do captopril observado pode nos sugerir um possível papel para as cininas geradas endogenamente nos linfonodos inflamados.

Apesar dos camundongos C57BL/6 possuírem uma baixa freqüência de células T responsivas ao antígeno OVA, observamos uma potente resposta no re-estímulo. É importante ressaltar que essa resposta foi ainda potencializada na presença de cininas. Ainda que não tenhamos avaliada a participação do componente de células T CD8<sup>+</sup> em nosso modelo, podemos especular efeitos das cininas sobre esse subtipo celular presente nos linfonodos inflamatórios. Essa possibilidade merece ser investigada, tendo em vista um relato recente de Teixeira e colaboradores que indica que a ativação de células T CD8<sup>+</sup> contribui na indução da diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em células T<sub>H</sub>1 produtoras de IFN- $\gamma$  (TEIXEIRA *et al.*, 2005). No referido estudo, os autores sugerem que a rápida produção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD8<sup>+</sup> ativadas estimula a transcrição de T-bet em células T CD4<sup>+</sup> ativadas via TCR (TEIXEIRA *et al.*, 2005), ou seja, o IFN- $\gamma$  produzido pelas células T CD8<sup>+</sup> ativadas poderia ser responsável pelo início do processo de diferenciação T<sub>H</sub>1, processo esse consolidado mediante engajamento do receptor completo de IL-12 (revisado por MURPHY & REINER, 2002). Caso a ativação do receptor B<sub>2</sub>R presente nas DCs residentes na malha endógena de DCs dos linfonodos aumentar a eficiência da apresentação cruzada, esse processo poderia ter impacto indireto sobre a diferenciação T<sub>H</sub>1 através da indução de T-bet pelas células T CD8<sup>+</sup>

ativadas. As questões acima levantadas podem ser relevantes para compreensão dos efeitos da BK no modelo de vacinação contra *T. cruzi*, em que a geração de células T CD8<sup>+</sup> efetoras e de memória induzida pela BK é crítica no processo de imunoproteção.

Considerando que diversas evidências revelaram que as cininas são capazes de induzir efeitos mitogênicos em células tumorais (revisto por LIEBMANN, 2001), musculares (YANG *et al.*, 2005), epiteliais (GRECO *et al.*, 2004) e queratinócitos (CHENG *et al.*, 2004) através da ativação de MAPK, avaliamos a proliferação celular induzida pela BK no nosso modelo. Observamos que a adição de BK não é capaz de alterar a proliferação celular das células dos linfonodos inflamatórios mediante re-estímulo com antígeno (Figura 14 e 16). Esses dados sugerem que a BK deve estar atuando diretamente na modulação da resposta T<sub>H</sub>1 e, não, simplesmente aumentando o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  nos linfonodos inflamatórios.

Tendo em vista que a expressão do receptor B<sub>1</sub>R havia sido documentada em células T humanas (PRAT *et al.*, 1999), avaliamos se a BK ou des-Arg-BK seriam capazes de estimular linfócitos diretamente, induzindo/potenciando a produção de IFN- $\gamma$  em células T estimuladas policlonalmente com anti-CD3. Nossos dados revelaram que a adição de BK, na presença ou ausência de captopril, ou des-Arg-BK não foi capaz de modular a produção de IFN- $\gamma$  em culturas de linfócitos isolados (Figura 17). Ainda que preliminar, não obtivemos indícios que a BK esteja agindo diretamente nos linfócitos ativados. Essas conclusões só podem ser feitas com reservas, já que não podemos excluir a possibilidade das cininas estarem agindo sobre receptores de cininas nas células T apenas em situações que envolvam a participação de APCs, excluídas nas experiências acima referidas. Ensaios adicionais com B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>/B<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> DCs e linfócitos B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>/B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T ou CD8<sup>+</sup> selvagens são necessários para descartar a participação dos receptores de cininas na ativação de linfócitos.

Nos estudos sobre os efeitos de BK sobre a resposta secundária induzida por OVA, a adição dos antagonistas clássicos dos receptores B<sub>2</sub>R (HOE-140) e/ou B<sub>1</sub>R ([Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK) não foi capaz de bloquear o aumento na produção de IFN- $\gamma$  induzido pelo estímulo com BK na presença de captopril (figura 18). Esses resultados nos surpreenderam uma vez que os antagonistas de B<sub>2</sub>R utilizados em nosso laboratório mostram-se muito eficazes no bloqueio das respostas mediadas pelas cininas em DCs CD11c<sup>+</sup> murinas (ALIBERTI *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2006), em células de linfonodos drenantes e baço no modelo de infecção com *T. cruzi* (MONTEIRO *et al.*, 2006, MONTEIRO *et al.*, em preparação) e em células endoteliais ou musculo liso humanos (ANDRADE, tese de doutorado, em andamento).

Como discutido anteriormente, as cininas induzem a liberação de histamina por mastócitos de modo independente de seus receptores. Os autores postulam que alterações mediadas por carga na superfície células dos mastócitos sejam responsáveis por esse efeito “inespecífico” das cininas (DEVILLIER *et al.*, 1985; BUEB *et al.*, 1990; REISSMANN *et al.*, 2000). Apesar de não termos avaliado a participação de mastócitos no nosso modelo, não podemos excluir a possibilidade de algo semelhante esteja ocorrendo com uma determinada sub-população de células presente nos linfonodos inflamatórios. Vale também mencionar que existem trabalhos que demonstram a existência de receptores alternativos para as cininas, tal como GPR100 (BOELS & SCHALLER, 2003). A participação desse receptor em nosso modelo é visto com reservas, uma vez que o GPR100 é bloqueado pelo antagonista HOE-140. Considerando que a maturação das DCs humanas também não foi bloqueada pelos antagonistas dos receptores de cininas, podemos sugerir que a BK esteja agindo nos linfonodos inflamatórios através de um população cognata às DCs derivadas de monócitos (DCs inflamatórias) e , portanto, também insensíveis à inibição pelos referidos antagonistas.

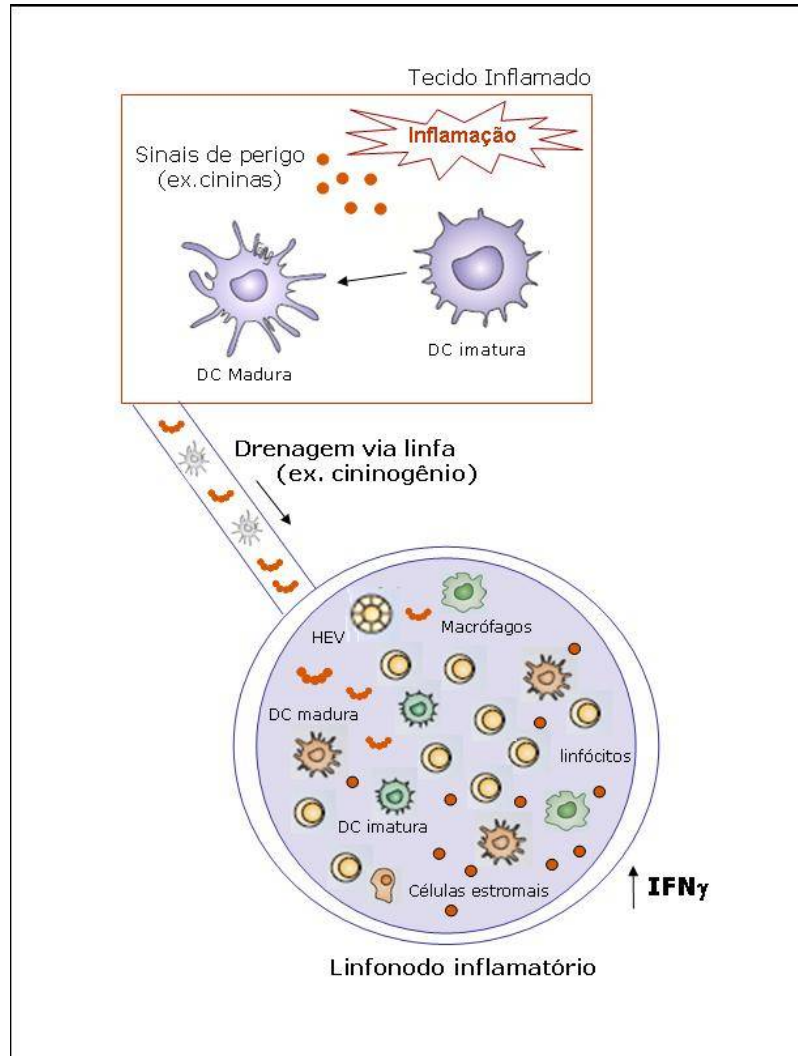
Os órgãos linfóides secundários são pequenos agregados nodulares constituídos de, predominantemente, células T e B organizadas em compartimentos específicos. Além de

