

**ESTEVAM JOSÉ BALDON**

**AÇÕES DAS Hsp65r NATIVA E SUA MUTANTE K<sup>409</sup>A  
DE *Mycobacterium leprae* DURANTE O  
PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ESTEVAM JOSÉ BALDON**

**AÇÕES DAS Hsp65r NATIVA E SUA MUTANTE K<sup>409</sup>A  
DE *Mycobacterium leprae* DURANTE O  
PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia  
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna

São Paulo  
2010

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

reprodução não autorizada pelo autor

Baldon, Estevam José.

Ações das Hsp65r nativa e sua mutante K<sup>409</sup>A de *Mycobacterium leprae* durante o processo de envelhecimento / Estevam José Baldon. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant Anna.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Genética da tolerância e imunossupressão.

Versão do título para o inglês: The influence of *Mycobacterium leprae* rHsp65 wild type and its mutant K<sup>409</sup>A during the ageing process.

Descritores: 1. Hsp65r nativa e mutante K<sup>409</sup>A 2. Processo de envelhecimento 3. Anticorpos I. Sant Anna, Osvaldo Augusto Brazil Esteves II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0112/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):                    Estevam José Baldon.

Título da Dissertação:        Ações das Hsp65r nativa e sua mutante K<sup>409</sup>A de  
Mycobacterium leprae durante o processo de envelhecimento .

Orientador(a):                Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant Anna.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**                     **Reprovado(a)**

Examinador(a):                Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

À Nely: minha orientadora, professora,  
auxiliadora, cantora e encantadora...

Minha MÃE!

A única que realmente soube me  
ensinar o verdadeiro sentido da palavra

AMOR!

## AGRADECIMENTOS

### A todos...

Ao Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna, pela orientação durante esse trabalho; a ele, quem me ensinou a “namorar os resultados” e a entender que nem toda desordem é desorganizada. A ele, que me estimulou a ler e pensar de maneira tão diferente. Você deixou meu caos mais organizado!

Aos mais que amigos: Caio “Kadu” Stanciar, André Gomes Lins, Carlos Rodrigues Neto, Brunno Silva, Bruno Arantes, Fernando Alves... A vocês que, perto ou longe, fizeram a minha vida mais completa e feliz! Obrigado pelos conselhos, broncas nas horas certas e pelo carinho sincero! A importância de vocês é imensurável, e cada um de vocês se encaixa de uma maneira ímpar em minha vida. Dizem que amigos mudam a todo o momento, mas eu faço questão de carregá-los em meu coração para sempre!

À Denise Vilarinho Tambourgi, que me mostrou, quando cheguei ao Laboratório de Imunoquímica, o quanto é importante ser incisivo e direto em meus objetivos.

Ao grupo: Karina Scaramuzzi, Eliana Blini Marengo e Luciana Vieira Carvalho. O que seria de mim sem essas *meninas*? Sem a convivência, a sinceridade, o apoio, o carinho e as brincadeiras? Sem os preciosos ensinamentos e até os puxões de orelha? Sou muito do que sou hoje graças a vocês!

Ao ilustríssimo Prof. Wilmar Dias da Silva, pelas boas conversas e discussões sobre todos os assuntos, sejam eles relacionados ao trabalho ou às experiências de vida.

Aos funcionários do Laboratório de Imunoquímica: Silvia, Maura, Cassiano, Ramos, Ana Cláudia, Ana Freire, Márcia, Elaine, Lia, Carolina, João. Tão fundamentais no funcionamento de tudo, inclusive do bom humor e do bom convívio!

Aos colegas: Mônica, Carla, Fábio, Jorge, Giselle, Cinthya, Daniela, Priscila “Muguerça” Hess, Priscila Lara, Isadora, Alessandra “Pódicarda”, Gabriela, Fernanda

Portaro, Míriam e Daniel Manzoni. Obrigado pela boa companhia e pelo auxílio sempre que preciso!

À família: minha mãe Nely, meu irmão Gustavo (juntamente com minha cunhada Ana Flávia e a minha linda sobrinha Luiza!), vó Lídia e vô Ataliba, vó Benedita e vô Sebastião, fundamentais em etapas anteriores e, portanto, não serão esquecidos nas seguintes e em nunca em minha vida! Aproximações e separações em nossas vidas são comuns, mas a distância nunca será grande o suficiente para me fazer esquecer vocês!

Ao Departamento de Imunologia do ICB-USP. Aos amigos e professores que me auxiliaram e ensinaram a começar a pensar como cientista.

À minha segunda família: Liliana, José, Natalie, D. Amélia, Juliana e Alex, Clarice e Ismael. O carinho, os conselhos sempre bem-vindos e bem colocados, a privacidade, a paciência, o cuidado e o amor que vocês me ofereceram nesse início de vida em outra cidade foram fundamentais para que tudo corresse da melhor maneira possível!

A um amigo em especial: Ademar G. Júnior... Deixou mais que saudades... Deixou boas marcas dentro de um coração que nunca vai esquecê-lo. Obrigado pelas conversas e pela companhia durante os *games* que muitas vezes jogávamos juntos ou apenas nos auxiliávamos para tornar as infindáveis horas de um RPG mais agradáveis do que nunca! Sua simplicidade, compreensão, bondade e seu carinho são lições que nunca me esquecerei. Sei que agora você é Kratos, o deus da guerra!

À Alessandra Veloso Melo. Faltam-me palavras para expressar o quanto fora especial em minha vida e continuará sendo! Minha leonina maluca preferida! Obrigado por ser minha amiga, advogada, companheira, confidente e conselheira! Obrigado pelos passeios, pelas viagens, pelos cafés e bolos! Obrigado por fazer parte daqueles que tornam a minha existência mais real! Amo-te, amiga!

**Todos igualmente importantes!**



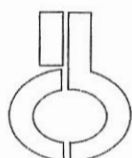
"A perfeição não existe nesse mundo. A maioria das pessoas admira e procura a perfeição. Mas, do que adianta alcançar a perfeição? Nada. Se algo é perfeito, então não resta nada... Não há espaço para imaginação! Não há espaço para se ganhar mais conhecimento ou habilidades. Para cientistas, como nós, perfeição só traz desespero. Nosso trabalho é criar coisas mais maravilhosas que qualquer outra, mas nunca obter a perfeição. Um cientista deve ser a pessoa que encontra êxtase enquanto sofre desse paradoxo."

***Kurotsuchi Mayuri***

(Bleach: mangá de *Tite Kubo* - 久保 帯人)

"A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado. A imaginação envolve o mundo."

***Albert Einstein***



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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **130** nas fls. **63** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Perfis de ação da Hsp65r de Mycobacterium leprae e seu mutante K 409 A durante o processo de envelhecimento de linhagens de camundongos**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Estevam José Baldon** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **15.12.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de dezembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador  
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI  
Secretária  
CEEA – ICB/USP



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505


## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Perfis de ação da Hsp65r de *Mycobacterium leprae* e seu mutante K<sup>409</sup>A durante o processo de envelhecimento de linhagens de camundongos," protocolo nº 475/08, sob a responsabilidade de Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna e Estevam José Baldon, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **09/04/2008**.

"We certify that the Research entitled "Profiles of action of Hsp65r Wild Type and K<sup>409</sup>A mutant of *M.leprae* in aging process of different mice lines", protocol nº 475/08, under the responsibility of Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna and Estevam José Baldon, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 04/09/2008".

Vigência do Projeto: 05/2008 – 05/2010	Nº de animais/espécie/linhagem
	120 / camundongo / Balb C (Origem: Biotério Central - I.Butantan); L <sub>III</sub> e H <sub>III</sub> (Origem: Biotério Lab. Imunogenética - I.Butantan)

São Paulo, 14 de abril de 2008.

  
PI Dra. Denise V. Tambourgi  
Presidente da CEUAIB

De acordo:

  
Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan

## RESUMO

BALDON, E. J. **Ações das Hsp65r nativa e sua mutante K<sup>409</sup>A de *Mycobacterium leprae* durante o processo de envelhecimento.** 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As Hsp60 acham-se conservadas nos organismos ao longo da escala evolutiva, apresentando como funções a capacidade de enovelamento, estruturação e translocação de proteínas através das membranas celulares, além de apresentarem papel essencial no crescimento e diferenciação celular e participarem em processos crônico-degenerativos. Neste estudo foi avaliada a ação das Hsp65r nativa (WT) e sua mutante K<sup>409</sup>A de *M. leprae* no processo de envelhecimento e resposta imune de camundongos. Análises do Tempo Médio de Sobrevida (TMS), titulação dos isótipos IgG1 e IgG2a, ensaios de avidéz de IgG anti-Hsp65 e análises histopatológicas foram realizadas em camundongos geneticamente selecionadas para alta e baixa produção de anticorpos, linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> respectivamente, inoculados intraperitonealmente aos 120 ou 270 dias de vida com 2,5 µg/mL (em 200 µL de PBS) das Hsp65r. Verificou-se diminuição no TMS de fêmeas envelhecidas H<sub>III</sub> inoculadas com a proteína WT ( $p \leq 0,01$ ) em relação ao grupo controle e mutante. Fêmeas H<sub>III</sub> adultas tratadas com a molécula WT apresentaram redução do TMS ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo K<sup>409</sup>A, sendo que o intervalo entre o tratamento e a primeira morte foi maior (247 dias) em relação às envelhecidas (18 dias). Diferentemente, a inoculação da Hsp65r WT em fêmeas em processo de envelhecimento da linhagem L<sub>III</sub> resultou no aumento ( $p \leq 0,01$ ) do TMS em relação ao grupo controle e K<sup>409</sup>A; machos envelhecidos das linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> não apresentaram diferença no TMS. A dosagem dos anticorpos não revelou alterações marcantes na produção de IgG1 e IgG2a nos grupos estudados, porém a avidéz de IgG foi menor ( $p \leq 0,05$ ) nas fêmeas H<sub>III</sub> envelhecidas inoculadas com a proteína nativa em relação ao grupo controle e K<sup>409</sup>A. A análise histopatológica mostrou a presença de influxo inflamatório principalmente nos rins de fêmeas H<sub>III</sub> envelhecidas inoculadas com a proteína nativa. Os resultados indicam a interferência da Hsp65r WT na imunidade durante o processo de senescência de fêmeas envelhecidas constitutivamente boas produtoras de anticorpos. Esses resultados são discutidos e relacionados com os obtidos anteriormente sobre o efeito da Hsp65 em processos autoimunes.

**Palavras-chave:** Hsp65r nativa e mutante K<sup>409</sup>A. Processo de Envelhecimento. Produção de Anticorpos. Mimetismo Molecular.

## ABSTRACT

BALDON, E. J. **The influence of *Mycobacterium leprae* rHsp65 wild type and its mutant K<sup>409</sup>A during the ageing process.** 2010. 78 p. Master Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The Hsp60 are conserved in all organisms along the evolutionary scale, involved in protein folding, refolding and translocation across cell membranes, besides having a main role in cell growth and differentiation and been associated in chronic-degenerative processes. In the present study was evaluated the actions of *M. leprae* native rHsp65 (WT) and its mutant K<sup>409</sup>A in the aging process and immunoresponse of mice. Analyses of mean survival time (MST), titration of IgG1 and IgG2a isotypes, avidity tests of anti-Hsp65 IgG antibodies and histopathological analyses were performed in mice genetically selected for High and Low antibody production, H<sub>III</sub> and L<sub>III</sub>, respectively, inoculated intraperitoneally at 120 or 270 days of life with 2.5 µg/mL (200 µL of PBS) of Hsp65r. There was a decrease in MST in aged H<sub>III</sub> females inoculated with the WT protein ( $p \leq 0.01$ ) compared to control and mutant. Adult H<sub>III</sub> females treated with the WT molecule showed a reduction of MST ( $p \leq 0.05$ ) compared to group K<sup>409</sup>A, and the interval between the treatment and first death was higher in these (247 days) in relation to aging mice (18 days). In contrast, WT rHsp65 inoculation in aged L<sub>III</sub> females resulted in increased ( $p \leq 0.01$ ) of MST compared with control and K<sup>409</sup>A groups; aged males mice from H<sub>III</sub> and L<sub>III</sub> lines showed no difference in survivor. The antibodies titration showed no marked changes in the production of IgG1 and IgG2a isotypes in all groups, but the IgG avidity was lower ( $p \leq 0.05$ ) in old H<sub>III</sub> female treated with native protein when compared with control and K<sup>409</sup>A groups. Histopathological analyses showed the presence of inflammatory influx in the kidneys of aged H<sub>III</sub> females mice inoculated with WT. The presented results revealed the interference of WT rHsp65 in immunity during the senescence of aged females from H<sub>III</sub> line and are discussed and related to those obtained previously on the effect of rHsp65 in autoimmune processes.

**Keywords:** Wild type rHsp65 and its mutant K<sup>409</sup>A. Ageing process. Antibody production. Molecular mimicry.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC – células apresentadoras de antígenos
- ATP – adenosina trifosfato
- BCR – receptor de célula B
- BSA – soro albumina bovina
- D.O. – densidade óptica
- DC – Células dendríticas
- DMBA – 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene
- DP – desvio padrão
- dsDNA – DNA de dupla fita
- EDTA – ácido etileno-diamino-tetraacético
- ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
- F<sub>0</sub> – população inicial
- Fab – porção variável da molécula de anticorpo
- GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
- H/E – hematoxilina/eosina
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio
- HSF – “Heat Shock Factors” (fatores de choque térmico)
- Hsp – “Heat shock protein” (proteína de choque térmico)
- Hsp65r WT – Hsp65 recombinante nativa
- Hsp65r WT K<sup>409</sup>A – Hsp65 recombinante mutante
- ICAM-1 – molécula de adesão intracelular-1
- IL – Interleucina
- INF- $\gamma$  – interferon-  $\gamma$
- iNOS – sintase óxido nítrico induzível
- IPTG – “Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside”
- KCl – cloreto de potássio
- KSCN – tiocianato de potássio
- LAL – “Limulus Amoebocyte Lysate”
- MCP-1 – proteína cofator de membrana tipo 1
- MHC-I – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I
- MHC-II – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II

MHV3 – Vírus-3 de Hepatite Murina

MIP-2 – proteína-2 inflamatória do macrófago

NO – óxido nítrico

OPD – o-phenylenedi-amine

PBS – solução tampão de fosfato

PBS-T – solução tampão de fosfato contendo 0,05% de Tween

RANTES – quimiocinas reguladas pela ativação, expressas e secretadas pelos linfócitos T

RE – reticulo endoplasmático

SDS-PAGE – “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis” (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio)

TCR – Receptores de células T

TLR – Receptores do tipo *Toll*

TMS – tempo médio de sobrevivência

TNF- $\alpha$  – Fator- $\alpha$  de necrose tumoral

TPA – 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate

Tris – hidroximetil aminometano

V – variância

V<sub>A</sub> – variância ambiental

VCAM-1 – molécula de adesão celular vascular-1

V<sub>F</sub> – variância fenotípica

V<sub>G</sub> – variância genética

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

kDa – kilodalton

$\lambda$  – comprimento de onda

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{L}$  – microlitro

$\mu\text{M}$  – micromolar

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

nm – nanômetro



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1 O sistema imune e o processo de envelhecimento</b> .....	17
<b>1.2 Proteínas de Choque Térmico</b> .....	19
<b>1.3 Relação entre as Hsp e processos patológicos no envelhecimento</b> .....	24
<b>1.4 As Linhagens High e Low de camundongos</b> .....	26
<b>2 OBJETIVO</b> .....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
<b>3.1 Obtenção e purificação das Hsp65 de <i>M. leprae</i> recombinantes nativa e mutante K<sup>409</sup>A</b> .....	30
<b>3.2 Ação das Hsp65r WT e sua mutante K<sup>409</sup>A na sobrevida de camundongos das Linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub></b> .....	30
<b>3.3 Titulação de anticorpos anti-DNA</b> .....	31
<b>3.4 Titulação de anticorpos anti-Hsp65 WT</b> .....	32
<b>3.5 Ensaio de avides</b> .....	32
<b>3.6 Análise histopatológica</b> .....	33
<b>3.7 Análises estatísticas</b> .....	33
<b>4 RESULTADOS</b> .....	35
<b>4.1 Expressão, obtenção e purificação das Hsp65r WT e K<sup>409</sup>A</b> .....	35
<b>4.2 Avaliação do efeito da administração das Hsp65r sobre o Tempo Médio de Sobrevida</b> .....	35
<b>4.3 Análise da produção de anticorpos anti-DNA</b> .....	38
<b>4.4 Análise da produção de anticorpos anti-Hsp65 WT</b> .....	40
<b>4.5 Avides dos anticorpos IgG anti-Hsp65 WT</b> .....	43
<b>4.6 Análise histopatológica</b> .....	46
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>ANEXOS</b> .....	72
<b>ANEXO A – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida H<sub>III</sub> inoculada com a proteína nativa</b> .....	73

<b>ANEXO B – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida L<sub>III</sub> inoculada com a proteína nativa .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO C – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida H<sub>III</sub> pertencente ao grupo controle.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO D – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida L<sub>III</sub> pertencente ao grupo controle.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO E – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida H<sub>III</sub> inoculada com a proteína mutante.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO F – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida L<sub>III</sub> inoculada com a proteína mutante.....</b>	<b>78</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O sistema imune e o processo de envelhecimento

Progressos médicos, melhorias nas políticas de saúde pública e certo desenvolvimento socioeconômico possibilitaram uma redução da taxa de mortalidade, com consequente aumento da expectativa de vida da população global (DORSHKIND; MONTECINO-RODRIGUEZ; SIGNER, 2009). O processo de envelhecimento, caracterizado por um declínio na habilidade do organismo em manter sua homeostase ou se adaptar ao ambiente, é influenciado por condições nutricionais e mudanças que ocorrem ao longo da vida (HASLER e ZOUALI, 2005) como alterações genéticas adaptativas que, transmitidas através de gerações, promovem variações na longevidade dos indivíduos e influenciam a sobrevivência de uma espécie (JAENISCH e BIRD, 2003; LITHGOW, 2006; TOWER, 2009).

Um dos principais aspectos do envelhecimento é a senescência do sistema imunológico, resultado de um processo de remodelamento contínuo e cujas funções imunológicas podem apresentar-se intactas, reduzidas ou mesmo aumentadas (FRANCESCHI et al., 1995). Um declínio na função imune pode resultar na incapacidade de discriminar antígenos próprios e não próprios (PRELOG, 2006), com consequências importantes como a susceptibilidade a infecções bacterianas e virais (JANSSENS e KRAUSE, 2004; LYNCH e WALSH, 2007), diminuição da resposta a vacinas (BOUREE, 2003), desenvolvimento de tumores (ZHANG e GRIZZLE, 2003) e de autoimunidades e outras doenças inflamatórias (JOHNSON e CAMBIER, 2004; YUNG e JULIUS, 2008).

Dados na literatura científica mostram controvérsias acerca das alterações quantitativas e qualitativas de cada componente do sistema imune nos diferentes organismos. Na imunidade inata, o número de macrófagos e granulócitos encontram-se inalterados em indivíduos envelhecidos (KRAUSE et al., 1999; MIYAJI et al., 2000; RYBKA et al., 2003); neutrófilos não apresentaram mudanças na quimiotaxia e adesão, mas redução na capacidade fagocítica de antígenos opsonizados (BUTCHER; CHAHAL; LORD, 2000; WENISCH et al., 2000). A função dos macrófagos também se encontra alterada, com diminuição nos níveis de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (MHC-II) (PLOWDEN et al., 2004), redução da secreção de citocinas e quimiocinas (PAWELEC et al., 1998), além da redução da produção de anions superóxido (PLACKETT et al., 2004) que,

associada à deficiência na expressão e função de receptores do tipo *Toll* (TLR), dificultam a fagocitose e a morte intracelular de bactérias gerando aumento na susceptibilidade a infecções (RENSHAW et al., 2002). Nas células dendríticas (DC), aptas a capturar e apresentar antígenos e secretar citocinas ligando a imunidade inata à adquirida, não há indicação concreta de alterações quanto à diferenciação e maturação em indivíduos envelhecidos (STEGER; MACZEK; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 1996); entretanto, estudos mostram diminuição na sua capacidade fagocítica (AGRAWAL; AGRAWAL; GUPTA, 2007), afetando a resposta de linfócitos T no envelhecimento. As células NK, importantes na imunidade contra infecções virais, apresentam diminuição em sua capacidade citotóxica (MIYAJI et al., 2000).