linfócitos, os linfonodos em repouso são constituídos de macrófagos, diversos subtipos de DCs e células estromais. Durante estados inflamatórios, os linfonodos drenantes sofrem alterações drásticas, como o acúmulo de linfócitos e a imigração de DCs ativadas, monócitos (revisado por VON ANDRIAN & MEMPEL, 2003), células NK (MARTÍN-FONTECHA *et al.*, 2004) e mastócitos (WANG *et al.*, 1998). Dentre as células do sistema imune sensíveis a ativação do receptor B<sub>2</sub>R pela BK podemos citar as DCs (ALIBERTI *et al.*, 2003, BERTRAM *et al.*, 2007), macrófagos (BÖCKMANN & PAEGELOW, 1995; BÖCKMANN *et al.*, 1995) e neutrófilos (CASSIM *et al.*, 1996, RAJASEKARIA *et al.*, 1997). Segundo alguns autores, os receptores B<sub>1</sub>R estão constitutivamente presentes em células T (PRAT *et al.*, 1999), DCs humanas derivadas de monócitos (BERTRAM *et al.*, 2007) e macrófagos espumosos ou “foam” (RAIDOO *et al.*, 1997), podendo também ser induzidos em outros subtipos de macrófagos (TSUKAGOSHI *et al.*, 1999). Não existem evidências claras sobre a presença dos receptores de cininas em eosinófilos e mastócitos (revisado por BÖCKMANN & PAEGELOW, 2000). Os estudos realizados com camundongos imunizados (CFA/OVA) partem da premissa que a drenagem linfática deve permitir a difusão de proteínas plasmáticas (e/ou de seus produtos de ativação) do tecido inflamado para os órgãos linfóides secundários. Uma vez difundidos através do estroma, os cininogênios presumivelmente associam-se a matriz extracelular, podendo ser, então, processados por enzimas liberadoras de cininas, sejam elas de procedência endógena (calicreínas plasmáticas ou tissulares) ou microbiana (cruzipaína e gingipaínas). Devido à presença de metalopeptidases na superfície de diferentes tipos celulares, é provável que as cininas liberadas nos linfonodos drenantes inflamatórios tenham meia-vida curta, exercendo suas funções por mecanismos de sinalização parácrina.

Apesar de desconhecermos todo o espectro de células sensíveis a BK no linfonodo drenante inflamatório, os efeitos aqui descritos podem estar envolvendo múltiplos mecanismos de ação, incluindo: (a) ativação de DCs imaturas residentes na malha endógena

dos linfonodos, aumentando a eficácia da apresentação de antígenos para células T circulantes recém-ativadas;(b) indução de moléculas de adesão, co-estimulatórias ou citocinas nas DCs maduras, aumentando a eficiência da apresentação de antígeno para as células T CD4<sup>+</sup> virgens; (c) indução de moléculas anti-apoptóticas nas DCs maduras, aumentando o tempo de contato/ativação das células T nos linfonodos; (d) aumento da eficiência da apresentação cruzada pelas DCs, estimulando a ativação e produção de INF- $\gamma$  por linfócitos T CD8<sup>+</sup>; (e) ativação de outras células presentes nos linfonodos inflamatórios, como macrófagos, células NK e células estromais.

Nossos resultados permitem sugerir que as cininas, uma vez geradas no estroma dos linfonodos inflamatórios, podem ter impacto sobre a resposta secundária, modulando positivamente a produção de INF- $\gamma$  pelos linfócitos circulantes (Figura 23).



**Figura 23** – Modelo esquemático que sugere um novo papel para as cininas na regulação das respostas imunes  $T_H1$ . A injúria tecidual promove a liberação de sinais de perigos (ex. cininas) que são capazes de ativar as células da imunidade inata presentes nos sítios inflamatórios (ex. maturação de DCs imaturas). As DCs maduras, bem como antígenos solúveis e proteínas plasmáticas, podem ser drenados através da linfa, alcançando os linfonodos drenantes inflamatórios. Uma vez difundidos através do estroma do linfonodo, os cininogênios presumivelmente associam-se a matriz extracelular, podendo ser, então, processados por enzimas liberadoras de cininas, sejam elas de procedência endógena (calicreínas plasmáticas ou tissulares) ou microbiana (cruzipaína e gingipaínas). Nos linfonodos inflamatórios, as cininas atuam através de mecanismos ainda desconhecidos, modulando positivamente a produção de IFN- $\gamma$  e, provavelmente, a resposta imune  $T_H1$ .

### 5.3. Ativação de DCs esplênicas murinas pela Ang-(1-7)

A motivação para investigar a participação do heptapeptídeo Ang-(1-7) nos mecanismos de maturação de DCs surgiu de resultados obtidos em nosso laboratório que relacionavam as atividades de Ang-(1-7) e BK. Utilizando o modelo de microscopia intravital da bolsa da bochecha de hamsters, observou-se que a adição de Ang-(1-7) é capaz de potencializar o aumento da permeabilidade vascular induzida pela BK (SVENSJO *et al.*, dados não publicados). Além disso, a análise dos mecanismos de sinalização que promovem a invasão de células endoteliais humanas por tripomastigotas de *T. cruzi* revelou que esse processo envolve a cooperação (“cross-talk”) entre os receptores Mas e B<sub>2</sub>R (ANDRADE, tese de doutorado, em andamento). Considerando a heterogeneidade das respostas observadas nos estudos com humanos, optamos por explorar o papel de Ang-(1-7) na ativação de DCs utilizando o modelo de ativação *in vitro* de DCs CD11c<sup>+</sup> murinas isoladas do baço. Esse modelo é amplamente utilizado em nosso laboratório, já tendo sido empregado em estudos sobre os mecanismos de maturação de DCs induzida pelo *T. cruzi* (MONTEIRO *et al.*, em preparação). Nessa dissertação, optamos por avaliar os efeitos de Ang-(1-7) sobre a produção de IL-12 nas DCs esplênicas CD11c<sup>+</sup>. Nossos dados indicam que o estímulo com Ang-(1-7) foi capaz de induzir aumento do percentual de células produtoras de IL-12 de modo dependente da concentração (Figura 19). Consistente com um efeito clássico de agonista, o aumento no percentual de células produtoras de IL-12 induzido pela Ang-(1-7) (concentração de 10 e 100 nM) foi prevenido mediante a adição dos antagonistas dos receptores Mas (A779) e AT1 (losartan) (Figura 20).

Em 2003, foi demonstrado que Ang-(1-7) é o ligante natural (com alta afinidade) do receptor Mas (SANTOS *et al.*, 2003). Embora com afinidades mais baixas, reportou-se que Ang-(1-7) pode também ativar os receptores de Ang II, AT1 e AT2 no tecido cerebral de ratos



(ROWE *et al.*, 1995). Como discutido anteriormente, existem inúmeros relatos de cooperação funcional entre os receptores do sistema renina-angiotensina. A formação de heterodímeros entre os receptores Mas e AT1 foi documentada em diversos tipos celulares (KOSTENIS *et al.*, 2005). Estudos com corações isolados indicam que o estímulo com Ang-(1-7) promove alterações vasculares complexas que envolvem a cooperação entre os receptores Mas, AT1 e AT2 (de CASTRO *et al.*, 2005). Nessa dissertação, mostramos que a ativação de DCs esplênicas murinas pela Ang-(1-7) depende da cooperação dos receptores Mas e AT1 (Figura 13), constituindo assim mais um exemplo de interdependência entre esses receptores. Dados preliminares sugerem que o antagonista do receptor AT2 (PD123319) não foi capaz de bloquear os efeitos mediados pela Ang-(1-7) (Figura 21), ainda que esses dados precisem ser confirmados em concentrações mais baixas de Ang-(1-7).