Observou-se, tanto em modelos experimentais quanto em humanos, que as respostas mediadas por células e humorais apresentam-se reduzidas na imunidade adquirida (PAWELEC e SOLANA, 1997). Há queda no número de linfócitos T *naives*, particularmente os CD8<sup>+</sup>, embora CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> estejam prejudicados em camundongos, com redução da diversidade de repertório dos receptores de células T (TCR) (GORONZY; LEE; WEYAND, 2007; HAKIM e GRESS, 2007). Ainda, observa-se a expansão compensatória de células de memória, as quais apresentam menor diversidade, funcionalidade e capacidade citotóxica, dificultando a resposta a infecções reincidentes (ASPINALL e ANDREW, 2000; BLACKBURN et al., 2009). A involução do timo, caracterizada pela diminuição do tamanho do órgão e a troca da medula e córtex funcionais por tecido gorduroso, é a principal causa da diminuição dessas células (ASPINALL e ANDREW, 2000). Estudos em modelos murinos demonstram que a atrofia tímica relaciona-se, parcialmente, à falha das células T tímicas em se diferenciarem e expressarem TCR, diminuindo a produção de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (ASPINALL, 1997). Além disso, em idosos há diminuição na produção de Interleucina-2 (IL-2) e da expressão do seu receptor e redução da expressão da molécula coestimuladora CD28 em linfócitos T, contribuindo para o decréscimo dessa população celular (CHAMBERLAIN; FALTA; KOTZIN, 2000; WEYAND et al., 1998).

Alterações no número de linfócitos B *naives* e antígeno-específicos, na produção de imunoglobulinas, no repertório de anticorpos em termos de especificidade, isótipos e afinidade são observadas no processo de envelhecimento (WEKSLER, 2000). Acredita-se que a diminuição do número e função de células T CD4<sup>+</sup> (MILLER, 1996), a redução da hipermutação somática em centros germinativos (ZHENG et al., 1997), bem como defeitos nas alterações de classes de imunoglobulinas (FRASCA et al., 2004) levam à incapacidade de

indivíduos envelhecidos produzirem anticorpos de maior afinidade. Embora animais envelhecidos apresentem, na periferia, um número de linfócitos B semelhante aos jovens, há ampliação do número de linfócitos B de memória, substituindo a população de B *naives*, causando resposta menos efetiva com anticorpos de baixa afinidade (STACY et al., 2002; WEISKOPF; WEINBERGER; GRUBECK-LOEBENSTEIN, 2009). Ocorre, ainda, aumento da resposta policlonal contra diversos mitógenos, porém com diminuição da resposta antígeno-específica, e aumento da frequência de autoanticorpos (GINALDI et al., 1999; KISHIMOTO et al., 1978; PAHWA; PAHWA; GOOD, 1981). Mudanças no padrão de produção de citocinas do perfil Th1 para Th2 foram observadas em indivíduos envelhecidos, levando à ativação de autoanticorpos (STACY et al., 2002). O aumento na concentração plasmática de IL-6, IL-1 $\beta$  e Fator- $\alpha$  de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) também foram descritos em populações envelhecidas (BRUUNSGAARD et al., 2003; ERSHLER e KELLER, 2000; O'MAHONY et al., 1998). Por outro lado, a administração de IL-12 reverteu o padrão Th1/Th2 em camundongos envelhecidos que desenvolvem Lupus Eritematoso Sistêmico (SEGAL et al., 2003).

Quanto à tolerância a antígenos próprios, os processos alterados pelo envelhecimento tende a desequilibrar os mecanismos da imunidade inata e adquirida, podendo resultar em processos crônico-degenerativos como inflamação, formação de tumores e autoimunidades, aumento na susceptibilidade a infecções, e consequente perda da qualidade de vida (COSSARIZZA et al., 1997; FRANCESCHI et al., 2000; HASLER e ZOUALI, 2005; LICASTRO et al., 2005).

## 1.2 Proteínas de Choque Térmico

Organismos são frequentemente expostos a fatores ambientais estressantes como temperatura, toxinas, carência nutricional, influências hormonais, infecções e variações metabólicas, dependendo da capacidade em suportar tais mudanças para sobreviverem. A resposta a esses fatores é caracterizada por alterações fisiológicas drásticas, incluindo a produção de proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins* - Hsp) (POCKLEY, 2003; SRIVASTAVA, 2002; WELCH, 1993), moléculas descobertas quando Ferruccio notou expressão diferencial de genes nas glândulas salivares de larvas de *Drosophila melanogaster* expostas ao aumento de temperatura (RITOSSA, 1962). Porém, o termo *heat shock protein* foi proposto, quando da observação no aumento do nível dessas proteínas com o acréscimo

em 5 °C da temperatura corpórea desse inseto (TISSIERES; MITCHELL; TRACY, 1974). Seus genes codificadores estão presentes em todas as células de organismos procariontes e eucariontes (incluindo as plantas) (POCKLEY, 2003; ZUGEL e KAUFMANN, 1999) e essas proteínas são encontradas em diferentes compartimentos intracelulares como citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndrias e cloroplastos (HIGHTOWER, 1991).

As Hsp são essenciais à viabilidade celular em situações normais de crescimento, participando de processos como duplicação do DNA, degradação de proteínas, enovelamento e desenovelamento de peptídeos, estruturação e desestruturação de complexos oligoméricos e translocação proteica através de membranas (BUKAU e HORWICH, 1998; GEORGOPOULOS, 1992). Em condições fisiológicas, constituem cerca de 5% da quantidade total de proteínas intracelulares; entretanto, seus níveis encontram-se até quintuplicados mediante a exposição a estresses que levam à denaturação, agregação ou fluxo de proteínas recém-sintetizadas não nativas, retornando a níveis normais após o impacto de fatores exógenos (POCKLEY, 2003; ZUGEL e KAUFMANN, 1999). A produção dessas moléculas deve ser extremamente controlada, pois sua persistência pode levar a mudanças na homeostase e em funções intracelulares, além de promover morte celular (POCKLEY, 2003). A regulação da expressão de Hsp é feita pela interação entre Fatores de Choque Térmico (*Heat Shock Factors*, HSF) e fatores ambientais estressantes sobre a região do gene que promove a produção de Hsp (VOELLMY, 1994). Em vertebrados, quatro HSF foram identificados, sendo que somente HSF1, envolvidos em respostas fisiológicas e ambientais (SARGE; MURPHY; MORIMOTO, 1993; ZUO et al., 1994), e HSF2, induzido durante a diferenciação e desenvolvimento precoce (PIRKKALA; NYKANEN; SISTONEN, 2001), são amplamente expressados e conservados (NAKAI e MORIMOTO, 1993; SARGE et al., 1991). O aumento da expressão de Hsp e a resistência a estresses foram descritos em monócitos, linfócitos B (CLAYTON et al., 2005), células tumorais (DAVIES et al., 2006) e alguns órgãos (SNOECKX et al., 2001).

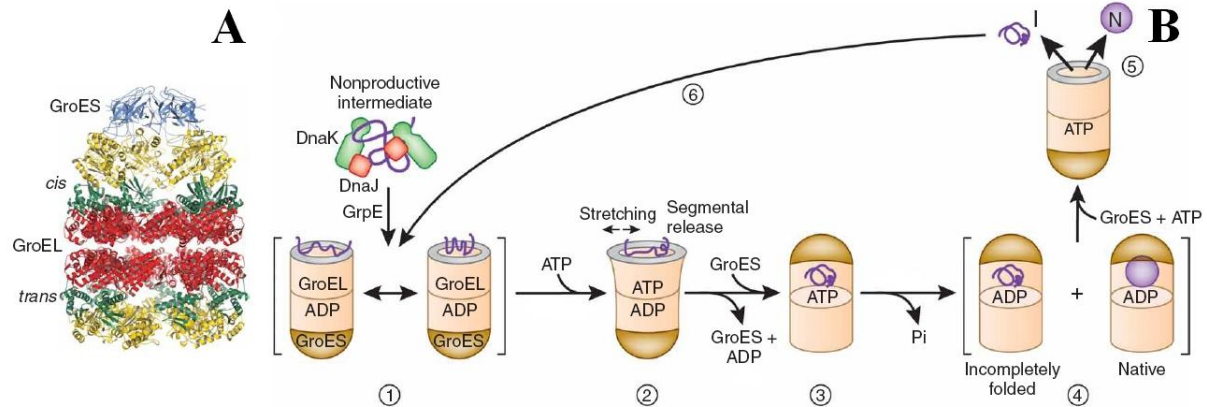
As Hsp são classificadas em famílias nomeadas de acordo com sua massa molecular aproximada e seus graus de homologia. Todas as famílias estão presentes em cada organismo, no entanto, nalgumas ocorrem variações na distribuição intraespécie e interespécies, (POCKLEY, 2003; SRIVASTAVA, 2002). Em mamíferos (TABELA 1), quatro famílias de Hsp são reconhecidas: HSP90, HSP70, HSP60 e HSP de baixo peso molecular (sHSP) (GARRIDO et al., 2001).

**Tabela 1** – Nomenclatura, localização e função chaperona de Hsp em mamíferos (GARRIDO et al., 2001).

Família	Chaperona	Localização	Principal Função
sHSP	Hsp27 $\alpha$ A-crystallin $\alpha$ B-crystallin	Citosol	Estabilização contra agregação celular.
HSP60	Hsp60 (chaperonina)	Mitocôndria	Estruturação e prevenção de agregação de proteínas denaturadas.
HSP70	Hsp70	Citosol / núcleo	Estruturação de polipeptídios nascentes, transporte inter-organelar, reestruturação de proteínas denaturadas.
	Hsc70	Citosol / núcleo	
	mHsp70	Mitocôndria	
HSP90	GRP78	RE	Maturação conformacional de receptores de hormônios esteroides e de quinases tradutoras de sinais.
	Hsp90 $\alpha$	Citosol	
	Hsp90 $\beta$ GRP94	Citosol RE	

RE= retículo endoplasmático

Atuam como chaperonas intracelulares ou proteases, características relacionadas à proteção celular e manutenção da homeostase (HARTL e HAYER-HARTL, 2002; HIGHTOWER, 1991; TISSIERES; MITCHELL; TRACY, 1974). O termo chaperonina foi utilizado na descrição de uma família de proteínas de cerca de 60 kDa altamente homólogas, que agiam como chaperonas moleculares encontradas em cloroplastos (Rubisco), mitocôndrias (Hsp60) e em eubactérias como *Escherichia coli* (GroEL) (HARTL e HAYER-HARTL, 2009; HEMMINGSEN et al., 1988). Processos como síntese de proteínas em compartimentos intracelulares requerem que essas moléculas tenham sua conformação desestruturada ou parcialmente estruturada, possibilitando então a exposição de suas regiões internas e a interação com outras proteínas (agregação proteica); as Hsp citosólicas ligam-se a essas regiões interativas, facilitando a estruturação dos polipeptídios denaturados ou recém-sintetizados, agindo como chaperoninas (BUKAU e HORWICH, 1998). A família das Hsp de 60 kDa, inclui moléculas abundantes e evolutivamente conservadas em todos os organismos, apresentando como funções fisiológicas, na dependência de ATP, a capacidade de enovelamento e estruturação proteica, regulação do tráfego intracelular e a translocação das proteínas através das membranas celulares (TOWER, 2009). A Hsp65 de *M. leprae* tem massa molecular de aproximadamente 57 kDa, o que a inclui na família da GroEL (FIGURA 1) ou das Hsp60 denominadas chaperoninas (ELLIS e VAN DER VIES, 1991), sendo considerada a principal proteína imunorreativa em micobactérias (THOLE et al., 1988).



**FIGURA 1** – A chaperonina GroEL-GroES. (a) Estrutura cristalina do complexo GroEL-GroES evidenciando a porção de ligação com a GroES (cis) e o anel oposto (trans). (b) Esquema da maquinaria resumindo as mudanças conformacionais de substratos proteicos durante o processo a estruturação. (1) O substrato proteico é encaminhado pelo complexo DnaK-DnaJ até a GroEL; após ligação, o substrato sofre desdobraimento local. (2) O movimento do domínio ATP-dependente da porção apical da GroEL resulta em alongamento de regiões fortemente ligadas do substrato e na liberação e compactação parcial das regiões menos estáveis. (3) A compactação é completada após a encapsulação da sequência peptídica pela GroES. (4) Estruturação da proteína no interior da chaperonina. (5) Liberação do substrato após dissociação da GroES. (6) Nova ligação caso não tenha ocorrido uma estruturação completa da proteína. N= estado nativo; I= estruturação intermediária; ADP= adenosina difosfato; ATP= adenosina trifosfato.

**FONTE:** Hartl e Hayer-Hartl (2009).

Processos como o enovelamento, oligomerização, transporte e degradação de proteínas requerem que as proteínas tenham, temporariamente, uma conformação parcialmente estruturada ou denaturada. Como consequência, algumas regiões dessas proteínas ficam expostas, podendo interagir com outras proteínas. Esse fenômeno é denominado de agregação proteica, prejudicial para a vida celular. As chaperonas moleculares protegem essas superfícies interativas, ligando-se a elas por meio de ligações não-covalentes e ATP-dependentes, facilitando a estruturação dos polipeptídeos denaturados ou recém-sintetizados (SLAVOTINEK e BIESECKER, 2001).

Após quase 20 anos da identificação e caracterização (GEORGOPOULOS, 1992), estudo mostrou que a Hsp65r de *M. leprae* possui atividade enzimática e que a substituição do resíduo de Lys<sup>409</sup> por Ala causa perda completa da sua atividade proteolítica (PORTARO et al., 2002). Assim, somente a Hsp65 de *M. leprae* teve sua atividade proteolítica observada. Estudos verificaram também uma possível atividade autolítica, sugerindo que esse processo possa gerar peptídeo(s)- epítipo(s) de forma independente do proteasoma (MARENCO, 2003; MARQUES et al., 1998; PARADA, 2007). A função chaperona das Hsp permite realizar a entrega de peptídeos, concomitantemente com a produção de estímulos pró-



inflamatórios, em células apresentadoras de antígenos (APC), com subsequente ativação de linfócitos T peptídeos-específicos (ANDERSON e SRIVASTAVA, 2000). Sendo assim, as Hsp são consideradas adjuvantes naturais, ativando APCs que internalizam e as apresentam para outras células do sistema imune via moléculas do MHC de classe I ou II. As Hsp65 de micobactérias foram descritas como adjuvantes em doenças como Artrite Reumatoide (COBELENS et al., 2000), Aterosclerose (WICK; PERSCHINKA; MILLONIG, 2001) e Tuberculose (BONATO et al., 1998), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF); quimiocinas como proteína cofator de membrana tipo 1 (MCP-1), proteína-2 inflamatória do macrófago (MIP-2) e RANTES (quimiocinas reguladas pela ativação, expressas e secretadas pelos linfócitos T); indução da isoforma induzível de Óxido Nítrico Sintase (iNOS) e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos e DC (LEHNER et al., 2000; MORE; BRELOER; VON BONIN, 2001). Quando presentes no meio extracelular relacionam-se à ativação e regulação de células, transdução de sinais, regulação do ciclo celular e apoptose. Sabe-se que as Hsp60 são reconhecidas por TCR, Receptor de Células B (BCR) e TLR, evidenciando a ampla ação dessas proteínas sobre células potencialmente imunocompetentes (VAN EDEN et al., 2007).

A descoberta de que Hsp induzem a produção de citocinas e a expressão de moléculas de adesão levou à pesquisa de seus possíveis receptores celulares (GALDIERO; DE L'ERO; MARCATILI, 1997; KOL et al., 1999; KOL et al., 2000). A identificação de ligantes para os diferentes membros da família das HSP60 em macrófagos sugere distintos papéis imunorreguladores entre essas moléculas. As Hsp60 e Hsp70 são ligantes endógenos de TLR-2 e TLR-4, importantes mediadores da resposta imune inata presentes em diversos tipos celulares, e o antígeno CD14 foi identificado como receptor de Hsp em monócitos humanos (KOL et al., 2000; VABULAS et al., 2002). Além disso, linfócitos T reguladores parecem ser ativados por essas proteínas (CARAMALHO et al., 2003). Recentemente foi demonstrada a variabilidade intraespécie e interespécie da ação fisiológica da Hsp quanto à proliferação celular, reatividade de células T e produção de citocinas, sendo que tais diferenças relacionadas ao perfil genético H-2 das linhagens de camundongos BALB/c (H-2<sup>d</sup>), C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), e C3H/HePas (H-2<sup>k</sup>) (LUNA et al., 2007).

Normalmente as Hsp são liberadas somente por células necróticas e sua presença extracelular pode induzir respostas pró-inflamatórias; sabe-se que Hsp60 humana induz a expressão de moléculas de adesão como E-selectina, molécula de adesão intracelular-1

(ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) nas células endoteliais, células de músculo liso e macrófagos (KOL et al., 1999; KOL et al., 2000). Contudo, alguns trabalhos mostram que essas moléculas possam ser liberadas passivamente (BASSAN et al., 1998; HIGHTOWER e GUIDON, 1989; LIAO et al., 2000; POCKLEY, 2003). Níveis de Hsp60 e Hsp70 e anticorpos anti-Hsp60 e anti-Hsp70 humanos e anti-Hsp65 de micobactéria foram detectados em indivíduos saudáveis entre 20 e 96 anos de idade, porém sem correlação significativa entre o nível de anticorpos anti-Hsp60 com o sexo e o aumento de idade (REA; MCNERLAN; POCKLEY, 2001). Por outro lado, verificou-se semelhança entre o aumento de anticorpos anti-Hsp65 e o aumento da idade, sugerindo-se que estes representem marcadores potenciais de idade (MANTLE; SINGH; HACHINSKI, 1995).

### **1.3 Relação entre as Hsp e processos patológicos no envelhecimento**

Dentre os processos patológicos na imunosenescência destacam-se o aparecimento de câncer e a maior susceptibilidade a infecções (TRZONKOWSKI et al., 2009), além de doenças envolvendo o processamento anormal, modificação e agregação de proteínas, nas quais as Hsp estão tipicamente associadas (MORIMOTO, 2008; TOWER, 2009). Na literatura científica são amplamente discutidas as duas relações entre as Hsp (próprias e bacterianas) e seus envolvimento em patologias. Membros da família das HSP60 são considerados *IMUNODOMINANTES* em vários processos infecciosos (KAUFMANN, 1990) e participam do contexto pró-inflamatório de Artrite, Diabetes tipo I, Esclerose Múltipla e Aterosclerose (AFEK et al., 2000; BONATO et al., 1998; GEORGOPOULOS e MCFARLAND, 1993; WICK; PERSCHINKA; MILLONIG, 2001); a ligação a TLR-2 e TLR-4 sugere que essas proteínas atuem como um sinal endógeno de perigo, com consequente liberação de citocinas inflamatórias e aumento da resposta imune tipo Th1 (HIGHTOWER, 1991; KOL et al., 2000). Sendo a proteína mais abundante na parede microbiana, Hsp65 é considerada como toxina e antígeno dominante em várias doenças infecciosas, capazes de induzir resposta imune humoral e celular (KONG et al., 1993; QAMRA e MANDE, 2004; QAMRA; SRINIVAS; MANDE, 2004). Por outro lado, estudos evidenciam a função *IMUNORREGULADORA* das Hsp60/65 sobre células T, na supressão da resposta imune em doenças como Artrite Reumatoide (DE KLEER et al., 2003; VAN EDEN et al., 2005); pacientes em processos crônicos de Artrite apresentaram reatividade de células com fenótipo de linfócitos T reguladores para as Hsp associada ao abrandamento e remissão

da doença (VAN EDEN et al., 2007). Estudos realizados em pacientes que apresentam Artrite Reumatoide mostraram os diferentes papéis dessas proteínas na ativação de linfócitos T: a estimulação com a proteína humana (Hsp60) leva a produção de citocinas reguladoras do tipo Th2, enquanto que a estimulação com Hsp60 bacteriana induziu a produção de interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), consistente com uma resposta pró-inflamatória do tipo Th1 (VAN ROON et al., 1997).

Várias hipóteses tentam explicar o envelhecimento e sua relação com patologias de origem genéticas, infecciosas, parasitárias ou autoimunes, relatando grande quantidade de efeitos biológicos atribuídos à senescência observados em órgãos específicos ou sistemicamente (CARNES; STAATS; SONNTAG, 2008). Apesar da maior incidência de doenças autoimunes, os idosos muitas vezes não apresentam resposta imunológica efetiva a estímulos antigênicos (PRELOG, 2006). Duas hipóteses, não necessariamente exclusivas, tentam explicar a relação entre a incidência de autoimunidades e processos infecciosos. A teoria *ANTIÍGENO NÃO ESPECÍFICO* propõe que o sistema imunológico seja ativado tanto pela liberação normal de proteínas endógenas em consequência à morte celular induzida por micro-organismos, quanto por APC ativadas por estímulos microbianos e que apresentam mais efetivamente antígenos próprios (WUCHERPFENNIG, 2001). A teoria *ANTIÍGENO ESPECÍFICO* é exemplificada pelo conceito do mimetismo molecular, no qual antígenos microbianos e próprios compartilham similaridades estruturais, facilitando a quebra da autotolerância (BENOIST e MATHIS, 2001); a presença de anticorpos e linfócitos T que reagem com Hsp60 ou Hsp65 reforça essa hipótese (DUDANI e GUPTA, 1989; FEIGE e VAN EDEN, 1996).

Indivíduos envelhecidos podem apresentar produção de autoanticorpos dependente do contato prolongado com antígenos exógenos (PANDEY et al., 1979; RAMOS-CASALS et al., 2003) e os anticorpos antinucleares e anti-DNA de dupla fita estão entre os mais detectados em idosos, atuando em doenças autoimunes sistêmicas e no controle antitumoral (IAKOUBOV e TORCHILIN, 1997). Anticorpos contra diversos membros das famílias das proteínas de choque térmico também foram detectados em pacientes com autoimunidades.

Estudos de homologia mostram que as Hsp60 de micobactérias apresentam cerca de 90% de similaridade entre si; em adição, as Hsp60 de bactérias e mamíferos possuem cerca de 50% de similaridade entre suas sequências primárias de aminoácidos (EL-ZAATARI et al., 1995; HAJEER et al., 1992). A partir de estudos imunoquímicos, verificou-se que a resposta antigênica e o reconhecimento cruzado com as Hsp60 de vertebrados são dirigidos à Hsp65 e

não à Hsp60 bacterianas; ainda, as diferenças entre Hsp60 e Hsp65 compreendem as regiões que contêm epítomos reconhecidos por células T (KONG et al., 1993). Este é um exemplo de mimetismo molecular, no qual determinantes antigênicos comuns são compartilhados por um potente antígeno bacteriano e proteínas próprias altamente conservadas (OLDSTONE, 1987). Acredita-se que Artrite Reumatoide, Esclerose Sistêmica, Psoríase, doença de Kawasaki e de Behçet sejam desencadeadas por células B e T através de epítomos que apresentam reação cruzada entre Hsp60 eucariotas e procariotas (ZUGEL e KAUFMANN, 1999).

Além desses aspectos, proteínas danificadas ou mal estruturadas acumulam-se como consequência natural do envelhecimento, promovendo um estado de sobrecarga de chaperonas que desafia os mecanismos de manutenção da homeostase (NARDAI; CSERMELY; SOTI, 2002), havendo uma relação de anticorpos anti-Hsp60/65, especialmente anti-Hsp65 de micobactérias, com processos inflamatórios, infecciosos e crônico-degenerativos (PROHASZKA et al., 1999; REA; MCNERLAN; POCKLEY, 2001; ZUGEL e KAUFMANN, 1999). Grande parte dos estudos da participação da reação cruzada do TCR focou-se em células CD4<sup>+</sup>. Entretanto, o papel de T CD8<sup>+</sup> começou a ser investigado em modelo murino de inflamação intestinal usando clones de células CD8<sup>+</sup> que reconhecem ambas Hsp60 micobacteriana e murina. A doença nesse sistema é mediada pelo reconhecimento de antígenos próprios de Hsp60 pelo TCR: um clone de linfócito T que reage somente contra Hsp60 micobacteriana não causa a doença; esses resultados estabelecem o papel do reconhecimento cruzado de TCR entre a Hsp60 murina e de micobactérias, indicando que o mimetismo molecular é relevante em células citotóxicas (STEINHOFF et al., 1999).

#### **1.4 As Linhagens High e Low de camundongos**

O controle poligênico multiespecífico da resposta imunológica foi estabelecido a partir de cinco seleções genéticas bidirecionais independentes de linhagens de camundongos para os fenótipos de alta (H) ou baixa (L) produção de anticorpos a antígenos naturais. Esse modelo é importante para o entendimento da regulação genética da resposta imune humoral e sua influência em processos como susceptibilidade a infecções (MOUTON; STIFFEL; BIOZZI, 1985), artrite experimental (DE FRANCO et al., 1995), longevidade (COVELLI et al., 1989) e tumorigenese (IBANEZ et al., 1999). Esses estudos, iniciados em 1965, desenvolveram-se a partir do intercruzamento de populações geneticamente heterogêneas de

camundongos *Swiss* (SIQUEIRA et al., 1976). Em cada linhagem H ou L, diferentemente da obtenção de animais isogênicos, as seleções genéticas evitaram a consanguinidade. A característica fenotípica escolhida para obtenção das linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> utilizadas no presente estudo foram as respostas secundárias máxima ou mínima aos antígenos flagelares de *Salmonella*, seguindo cruzamentos em gerações sucessiva de animais apresentando fenótipos extremos, após imunizações alternadas com os antígenos não cross-reativos de *S. typhimurium* e *S. oranienburg*, evitando-se, assim, a interferência de anticorpos maternos passivamente transmitidos. O cruzamento dos camundongos que apresentavam alta ou baixa resposta levou à divergência progressiva dos fenótipos durante 16 gerações, quando se atingiu a homozigose dos *loci* que controlam o caráter (BIOZZI et al., 1979). Esses camundongos geneticamente selecionados diferem também em suas respostas a antígenos não relacionados, indicando uma modificação geral no mecanismo de síntese de anticorpos (efeito multiespecífico). Análises genéticas das linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> demonstraram que a característica *produção quantitativa de anticorpos* está sob controle poligênico de 5 a 7 *loci* independentes e que as pressões seletivas exercidas pelo método de seleção induziram modificações em diferentes etapas que promovem a síntese de anticorpos (REIS et al., 1992; SANT'ANNA et al., 1982).

Nas Seleções I, II e IVA (selecionadas por imunizações com eritrócitos de carneiro e pombo – Seleção I, eritrócitos de carneiro – Seleções II e IVA) foi demonstrado que a baixa resposta de anticorpos relaciona-se à alta atividade catabólica de seus macrófagos, limitando a quantidade de antígenos disponíveis capazes de ativar a resposta imune adquirida em camundongos L (IBANEZ et al., 1988; MOUTON et al., 1984). Por outro lado, os macrófagos de camundongos H e L da Seleção III e IV tem atividade catabólica similar (FERREIRA et al., 1985). Além disso, o tempo médio de sobrevivência é semelhante entre animais H<sub>III</sub> (611 ± 153 dias de vida) e L<sub>III</sub> (622 ± 166 dias de vida), contrastando com as Seleções I, II e V, na qual a sobrevivência é maior em animais H (DORIA et al., 1997).

Essas linhagens de camundongos, nas quais as potencialidades em extremos opostos foram definidas, representam também um modelo adequado para investigar fatores ambientais e genéticos atuantes no sistema imunológico inato e adquirido, sendo empregadas em estudos sobre resistência ou susceptibilidade a patógenos e/ou toxinas. Em relação à tumorigênese, camundongos bons respondedores são mais susceptíveis a indução de tumor de pele por DMBA/TPA que os maus respondedores, sugerindo que a resistência inata a esse tipo de carcinoma pode estar geneticamente relacionada com a baixa resposta de anticorpos (IBANEZ et al., 1999).

Trabalhos mostraram a susceptibilidade a doenças autoimunes nesses camundongos, nos quais H<sub>III</sub> são resistentes e L<sub>III</sub> extremamente vulneráveis a artrite induzida por pristano, indicando a colocalização dos genes responsáveis pela produção de anticorpos e de susceptibilidade da doença. Nesse modelo é requerida a estimulação por Hsp65 de micobactérias reconhecidas na resposta autoimune que se segue após a injeção de pristano e sua semelhança com proteínas próprias a tornam uma possível candidata na indução desse tipo de autoimunidade (THOMPSON et al., 1990). Foi demonstrado que a diferente susceptibilidade dos animais H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> pode estar relacionada com o padrão de citocinas produzidas no início do desenvolvimento da doença e aos isótipos de IgG anti-Hsp65 predominantes na resposta; apesar de produzir quantidades semelhantes desses anticorpos, H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> diferem marcadamente nos isótipos produzidos durante o estabelecimento da artrite induzida por pristano (JENSEN et al., 2006).

Outro modelo patogênico estudado nessas linhagens é da infecção viral, sendo possível verificar o efeito da produção de anticorpos e suas vias de ativação do sistema imune no controle da doença. Para o Vírus-3 de Hepatite Murina (MHV3), camundongos L<sub>III</sub> mostraram-se resistentes em relação aos H<sub>III</sub>, mesmo que ambas as linhagens sejam capazes de produzir anticorpos contra o vírus; a resistência adquirida pelos camundongos suscetíveis H<sub>III</sub> acompanha a síntese de anticorpos, inclusive quando foi realizada transferência de anticorpos anti-MHV3 anterior à infecção (VASSAO et al., 2003); camundongos bons respondedores são mais vulneráveis, indicando que diferentes mecanismos podem estar envolvidos na aquisição da resistência à infecção viral (QUEIROZ-DA-SILVA; DE-FRANCO; SANT'ANNA, 1997).

A resposta imune a diversos antígenos depende da genética e da experiência imunológica pré- e pós-nascimento dos indivíduos. Baseando-se no conceito de mimetismo molecular e nos relatos de funções fisiológicas distintas para as moléculas Hsp60 próprias e Hsp65 bacteriana (autorreatividade e ação anti-inflamatória), sugere-se que as respostas a essas proteínas sejam variáveis, inclusive durante as mudanças observadas na imunosenescência. Dessa maneira, levantou-se a possibilidade de haver correlação entre a produção de Hsp e seus respectivos anticorpos com a expressão de processos patológicos presentes durante o processo de envelhecimento em linhagens de camundongos boas e más respondedoras.

## 2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo incluiu analisar o efeito da administração passiva das Hsp65r nativa (WT) e sua mutante K<sup>409</sup>A de *Mycobacterium leprae* em camundongos envelhecidos das linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub>, machos e fêmeas, e compará-los a adultos jovens quanto aos fenótipos de tempo médio de sobrevivência, produção dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-DNA e anti-Hsp65, avidéz de IgG total e alterações histológicas decorrentes da administração das proteínas recombinantes de Hsp65.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção e purificação das Hsp65 de *M. leprae* recombinantes nativa e mutante K<sup>409</sup>A

O clone pIL161, contendo a sequência que codifica para a Hsp65 de *M. leprae*, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Célio L. Silva da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, e sua molécula mutante K<sup>409</sup>A, que contém a sequência não ativa proteoliticamente (PORTARO et al., 2002) foram amplificadas em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  Heat Shock. As expressões das proteínas recombinantes Hsp65r WT e K<sup>409</sup>A foram realizadas como descrito por Portaro et al. (2002). As proteínas recombinantes (Hsp65r WT ou K<sup>409</sup>A) presentes no *pellet* do extrato bacteriano foram solubilizadas em ureia 6M e submetidas a SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) preparativo e a banda que contém Hsp65 foi recortada do gel de poliacrilamida para obtenção de Hsp65r WT ou K<sup>409</sup>A purificadas, seguida de eluição (PEREIRA et al., 2005). A homogeneidade das preparações de Hsp65r de *M. leprae* foi analisada por eletroforese de gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) seguido de coloração por nitrato de prata e submetidos à análise de espectrometria de massas – *Peptide Mass Fingerprint* (WESTERMEIER e NAVEM, 2002). Determinaram-se as concentrações proteicas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, realizou-se a análise de dosagem de LPS utilizando o kit LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*), e como controle positivo a endotoxina de *E. coli* (Biowhittaker Cambres Inc. – USA) 2,5 Unidades de Endotoxina/mL (UE/mL); essas dosagens foram realizadas na Seção de Controle de Qualidade do Instituto Butantan.

#### 3.2 Ação das Hsp65r WT e sua mutante K<sup>409</sup>A na sobrevida de camundongos das Linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub>

Para o estudo da participação das Hsp65 nativa e mutante no processo de envelhecimento foram utilizados camundongos machos e fêmeas (n= 5-8 animais/grupo) da Seleção III, geneticamente modificados para alta (H<sub>III</sub>) e baixa (L<sub>III</sub>) produção de anticorpos. Cada animal foi inoculado aos 270 dias de vida com dose única de 2,5  $\mu$ g de Hsp65r WT ou K<sup>409</sup>A pela via intraperitoneal, em volume final de 200  $\mu$ L de PBS; o grupo controle (n= 5 a 8 animais/grupo) recebeu apenas 200  $\mu$ L de PBS. Os animais foram acompanhados até a morte



para o cálculo do TMS e porcentagem de sobrevivência. Fêmeas adultas da linhagem H<sub>III</sub> (n= 4 animais/grupo) foram tratadas com 2,5 µg de Hsp65r WT ou K<sup>409</sup>A, pela via intraperitoneal, aos 120 dias de vida e os resultados de TMS e porcentagens de sobrevivência foram comparados com os animais mais velhos.

Após as inoculações, os animais foram periodicamente sangrados pelo plexo venoso retro-orbital e os antissoros foram estocados a -20 °C para avaliação dos níveis de IgG1 e IgG2a anti-DNA e anti-Hsp65 WT e ensaios de avidéz dos anticorpos IgG anti-Hsp65 WT por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Os camundongos foram obtidos e mantidos nos Biotérios dos Laboratórios de Imunoquímica e Imunogenética do Instituto Butantan. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

### **3.3 Titulação de anticorpos anti-DNA**

Níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-DNA foram detectados pelo método de ELISA indireto. Poços de placas de fundo chato com propriedades de alta ligação (Nunc Maxisorp™, Roskild, Denmark) foram sensibilizados com 1 µg/poço de dsDNA de esperma de salmão (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em solução de Tris (hidroximetil aminometano 10 mM, pH 7,5) acrescido de ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA) 1 mM e mantidas em câmara úmida por 16 a 18 horas em estufa a 37 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com PBS-T / BSA 1% a 37 °C por 1 hora. Foi realizada diluição seriada partindo-se de um inicial 1:16 de soro, com incubação a 37 °C por 2 horas. As placas foram novamente lavadas 3 vezes e incubadas com 100 µL/poço com anticorpos anti-IgG1 ou anti-IgG2a (BD Pharmingen™ - BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) na proporção 1:1000, ambos conjugados com peroxidase, em PBS-T / BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi adicionado 100 µL/poço do tampão substrato (20 mg de *o-phenylenedi-amine* – OPD, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA – diluído em 40 mL de tampão citrato/fosfato 0,3M, pH 5,2 / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%) e a reação foi incubada a 37 °C durante 10 minutos e interrompida utilizando-se 50 µL/poço de ácido cítrico 0,2M. A absorbância foi medida a  $\lambda = 450$  nm utilizando-se um leitor de ELISA (Molecular Devices - Mountain View,

CA, EUA). Os títulos de anticorpos foram expressos como  $\log_2$  da maior diluição positiva estabelecida em 20% do valor máximo da D.O. (densidade óptica) obtida na leitura.

### 3.4 Titulação de anticorpos anti-Hsp65 WT

A detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 WT (indicado somente como anti-Hsp65) foi realizada através de ELISA indireto. Poços de placas de fundo chato com propriedades de alta ligação (Nunc) foram sensibilizados por 18 horas com 1  $\mu\text{g}$ /poço da proteína Hsp65r WT de *M. leprae*, diluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,6, a 4 °C. Seguiu-se a lavagem das placas por 3 vezes com PBS-T e o bloqueio de ligações inespecíficas com PBS-T / BSA 1% a 37 °C por 1 hora. Os soros dos animais foram diluídos seriadamente partindo-se da proporção 1:16 e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes e em seguida incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente com 100  $\mu\text{L}$ /poço com anticorpo anti-IgG1 ou anti-IgG2a (BD Pharmingen™ - 1:1000) conjugados com peroxidase e diluídos em PBS-T / BSA 1%. Após nova lavagem foi adicionado 100  $\mu\text{L}$ /poço do tampão substrato (20 mg de *o-phenylenedi-amine* – OPD – diluído em 40 mL de tampão citrato/fosfato 0,3M, pH 5,2 /  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3%) e a reação foi incubada a 37 °C durante 10 minutos e interrompida utilizando-se 50  $\mu\text{L}$ /poço de ácido cítrico 0,2M. A absorbância foi medida a  $\lambda = 450$  nm utilizando-se um leitor de ELISA (Molecular Devices). Os títulos de anticorpos também foram expressos em  $\log_2$  da maior diluição positiva estabelecida em 20% do valor máximo da D.O. obtida na leitura.

### 3.5 Ensaio de avides

A avides de ligação dos anticorpos foi estimada medindo-se os graus de dissociação das ligações antígeno-anticorpo quando incubados com KSCN (tiocianato de potássio) (PULLEN; FITZGERALD; HOSKING, 1986). A análise é similar à técnica de ELISA anti-Hsp65, incrementada com um passo adicional: após incubação dos soros (duplicata de *pools* de animais de cada grupo experimental), as placas foram incubadas por 30 minutos com KSCN (Sigma-Aldrich, CO. St. Louis, MO, EUA) em 6 concentrações, variando de 0,0625 a 6,0 M, diluídas seriadamente em PBS-T / BSA 1%, reservando-se poços com soros incubados apenas com PBS (duplicata). As placas foram lavadas 3 vezes e em seguida incubadas com 100  $\mu\text{L}$ /poço com anticorpo anti-IgG (Sigma-Aldrich Biotechnology Co., St. Louis, MO,

EUA) conjugado com peroxidase, na diluição 1:25000, em PBS-T / BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Após nova lavagem, seguiu-se o protocolo de ELISA. A absorvância foi medida a  $\lambda = 450$  nm utilizando-se um leitor de ELISA (Molecular Devices).

### 3.6 Análise histopatológica

Fêmeas envelhecidas das linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> (3 animais/grupo), com aproximadamente 270 dias de vida, foram inoculadas com 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de Hsp65r WT ou K<sup>409</sup>A ou PBS (grupo controle) e sacrificadas 17 dias após os tratamentos. Rins, baço, fígado, pulmões e coração foram retirados e conservados em formaldeído 10% e incluídos em parafina. Após processamento, cortes de 5  $\mu\text{m}$  de cada órgão foram corados com Hematoxilina/Eosina (H/E) e a análise microscópica foi realizada pela Dr. Cláudia Ferreira dos Santos (Patologista Veterinária - CRMV/SP 9231) do Instituto Veterinário de Imagens (São Paulo, SP). Os laudos obtidos foram devidamente anexados nesse documento (ANEXOS A-F).