Conforme mencionado anteriormente, Abdalla e colaboradores demonstraram que os receptores AT1 e B<sub>2</sub>R formam heterodímeros na superfície celular (ABDALLA *et al.*, 2000, ABDALLA *et al.*, 2001). Entretanto, nossos dados sugerem que a ativação de DCs murinas pela Ang-(1-7) ocorre de modo independente da ativação do receptor B<sub>2</sub>R, uma vez que o estímulo com Ang-(1-7) foi capaz de induzir aumento do percentual de células produtoras de IL12 em DCs isoladas de animais B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> (Figura 22). Estudos complementares serão necessários para determinar se Ang-(1-7) é capaz de induzir a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície das DCs esplênicas. Em caso positivo, será necessário avaliar se essa resposta também ocorre independentemente do receptor B<sub>2</sub>R, porém interdependente dos receptores AT1 e Mas, tal como observado para a produção de IL-12. Vale mencionar que efeitos de maturação parcial de DCs já foram relatados. Ao comparar os efeitos de ligantes de TLRs (PAMPs) e mediadores inflamatórios (sinais de perigo endógenos) utilizando camundongos quimera constituídos por DCs selvagens e deficientes para a sinalização dos TLRs, Sporri e Reis e Souza demonstraram que os sinais de perigo endógenos foram capazes

de induzir proliferação de células T virgens sem que esse efeito estivesse associado ao aumento de produção de IL-12 necessário para converter as DCs convencionais em células indutoras de  $T_H1$  (SPORRI & REIS E SOUZA, 2005). Entretanto, observações realizadas pelo nosso grupo indicam que esse conceito não pode ser generalizado. Nas infecções causadas por patógenos dotados de enzimas liberadoras de cininas, como por exemplo, por *Trypanosoma cruzi* (MONTEIRO *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, em preparação) ou pela bactéria gram-negativa *Porphyromonas gingivalis* (RAPOSO, dissertação de mestrado, em andamento) a liberação endógena das cininas (sinais de perigo) pode induzir a maturação plena de DCs esplênicas, convertendo-as em DCs capazes de induzir respostas adaptativas  $T_H1$ . Dessa maneira, podemos especular que a liberação de Ang-(1-7) em tecidos inflamados, decorrente de metabolização da Ang I (pela NEP) ou Ang II (pela ACE2), possa ter impacto sobre as vias de integração entre as respostas imunes inata e adaptativa. Sob esse ponto de vista, é interessante determinar se DCs convencionais migratórias (ex. células de Langerhan, DCs intersticiais) são sensíveis ao estímulo com Ang-(1-7) através das vias de sinalização dos receptores AT1 e/ou Mas.

Apesar na natureza fragmentada dos dados aqui apresentados, esse conjunto de resultados traz observações novas e potencialmente relevantes para a compreensão da função imunológica do sistema renina-angiotensina. Ainda que esses estudos devam ser aprofundados, eles sugerem uma interface entre os sistemas caliceína-cinina e renina-angiotensina na ativação de células dendríticas.

## 5. Conclusões

- 1) As cininas são capazes de induzir a ativação de DCs humanas derivadas de monócitos, aparentemente, de modo independente dos receptores clássicos de cininas;
- 2) As cininas modulam positivamente a produção de IFN- $\gamma$  pelas células dos linfonodos inflamatórios durante respostas secundárias, sem que esse efeito esteja associado à proliferação celular;
- 3) O heptapeptídeo Ang-(1-7) induz a produção de IL-12 por DCs esplênicas imaturas através de uma via dependente dos receptores Mas e AT1 e independente dos receptores de cininas.

## 6. Referências

- ABADIR P.M.; PERIASAMY A.; CAREY R.M.; SIRAGY H.M. Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. **Hypertension** 48(2):316-22, 2006.
- ABDALLA S.; LOTHER H.; EL MASSIERY A.; QUITTERER U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. **Nat Med.** 7(9):1003-9, 2001.
- ABDALLA S.; LOTHER H.; QUITTERER U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. **Nature** 407(6800):94-8, 2000.
- ADAMS J.C. Roles of fascin in cell adhesion and motility. **Curr. Opin. Cell Biol.** 16(5): 590-6, 2004.
- ALIBERTI J.; HIENY S.; REIS E SOUSA C.; SERHAN C.N.; SHER A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. **Nat Immunol.** 3(1):76-82, 2002.
- ALIBERTI J.; REIS E SOUSA C.; SCHITO M.; HIENY S.; WELLS T.; HUFFNAGLE G.B.; SHER A. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. **Nat Immunol.** 1(1):83-7, 2000.
- ALIBERTI J.; VIOLA J.P.; VIEIRA-DE-ABREU A.; BOZZA P.T.; SHER A.; SCHARFSTEIN J. Cutting edge: Bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. **J. Immunol.** 170: 5349-5353, 2003.
- ANDRADE D.S. Participação de Receptores B1 de Bradicinina e receptores do tipo Toll na invasão de células endoteliais pelo *T. cruzi*. 2003. (Mestrado em ciências biológicas – biofísica). **Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ**, Rio de Janeiro, 2003
- ARDAVIN C. Thymic dendritic cells. **Immunol Today.** 18(7):350-61, 1997.
- ARDAVIN C.; WU L.; LI C.L.; SHORTMAN K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. **Nature** 362(6422): 761-3, 1993.
- AUSTYN J.M.; KUPIEC-WEGLINSKI J.W.; HANKINS D.F.; MORRIS P.J. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell-dependent areas of spleen, and binding within marginal zone. **J Exp Med.** 167(2):646-51, 1988.
- BANCHEREAU J.; BRIERE F.; CAUX C.; DAVOUST J.; LEBECQUE S.; LIU Y-J.; PULENDRAN B.; PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.** 18: 767-811, 2000.
- BASU S.; BINDER R.J.; RAMALINGAM T.; SRIVASTAVA P.K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. **Immunity** 14(3): 303-13, 2001.
- BATTEN M.; LI J.; YI S.; KLJAVIN N.M.; DANILENKO D.M.; LUCAS S.; LEE J.; DE SAUVAGE F.J.; GHILARDI N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. **Nat Immunol.** 7(9):929-36, 2006.
- BERTRAM C.M.; BALTIC S.; MISSO N.L.; BHOOLA K.D.; FOSTER P.S.; THOMPSON P.J.; FOGEL-PETROVIC M. Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived

dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> and cell migration. **J Leukoc Biol.** Feb 27; no prelo, 2007.

BERWIN B.; HART J.P.; RICE S.; GASS C.; PIZZO S.V.; POST S.R.; NICCHITTA C.V. Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. **EMBO J.** 22(22): 6127-36, 2003.

BETTELLI E. & KUCHROO V.K. IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. **J Exp Med.** 201(2):169-71, 2005.

BETTELLI E.; CARRIER Y.; GAO W.; KORN T.; STROM T.B.; OUKKA M.; WEINER H.L.; KUCHROO V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature** 441(7090):235-8, 2006.

BHOOLA K.D.; FIGUEROA C.D.; WORTHY K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev.** 44(1):1-80, 1992.

BILLIAU A. & MATTHYS P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **J Leukoc Biol.** 70(6):849-60, 2001.

BLAUKAT A. 2003. Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia.* 35(1):17-23

BLAUKAT A.; PIZARD A.; BREIT A.; WERNSTEDT C.; ALHENC-GELAS F.; MULLER-ESTERL W.; DIKIC I. Determination of bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. **J Biol Chem.** 276(44):40431-40, 2001.

BOCKMANN S. & PAEGELOW I. Bradykinin receptors in signal transduction pathways in peritoneal guinea pigs macrophages. **Eur J Pharmacol.** 291(2):159-65, 1995.

BOCKMANN S. & PAEGELOW I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. **J Leukoc Biol.** 68(5):587-92, 2000.

BOCKMANN S.; ZUNDORF G.; WARTNER U.; PAEGELOW I. Effect of pertussis toxin on bradykinin-mediated calcium mobilization and the bradykinin-induced stimulation of arachidonic acid and PGE<sub>2</sub> release in guinea pig peritoneal macrophages. **Inflamm Res.** 44 (Suppl.), S284, 1995.

BOELS K. & SCHALLER H.C. Identification and characterisation of GPR100 as a novel human G-protein-coupled bradykinin receptor. **Br. J. Pharmacol.** 140(5):932-8, 2003.

BRAMUCCI M.; MIANO A.; QUASSINTI L.; MACCARI E.; MURRI O.; AMICI D. Presence and comparison of angiotensin converting enzyme in commercial cell culture sera. **Biochem Mol Biol Int.** 47(1):107-15, 1999.

BROMLEY S.K.; BURACK W.R.; JOHNSON K.G.; SOMERSALO K.; SIMS T.N.; SUMEN C.; DAVIS M.M.; SHAW A.S.; ALLEN P.M.; DUSTIN M.L. The immunological synapse. **Annu Rev Immunol.** 19:375-96, 2001.

BROSNIHAN K.B.; SENANAYAKE P.S.; LI P.; FERRARIO C.M. Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. **Braz J Med Biol Res.** 32(4):373-81, 1999.

BUEB J.L.; MOUSLI M.; BRONNER C.; ROUOT B.; LANDRY Y. Activation of Gi-like proteins, a receptor-independent effect of kinins in mast cells. **Mol Pharmacol.** 38(6):816-22, 1990.

BUNNEMANN B.; FUXE K.; METZGER R.; MULLINS J.; JACKSON T.R.; HANLEY M.R.; GANTEN D. Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. **Neurosci Lett** 114(2):147-53, 1990.