### 3.7 Análises estatísticas

As curvas de sobrevida dos diferentes grupos experimentais foram analisadas através do método Mantel-Cox e comparadas pelo teste de “log rank”, considerando a probabilidade mínima de  $p \leq 0,05$  para diferenças encontradas na porcentagem de sobrevivência. A variância (V), que demonstra a influência de fatores externos nos fenótipos observados, foi obtida através do quadrado do desvio padrão do tempo médio de sobrevida.

A significância da diferença entre as médias dos grupos experimentais foi estabelecida através do teste *One-Way ANOVA* para análise da variância, considerando a probabilidade mínima de  $p \leq 0,05$ ; o teste de Tukey foi realizado para comparação entre os grupos experimentais e o grupo controle. Para a análise da influência dos fatores “tempo” e “tratamento” sobre a produção de anticorpos foi utilizado o teste de análise da variância *Two-Way ANOVA* (significância mínima de  $p \leq 0,05$ ), seguido pelo pós-teste de Bonferroni para a comparação e determinação da origem da diferença entre grupos.

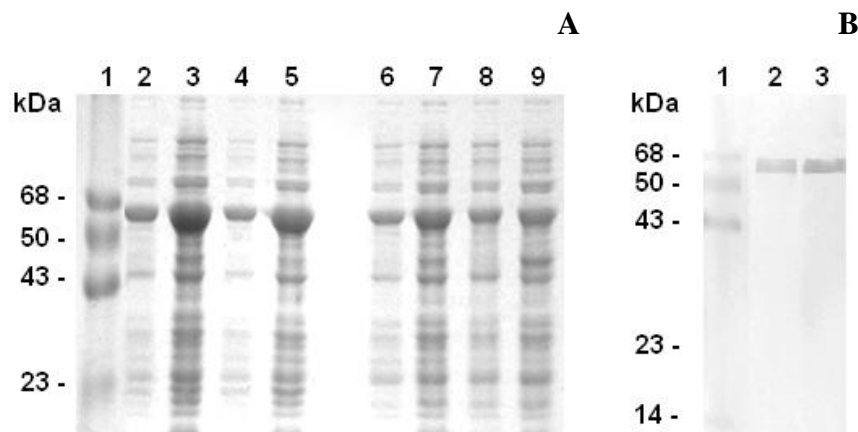
Nos ensaios de avidéz, as leituras da absorvância na ausência de KSCN representaram a ligação total de anticorpos anti-Hsp65, e as leituras subsequentes na presença de concentrações crescentes de KSCN foram convertidas na porcentagem da ligação total de

anticorpos (PULLEN; FITZGERALD; HOSKING, 1986). O índice de avidéz estimado é calculado como a concentração de KSCN requerida para reduzir a D.O. da amostra em 50%, comparada com a maior atividade obtida nos poços com soros incubados apenas com PBS. Todos os testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.00 (Graph Software, Inc.).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Expressão, obtenção e purificação das Hsp65r WT e K<sup>409</sup>A

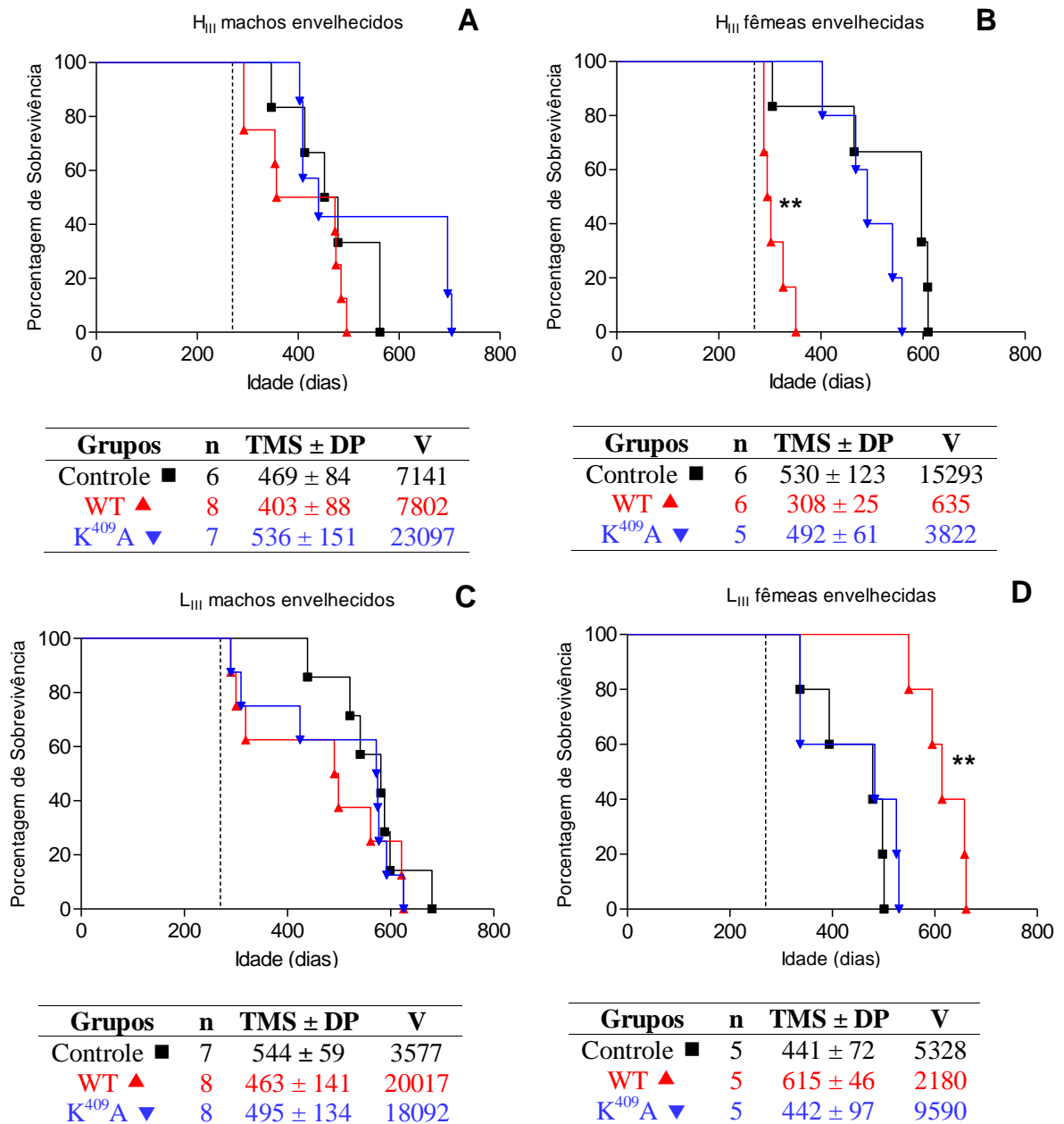
A FIGURA 2A mostra a expressão das proteínas recombinantes nativa e mutante (Hsp65r WT e K<sup>409</sup>A, respectivamente) aplicadas em SDS-PAGE 12,5%, e que migram na região de 65 kDa (FIGURA 2B). Para inoculação dos grupos experimentais, ao final da corrida, as proteínas foram precipitadas em solução refrigerada de KCl 1,9% e a banda correspondente a Hsp65r recortada do gel e eluída em tampão PBS.



**FIGURA 2** – Purificação da Hsp65r de *M. leprae*. (A) Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% da análise da expressão das Hsp65 nativa (linhas 2 e 4 – não induzidas; linhas 3 e 5 – induzidas com IPTG 0,5mM) e mutante (linhas 6 e 8 – não induzidas; linhas 7 e 9 – induzidas com IPTG 0,5mM) e marcador de peso molecular (linha 1); corante Comassie Brilliant Blue R-250. (B) Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% da Hsp65 WT (linha 2), seu mutante K<sup>409</sup>A (linha 3) e marcador de peso molecular (linha 1) após eluição; coloração de nitrato de prata.

### 4.2 Avaliação do efeito da administração das Hsp65r sobre o Tempo Médio de Sobrevida

O fato das Hsp participar da ativação/progressão de processos crônico-degenerativos como inflamação e autoimunidades levou ao estudo da influência da Hsp65 de *M. leprae* no processo de envelhecimento das Linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub>. Assim, camundongos de ambos os sexos, de 270 dias de vida, foram inoculados intraperitonealmente com dose única de 2,5 µg das Hsp65r WT ou K<sup>409</sup>A ou PBS (controle). Os animais foram acompanhados até a morte e a curva de sobrevida e os tempos médios de sobrevida determinados.

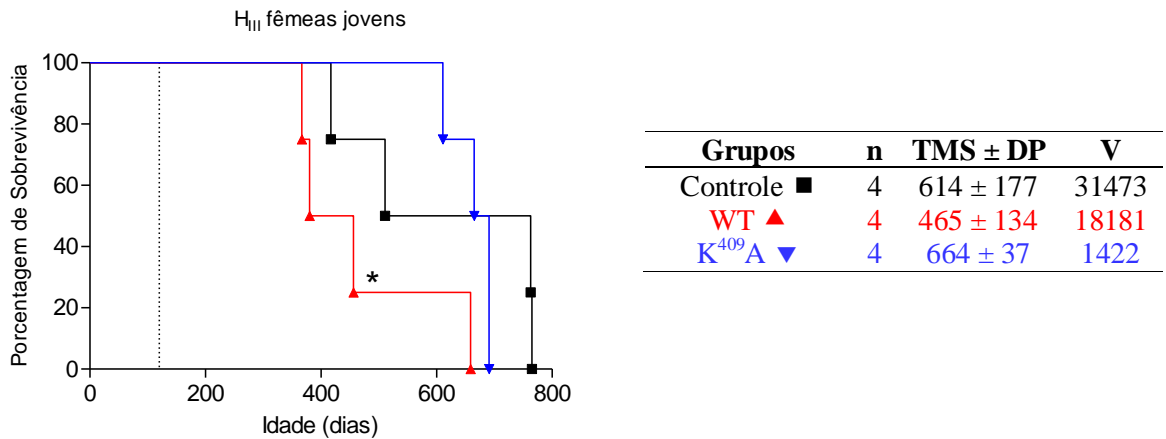


**FIGURA 3** – Curva de sobrevivência de machos e fêmeas envelhecidas das linhagens H<sub>III</sub> (A e B) e L<sub>III</sub> (C e D) inoculados com 2,5 µg/animal de Hsp65r WT ou K<sup>409</sup>A ou PBS (controle). TMS= tempo médio de sobrevivência; DP= desvio padrão; V= variância; \*\**p* ≤ 0,01 (Teste log rank (Mantel-Cox)) em relação ao grupo controle. A linha pontilhada indica o dia da inoculação das proteínas (270 dias).

A análise de animais machos envelhecidos, de ambas as linhagens, inoculados com as Hsp65 evidenciou TMS semelhante aos respectivos grupos controle (FIGURA 3A e C). Em contraste, fêmeas H<sub>III</sub> inoculadas com a proteína nativa apresentaram redução do TMS (308 ± 25 dias, *p* ≤ 0,01) comparado ao grupo controle (530 ± 123 dias); resalte-se que 40 dias após a inoculação ocorreu a morte do último indivíduo do grupo WT (FIGURA 3B). A

análise dos valores de variância mostrou uma redução marcante em fêmeas envelhecidas da linhagem H<sub>III</sub> (FIGURA 3B) inoculadas com a proteína nativa (V= 635) em relação ao grupo mutante (V= 3822) e controle (V= 15293). De maneira oposta, na FIGURA 3D observa-se que fêmeas da linhagem L<sub>III</sub> tratadas com 2,5 µg de Hsp65r WT apresentaram maior TMS (615 ± 46 dias,  $p \leq 0,01$ ) comparativamente aos camundongos do grupo K<sup>409</sup>A e grupo controle (442 ± 97 dias e 441 ± 72 dias, respectivamente), também apresentando redução na variância (V= 2180) em relação ao grupo controle (V= 5328) e K<sup>409</sup>A (V= 9590).

Verificada a diminuição da sobrevida de fêmeas envelhecidas H<sub>III</sub> após a inoculação da molécula nativa, comparou-se o efeito das proteínas recombinantes de Hsp65 em fêmeas adultas H<sub>III</sub> (120 dias de idade), inoculadas com WT ou K<sup>409</sup>A ou PBS (controle).



**FIGURA 4** – Influência do tratamento das proteínas WT e K<sup>409</sup>A na sobrevida de fêmeas adultas da linhagem H<sub>III</sub>. TMS= tempo médio de sobrevida; DP= desvio padrão; V= variância; \* $p \leq 0,05$  (Teste log rank (Mantel-Cox)) em relação ao grupo K<sup>409</sup>A. A linha pontilhada indica a data de inoculação das proteínas (120 dias de vida).

A FIGURA 4 mostra redução no TMS de fêmeas H<sub>III</sub> adultas após administração da proteína WT (465 ± 134 dias,  $p \leq 0,01$ ) comparativamente ao grupo K<sup>409</sup>A (664 ± 37 dias); nesse grupo, a primeira morte ocorreu após 247 dias da inoculação da molécula nativa e a variância estava reduzida em animais inoculados com a proteína mutante (V= 1422).

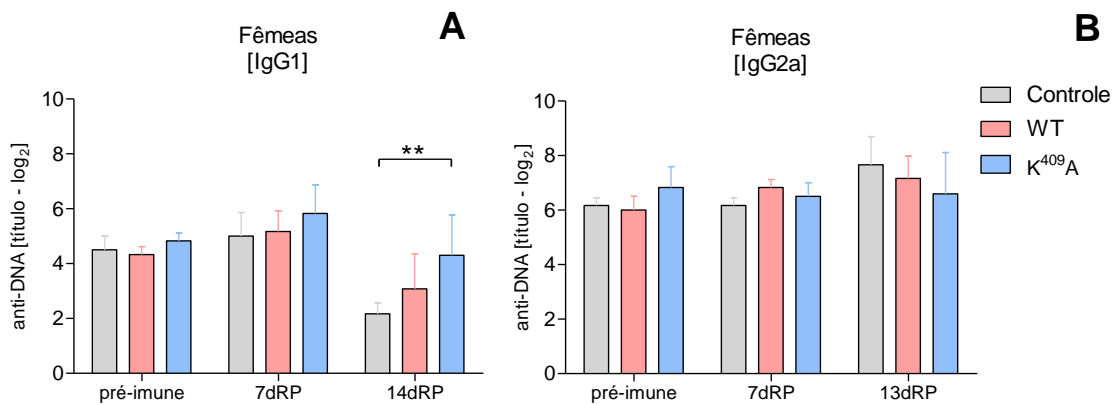
Durante a análise do TMS, os camundongos dos diferentes grupos experimentais foram avaliados quanto ao aparecimento de sinais que indicariam alterações causadas pela administração das proteínas, mas nenhuma mudança foi observada (perda de peso, pilo-ereção, ascite, etc.).

### 4.3 Análise da produção de anticorpos anti-DNA

Para verificar possíveis alterações na produção de anticorpos nos animais tratados com as proteínas recombinantes de Hsp65, ensaios de detecção dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-DNA foram realizados em camundongos H e L da Seleção III (9 meses de idade) de ambos os sexos (n= 5-8 animais/grupo) inoculados com 2,5 µg de Hsp65r WT ou K<sup>409</sup>A ou PBS (controle).

A produção de anticorpos anti-DNA no soro pré-imune de animais envelhecidos H<sub>III</sub>, machos e fêmeas, foi semelhante (média de título do isótipo IgG1 de  $4,56 \pm 0,25 \log_2$  e de IgG2a de  $6,33 \pm 0,44 \log_2$ ); em ambos os sexos na linhagem L<sub>III</sub> a produção foi semelhante para os isótipos ( $2,79 \pm 0,50 \log_2$ ).

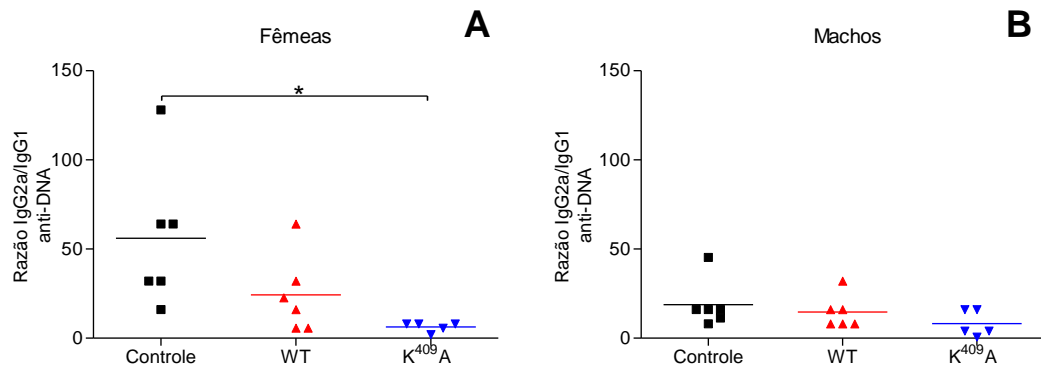
A cinética de produção dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-DNA foi avaliada no processo de envelhecimento de fêmeas da linhagem H<sub>III</sub>. Para o isótipo IgG1, após 7 dias da inoculação das Hsp, não se observaram diferenças significantes na produção de anticorpos entre os grupos inoculados e controle. Já aos 14 dias da inoculação das proteínas, notou-se aumento da produção de IgG1 ( $p \leq 0,01$ ) no grupo K<sup>409</sup>A em relação ao grupo controle (FIGURA 5A), mas redução desse isótipo em comparação ao soro pré-imune. A FIGURA 5B mostra que o tratamento não influencia a cinética de produção do isótipo IgG2a.



**FIGURA 5** – Produção dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-DNA após a inoculação de WT e K<sup>409</sup>A em fêmeas envelhecidas da linhagem H<sub>III</sub>. Os títulos foram determinados por ELISA antes da inoculação e 7 e 14 dias após tratamento com as proteínas (pré-imune, 7dRP e 14dRP respectivamente). \*\* $p \leq 0,01$  (Two-way ANOVA – pós-teste Bonferroni).

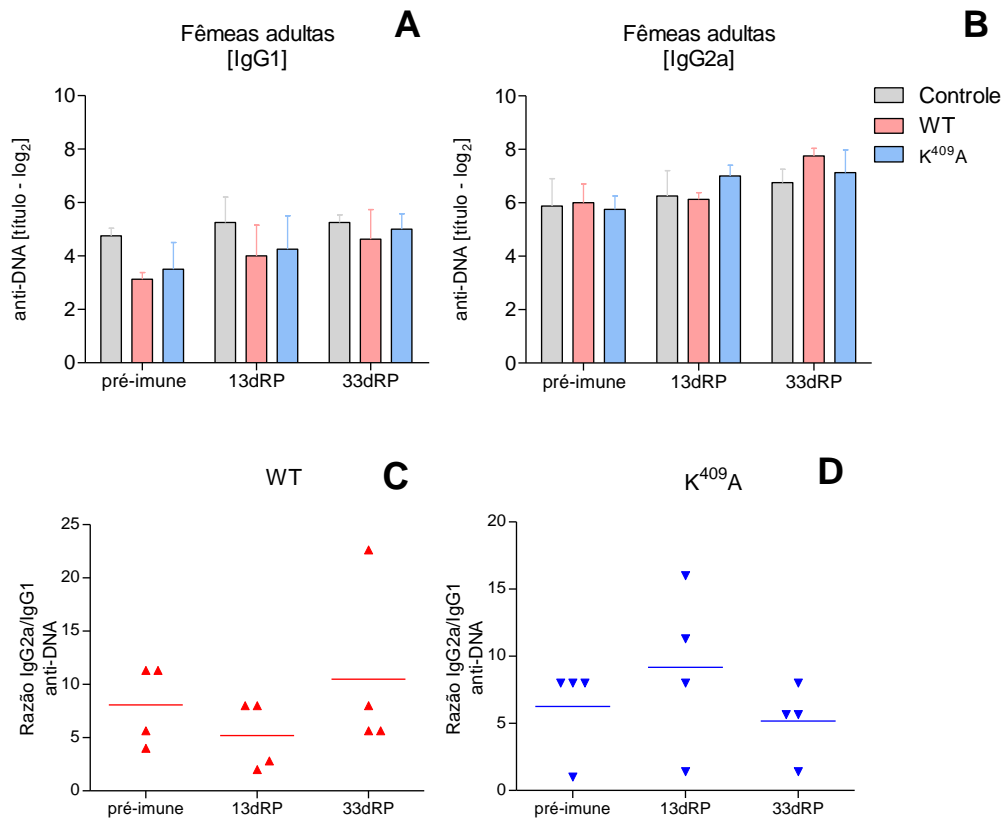


Ainda, foi analisado o balanço de produção dos isótipos IgG2a/IgG1 anti-DNA em camundongos envelhecidos H<sub>III</sub>. Nas fêmeas, 14 dias após a inoculação da molécula K<sup>409</sup>A, ocorreu redução da razão IgG2a/IgG1 anti-DNA ( $p \leq 0,05$ , FIGURA 6A). Camundongos machos mantiveram o balanço da produção dos isótipos nos diferentes tratamentos quando comparados ao grupo controle (FIGURA 6B).



**FIGURA 6** – Razão IgG2a/IgG1 anti-DNA em animais envelhecidos da linhagem H<sub>III</sub> 14 dias após inoculação das Hsp65 WT e K<sup>409</sup>A. \* $p \leq 0,05$  (Teste Tukey).

Como fêmeas envelhecidas H<sub>III</sub> apresentaram redução no TMS após a inoculação da proteína nativa, soros obtidos de fêmeas adultas (4 meses de idade) da linhagem H<sub>III</sub> tratadas com as proteínas recombinantes (4 animais/grupo) tiveram os isótipos IgG1 e IgG2a anti-DNA titulados para comparação. A administração das proteínas não promoveu alteração na produção de IgG1 e IgG2a entre os grupos até o 33º dia analisado após o tratamento; a cinética da produção dos anticorpos mostrou aumento de IgG1 ( $p \leq 0,05$  *Two-Way* ANOVA) e IgG2a ( $p \leq 0,001$  *Two-Way* ANOVA) com o decorrer do tempo após a administração das proteínas e PBS (FIGURA 7A e B), não ocorrendo alteração na razão IgG2a/IgG1 (FIGURA 7C e D).



**FIGURA 7** – Cinética de produção de anticorpos anti-DNA (A e B) e razão IgG2a/IgG1 anti-DNA (C e D) em fêmeas adultas da linhagem H<sub>III</sub> inoculadas com a proteínas recombinantes WT ou K<sup>409</sup>A ou PBS (controle). Os títulos foram determinados por ELISA após 13 e 33 dias da inoculação das proteínas (13dRP e 33dRP, respectivamente).

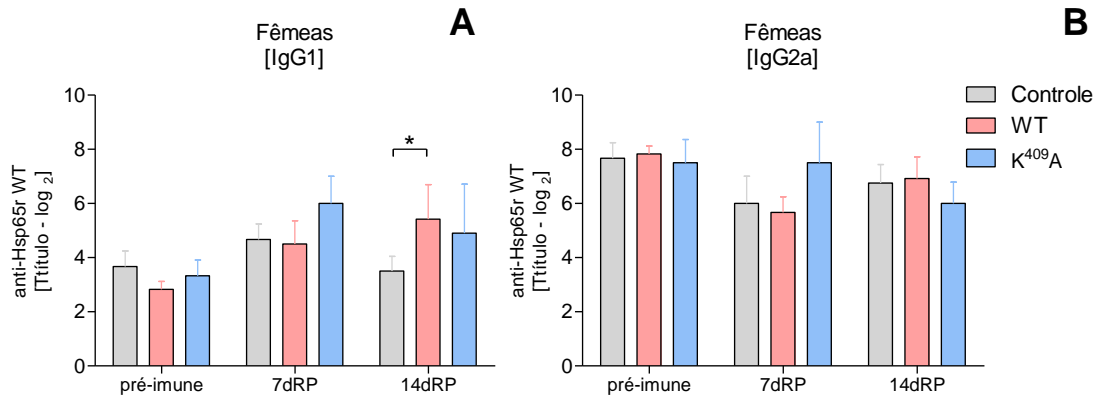
Também foi verificado o efeito das proteínas recombinantes de Hsp65 na produção de anticorpos anti-DNA em camundongos envelhecidos da linhagem L<sub>III</sub>. Machos e fêmeas não apresentaram alterações na produção dos isótipos IgG1 e IgG2a em relação aos diferentes tratamentos a que foram submetidos, e a cinética não mostrou aumento significativo desses anticorpos em ambos os sexos a partir do 7º dia em todos os grupos experimentais (dados não mostrados).

#### 4.4 Análise da produção de anticorpos anti-Hsp65 WT

Os isótipos IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 foram quantificados em machos e fêmeas envelhecidos H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> (n= 3-6 animais/grupo) que receberam 2,5 µg/animal da proteína WT, K<sup>409</sup>A ou PBS (controle).

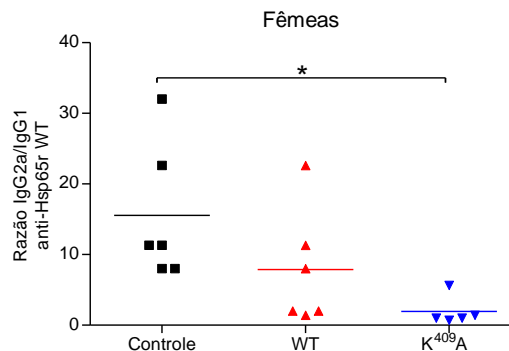
A cinética de produção de anticorpos foi verificada inicialmente em fêmeas envelhecidas da linhagem H<sub>III</sub>. Referente ao isótipo IgG1, aos 7 dias da inoculação das

proteínas não foram observadas alterações na produção desses anticorpos; já aos 14 dias, foi notado aumento da resposta ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle (FIGURA 8A). Não houve diferença significativa na produção de IgG2a após a inoculação das Hsp65 WT e K<sup>409</sup>A nos tempos analisados (FIGURA 8B).



**FIGURA 8** – Cinética da produção dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 após inoculação das proteínas nativa ou mutante ou PBS (controle) em fêmeas H<sub>III</sub> envelhecidas. Os títulos foram determinados por ELISA após 7 e 14 dias da inoculação das proteínas (7dRP e 14dRP, respectivamente). \* $p \leq 0,05$  (Two-way ANOVA – pós-teste Bonferroni).

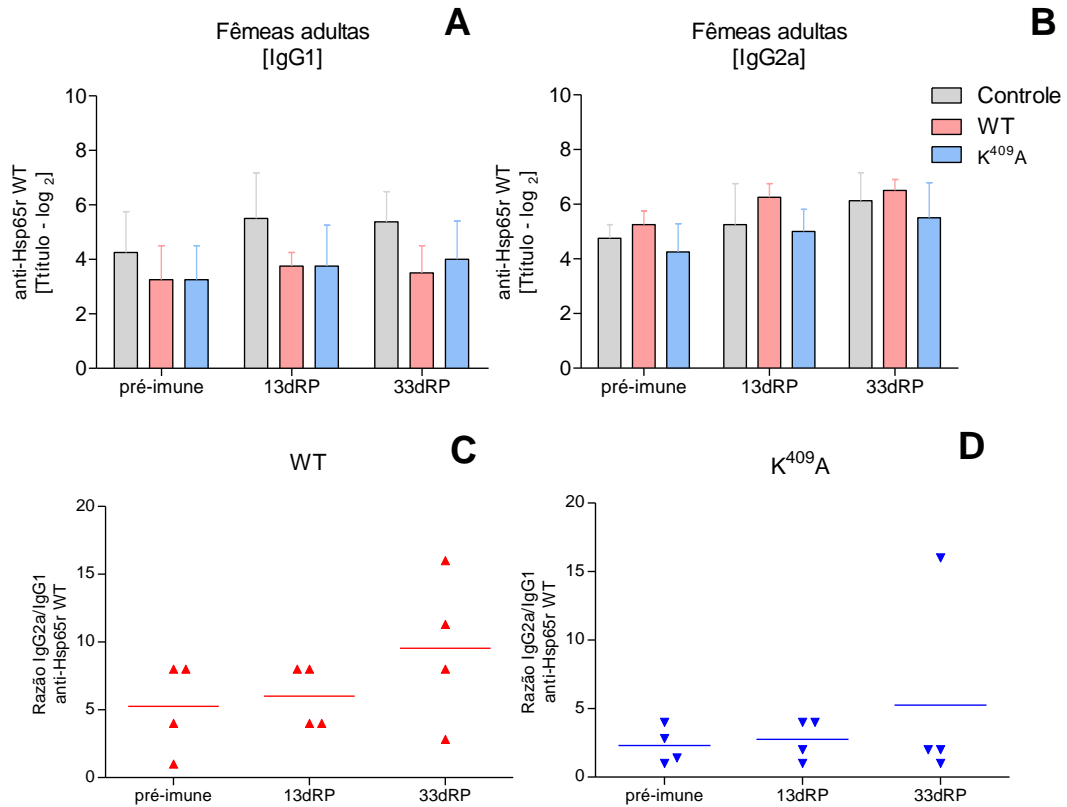
Também foi analisada possível alteração na razão de produção dos isótipos IgG1 e IgG2a em fêmeas envelhecidas da linhagem H<sub>III</sub>. Houve redução da razão IgG2a/IgG1 anti-Hsp65 após a inoculação da proteína mutante ( $p \leq 0,05$ , FIGURA 9), fato não observado em machos (dados não apresentados).



**FIGURA 9** – Razão IgG2a/IgG1 anti-Hsp65 após tratamento com as proteínas nativa ou mutante ou PBS (controle) em fêmeas H<sub>III</sub> envelhecidas 14 dias após a inoculação. \* $p \leq 0,05$  (teste de Tukey).

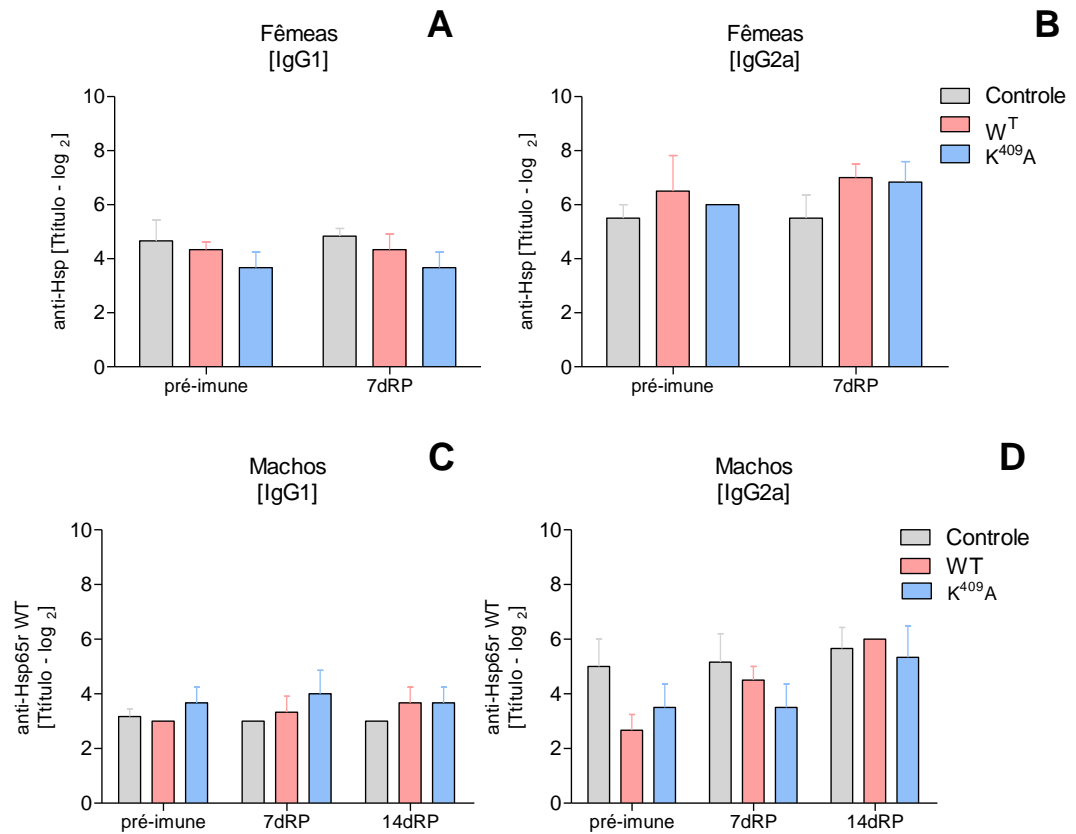
Em paralelo, foram avaliados os níveis de IgG1 e IgG2a nos soros de fêmeas adultas H<sub>III</sub> inoculadas pela via intraperitoneal com 2,5 µg/animal das proteínas recombinantes ou PBS (controle). Não foram observadas diferenças na produção dos isótipos após as

inoculações das Hsp nativa e mutante K<sup>409</sup>A no período analisado - 13 e 33 dias (FIGURA 10A e B) e nem na razão IgG2a/IgG1 (FIGURA 10C e D).



**FIGURA 10** – Cinética da produção de anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) e razão IgG2a/IgG1 (C e D) após o tratamento com as proteínas recombinantes ou PBS (controle) em fêmeas H<sub>III</sub> adultas. Os títulos foram determinados por ELISA após 13 e 33 dias da inoculação das proteínas (13dRP e 33dRP, respectivamente).

As dosagens de IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 também foram realizadas em camundongos da linhagem L<sub>III</sub> envelhecidos. Assim como para a dosagem de anticorpos anti-DNA, fêmeas e machos não apresentaram alterações na produção de seus anticorpos anti-Hsp65 nos diferentes grupos experimentais durante o período analisado (FIGURA 11).

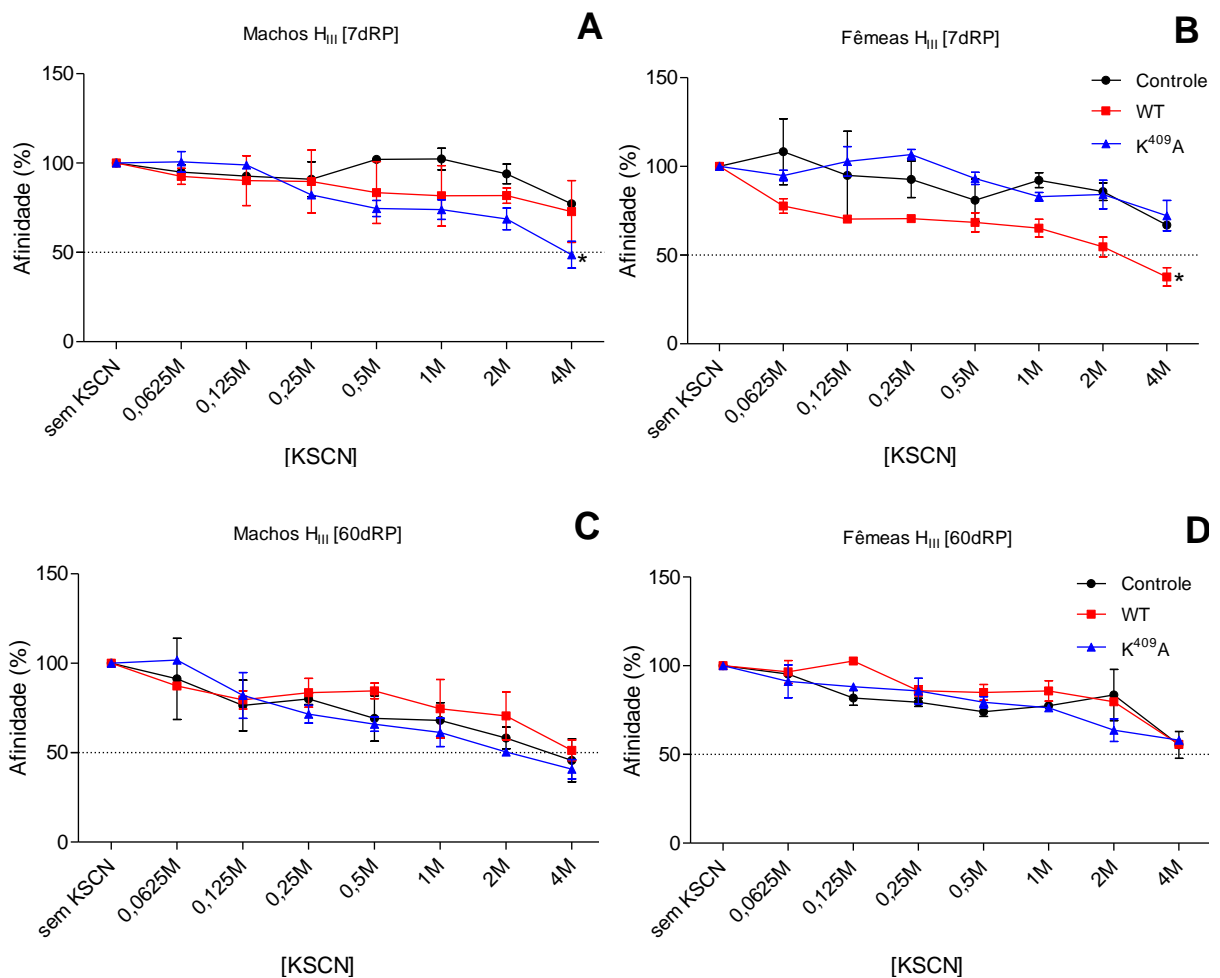


**FIGURA 11** – Cinética da produção dos isótipos IgG1 e IgG2a em fêmeas e machos em processo de envelhecimento da linhagem L<sub>III</sub>. Os títulos foram determinados por ELISA antes e após 7 e 14 dias da inoculação das proteínas WT, K<sup>409</sup>A ou PBS (pré-immune, 7dRP e 14dRP, respectivamente).

#### 4.5 Aidez dos anticorpos IgG anti-Hsp65 WT

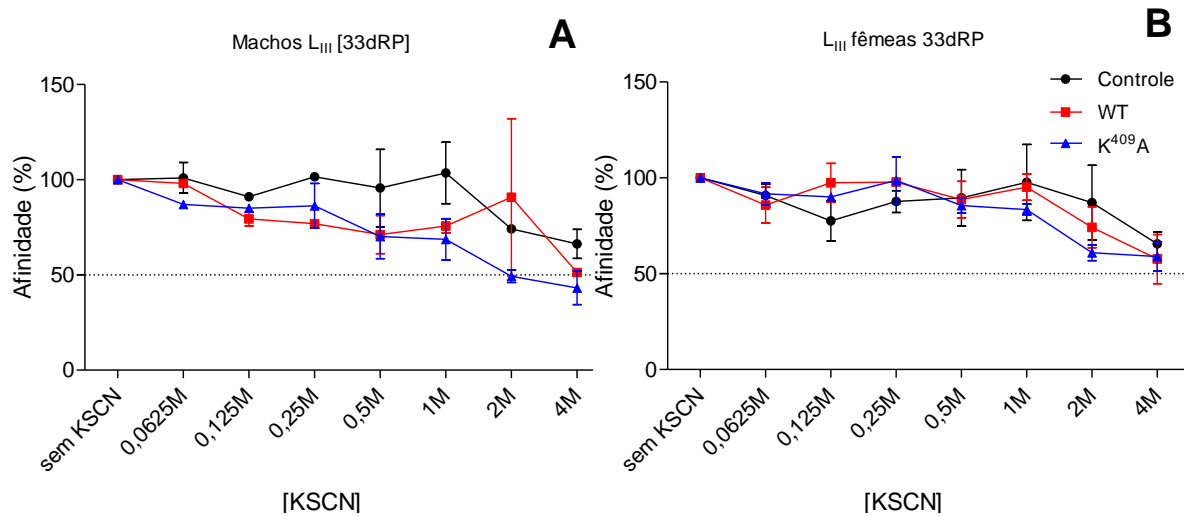
A força de ligação de anticorpos IgG contra a proteína Hsp65r WT foi verificada através do índice de aidez de anticorpos produzidos pelos camundongos após a inoculação das proteínas nativa ou mutante de *M. leprae* ou PBS (grupo controle). Pools de soros (duplicata) dos grupos experimentais de camundongos H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> foram quantificados e os resultados são apresentados a seguir.