BURNET F. M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. **Australian Journal of Science** 20, 67-69, 1957.

CALIXTO J.B.; CABRINI D.A.; FERREIRA J.; CAMPOS M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain** 87(1):1-5, 2000.

CAMPBELL D.J.; KLADIS A.; DUNCAN A.M. Nephrectomy, converting enzyme inhibition, and angiotensin peptides. **Hypertension** 22(4):513-22, 1993.

CARUSO-NEVES C.; PROVENZANO K.; LUZ F.F.; SANTOS F.M.; FERNANDES M.S.; LEAO-FERREIRA L.R.; LOPES A.G. Bradykinin counteracts the stimulatory effect of angiotensin-(1-7) on the proximal tubule Na<sup>+</sup>-ATPase activity through B2 receptor. **Regul Pept.** 110(3):207-12, 2003.

CASSIM B.; NAIDOO S.; NAIDOO Y.; WILLIAMS R.; BHOOLA K.D. Immunolocalisation of the kinin moiety and bradykinin (B2) receptors on synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunopharmacology** 33, 321-324, 1996.

CEBON J.; LAYTON J.E.; MAHER D.; MORSTYN G. Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. **Br J Haematol.** 86(2):265-74, 1994.

CELLA M.; JARROSSAY D.; FACCHETTI F.; ALEBARDI O.; NAKAJIMAH.; LANZAVECCHIA A.; COLONNA M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. **Nat. Med.** 5:919-23, 1999.

CELLA M.; SCHEIDEGGER D.; PALMER-LEHMANN K.; LANE P.; LANZAVECCHIA A.; ALBER G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. **J Exp Med.** 184(2):747-52, 1996.

CHAPPELL M.C.; PIRRO N.T.; SYKES A.; FERRARIO C.M. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. **Hypertension.** 31(1 Pt 2):362-7, 1998.

CHEN Y.; LANGRISH C.L.; MCKENZIE B.; JOYCE-SHAIKH B.; STUMHOFER J.S.; MCCLANAHAN T.; BLUMENSCHWEIN W.; CHURAKOVSA T.; LOW J.; PRESTA L.; HUNTER C.A.; KASTELEIN R.A.; CUA D.J. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. **J Clin Invest.** 116(5):1317-26, 2006.

CHENG C.Y.; HUANG S.C.; HSIAO L.D.; SUN C.C.; JOU M.J.; YANG C.M. Bradykinin-stimulated p42/p44 MAPK activation associated with cell proliferation in corneal keratocytes. **Cell Signal.** 16(5):535-49, 2004.

CLEMENS M.J.; ELIA A. The double stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. **J. Interferon Cytokine Res.** 17:503-24, 1997.

COSTEROUSSSE O.; ALLEGRINI J.; LOPEZ M.; ALHENC-GELAS F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. **Biochem J.** 290 (Pt 1):33-40, 1993.

CRACKOWER M.A.; SARAO R.; OUDIT G.Y.; YAGIL C.; KOZIERADZKI I.; SCANGA S.E.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS A.J.; DA COSTA J.; ZHANG L.; PEI Y.; SCHOLEY J.; FERRARIO C.M.; MANOUKIAN A.S.; CHAPPELL M.C.; BACKX P.H.; YAGIL Y.; PENNINGER J.M.

Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature** 417(6891):822-8, 2002.

CUA D.J.; SHERLOCK J.; CHEN Y.; MURPHY C.A.; JOYCE B.; SEYMOUR B.; LUCIAN L.; TO W.; KWAN S.; CHURAKOVA T.; ZURAWSKI S.; WIEKOWSKI M.; LIRA S.A.; GORMAN D.; KASTELEIN R.A.; SEDGWICK J.D. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature** 421(6924):744-8, 2003.

DANILOV S.M.; SADOVNIKOVA E.; SCHARENBERG N.; BALYASNIKOVA I.V.; SVINAREVA D.A.; SEMIKINA E.L.; PAROVICHNIKOVA E.N.; SAVCHENKO V.G.; ADEMA G.J. Angiotensin-converting enzyme (CD143) is abundantly expressed by dendritic cells and discriminates human monocyte-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells. **Exp Hematol.** 31(12):1301-9, 2003.

De CASTRO C.H.; SANTOS R.A.; FERREIRA A.J.; BADER M.; ALENINA N.; ALMEIDA A.P. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. **Hypertension** 46(4):937-42, 2005.

DEDDISH P.A.; MARCIC B.; JACKMAN H.L.; WANG H.Z.; SKIDGEL R.A.; ERDOS E.G. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. **Hypertension.** 31(4):912-7, 1998.

den HAAN J.M.; LEHAR S.M.; BEVAN M.J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. **J Exp Med.** 192(12):1685-96, 2000.

DEVILLIER P.; RENOUX M.; GIROUD J.P.; REGOLI D. Peptides and histamine release from rat peritoneal mast cells. **Eur J Pharmacol.** 117(1):89-96, 1985.

DIEU M.C., VANBERVLIET B.; VICARI A.; BRIDON J.M.; OLDHAM E.; AIT-YAHIA S.; BRIERE F.; ZLOTNIK A.; LEBECQUE S.; CAUX C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **J. Exp. Med.** 188:373-86, 1998.

DONOGHUE M.; HSIEH F.; BARONAS E.; GODBOUT K.; GOSSELIN M.; STAGLIANO N.; DONOVAN M.; WOOLF B.; ROBISON K.; JEYASEELAN R.; BREITBART R.E.; ACTON S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ Res.** 87(5):E1-9, 2000.

DOSTAL D.E. & BAKER K.M. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? **Circ Res.** 85(7):643-50, 1999.

DRINKWATER C.C.; EVANS B.A.; RICHARDS R.I. Mouse glandular kallikrein genes: identification and characterization of the genes encoding the epidermal growth factor binding proteins. **Biochemistry** 26(21):6750-6, 1987.

DUSTIN M.L.; COOPER J.A. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. **Nat Immunol.** 1(1):23-9, 2000.

EISENLOHR L.C.; BACIK I.; BENNINK J.R.; BERNSTEIN K.; YEWDELL J.W. Expression of a membrane protease enhances presentation of endogenous antigens to MHC class I-restricted T lymphocytes. **Cell** 71(6):963-72, 1992.

ERIKSSON U.; DANILCZYK U.; PENNINGER J.M. Just the beginning: novel functions for angiotensin-converting enzymes. **Curr Biol.** 12(21):R745-52, 2002.

- ESTHER C.R.; MARINO E.M.; HOWARD T.E.; MACHAUD A.; CORVOL P.; CAPECCHI M.R.; BERNSTEIN K.E. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. **J Clin Invest.** 99(10):2375-85, 1997.
- FARIA-SILVA R.; DUARTE F.V.; SANTOS R.A. Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. **Hypertension** 46(4):948-52, 2005.
- FARMER S.G.; BURCH R.M.; MEEKER S.A.; WILKINS D.E. Evidence for a pulmonary B3 bradykinin receptor. **Mol. Pharmacol.** 36(1):1-8, 1989.
- FERGUSON S.S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacol. Rev.** 53(1):1-24, 2001.
- FERRARIO C.M. & CHAPPELL M.C. Novel angiotensin peptides. **Cell Mol Life Sci.** 61(21):2720-7, 2004.
- FERRARIO C.M. & IYER S.N. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. **Regul Pept.** 78(1-3):13-8, 1998.
- FERREIRA J.; CAMPOS M.M.; PESQUERO J.B.; ARAUJO R.C.; BADER M.; CALIXTO J.B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacology** 41(8):1006-12, 2001.
- FERREIRA J.; DA SILVA G.L.; CALIXTO J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **Br J Pharmacol.** 141(5):787-94, 2004.
- FIGUEIREDO R.T.; FERNANDEZ P.L.; MOURAO-SA D.S.; PORTO B.N.; DUTRA F.F.; ALVES L.S.; OLIVEIRA M.F.; OLIVEIRA P.L.; GRAÇA-SOUZA A.V.; BOZZA MT. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **J Biol Chem.** 282(28):20221-9, 2007.
- FLOHE S.B.; BRUGGEMANN J.; LENDEMANS S.; NIKULINA M.; MEIERHOFF G.; FLOHE S.; KOLB H. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. **J Immunol.** 170(5):2340-8, 2003.
- FRASER I.P.; KOZIEL H.; EZEKOWITZ R.A. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptative immunity. **Semin. Immunol.** 10:363-72, 1998.
- FUCHS S.; FRENZEL K.; HUBERT C.; LYNG R.; MULLER L.; MICHAUD A.; XIAO H.D.; ADAMS J.W.; CAPECCHI M.R.; CORVOL P.; SHUR B.D.; BERNSTEIN K.E. Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE. **Nat Med.** 11(11):1140-2, 2005.
- GALLAGHER P.E.; LI P.; LENHART J.R.; CHAPPELL M.C.; BROSNIHAN K.B. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. **Hypertension** 33(1 Pt 2):323-8, 1999.
- GALLAGHER P.E. & TALLANT E.A. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). **Carcinogenesis** 25(11):2045-52, 2004.
- GAVIN A.L.; HOEBE K.; DUONG B.; OTA T.; MARTIN C.; BEUTLER B.; NEMAZEE D. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. **Science** 314(5807):1936-8, 2006.
- GEISSMANN F.; JUNG S.; LITTMAN D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity** 19(1):71-82, 2003.