Sete dias após o tratamento, machos  $H_{III}$  envelhecidos apresentaram índice de avididade de 48,65 (4M KSCN) quando inoculados com a proteína mutante (FIGURA 12A), enquanto que fêmeas apresentaram um índice de 37,72 (4M KSCN) após inoculação com a proteína WT (FIGURA 12B). Anticorpos IgG em machos exibiram índice de avididade de 47,67 (grupo controle), 51,30 (grupo WT) e 40,76 (grupo  $K^{409}A$ ) após 60 dias da administração das proteínas (FIGURA 12C) e fêmeas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais (FIGURA 12D).



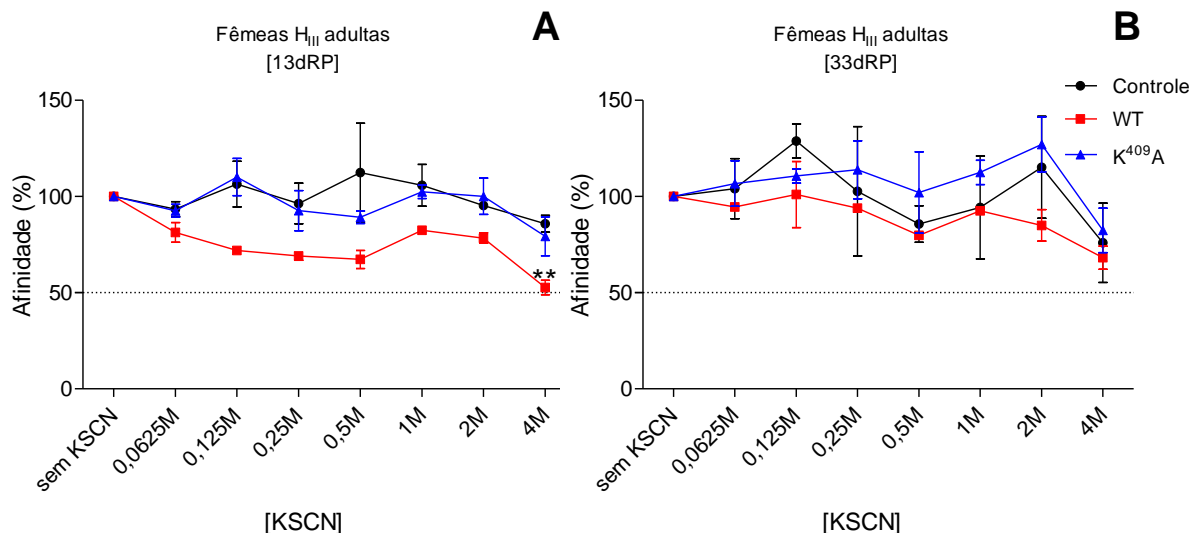
**FIGURA 12** – Capacidade de inibição da ligação dos anticorpos IgG contra a Hsp65r WT por tiocianato de potássio em machos (A e B) e fêmeas (C e D) envelhecidos da linhagem  $H_{III}$  após 7 (7dRP) e 60 (60dRP) dias da inoculação das proteínas WT ou  $K^{409}A$  ou PBS (grupo controle). [KSCN]= concentração de tiocianato de potássio (em molar); \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle (Two-way ANOVA – pós-teste Bonferroni).

Na linhagem  $L_{III}$  foi observada diferença significativa quanto a avides de anticorpos IgG somente nos soros de camundongos machos após 33 dias da inoculação da proteína  $K^{409}A$  (FIGURA 13A), apresentando índice de avides de 43,23 (4M KSCN). Nos demais períodos analisados – pré-imune e 7 dias após a inoculação das proteínas – não foram observadas alterações em ambos os sexos da linhagem (dados não mostrados).



**FIGURA 13** – Porcentagem da afinidade de anticorpos IgG contra a Hsp65r WT inibidos por KSCN em machos (A) e fêmeas (B) envelhecidos da linhagem  $L_{III}$  após 33 dias (33dRP) da administração das proteínas WT ou  $K^{409}A$  ou PBS (grupo controle). [KSCN]= concentração de tiocianato de potássio (em molar).

As mesmas dosagens foram realizadas para fêmeas adultas da linhagem  $H_{III}$  tratadas com as proteínas recombinantes de Hsp65r de *M. leprae*. A FIGURA 14 mostra as concentrações utilizadas de KSCN não foram capazes de romper as ligações dos anticorpos IgG anti-Hsp65r WT num índice menor que 50%; porém, 13 dias após a administração da proteína nativa (FIGURA 14A), os indivíduos apresentaram uma maior inibição da ligação dos anticorpos após incubação com tiocianato de potássio, com índice de 85,79 (4M KSCN, grupo controle) e 52,64 (4M KSCN, grupo WT;  $p \leq 0,01$ ).



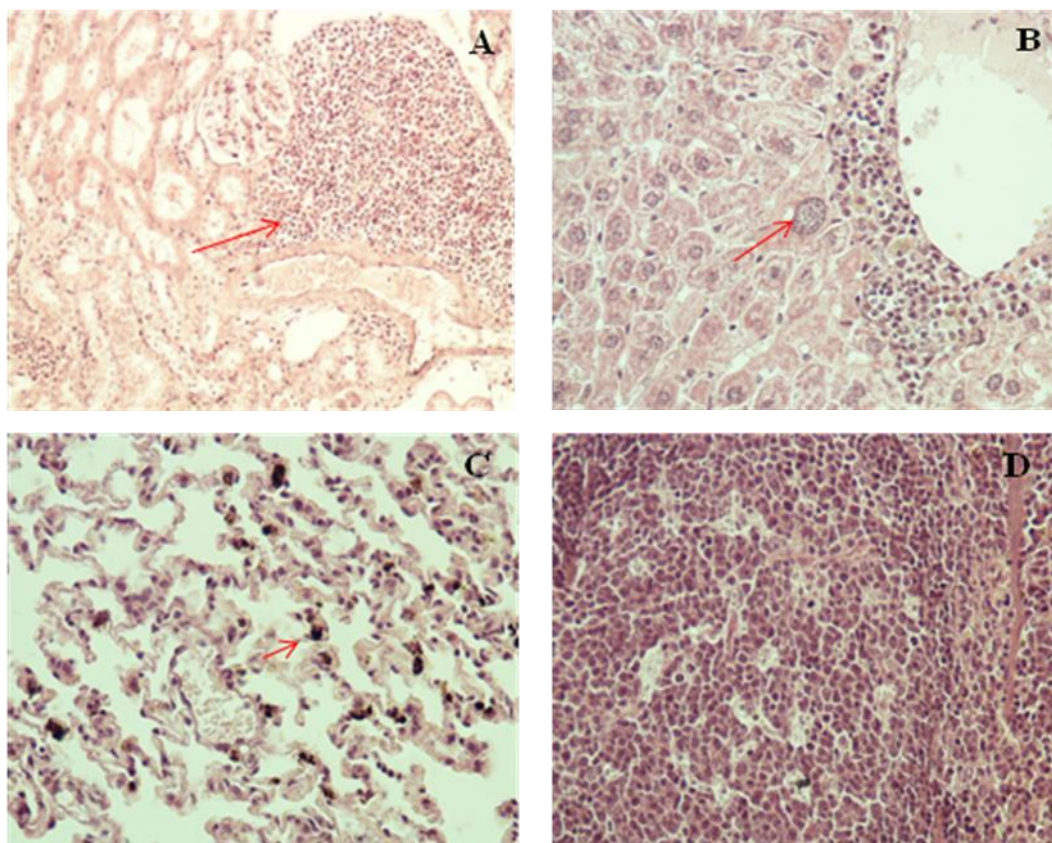
**FIGURA 14** – Porcentagem de inibição da ligação dos anticorpos IgG contra a Hsp65r WT por KSCN em fêmeas adultas da linhagem H<sub>III</sub> dos soros após 13 (13dRP) (A) e 33 dias (33dRP) (B) da administração das proteínas WT ou K<sup>409</sup>A ou PBS (grupo controle). [KSCN]= concentração de tiocianato de potássio (em molar); \*\* $p \leq 0,01$  em relação ao grupo controle (Two-way ANOVA – pós-teste Bonferroni).

#### 4.6 Análise histopatológica

Para verificar se a inoculação das moléculas nativa e mutante de Hsp65r de *M. leprae* desencadeou algum tipo de processo crônico-degenerativo evidenciado por alterações morfológicas, foi realizada a análise histopatológica de rins, baço, fígado, pulmão e coração de fêmeas de camundongos H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub>, os quais que apresentaram alteração no TMS. Esses órgãos foram fixados em formaldeído 10% e após inclusão e consequente coloração foram analisados e os resultados são mostrados a seguir.

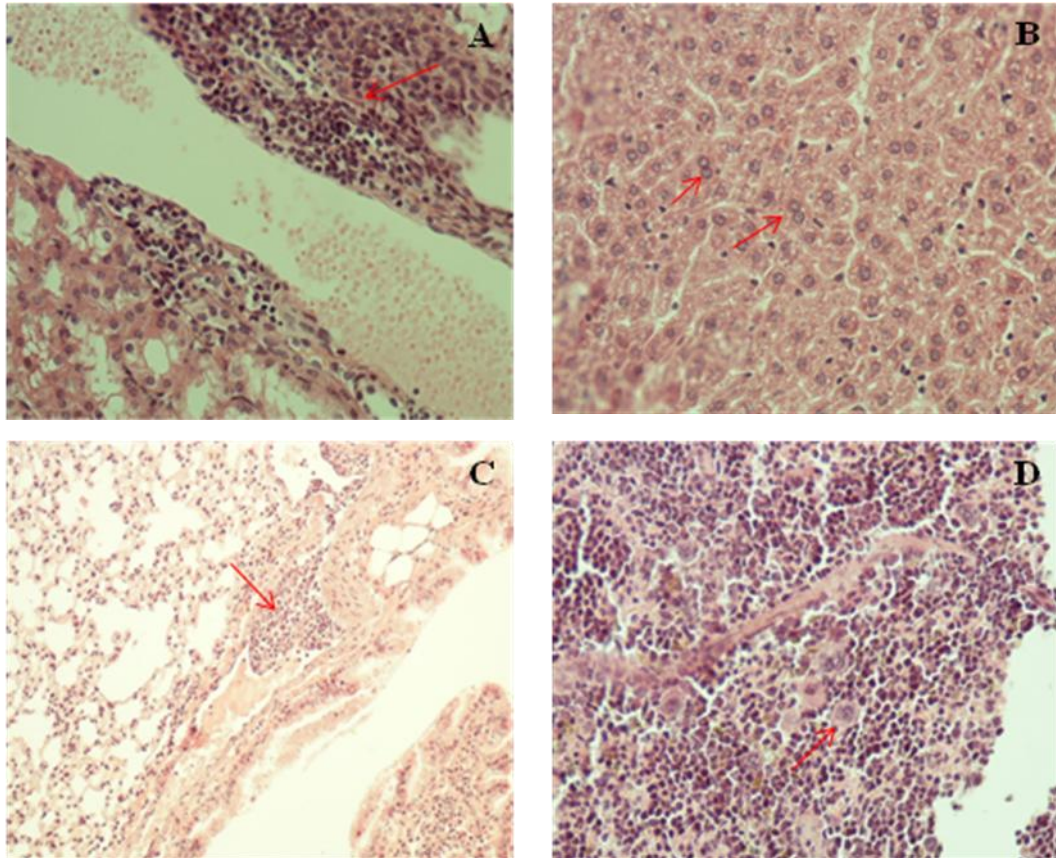
Fêmeas envelhecidas da linhagem H<sub>III</sub> e inoculadas com a proteína Hsp65r WT apresentaram infiltrado inflamatório nos rins e no fígado (FIGURA 15A e B, respectivamente), presença de discreto colapso alveolar nos pulmões (FIGURA 15C) e baço com intensa atividade mitótica (FIGURA 15D). Não foram observadas mudanças no músculo esquelético cardíaco (dados não mostrados). Ressalta-se que, nos rins, o infiltrado inflamatório é constituído de linfócitos, plasmócitos e poucos macrófagos (ANEXO A). Fêmeas do grupo controle e K<sup>409</sup>A (ANEXOS C e E) apresentaram hepatite crônica e nefrite intersticial, porém, aparentemente em menor grau que naquelas inoculadas com a proteína nativa.





**FIGURA 15** – Análise histopatológica em rim, fígado, pulmões e baço de fêmeas H<sub>III</sub> envelhecidas inoculadas com 2,5 µg de Hsp65r WT. (A) Fotomicrografia de rim apresentando infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intersticial (seta); (B) Fotomicrografia de fígado apresentando megalócitos (seta) e infiltrado inflamatório linfocitário em zona 3; (C) Fotomicrografia de pulmão apresentando células com pigmentação acastanhada intracitoplasmática em septo (seta); (D) Fotomicrografia de baço apresentando centro germinativo reativo com linfoblastos e atividade mitótica. A, C e D: aumento 20x; B: aumento 40x. Coloração: H/E.

A análise histopatológica nos órgãos de fêmeas envelhecidas da linhagem L<sub>III</sub> que receberam 2,5 µg Hsp65r WT revelou a presença de infiltrado inflamatório na pelve renal e pulmões (FIGURA 16A e C, respectivamente), hepatócitos binucleados (FIGURA 16B) e baço com hipoplasia folicular (FIGURA 16D). Como em fêmeas envelhecidas da linhagem H<sub>III</sub>, não foram observadas mudanças quanto à distribuição e morfologia celular no coração desses indivíduos (dados não mostrados). Animais L<sub>III</sub> mostraram presença de hepatite crônica multifocal, nefrose, hematopoiese extramedular esplênica e discreta congestão pulmonar e cardíaca (ANEXOS B, D e F).



**FIGURA 16** – Análise histopatológica em rim, fígado, pulmões e baço de fêmeas  $L_{III}$  envelhecidas inoculadas com  $2,5 \mu\text{g}$  de Hsp65r WT. (A) Fotomicrografia de rim apresentando infiltrado inflamatório linfocitário na região de pelve (seta); (B) Fotomicrografia de fígado apresentando hepatócitos binucleados (setas); (C) Fotomicrografia de pulmão apresentando população linfóide peri-bronquiolar (MALT) (seta); (D) Fotomicrografia de baço apresentando células hematopoiéticas imaturas (seta). A: aumento 40x; B-D: aumento 20x. Coloração: H/E.

## 5 DISCUSSÃO

É evidente que a atividade do sistema imunológico altera-se com a idade e que essas mudanças levam a uma deficiência na resposta a infecções e vacinas (EFFROS, 2007; MCELHANEY e EFFROS, 2009). Modificações observadas durante o envelhecimento incluem diminuição no número absoluto de linfócitos T, aumento do número de células T periféricas ativadas, redução de linfócitos T *naïves*, mudanças na tradução de sinais pelo TCR, elevação nos níveis séricos de imunoglobulinas (principalmente IgA e IgG), diminuição do número total de linfócitos B, limitação da resposta protetora de anticorpos de alta afinidade, ampliação da produção de autoanticorpos e mudança para um padrão Th2 de resposta de citocinas (GINALDI et al., 2001).

Concomitante a essas variações, o processo de envelhecimento pode aumentar a predisposição a processos crônico-degenerativos, seja por alteração na tolerância ao próprio, perda da integridade tecidual ou maior incidência de processos infecciosos que levam à liberação de novos antígenos, ativação de linfócitos não responsivos (*bystander activation*) e mimetismo molecular (OLSON; CROXFORD; MILLER, 2001). Linfócitos T e B primados inicialmente por resposta a uma proteína viral ou bacteriana podem se reativar e superestimular linfócitos CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> além da capacidade do sistema, levando ao aumento da produção de anticorpos contra proteínas próprias (STACY et al., 2002; TSUMIYAMA; MIYAZAKI; SHIOZAWA, 2009).

Baseando-se nos eventos da alteração do sistema imune no envelhecimento, na incidência de processos crônico-degenerativos em indivíduos idosos (DORSHKIND; MONTECINO-RODRIGUEZ; SIGNER, 2009; YUNG e JULIUS, 2008) e na participação da Hsp65r WT na redução da sobrevivência de camundongos lúpicos (MARENCO et al., 2008), foi verificada a ação das proteínas recombinantes de Hsp65 de *M. leprae* em camundongos envelhecidos das linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub>, população geneticamente heterogênea e com homozigose nos *loci* que controlam a produção de anticorpos. Dessa forma, esse modelo pareceu consistente para o estudo da participação dos anticorpos frente a moléculas altamente conservadas, como as proteínas da família das Hsp60, aventando-se a hipótese de que os fenótipos se correlacionariam com alterações gerais e imunológicas nos indivíduos recebendo Hsp65r.

A administração passiva da Hsp65r WT de *M. leprae* causou redução da sobrevivência de fêmeas H<sub>III</sub> envelhecidas, com a primeira morte ocorrendo 18 dias após a inoculação

(FIGURA 3B), indicando a interferência dessa proteína nesse grupo. Experimentos em camundongos lúpicos (MARENGO et al., 2008) e em modelos de Uveíte Autoimune Experimental (MARENGO et al., 2009) indicaram a participação das Hsp60 em autoimunidades. Sendo assim, a Hsp65r WT de *M. leprae* parece atuar em sistemas biológicos em desequilíbrio, ou entropia elevada, e/ou com processos crônico-degenerativos instalados, como os possivelmente presentes no processo de envelhecimento nessas linhagens. Comparativamente aos animais envelhecidos, a primeira morte em fêmeas H<sub>III</sub> adultas ocorreu 239 dias após a administração da proteína nativa (FIGURA 4), período 13 vezes maior que as fêmeas envelhecidas; esse efeito mais pronunciado da proteína WT em camundongos envelhecidos reforça a ideia da participação da molécula no decorrer do envelhecimento.

Em contrapartida, fêmeas L<sub>III</sub> apresentaram aumento do TMS quando inoculadas com a proteína nativa (FIGURA 3D), efeito possivelmente relacionado com o fenótipo de baixa resposta de anticorpos. Indivíduos dessa linhagem possuem um limiar de produção de imunoglobulinas 18 vezes menor que camundongos *Swiss*, utilizados no início dessa seleção (BIOZZI et al., 1979), e baixa proliferação de linfócitos T, possivelmente ocasionada por um defeito na expressão do receptor de IL-2 ou em sua afinidade, o que prejudica sua capacidade proliferativa, de maturação e consequente diminuição da resposta a epítomos apresentados (CANTRELL e SMITH, 1983; REIS et al., 1992; SAITO et al., 1990).

Outro dado importante a ser considerado é a não alteração do TMS de camundongos machos, de ambas as linhagens. O sistema imunológico é regulado diferentemente nos dois gêneros pelos hormônios sexuais (BOUMAN et al., 2004) e tal dimorfismo na resposta imune é positivamente relacionado com a diferente susceptibilidade a infecções, doenças autoimunes e incidência de tumores (OTTONELLO et al., 2002; SINGH; RAI; SINGH, 2005). Há uma dicotomia entre a imunidade de machos e fêmeas aparentemente exibida em todos os aspectos do sistema imunológico, uma vez que fêmeas têm maior concentração plasmática de imunoglobulinas, forte ativação e maior número de células T CD4<sup>+</sup>, níveis mais elevados de citocinas do tipo Th1 e uma maior resposta primária e secundária de anticorpos (AMADORI et al., 1995; MICHAELS e ROGERS, 1971), sendo mais sensíveis ao tratamento submetido nos experimentos aqui discutidos.

É importante ressaltar que as populações F<sub>0</sub> desses camundongos são geneticamente heterogêneas: sua variação fenotípica ( $V_F$ ) é devida a variância genética ( $V_G$ ) e a todas as causas de variabilidade resultantes do meio, a variância ambiental ( $V_A$ ). A seleção bidirecional causou um aumento (H) e uma diminuição (L) progressivos nas médias de

resposta de anticorpos, acompanhados da redução da  $V_F$  em ambas as linhagens (BIOZZI et al., 1979; SANT'ANNA et al., 1982). Então, a variância (V) nesse modelo experimental é dada, principalmente, pelas alterações causadas pela administração das proteínas Hsp65r WT e sua mutante K<sup>409</sup>A. A maior redução da variância foi observada em fêmeas envelhecidas da linhagem H<sub>III</sub> inoculadas com a molécula nativa, responsável pela abreviação da sobrevivência desses animais (FIGURA 3B), mostrando o impacto da inoculação na morte desses animais e excluindo-se a interferência de possíveis fatores externos no efeito observado. Vale ressaltar que, nesse modelo animal, não se exclui a participação de fatores genéticos que venham a alterar a resposta humoral dos camundongos das linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub>, como a deriva genética durante o processo de seleção, que pode ter modificado outros mecanismos além da produção de anticorpos; a epistasia, fenômeno no qual um ou mais genes alteram a expressão de outro, também pode ser pautada desde que as mudanças genéticas causadas pela seleção dos camundongos influenciem nos subprodutos de outros genes e esses sobre a resposta à proteína Hsp65 de *M. leprae*.

Nessas linhagens geneticamente selecionadas, os fenótipos opostos H e L não são restritos a antígenos específicos e, portanto, incluem resposta imune a antígenos de natureza diversa. Em camundongos, os isótipos IgG2a e IgG2b são importantes ativadores de resposta efetora, capazes de se ligar e ativar, *in vitro*, todos os receptores que reconhecem as cadeias  $\gamma$ ; as funções de IgG1, IgG2a ou IgG2b são dependentes do limiar de ativação de células do sistema imunológico, determinada pela afinidade dos anticorpos e a alta ou baixa expressão de receptores inibidores ou ativadores (NIMMERJAHN e RAVETCH, 2006). Baseando-se nesse contexto, pode-se relacionar a taxa de produção dos isótipos IgG1 e IgG2a em camundongos H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> com os fenótipos observados. Em fêmeas envelhecidas H<sub>III</sub> houve redução na razão IgG2a/IgG1 anti-DNA (FIGURA 6A) e anti-Hsp65 (FIGURA 9) após a inoculação das proteínas WT (não significativo) e K<sup>409</sup>A ( $p \leq 0,05$ ) comparativamente ao grupo controle, o oposto observado em camundongos predispostos a desenvolver lúpus (MARENGO et al., 2008); esse desbalanço foi causado por um possível redução da produção do isótipo IgG1 observado no 14º dia após a inoculação, tempo que antecede a primeira morte no grupo (18 dias).

Devido ao fato das fêmeas H<sub>III</sub> em processo de envelhecimento apresentar redução da sobrevivência após a inoculação da proteína nativa, resolveu-se comparar esse grupo com fêmeas adultas da mesma linhagem. A análise das cinéticas de produção dos isótipos no grupo experimental mostrou ligeiro aumento dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-DNA e anti-Hsp65

(FIGURA 7 e FIGURA 10, respectivamente) com o decorrer do tempo nos grupos experimentais (controle, WT e K<sup>409</sup>A). Esses animais não apresentaram mudança na razão de produção dos isótipos anti-DNA e anti-Hsp65, mantendo o equilíbrio de ativação/inibição do sistema imune; a produção dos anticorpos não foi influenciada pela administração das proteínas, apresentando-se como um processo natural do avanço da idade nos animais. O aumento gradativo na produção dos isótipos anti-Hsp65 sugere que estes sejam indicadores de envelhecimento e não que essas proteínas tivessem sido liberadas devido a um processo crônico-degenerativo causado pela inoculação das moléculas.

Diferentemente dos animais H<sub>III</sub>, machos e fêmeas envelhecidos da linhagem L<sub>III</sub> não apresentaram mudanças significativas na produção de IgG1 e IgG2a após as inoculações com as proteínas Hsp65r nativa e sua mutante K<sup>409</sup>A (FIGURA 11 e dados não mostrados). É importante observar que esses indivíduos desenvolveram certa resposta humoral contra dsDNA e Hsp65, indicando que no processo de envelhecimento possa ocorrer resposta de anticorpos contra antígenos bacterianos e antígenos próprios, inclusive em indivíduos maus respondedores.

Em camundongos lúpicos, inoculação da proteína mutante anteriormente à nativa é capaz de inibir, mas não reverter o efeito da proteína nativa na mortalidade desses animais, comparativamente a camundongos que receberam inicialmente a proteína WT e depois a K<sup>409</sup>A, neutralizando o padrão de desequilíbrio endógeno do lúpus e apresentando um papel protetor nessa doença (MARENGO et al., 2008). Devido ao fato desse possível papel protetor da proteína mutante, esta foi inoculada em camundongos envelhecidos de ambos os sexos das linhagens H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> para verificar seu papel no sistema imunológico. Surpreendentemente, os animais inoculados com a proteína K<sup>409</sup>A não apresentaram aumento no TMS em relação ao grupo controle ou inoculados com a proteína WT (FIGURA 3A-D); fêmeas envelhecidas H<sub>III</sub> apresentaram aumento do isótipo IgG1 anti-DNA quando inoculadas com a molécula mutante (FIGURA 5A), mostrando que a alteração pontual nessa proteína leva à produção e reconhecimento mais específico de anticorpos.

Vários tipos de interações não-covalentes contribuem para a ligação do anticorpo aos antígenos, incluindo forças eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas e a importância de cada uma dessas ligações depende da estrutura do sítio de ligação de uma molécula de anticorpo e um determinante antigênico. A força da ligação entre apenas um sítio de ligação do anticorpo e um epítipo é chamado de *afinidade* do anticorpo, comumente representada por uma constante de dissociação que indica o quão fácil

é de separar o complexo formado pelos dois componentes. Para IgG ou IgE, a ligação envolve, no máximo, dois sítios de ligação (um em cada Fab); para a IgM pentamérica, entretanto, uma única molécula de anticorpo pode se ligar a 10 sítios diferentes. Embora a afinidade seja a mesma para um determinado epítipo, devem ser consideradas as ligações em todos os sítios disponíveis (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007). De maneira geral, não foram observados aumentos marcantes dos isótipos IgG1 e IgG2a reativos a componentes nucleares ou à Hsp65r nos camundongos machos e fêmeas da linhagem H<sub>III</sub>, demonstrando o fraco poder de ligação dos anticorpos às proteínas e a ausência de resposta específica. Para verificar a capacidade de ligação desses anticorpos, realizaram-se ensaios de avidéz de IgG anti-Hsp65.

A redução na avidéz das ligações de IgG contra Hsp65r WT foi observada em fêmeas envelhecidas e adultas da linhagem H<sub>III</sub> inoculadas com a proteína nativa (FIGURA 12B e 14A, respectivamente), mostrando que a administração de uma substância altamente conservada não desencadeia, em primeira instância, produção de anticorpos de alta afinidade. A maturação de afinidade ocorre após a imunização com o antígeno, seguida de uma ou mais doses de reforço para que os linfócitos B de memória passem a produzir anticorpos mais afins ao antígeno administrado (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007). Isso explica o fato da baixa reatividade observada nos isótipos IgG1 e IgG2a anti-Hsp65 em fêmeas H<sub>III</sub> (envelhecidas e adultas) inoculadas com a proteína mutante, pois sua administração não foi capaz de levar a produção de anticorpos de alta avidéz.

Mesmo assim, são as fêmeas H e L que apresentaram a principal diferença entre os tratamentos: as H<sub>III</sub> com menor sobrevida, enquanto que as L<sub>III</sub> têm maior TMS após a administração da proteína nativa. Para buscar a possível causa da morte desses indivíduos, foram realizadas análises histopatológicas em diferentes órgãos. Fêmeas envelhecidas H<sub>III</sub> apresentam um quadro de hepatite crônica mais disseminada pelo tecido hepático, hiperplasia do baço e, diferente das fêmeas H<sub>III</sub> e L<sub>III</sub> dos outros grupos experimentais, grau mais elevado de nefrose e nefrite crônica com infiltrado inflamatório de plasmócitos e macrófagos, além de linfócitos (FIGURA 15); essa última característica é observada no Lupus Eritematoso Sistêmico (LIGHTSTONE, 2010), o que pode confirmar a participação das Hsp em processos crônico-degenerativos e no desencadeamento de sinais clínicos semelhantes a essa doença.

As Hsp estabelecem diferentes diálogos com o sistema imune, sendo alvos de linfócitos T específicos e anticorpos em indivíduos jovens e presentes durante o curso de autoimunidades (QUINTANA e COHEN, 2008). O manejo adaptativo de sistemas biológicos

de acordo com mudanças ambientais é essencial para a sobrevivência dos organismos e as moléculas de Hsp podem interferir quantitativamente e qualitativamente nos fenótipos imunes submetidos a controles poligênicos independentes (resposta inflamatória, tolerância imunológica ou produção de anticorpos). No envelhecimento, além da perda da capacidade de controle do sistema imune, há diminuição da expressão de Hsp dependente dos chamados *Heat Shock Factors* que se encontram comprometidos, implicando na redução da produção dessas proteínas durante o estresse e no controle da homeostase celular. Além disso, a apresentação das Hsp por APC parece estar comprometida com o aumento da idade; assim, a combinação desses fatores pode ser responsável pela diminuição da imunorregulação através do reconhecimento de Hsp próprias (VAN EDEN et al., 2007). Entretanto, o aumento da expressão de Hsp e seus determinantes antigênicos podem evoluir não somente para um mecanismo patogênico, mas também para a regulação de processos crônico-degenerativos (RAJIAH e MOUDGIL, 2009). Estudos sugerem que as Hsp são antígenos detectados por células T reguladoras naturais, devendo ser apresentadas via moléculas do MHC-II (NISHIKAWA et al., 2005); na periferia, as Hsp bacterianas ativam linfócitos T, mas proteínas próprias causam tolerância (PAUL et al., 2000).

De maneira geral, as proteínas apresentam efeitos pleiotrópicos nos sistemas biológicos, influenciando as respostas de diferentes tipos celulares e a produção de outras moléculas. A *PLEIOTROPIA* é descrita como o efeito de um único gene em múltiplos fenótipos não relacionados, em que um produto celular, por exemplo, é usado por várias células ou tem uma função de sinalização em vários alvos. Como comentado anteriormente, as Hsp interferem não somente na produção de anticorpos, mas também na produção de citocinas, ativação de diversos tipos celulares e na quebra da tolerância ao próprio, apresentando um efeito pleiotrópico no sistema imune. A *TEORIA DO ENVELHECIMENTO* proposta por George C. Williams tem como base a pleiotropia, sugerindo que alguns genes responsáveis pela aptidão aumentada em jovens férteis contribuem para a diminuição dessa aptidão mais tarde na vida (WILLIAMS, 1957). As Hsp são essenciais na manutenção da homeostase celular, e as alterações em fatores reguladores durante o processo de envelhecimento ocasionam aumento no erro metabólico e no acúmulo de proteínas no organismo, apresentando-se como toxinas.

Ilya Prigogine propôs que sistemas biológicos adquirem um estado ordenado a partir de configurações relativamente desorganizadas ao custo da irreversibilidade, agregando um novo tipo de estado dinâmico, definido como estrutura dissipativa (PRIGOGINE, 2003,



1978). Como demonstrado anteriormente, a administração passiva da Hsp65r WT interferiu no equilíbrio endógeno aumentando a entropia do sistema imunobiológico, verificado pela morte precoce de camundongos lúpicos. A seguinte equação linear foi proposta:

$$y = a + \Delta_i$$

Assim, a história imunológica de um indivíduo ( $y$ ) é única e irreversível e cumulativa; no agravamento contínuo de um processo autoimune ( $a$ ), há aumento progressivo na entropia ( $\Delta_i$ ) que resulta na incapacidade de regeneração dos tecidos nos sistemas afetados; o  $\Delta$  é o aumento da entropia ou desordem (sempre  $>0$ ) e o  $i$  representa o número de episódios autoimunes (MARENGO et al., 2008). Em camundongos da Seleção III, os quais não têm pré-disposição a processos autoimunes naturais, a variável “ $a$ ” inclui os processos crônico-degenerativos possivelmente incidentes no envelhecimento e “ $i$ ” é dado pela somatória dos seguintes fatores moduladores da entropia: a) idade; b) sexo; c) taxa de produção de anticorpos; d) alterações celulares e moleculares encontradas na linhagem. Todos esses elementos interferem na maneira como as Hsp interagem com o sistema imune de camundongos bons respondedores; portanto, quanto maior a influência de “ $i$ ”, maior a energia entrópica, dificultando o reequilíbrio da homeostase e contribuindo para a morte dos animais.

Apesar das diferenças na produção de anticorpos não serem marcantes nos experimentos realizados, talvez o dobro na produção de anticorpos em fêmeas H<sub>III</sub> em relação aos machos (BIOZZI et al., 1979), associado a mudanças que ocorrem no sistema imune, seja suficiente para causar suas mortes. Paralelamente, a alta taxa de produção dos anticorpos em animais H<sub>III</sub>, além de aumentar a entropia do sistema, pode acarretar na afinidade reduzida pela proteína, facilitando sua subsequente ligação a antígenos próprios. Em caso de desbalanço da regulação devido à superestimulação por estresses ou inflamação, doenças autoimunes podem emergir ou se agravar, como observado na ruptura do balanço no Lupus Eritematoso Sistêmico após a inoculação da proteína Hsp65 WT em camundongos susceptíveis a essa doença (MARENGO et al., 2008; PROHASZKA e FUST, 2004). O inverso ocorreu em fêmeas L<sub>III</sub> tratadas com a molécula WT, as quais tiveram um aumento no TMS, sugerindo que a baixa produção de imunoglobulinas foi responsável por controlar os efeitos da proteína inoculada e proteger o sistema imune. Além disso, a linhagem L<sub>III</sub> pode apresentar um mecanismo gênico mais controlado de produção de anticorpos e de suas ações no sistema imune, mantendo o balanço dos isótipos, homeostase e o nível de entropia nesses animais.

## 6 CONCLUSÃO

Mais que um efeito do fenótipo da produção de anticorpos frente a administração da Hsp65r WT, o efeito pleiotrópico extenso do sistema imune e o aumento da entropia, provocados pelo tratamento, causaram ampliação da desordem em fêmeas H<sub>III</sub>, indivíduos que devem apresentar naturalmente grau mais elevado de entropia. Além disso, o sistema imune remodelado durante o processo de envelhecimento apresentaria maior grau de entropia e a administração passiva da Hsp65r WT de *M. leprae* em fêmeas envelhecidas causa desequilíbrio em um sistema que não se assemelha àquele de indivíduos jovens, originando processos irreversíveis capazes de levar à morte. Como a história imunológica do indivíduo envelhecido é complexa e influenciada por fatores ambientais endógenos e/ou exógenos, chega-se um determinado limiar que o sistema não é capaz de reequilibrar-se, levando à morte.

**REFERÊNCIAS<sup>1</sup>**

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular immunology**. 6th edition. Philadelphia, PA, USA: Elsevier, 2007. 574 p.

AFEK, A. et al. Immunization of low-density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heat shock protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis. **J. Autoimmun.**, v. 14, n. 2, p. 115-121, 2000.

AGRAWAL, A.; AGRAWAL, S.; GUPTA, S. Dendritic cells in human aging. **Exp. Gerontol.**, v. 42, n. 5, p. 421-426, 2007.

AMADORI, A. et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. **Nat. Med.**, v. 1, n. 12, p. 1279-1283, 1995.

ANDERSON, K. M.; SRIVASTAVA, P. K. Heat, heat shock, heat shock proteins and death: a central link in innate and adaptive immune responses. **Immunol. Lett.**, v. 74, n. 1, p. 35-39, 2000.

ASPINALL, R. Age-associated thymic atrophy in the mouse is due to a deficiency affecting rearrangement of the TCR during intrathymic T cell development. **J. Immunol.**, v. 158, n. 7, p. 3037-3045, 1997.

ASPINALL, R.; ANDREW, D. Thymic involution in aging. **J. Clin. Immunol.**, v. 20, n. 4, p. 250-256, 2000.

BASSAN, M. et al. The identification of secreted heat shock 60 -like protein from rat glial cells and a human neuroblastoma cell line. **Neurosci. Lett.**, v. 250, n. 1, p. 37-40, 1998.

BENOIST, C.; MATHIS, D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 9, p. 797-801, 2001.

BIOZZI, G. et al. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 85, n. p. 31-98, 1979.

---

<sup>1</sup> De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BLACKBURN, S. D. et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. **Nat. Immunol.**, v. 10, n. 1, p. 29-37, 2009.

BONATO, V. L. et al. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-infected mice. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 1, p. 169-175, 1998.

BOUMAN, A. et al. Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 52, n. 1, p. 19-26, 2004.

BOUREE, P. Immunity and immunization in elderly. **Pathol. Biol. (Paris)**, v. 51, n. 10, p. 581-585, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n. p. 248-254, 1976.

BRUUNSGAARD, H. et al. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. **Am. J. Med.**, v. 115, n. 4, p. 278-283, 2003.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 351-366, 1998.

BUTCHER, S.; CHAHHEL, H.; LORD, J. M. Review article: ageing and the neutrophil: no appetite for killing? **Immunology**, v. 100, n. 4, p. 411-416, 2000.

CANTRELL, D. A.; SMITH, K. A. Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. **J. Exp. Med.**, v. 158, n. 6, p. 1895-1911, 1983.

CARAMALHO, I. et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 4, p. 403-411, 2003.

CARNES, B. A.; STAATS, D. O.; SONNTAG, W. E. Does senescence give rise to disease? **Mech. Ageing Dev.**, v. 129, n. 12, p. 693-699, 2008.

CHAMBERLAIN, W. D.; FALTA, M. T.; KOTZIN, B. L. Functional subsets within clonally expanded CD8(+) memory T cells in elderly humans. **Clin. Immunol.**, v. 94, n. 3, p. 160-172, 2000.

CLAYTON, A. et al. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. **J. Cell. Sci.**, v. 118, n. Pt 16, p. 3631-3638, 2005.

COBELENS, P. M. et al. Treatment of adjuvant-induced arthritis by oral administration of mycobacterial Hsp65 during disease. **Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 12, p. 2694-2702, 2000.

COSSARIZZA, A. et al. Cytometric analysis of immunosenescence. **Cytometry**, v. 27, n. 4, p. 297-313, 1997.

COVELLI, V. et al. Inheritance of immune responsiveness, life span, and disease incidence in interline crosses of mice selected for high or low multispecific antibody production. **J. Immunol.**, v. 142, n. 4, p. 1224-1234, 1989.