GERA L.; STEWART J.M.; WHALLEY E.T.; BURKARD M.; ZUZACK J.S. New bradykinin antagonists having high potency at B1 receptors. **Immunopharmacology** 33:183-185, 1996.

GEWURZ H.; MOLD C.; SIEGEL J.; FIEDEL B. C-reactive protein and the acute phase response. **Adv. Intern. Med.** 27: 3455-72, 1982.

GINHOUX F.; TACKE F.; ANGELI V.; BOGUNOVIC M.; LOUBEAU M.; DAI X.M.; STANLEY E.R.; RANDOLPH G.J.; MERAD M. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. **Nat. Immunol.** 7(3):265-73, 2006.

GOBEIL F. JR.; CHARLAND S.; FILTEAU C.; PERRON S.I.; NEUGEBAUER W.; REGOLI D. Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities. **Hypertension** 33:823-829, 1999.

GORDON S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell** 111:927-30, 2002.

GRECO S.; MUSCELLA A.; ELIA M.G.; ROMANO S.; STORELLI C.; MARSIGLIANTE S. Mitogenic signalling by B2 bradykinin receptor in epithelial breast cells. **J Cell Physiol.** 201(1):84-96, 2004.

HALL J.M. Bradykinin receptors. **Gen Pharmacol.** 28(1):1-6, 1997.

HARRINGTON L.E.; HATTON R.D.; MANGAN P.R.; TURNER H.; MURPHY T.L.; MURPHY K.M.; WEAVER C.T. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol.** 6(11):1123-32, 2005.

HASAN A.A.; AMENTA S.; SCHMAIER A.H. Bradykinin and its metabolite, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, are selective inhibitors of alpha-thrombin-induced platelet activation. **Circulation.** 94(3):517-28, 1996.

HAYASHI R.; YAMASHITA N.; MATSUI S.; FUJITA T.; ARAYA J.; SASSA K.; ARAI N.; YOSHIDA Y.; KASHII T.; MARUYAMA M.; SUGIYAMA E.; KOBAYASHI M. Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. **Eur. Respir J.** 16(3):452-8, 2000.

HEIMARK R.L.; KURACHI K.; FUJIKAWA K.; DAVIE E.W. Surface activation of blood coagulation, fibrinolysis and kinin formation. **Nature** 286(5772):456-60, 1980.

HELLINGS P.W.; KASRAN A.; LIU Z.; VANDEKERCKHOVE P.; WUYTS A.; OVERBERGH L.; MATHIEU C.; CEUPPENS J.L. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 28(1):42-50, 2003.

HENDERSON L.M.; FIGUEROA C.D.; MULLER-ESTERL W.; BHOOLA K.D. Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. **Blood.** 84(2):474-82, 1994.

HENDERSON L.M.; FIGUEROA C.D.; MULLER-ESTERL W.; STAIN A.; BHOOLA K.D. Immunovisualisation of plasma prekallikrein and H-kininogen on human neutrophils and in human hepatocytes. **Agents Actions Suppl.** 38 (Pt 1):590-4, 1992.

HENSON P.M. Dampening inflammation. **Nat. Immunol.** 6(12): 1179-1181, 2005.

HOCHREIN H.; SHORTMAN K.; VREMEC D.; SCOTT B.; HERTZOG P.; O'KEEFFE M. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. **J Immunol.** 166(9):5448-55, 2001.

HOCK F.J.; WIRTH K.; ALBUS U.; LINZ W.; GERHARDS H.J.; WIEMER G.; HENKE S.; BREIPOHL G.; KÖNIG W.; KNOLLE J. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin antagonist: in vitro studies. **Br J Pharmacol** 102:769-773, 1991.

HUANG C.D.; TLIBA O.; PANETTIERI R.A. JR.; AMRANI Y. Bradykinin induces interleukin-6 production in human airway smooth muscle cells: modulation by Th2 cytokines and dexamethasone. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** 28(3):330-8, 2003.

HUANG F.P.; MACPHERSON G.G. Continuing education of the immune system--dendritic cells, immune regulation and tolerance. **Curr Mol Med.** 1(4):457-68, 2001.

IGIC R & BEHNIA R. Properties and distribution of angiotensin I converting enzyme. **Curr Pharm Des.** 9(9):697-706, 2003.

IMAMURA T.; POTEPA J.; TRAVIS J. Activation of the kallikrein-kinin system and release of new kinins through alternative cleavage of kininogens by microbial and human cell proteinases. **Biol Chem.** 385(11):989-96, 2004.

INABA K.; INABA M.; ROMANI N.; AYA H.; DEGUCHI M.; IKEHARA S.; MURAMATSU S.; STEINMAN R.M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.** 176:1693-702, 1992.

INFANTE-DUARTE C.; HORTON H.F.; BYRNE M.C.; KAMRADT T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. **J Immunol.** 165(11):6107-15, 2000.

IVANOV I.I.; MCKENZIE B.S.; ZHOU L.; TADOKORO C.E.; LEPELLEY A.; LAFAILLE J.J.; CUA D.J.; LITTMAN D.R. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. **Cell** 126(6):1121-33, 2006.

JANEWAY C.A. JR. & MEDZHITOV R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.** 20:197-216, 2002.

KALINSKI P.; VIEIRA P.L.; SCHUITEMAKER J.H.; DE JONG E.C.; KAPSENBERG M.L. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p40/70 heterodimer. **Blood** 97(11):3466-9, 2001.

KAPSENBERG M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat Rev Immunol.** 3(12):984-93, 2003.

KATSNELSON A. Kicking off adaptive immunity: the discover of dendritic cells. **J. Exp. Med.** 203(7): 1622, 2006.

KAUFMANN J.; HAASEMANN M.; MODROW S.; MULLER-ESTERL W. Structural dissection of the multidomain kininogens. Fine mapping of the target epitopes of antibodies interfering with their functional properties. **J Biol Chem.** 268(12):9079-91, 1993.

KAWAI T. & AKIRA S. TLR signaling. **Semin Immunol.** 19(1):24-32, 2007.

KHAN M.M.; BRADFORD H.N.; ISORDIA-SALAS I.; LIU Y.; WU Y.; ESPINOLA R.G.; GHEBREHIWET B.; COLMAN R.W. High-molecular-weight kininogen fragments stimulate the

secretion of cytokines and chemokines through uPAR, Mac-1, and gC1qR in monocytes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 26(10):2260-6, 2006.

KIMURA Y.; FUJIHIRA T.; KATO K.; FURUYA M.; ONDA M.; SHIROTA A. Effect of bradykinin to cyclic AMP levels and response of murine lymphocytes. **Adv Exp Med Biol.** 120A:393-407, 1979.

KOENDERS M.I.; LUBBERTS E.; OPPERS-WALGREEN B.; VAN DEN BERSSELAAR L.; HELSEN M.M.; KOLLS J.K.; JOOSTEN L.A.; VAN DEN BERG W.B. Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1. **Arthritis Rheum.** 52(3):975-83, 2005.

KOHLSTEDT K.; BRANDES R.P.; MULLER-ESTERL W.; BUSSE R.; FLEMING I. Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells. **Circ. Res.** 94(1):60-7, 2004.

KOMIYAMA Y.; NAKAE S.; MATSUKI T.; NAMBU A.; ISHIGAME H.; KAKUTA S.; SUDO K.; IWAKURA Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol.** 177(1):566-73, 2006.

KONDOH G.; TOJO H.; NAKATANI Y.; KOMAZAWA N.; MURATA C.; YAMAGATA K.; MAEDA Y.; KINOSHITA T.; OKABE M.; TAGUCHI R.; TAKEDA J. Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. **Nat Med.** 11(2):160-6, 2005.

KOSTENIS E.; MILLIGAN G.; CHRISTOPOULOS A.; SANCHEZ-FERRER C.F.; HERINGER-WALTHER S.; SEXTON P.M.; GEMBARDT F.; KELLETT E.; MARTINI L.; VANDERHEYDEN P.; SCHULTHEISS H.P.; WALTHER T. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. **Circulation** 111(14):1806-13, 2005.

KOZLOWSKI S.; CORR M.; TAKESHITA T.; BOYD L.F.; PENDLETON C.D.; GERMAIN R.N.; BERZOFISKY J.A.; MARGULIES D.H. Serum angiotensin-1 converting enzyme activity processes a human immunodeficiency virus 1 gp160 peptide for presentation by major histocompatibility complex class I molecules. **J Exp Med.** 175(6):1417-22, 1992.

KRAMERS C.; DANILOV S.M.; DEINUM J.; BALLYASNIKOVA I.V.; SCHARENBERG N.; LOOMAN M.; BOOMSMA F.; DE KEIJZER M.H.; VAN DUIJN C.; MARTIN S.; SOUBRIER F.; ADEMA G.J. Point mutation in the stalk of angiotensin-converting enzyme causes a dramatic increase in serum angiotensin-converting enzyme but no cardiovascular disease. **Circulation.** 104(11):1236-40, 2001.

KREGE J.H.; JOHN S.W.; LANGENBACH L.L.; HODGIN J.B.; HAGAMAN J.R.; BACHMAN E.S.; JENNETTE J.C.; O'BRIEN D.A.; SMITHIES O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. **Nature** 375(6527):146-8, 1995.

KURDI M.; DE MELLO W.C.; BOOZ G.W. Working outside the system: an update on the unconventional behavior of the renin-angiotensin system components. **Int J Biochem Cell Biol.** 37(7):1357-67, 2005.

LANZAVECCHIA A. & SALLUSTO F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. **Science** 290(5489):92-7, 2000.

LAPTEVA N.; IDE K.; NIEDA M.; ANDO Y.; HATTA-OHASHI Y.; MINAMI M.; DYMSHITS G.; EGAWA K.; JUJI T.; TOKUNAGA K. Activation and suppression of renin-angiotensin system in human dendritic cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 296(1):194-200, 2002.

- LAPTEVA N.; NIEDA M.; ANDO Y.; IDE K.; HATTA-OHASHI Y.; DYMSHITS G.; ISHIKAWA Y.; JUJI T.; TOKUNAGA K. Expression of renin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA microarray. **Biochem Biophys Res Commun.** 285(4):1059-65, 2001.
- LEEB-LUNDBERG L.M.; MARCEAU F.; MULLER-ESTERL W.; PETTIBONE D.J.; ZURAW B.L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev.** 57(1):27-77, 2005.
- LI W.; MOORE M.J.; VASILIEVA N.; SUI J.; WONG S.K.; BERNE M.A.; SOMASUNDARAN M.; SULLIVAN J.L.; LUZURIAGA K.; GREENOUGH T.C.; CHO E.; FARZAN M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature** 426(6965):450-4, 2003.
- LIEBMANN C. Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. **Biol Chem.** 382(1):49-55, 2001.
- LIMA C.V.; PAULA R.D.; RESENDE F.L.; KHOSLA M.C.; SANTOS R.A. Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. **Hypertension** 30(3 Pt 2):542-8, 1997.
- LOHR J.; KNOEHEL B.; ABBAS A.K. Regulatory T cells in the periphery. **Immunol Rev.** 212:149-62, 2006.
- LUFT T.; JEFFORD M.; LUETJENS P.; HOCHREIN H.; MASTERMAN K.A.; MALISZEWSKI C.; SHORTMAN K.; CEBON J.; MARASKOVSKY E. IL-1 beta enhances CD40 ligand-mediated cytokine secretion by human dendritic cells (DC): a mechanism for T cell-independent DC activation. **J Immunol.** 168(2):713-22, 2002.
- MACDONALD R.J.; MARGOLIUS H.S.; ERDOS E.G. Molecular biology of tissue kallikrein. **Biochem J.** 253(2):313-21, 1988.
- MANDLE R.J.; COLMAN R.W.; KAPLAN A.P. Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 73(11):4179-83, 1976.
- MANGAN P.R.; HARRINGTON L.E.; O'QUINN D.B.; HELMS W.S.; BULLARD D.C.; ELSON C.O.; HATTON R.D.; WAHL S.M.; SCHOEB T.R.; WEAVER C.T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature** 441(7090):231-4, 2006.
- MANZ M.G.; TRAVER D.; AKASHI K.; MERAD M.; MIYAMOTO T.; ENGLEMAN E.G.; WEISSMAN I.L. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. **Ann N Y Acad Sci.** 938:167-73, 2001.
- MARCEAU F. & BACHVAROV D.R. Kinin receptors. **Clin Rev Allergy Immunol.** 16(4):385-401, 1998.
- MARCEAU F.; HESS J.F.; BACHVAROV D.R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol Rev.** 50(3):357-86, 1998.
- MARTIN D. & TARLETON R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Rev.** 201:304-17, 2004.
- MARTIN-FONTECHA A.; THOMSEN L.L.; BRETT S.; GERARD C.; LIPP M.; LANZAVECCHIA A.; SALLUSTO F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. **Nat Immunol.** 5(12):1260-5, 2004.

- MATZINGER P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annu. Rev. Immunol.** 12: 991-1045, 1994.
- MATZINGER P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? **Nat. Immunol.** 8(1):11-3, 2007.
- MCFADDEN R.G. & VICKERS K.E. Bradykinin augments the in vitro migration of nonsensitized lymphocytes. **Clin Invest Med.** 12(4):247-53, 1989.
- MEINI S.; BELLUCCI F.; CUCCHI P.; GIULIANI S.; QUARTARA L.; GIOLITTI A.; ZAPPITELLI S.; ROTONDARO L.; BOELS K.; MAGGI C.A. Bradykinin B2 and GPR100 receptors: a paradigm for receptor signal transduction pharmacology. **Br. J. Pharmacol.** 143(8):938-41, 2004.
- MENARD J. & PATCHETT A.A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Adv Protein Chem.** 56:13-75, 2001.
- MERAD M.; MANZ M.G.; KARSUNKY H.; WAGERS A.; PETERS W.; CHARO I.; WEISSMAN I.L.; CYSTER J.G.; ENGLEMAN E.G. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. **Nat Immunol.** 2002 Dec;3(12):1135-41, 2002.
- MEYLAN E.; TSCHOPP J.; KARIN M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature** 442: 39-44, 2006.
- MONTEIRO A.C.; SCHMITZ V.; SVENSJO E.; GAZZINELLI R.T.; ALMEIDA I.C.; TODOROV A.; DE ARRUDA L.B.; TORRECILHAS A.C.; PESQUERO J.B.; MORROT A.; BOUSKELA E.; BONOMO A.; LIMA A.P.; MULLER-ESTERL W.; SCHARFSTEIN J. Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol** 177(9):6325-35, 2006.
- MORTARINI R.; ANICHINI A.; DI NICOLA M.; SIENA S.; BREGNI M.; BELLI F.; MOLLA A.; GIANNI A.M.; PARMIANI G. Autologous dendritic cells derived from CD34 progenitors and from monocytes are not functionally equivalent antigen-presenting cells in the induction of melan-A/Mart-1(27-35)-specific CTLs from peripheral blood lymphocytes of melanoma patients with low frequency of CTL precursors. **Cancer Res.** 57:5534-41, 1997.
- MOTTA G.; SAMPAIO C.A.; SAMPAIO M.U. Human plasma kallikrein. Immunoreactivity and activity on natural and synthetic substrates. **Agents Actions Suppl.** 36:200-8, 1992.
- MURPHEY L.J.; MALAVE H.A.; PETRO J.; BIAGGIONI I.; BYRNE D.W.; VAUGHAN D.E.; LUTHER J.M.; PRETORIUS M.; BROWN N.J. Bradykinin and its metabolite bradykinin 1-5 inhibit thrombin-induced platelet aggregation in humans. **J Pharmacol Exp Ther.** 318(3):1287-92, 2006.
- MURPHY C.A.; LANGRISH C.L.; CHEN Y.; BLUMENSCHEN W.; MCCLANAHAN T.; KASTELEIN R.A.; SEDGWICK J.D.; CUA D.J. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. **J Exp Med.** 198(12):1951-7, 2003.
- MURPHY K.M. & REINER S.L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat Rev Immunol.** 2(12):933-44, 2002.
- NAIK S.H.; METCALF D.; VAN NIEUWENHUIJZE A.; WICKS I.; WU L.; O'KEEFFE M.; SHORTMAN K. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. **Nat. Immunol.** 7(6):663-71, 2006.

- NAKAE S.; NAMBU A.; SUDO K.; IWAKURA Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. **J Immunol.** 171(11):6173-7, 2003.
- PAEGELOW I. & LANGE P. Pharmacological studies on lymphocytes. 1. Effects of 5-hydroxytryptamine, bradykinin, and lymphokines on the migration of lymphocytes in vitro. **Agents Actions Suppl.** 10:255-65, 1982.
- PAEGELOW I. & WERNER H. Immunomodulation by some oligopeptides. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.** 8(2):91-5, 1986.
- PALIOURAS M. & DIAMANDIS E.P. The kallikrein world: an update on the human tissue kallikreins. **Biol Chem.** 387(6):643-52, 2006.
- PARK H.; LI Z.; YANG X.O.; CHANG S.H.; NURIEVA R.; WANG Y.H.; WANG Y.; HOOD L.; ZHU Z.; TIAN Q.; DONG C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol.** 6(11):1133-41, 2005.
- PAULA R.D.; LIMA C.V.; KHOSLA M.C.; SANTOS R.A. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. **Hypertension** 26(6 Pt 2):1154-9, 1995.
- PESQUERO J.B.; ARAUJO R.C.; HEPPENSTALL P.A.; STUCKY C.L.; SILVA J.A. JR.; WALTHER T.; OLIVEIRA S.M.; PESQUERO J.L.; PAIVA A.C.; CALIXTO J.B.; LEWIN G.R.; BADER M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 97(14):8140-5, 2000.
- PIZARD A.; BLAUKAT A.; MICHINEAU S.; DIKIC I.; MULLER-ESTERL W.; ALHENC-GELAS F.; RAJERISON R.M. Palmitoylation of the human bradykinin B2 receptor influences ligand efficacy. **Biochemistry.** 40(51):15743-51, 2001.
- PRADO G.N.; TAYLOR L.; ZHOU X.; RICUPERO D.; MIERKE D.F.; POLGAR P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. **J Cell Physiol.** 193(3):275-86, 2002.
- PRAT A.; BIERNACKI K.; SAROLI T.; ORAV J.E.; GUTTMANN C.R.; WEINER H.L.; KHOURY S.J.; ANTEL J.P. Kinin B1 receptor expression on multiple sclerosis mononuclear cells: correlation with magnetic resonance imaging T2-weighted lesion volume and clinical disability. **Arch. Neurol.** 62(5):795-800, 2005.
- PRAT A.; WEINRIB L.; BECHER B.; POIRIER J.; DUQUETTE P.; COUTURE R.; ANTEL J.P. Bradykinin B1 receptor expression and function on T lymphocytes in active multiple sclerosis. **Neurology** 53(9):2087-92, 1999.
- PRIETO A.R.; MA H.; HUANG R.; KHAN G.; SCHWARTZ K.A.; HAGE-KORBAN E.E.; SCHMAIER A.H.; DAVIS J.M.; HASAN A.A.; ABELA G.S. Thrombostatin, a bradykinin metabolite, reduces platelet activation in a model of arterial wall injury. **Cardiovasc Res.** 53(4):984-92, 2002.
- PULENDRAN B.; SMITH J.L.; CASPARY G.; BRASEL K.; PETTIT D.; MARASKOVSKY E.; MALISZEWSKI C.R. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96:1036-41, 1999.
- RAIDOO D.M.; RAMSAROOP R.; NAIDOO S.; MÜLLER-ESTERL W.; BHOOLA K.D. Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. **Immunopharmacology** 36, 153-160, 1997.

- RANDOLPH G.J.; ANGELI V.; SWARTZ M.A. Dendritic cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **Nat. Rev. Immunol.** 5: 617-628, 2005.
- RANDOLPH G.J.; INABA K.; ROBBIANI D.F.; STEINMAN R.M.; MULLER W.A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. **Immunity** 11(6):753-61, 1999.
- REGOLI D.; BARABE' J.; PARK W.K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. **Can J Physiol Pharmacol.** 55:855-867, 1977.
- REGOLI D.; GOBEIL F.; NGUYEN Q.T.; JUKIC D.; SEOANE P.R.; SALVINO J.M.; SAWUTZ D.G. Bradykinin receptor types and B2 subtypes. **Life Sci.** 55(10):735-49, 1994.
- REIS e SOUSA C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptative immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 16: 21-25, 2004.
- REIS e SOUSA C. Dendritic cells in a mature age. 6: 476-483, 2006.
- REISSMANN S.; PINEDA F.; VIETINGHOFF G.; WERNER H.; GERA L.; STEWART J.M.; PAEGELOW I. Structure activity relationships for bradykinin antagonists on the inhibition of cytokine release and the release of histamine. **Peptides** 21(4):527-33, 2000.
- REMUZZI G. & RUGGENENTI P. Overview of randomised trials of ACE inhibitors. **Lancet** 368(9535):555-6, 2006.
- RHALEB N.E.; ROUISSI N.; JUKIC D.; REGOLI D.; HENKE S.; BREIPOHL G.; KNOLLE J. Pharmacological characterization of a new highly potent B2 receptor antagonist (HOE 140: D-Arg-[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Qic8]bradykinin). **Eur J Pharmacol.** 210(2):115-20, 1992.
- ROHRBACH M.S. Metabolism and subcellular localization of angiotensin converting enzyme in cultured human monocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 124(3):843-9, 1984.
- ROJKJAER R. & SCHMAIER A.H. Activation of the plasma kallikrein/kinin system on endothelial cell membranes. **Immunopharmacology.** 43(2-3):109-14, 1999.
- ROWE B.P.; SAYLOR D.L.; SPETH R.C.; ABSHER D.R. Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. **Regul Pept.** 56(2-3):139-46, 1995.
- SALLUSTO F. & LANZAVECCHIA A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . **J. Exp. Med.** 179:1109-1118, 1994.
- SAMPAIO W.O.; SOUZA DOS SANTOS R.A.; FARIA-SILVA R.; DA MATA MACHADO L.T.; SCHIFFRIN E.L.; TOUYZ R.M. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension** 49(1):185-92, 2007.
- SANTOS R.A.; CAMPAGNOLE-SANTOS M.J.; BARACHO N.C.; FONTES M.A.; SILVA L.C.; NEVES L.A.; OLIVEIRA D.R.; CALIGIORNE S.M.; RODRIGUES A.R.; GROPEN JUNIOR C. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. **Brain Res Bull.** 35(4):293-8, 1994.
- SANTOS R.A.; HAIBARA A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS M.J.; SIMOES E SILVA A.C.; PAULA R.D.; PINHEIRO S.V.; LEITE M.F.; LEMOS V.S.; SILVA D.M.; GUERRA M.T.; KHOSLA M.C. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). **Hypertension** 41(3 Pt 2):737-43, 2003.

SANTOS R.A.; SIMOES E SILVA A.C.; MARIC C.; SILVA D.M.; MACHADO R.P.; DE BUHR I.; HERINGER-WALTHER S.; PINHEIRO S.V.; LOPES M.T.; BADER M.; MENDES E.P.; LEMOS V.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS M.J.; SCHULTHEISS H.P.; SPETH R.; WALTHER T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 100(14):8258-63, 2003.

SAYED-TABATABAEI FA, OOSTRA BA, ISAACS A, VAN DUIJN CM, WITTEMAN JC. ACE polymorphisms. **Circ Res.** 98(9):1123-33, 2006.

SCHARFSTEIN J.; SCHMITZ V.; MORANDI V.; CAPELLA M.M.; LIMA A.P.; MORROT A.; JULIANO L.; MULLER-ESTERL W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. **J Exp Med.** 192(9):1289-300, 2000.

SCHMAIER A.H. The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 285(1):R1-13, 2003.

SCHNURR M.; THEN F.; GALAMBOS P.; SCHOLZ C.; SIEGMUND B.; ENDRES S.; EIGLER A. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. **J. Immunol.** 165: 4704-4709, 2000.

SCHWALBE R.A.; DAHLBACK B.; COE J.E.; NELSESTUEN G.L. Pentraxin family of proteins specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. **Biochemistry** 31: 4907-15, 1992.

SCHWANINGER M.; SALLMANN S.; PETERSEN N.; SCHNEIDER A.; PRINZ S.; LIBERMANN T.A.; SPRANGER M. Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. **J. Neurochem.** 73(4):1461-6, 1999.

SEYA T.; AKAZAWA T.; TSUJITA T.; MATSUMOTO M. Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. **Evid Based Complement Alternat Med.** 3(1):31-8; discussion 133-7, 2006.

SHARIAT-MADAR Z.; MAHDI F.; SCHMAIER A.H. Assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system: a new interpretation. **Int Immunopharmacol.** 2(13-14):1841-9, 2002.

SHORTMAN K. & NAIK S.H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nat. Rev. Immunol.** 7:19-29, 2007.

SHURIN M.R.; PANDHARIPANDE P.P.; ZORINA T.D.; HALUSZCZAK C.; SUBBOTIN V.M.; HUNTER O.; BRUMFIELD A.; STORKUS W.J.; MARASKOVSKY E.; LOTZE M.T. FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. **Cell Immunol.** 179:174-84, 1997.

SIEGAL F.P.; KADOWAKI N.; SHODELL M.; FITZGERALD-BOCARSLY P.A.; SHAH K.; HO S.; ANTONENKO S.; LIU Y.J. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. **Science** 284:1835-37, 1999.

SIMPSON S.J. & HINES P.J. Self-Discrimination, a Life and Death Issue. **Science.** 296 (5566):297, 2002.

SINGH-JASUJA H.; SCHERER H.U.; HILF N.; ARNOLD-SCHILD D.; RAMMENSEE H.G.; TOES R.E.; SCHILD H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. **Eur J Immunol.** 30(8):2211-5, 2000.



SIRAGY H.M. & CAREY R.M. The subtype 2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. **J Clin Invest.** 100(2):264-9, 1997.

SIRAGY H.M.; JAFFA A.A.; MARGOLIUS H.S.; CAREY R.M. Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. **Am J Physiol.** 271(4 Pt 2):R1090-5, 1996.

SPORRI R. & REIS E SOUSA C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4<sup>+</sup> T cell populations lacking helper function. **Nat Immunol.** 6(2):163-70, 2005.

STEINMAM R.M.; LUSTIG D.S.; COHN Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. **J. Exp. Med.** 139(6):1431-45, 1974.

STEINMAN L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat Med.** 13(2):139-45, 2007.

STEINMAN R.M. & COHN Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.** 137(5): 1142-62, 1973.

STEINMAN R.M. & NUSSENZWEIG M.C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99:351-358, 2002.

STEINMAN R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu Rev Immunol.** 9:271-96, 1991.

STEWART J.M.; GERA L.; HANSON W.; ZUZAK J.S.; BURKARD M.; MCCULLOUGH R.; WHALLEY E.T. A new generation of bradykinin antagonists. **Immunopharmacology** 31:51-60, 1996.

STUMHOFER J.S.; LAURENCE A.; WILSON E.H.; HUANG E.; TATO C.M.; JOHNSON L.M.; VILLARINO A.V.; HUANG Q.; YOSHIMURA A.; SEHY D.; SARIS C.J.; O'SHEA J.J.; HENNIGHAUSEN L.; ERNST M.; HUNTER C.A. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. **Nat Immunol.** 7(9):937-45, 2006.

TALLANT E.A. & CLARK M.A. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). **Hypertension** 42(4):574-9, 2003.

TALLANT E.A.; DIZ D.I.; FERRARIO C.M. 1999. State-of-the-Art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. **Hypertension** 34(4 Pt 2):950-7

TALLANT E.A.; FERRARIO C.M.; GALLAGHER P.E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 289(4):H1560-6, 2005.

TANG A.; AMAGAI M.; GRANGER L.G.; STANLEY J.R.; UDEY M.C. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. **Nature** 361:82-85, 1993.

TEIXEIRA L.K.; FONSECA B.P.; VIEIRA-DE-ABREU A.; BARBOZA B.A.; ROBBS B.K.; BOZZA P.T.; VIOLA J.P. IFN- $\gamma$  production by CD8<sup>+</sup> T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. **J Immunol.** 175(9):5931-9, 2005.

TIPNIS S.R.; HOOPER N.M.; HYDE R.; KARRAN E.; CHRISTIE G.; TURNER A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J Biol Chem.** 275(43):33238-43, 2000.

TODOROV A.G.; ANDRADE D.; PESQUERO J.B.; ARAUJO R.DE C.; BADER M.; STEWART J.; GERA L.; MULLER-ESTERL W.; MORANDI V.; GOLDENBERG R.C.; NETO H.C.; SCHARFSTEIN J. Trypanosoma cruzi induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. **FASEB J.** 17(1):73-5, 2003.

TRAVER D.; AKASHI K.; MANZ M.; MERAD M.; MIYAMOTO T.; ENGLEMAN E.G.; WEISSMAN I.L. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. **Science** 290(5499):2152-4, 2000.

TRINCHIERI G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol.** 3(2):133-46, 2003.

TSUKAGOSHI H.; SHIMIZU Y.; HORIE T.; FUKABORI Y.; SHIMIZU Y.; IWAMAE S.; HISADA T.; ISHIZUKA T.; IIZUKA K.; DOBASHI K.; MORI M. Regulation by interleukin-1b of gene expression of bradykinin B1 receptor in MH-S murine alveolar macrophage cell line. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 259, 476-482, 1999.

TURNER A.J. & HOOPER N.M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. **Trends Pharmacol Sci.** 23(4):177-83, 2002.

VAROL C.; LANDSMAN L.; FOGG D.K.; GREENSHTEIN L.; GILDOR B.; MARGALIT R.; KALCHENKO V.; GEISSMANN F.; JUNG S. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. **J. Exp. Med.** 204(1):171-80, 2007.

VELDHOEN M.; HOCKING R.J.; ATKINS C.J.; LOCKSLEY R.M.; STOCKINGER B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity.** 24(2):179-89, 2006.

VIEIRA P.L.; DE JONG E.C.; WIERENGA E.A.; KAPSENBERG M.L.; KALINSKI P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. **J Immunol.** 164(9):4507-12, 2000.

von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. **Nat Rev Immunol.** 3(11):867-78, 2003.

VREMEC D.; LIESCHKE G.J.; DUNN A.R.; ROBB L.; METCALF D.; SHORTMAN K. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. **Eur J Immunol.** 27(1):40-4, 1997.

VREMEC D.; POOLEY J.; HOCHREIN H.; WU L.; SHORTMAN K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. **J. Immunol.** 164(6):2978-86, 2000.

WANG H.W.; TEDLA N.; LLOYD A.R.; WAKEFIELD D.; MCNEIL P.H. Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. **J Clin Invest.** 102(8):1617-26, 1998.

WEAVER C.T.; HATTON R.D.; MANGAN P.R.; HARRINGTON L.E. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. **Annu Rev Immunol.** 25:821-52, 2007.

WILSON N.S.; EL-SUKKARI D.; BELZ G.T.; SMITH C.M.; STEPTOE R.J.; HEATH W.R.; SHORTMAN K.; VILLADANGOS J.A. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. **Blood.** 102(6):2187-94, 2003.

XU P.; SANTOS R.A.; BADER M.; ALENINA N. Alterations in gene expression in the testis of angiotensin-(1-7)-receptor Mas-deficient mice. **Regul Pept.** 138(2-3):51-5, 2007.

XU Y.Y.; YANG C.; LI S.N. Effects of genistein on angiotensin-converting enzyme in rats. **Life Sci.** 79(9):828-37, 2006.

YAMADA K.; IYER S.N.; CHAPPELL M.C.; GANTEN D.; FERRARIO C.M. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). **Hypertension** 32(3):496-502, 1998.

YANG C.M.; LIN M.I.; HSIEH H.L.; SUN C.C.; MA Y.H.; HSIAO L.D. Bradykinin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation and cell proliferation via Src, EGF receptors, and PI3-K/Akt in vascular smooth muscle cells. **J Cell Physiol.** 203(3):538-46, 2005.

YE P.; RODRIGUEZ F.H.; KANALY S.; STOCKING K.L.; SCHURR J.; SCHWARZENBERGER P.; OLIVER P.; HUANG W.; ZHANG P.; ZHANG J.; SHELLITO J.E.; BAGBY G.J.; NELSON S.; CHARRIER K.; PESCHON J.J.; KOLLS J.K. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **J Exp Med.** 194(4):519-27, 2001.

YRLID U.; JENKINS C.D.; MACPHERSON G.G. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. **J Immunol.** 176(7):4155-62, 2006.

## 7. Lista de publicações e manuscritos

Julio Scharfstein, Veronica Schmitz, Erik Svensjo, **Alessandra Granato** and Ana Carolina Monteiro. Kininogens Coordinate Adaptive Immunity through the Proteolytic Release of Bradykinin, an Endogenous Danger Signal Driving Dendritic Cell Maturation. **Scandinavian Journal of Immunology**, 66(2-3):128-36, 2007.

Ana Carolina dos Santos Monteiro, Luciana Barros de Arruda, Veronica Schmitz, **Alessandra Granato**, Alexandre Morrot, Helton Santiago, Nagajyothi, Ricardo T. Gazzinelli, João B. Pesquero, Werner Müller-Esterl, Herbert B. Tanowitz and Julio Scharfstein. Bradykinin B<sub>2</sub> receptors on dendritic cells acts as a sensor of kinin-releasing *Trypanosoma cruzi* strains to induce type-1 immunity while repressing T<sub>H</sub>17 responses, submetido.

# 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](#)