DAVIES, E. L. et al. Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 145, n. 1, p. 183-189, 2006.

DE FRANCO, M. et al. T helper subset involvement in two high antibody responder lines of mice (Biozzi mice): HI (susceptible) and HII (resistant) to collagen-induced arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 1, p. 132-136, 1995.

DE KLEER, I. M. et al. The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30+ T cells directed to human heat-shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 7, p. 2001-2010, 2003.

DORIA, G. et al. Genetic control of immune responsiveness, aging and tumor incidence. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 96, n. 1-3, p. 1-13, 1997.

DORSHKIND, K.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; SIGNER, R. A. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 1, p. 57-62, 2009.

DUDANI, A. K.; GUPTA, R. S. Immunological characterization of a human homolog of the 65-kilodalton mycobacterial antigen. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 9, p. 2786-2793, 1989.

EFFROS, R. B. Role of T lymphocyte replicative senescence in vaccine efficacy. **Vaccine**, v. 25, n. 4, p. 599-604, 2007.

EL-ZAATARI, F. A. et al. Nucleotide sequence analysis and seroreactivities of the 65K heat shock protein from *Mycobacterium paratuberculosis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 2, n. 6, p. 657-664, 1995.

ELLIS, R. J.; VAN DER VIES, S. M. Molecular chaperones. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 60, n. p. 321-347, 1991.

ERSHLER, W. B.; KELLER, E. T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. **Annu. Rev. Med.**, v. 51, n. p. 245-270, 2000.

FEIGE, U.; VAN EDEN, W. Infection, autoimmunity and autoimmune disease. **EXS**, v. 77, n. p. 359-373, 1996.

FERREIRA, V. et al. Potentialities of immunocompetent cells in high and low antibody-producing lines of mice obtained by selective breedings for responsiveness to flagellar or somatic antigens of *Salmonellae*. **J. Immunogenet.**, v. 12, n. 6, p. 309-319, 1985.

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 908, n. p. 244-254, 2000.

FRANCESCHI, C. et al. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. **Immunol. Today**, v. 16, n. 1, p. 12-16, 1995.

FRASCA, D. et al. Reduced Ig class switch in aged mice correlates with decreased E47 and activation-induced cytidine deaminase. **J. Immunol.**, v. 172, n. 4, p. 2155-2162, 2004.

GALDIERO, M.; DE L'ERO, G. C.; MARCATILI, A. Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 2, p. 699-707, 1997.

GARRIDO, C. et al. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 286, n. 3, p. 433-442, 2001.

GEORGOPOULOS, C. The emergence of the chaperone machines. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 17, n. 8, p. 295-299, 1992.

GEORGOPOULOS, C.; MCFARLAND, H. Heat shock proteins in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. **Immunol. Today**, v. 14, n. 8, p. 373-375, 1993.

GINALDI, L. et al. Immunological changes in the elderly. **Aging (Milano)**, v. 11, n. 5, p. 281-286, 1999.

GINALDI, L. et al. Immunosenescence and infectious diseases. **Microbes. Infect.**, v. 3, n. 10, p. 851-857, 2001.

GORONZY, J. J.; LEE, W. W.; WEYAND, C. M. Aging and T-cell diversity. **Exp. Gerontol.**, v. 42, n. 5, p. 400-406, 2007.

HAJEER, A. H. et al. Monoclonal antibody epitopes of mycobacterial 65-kD heat-shock protein defined by epitope scanning. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 89, n. 1, p. 115-119, 1992.

HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. **Tissue Antigens**, v. 70, n. 3, p. 179-189, 2007.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 16, n. 6, p. 574-581, 2009.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1852-1858, 2002.

HASLER, P.; ZOUALI, M. Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. **Cell Immunol.**, v. 233, n. 2, p. 102-108, 2005.

HEMMINGSSEN, S. M. et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. **Nature**, v. 333, n. 6171, p. 330-334, 1988.

HIGHTOWER, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 191-197, 1991.

HIGHTOWER, L. E.; GUIDON, P. T., JR. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. **J. Cell Physiol.**, v. 138, n. 2, p. 257-266, 1989.

IAKOUBOV, L. Z.; TORCHILIN, V. P. A novel class of antitumor antibodies: nucleosome-restricted antinuclear autoantibodies (ANA) from healthy aged nonautoimmune mice. **Oncol. Res.**, v. 9, n. 8, p. 439-446, 1997.

IBANEZ, O. M. et al. Polygenic control of quantitative antibody responsiveness: restrictions of the multispecific effect related to the selection antigen. **Immunogenetics**, v. 28, n. 1, p. 6-12, 1988.

IBANEZ, O. M. et al. Low antibody responsiveness is found to be associated with resistance to chemical skin tumorigenesis in several lines of Biozzi mice. **Cancer Lett.**, v. 136, n. 2, p. 153-158, 1999.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat. Genet.**, v. 33 Suppl, n. p. 245-254, 2003.

JANSSENS, J. P.; KRAUSE, K. H. Pneumonia in the very old. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 112-124, 2004.

JENSEN, J. R. et al. Involvement of antibody production quantitative trait loci in the susceptibility to pristane-induced arthritis in the mouse. **Genes Immun.**, v. 7, n. 1, p. 44-50, 2006.

JOHNSON, S. A.; CAMBIER, J. C. Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity. **Arthritis Res. Ther.**, v. 6, n. 4, p. 131-139, 2004.

KAUFMANN, S. H. Heat shock proteins and the immune response. **Immunol. Today**, v. 11, n. 4, p. 129-136, 1990.

KISHIMOTO, S. et al. Age-related changes in the subsets and functions of human T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 121, n. 5, p. 1773-1780, 1978.

KOL, A. et al. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 4, p. 571-577, 1999.

KOL, A. et al. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. **J. Immunol.**, v. 164, n. 1, p. 13-17, 2000.

KONG, T. H. et al. Mycobacterium tuberculosis expresses two chaperonin-60 homologs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 7, p. 2608-2612, 1993.



KRAUSE, D. et al. Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well-nourished women. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 112, n. 1, p. 43-57, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEHNER, T. et al. Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, n. 2, p. 594-603, 2000.

LIAO, D. F. et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 1, p. 189-196, 2000.

LICASTRO, F. et al. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. **Immun. Ageing**, v. 2, n. p. 8, 2005.

LIGHTSTONE, L. Lupus nephritis: where are we now? **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 22, n. 3, p. 252-256, 2010.

LITHGOW, G. J. Why aging isn't regulated: a lamentation on the use of language in aging literature. **Exp. Gerontol.**, v. 41, n. 10, p. 890-893, 2006.

LUNA, E. et al. Diversity of physiological cell reactivity to heat shock protein 60 in different mouse strains. **Cell Stress Chaperones**, v. 12, n. 2, p. 112-122, 2007.

LYNCH, J. P., 3RD; WALSH, E. E. Influenza: evolving strategies in treatment and prevention. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v. 28, n. 2, p. 144-158, 2007.

MANTLE, R.; SINGH, B.; HACHINSKI, V. Do serum antibodies to heat-shock protein 65 relate to age or stroke? **Lancet**, v. 346, n. 8991-8992, p. 1715, 1995.

MARENGO, E. B. **Caracterização da especificidade primária da hsp65r de Mycobacterium leprae e estudo da possível relação desta atividade com o seu poder imunogênico.** 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - UNIFESP/Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2003.

MARENGO, E. B. et al. Administration of Mycobacterium leprae rHsp65 aggravates experimental autoimmune uveitis in mice. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7912, 2009.

MARENGO, E. B. et al. Administration of *M. leprae* Hsp65 interferes with the murine lupus progression. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. e3025, 2008.

MARQUES, M. A. et al. Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 6, p. 2625-2631, 1998.

MCELHANEY, J. E.; EFFROS, R. B. Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 418-424, 2009.

MICHAELS, R. M.; ROGERS, K. D. A sex difference in immunologic responsiveness. **Pediatrics**, v. 47, n. 1, p. 120-123, 1971.

MILLER, R. A. The aging immune system: primer and prospectus. **Science**, v. 273, n. 5271, p. 70-74, 1996.

MIYAJI, C. et al. Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians. **Hum. Immunol.**, v. 61, n. 9, p. 908-916, 2000.

MORE, S. H.; BRELOER, M.; VON BONIN, A. Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60-mediated activation of cytotoxic T cells. **Int. Immunol.**, v. 13, n. 9, p. 1121-1127, 2001.

MORIMOTO, R. I. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. **Genes Dev.**, v. 22, n. 11, p. 1427-1438, 2008.

MOUTON, D. et al. Genetic selection for antibody responsiveness in mice: further evidence for inverse modification of macrophage catabolic activity without alteration of the expression of T-cell-mediated immunity. **Ann. Immunol. (Paris)**, v. 135D, n. 2, p. 173-186, 1984.

MOUTON, D.; STIFFEL, C.; BIOZZI, G. Genetic factors of immunity against infection. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, v. 136D, n. 2, p. 131-141, 1985.

NAKAI, A.; MORIMOTO, R. I. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, n. 4, p. 1983-1997, 1993.

NARDAI, G.; CSERMELY, P.; SOTI, C. Chaperone function and chaperone overload in the aged. A preliminary analysis. **Exp. Gerontol.**, v. 37, n. 10-11, p. 1257-1262, 2002.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Fc $\gamma$  receptors: old friends and new family members. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 19-28, 2006.

NISHIKAWA, H. et al. Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 201, n. 5, p. 681-686, 2005.

O'MAHONY, L. et al. Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 113, n. 2, p. 213-219, 1998.

OLDSTONE, M. B. Molecular mimicry and autoimmune disease. **Cell**, v. 50, n. 6, p. 819-820, 1987.

OLSON, J. K.; CROXFORD, J. L.; MILLER, S. D. Virus-induced autoimmunity: potential role of viruses in initiation, perpetuation, and progression of T-cell-mediated autoimmune disease. **Viral Immunol.**, v. 14, n. 3, p. 227-250, 2001.

OTTONELLO, L. et al. Delayed neutrophil apoptosis induced by synovial fluid in rheumatoid arthritis: role of cytokines, estrogens, and adenosine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 966, n. p. 226-231, 2002.

PAHWA, S. G.; PAHWA, R. N.; GOOD, R. A. Decreased in vitro humoral immune responses in aged humans. **J. Clin. Invest.**, v. 67, n. 4, p. 1094-1102, 1981.

PANDEY, J. P. et al. Autoantibodies in healthy subjects of different age groups. **Mech. Ageing Dev.**, v. 10, n. 6, p. 399-404, 1979.

PARADA, C. **Atividade autolítica da hsp65 de Mycobacterium leprae: Nova rota de apresentação de antígenos?** 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PAUL, A. G. et al. Highly autoproliiferative T cells specific for 60-kDa heat shock protein produce IL-4/IL-10 and IFN- $\gamma$  and are protective in adjuvant arthritis. **J. Immunol.**, v. 165, n. 12, p. 7270-7277, 2000.

PAWELEC, G.; SOLANA, R. Immunosenescence. **Immunol. Today**, v. 18, n. 11, p. 514-516, 1997.

PAWELEC, G. et al. Impact of aging on innate immunity. **J. Leukoc. Biol.**, v. 64, n. 6, p. 703-712, 1998.

PEREIRA, C. M. et al. IMPACT, a protein preferentially expressed in the mouse brain, binds GCN1 and inhibits GCN2 activation. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 31, p. 28316-28323, 2005.

PIRKKALA, L.; NYKANEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **FASEB J.**, v. 15, n. 7, p. 1118-1131, 2001.

PLACKETT, T. P. et al. Aging and innate immune cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 76, n. 2, p. 291-299, 2004.

PLOWDEN, J. et al. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. **Aging Cell**, v. 3, n. 4, p. 161-167, 2004.

POCKLEY, A. G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. **Lancet**, v. 362, n. 9382, p. 469-476, 2003.

PORTARO, F. C. et al. The *Mycobacterium leprae* hsp65 displays proteolytic activity. Mutagenesis studies indicate that the *M. leprae* hsp65 proteolytic activity is catalytically related to the HslVU protease. **Biochemistry**, v. 41, n. 23, p. 7400-7406, 2002.

PRELOG, M. Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? **Autoimmun. Rev.**, v. 5, n. 2, p. 136-139, 2006.

PRIGOGINE, I. Chemical kinetics and dynamics. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 988, n. p. 128-132, 2003.

PRIGOGINE, I. Time, Structure, and Fluctuations. **Science**, v. 201, n. 4358, p. 777-785, 1978.

PROHASZKA, Z. et al. Antibodies against human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement-activating ability. **Int. Immunol.**, v. 11, n. 9, p. 1363-1370, 1999.

PROHASZKA, Z.; FUST, G. Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. **Mol. Immunol.**, v. 41, n. 1, p. 29-44, 2004.

PULLEN, G. R.; FITZGERALD, M. G.; HOSKING, C. S. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. **J. Immunol. Methods**, v. 86, n. 1, p. 83-87, 1986.

QAMRA, R.; MANDE, S. C. Crystal structure of the 65-kilodalton heat shock protein, chaperonin 60.2, of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 23, p. 8105-8113, 2004.

QAMRA, R.; SRINIVAS, V.; MANDE, S. C. *Mycobacterium tuberculosis* GroEL homologues unusually exist as lower oligomers and retain the ability to suppress aggregation of substrate proteins. **J. Mol. Biol.**, v. 342, n. 2, p. 605-617, 2004.

QUEIROZ-DA-SILVA, L. H.; DE-FRANCO, M.; SANT'ANNA, O. A. Rabies infection and specific effect of vaccination in mice selected for high and low immunobiological parameters. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 11, p. 1309-1313, 1997.

QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. HSP60 speaks to the immune system in many voices. **Novartis Found Symp.**, v. 291, n. p. 101-111; discussion 111-104, 137-140, 2008.

RAJIAIAH, R.; MOUDGIL, K. D. Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. **Autoimmun. Rev.**, v. 8, n. 5, p. 388-393, 2009.

RAMOS-CASALS, M. et al. Autoimmunity and geriatrics: clinical significance of autoimmune manifestations in the elderly. **Lupus**, v. 12, n. 5, p. 341-355, 2003.

REA, I. M.; MCNERLAN, S.; POCKLEY, A. G. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. **Exp. Gerontol.**, v. 36, n. 2, p. 341-352, 2001.

REIS, M. H. et al. T-helper functions in lines of mice selected for high or low antibody production (Selection III): modulation by anti-CD4+ monoclonal antibody. **Immunology**, v. 75, n. 1, p. 80-85, 1992.

RENSHAW, M. et al. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. **J. Immunol.**, v. 169, n. 9, p. 4697-4701, 2002.

RITOSSA, F. M. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. n. 18, p. 3, 1962.

RYBKKA, K. et al. Age related natural antiviral non-specific immunity of human leukocytes. **Med. Sci. Monit.**, v. 9, n. 12, p. BR413-417, 2003.

SAITO, Y. et al. Stepwise formation of the high-affinity complex of the interleukin 2 receptor. **Int. Immunol.**, v. 2, n. 12, p. 1167-1177, 1990.

SANT'ANNA, O. A. et al. Genetic parameters of the polygenic regulation of antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of salmonellae. **J. Immunogenet.**, v. 9, n. 3, p. 191-205, 1982.

SARGE, K. D.; MURPHY, S. P.; MORIMOTO, R. I. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, n. 3, p. 1392-1407, 1993.

SARGE, K. D. et al. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. **Genes Dev.**, v. 5, n. 10, p. 1902-1911, 1991.

SEGAL, R. et al. The effect of IL-12 on clinical and laboratory aspects of experimental SLE in young and aging mice. **Exp. Gerontol.**, v. 38, n. 6, p. 661-668, 2003.

SINGH, M. P.; RAI, A. K.; SINGH, S. M. Gender dimorphism in the progressive in vivo growth of a T cell lymphoma: involvement of cytokines and gonadal hormones. **J. Reprod. Immunol.**, v. 65, n. 1, p. 17-32, 2005.

SIQUEIRA, M. et al. Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of salmonellae. **Eur. J. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 241-249, 1976.

SLAVOTINEK, A. M.; BIESECKER, L. G. Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. **Trends Genet.**, v. 17, n. 9, p. 528-535, 2001.

SNOECKX, L. H. et al. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 4, p. 1461-1497, 2001.

SRIVASTAVA, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 185-194, 2002.

STACY, S. et al. Immunological memory and late onset autoimmunity. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 123, n. 8, p. 975-985, 2002.

STEGER, M. M.; MACZEK, C.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. Morphologically and functionally intact dendritic cells can be derived from the peripheral blood of aged individuals. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 105, n. 3, p. 544-550, 1996.

STEINHOFF, U. et al. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. **Immunity**, v. 11, n. 3, p. 349-358, 1999.

THOLE, J. E. et al. Antigenic relatedness of a strongly immunogenic 65 kDA mycobacterial protein antigen with a similarly sized ubiquitous bacterial common antigen. **Microb. Pathog.**, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1988.

THOMPSON, S. J. et al. Autoimmune reactions to heat-shock proteins in pristane-induced arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, n. 11, p. 2479-2484, 1990.

TISSIERES, A.; MITCHELL, H. K.; TRACY, U. M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. **J. Mol. Biol.**, v. 84, n. 3, p. 389-398, 1974.

TOWER, J. Hsps and aging. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 20, n. 5, p. 216-222, 2009.

TRZONKOWSKI, P. et al. From bench to bedside and back: the SENIEUR Protocol and the efficacy of influenza vaccination in the elderly. **Biogerontology**, v. 10, n. 1, p. 83-94, 2009.

TSUMIYAMA, K.; MIYAZAKI, Y.; SHIOZAWA, S. Self-organized criticality theory of autoimmunity. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8382, 2009.

VABULAS, R. M. et al. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 23, p. 20847-20853, 2002.

VAN EDEN, W. et al. Stress proteins as inducers and targets of regulatory T cells in arthritis. **Int. Rev. Immunol.**, v. 24, n. 3-4, p. 181-197, 2005.

VAN EDEN, W. et al. Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1113, n. p. 217-237, 2007.

VAN ROON, J. A. et al. Stimulation of suppressive T cell responses by human but not bacterial 60-kD heat-shock protein in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 2, p. 459-463, 1997.

VASSAO, R. C. et al. Antibody responsiveness during immunization and challenge of genetically modified antibody responder mice with murine hepatitis virus 3. **Immunobiology**, v. 207, n. 4, p. 275-283, 2003.

VOELLMY, R. Transduction of the stress signal and mechanisms of transcriptional regulation of heat shock/stress protein gene expression in higher eukaryotes. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 4, n. 4, p. 357-401, 1994.

WEISKOPF, D.; WEINBERGER, B.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. The aging of the immune system. **Transpl. Int.**, v. 22, n. 11, p. 1041-1050, 2009.

WEKSLER, M. E. Changes in the B-cell repertoire with age. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1624-1628, 2000.

WELCH, W. J. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 339, n. 1289, p. 327-333, 1993.

WENISCH, C. et al. Effect of age on human neutrophil function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, n. 1, p. 40-45, 2000.

WESTERMEIER, R.; NAVEM, T. **Proteomics in practice - A laboratory manual of proteome analysis**. 3rd Edition. Weinheim, Germany: Wiley-VHC, 2002. 342 p.

WEYAND, C. M. et al. Functional properties of CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells in the aging immune system. **Mech. Ageing Dev.**, v. 102, n. 2-3, p. 131-147, 1998.

WICK, G.; PERSCHINKA, H.; MILLONIG, G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. **Trends Immunol.**, v. 22, n. 12, p. 665-669, 2001.

WILLIAMS, G. C. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. **Evolution**, v. 11, n. 4, p. 398-411, 1957.



WUCHERPFENNIG, K. W. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 8, p. 1097-1104, 2001.

YUNG, R. L.; JULIUS, A. Epigenetics, aging, and autoimmunity. **Autoimmunity**, v. 41, n. 4, p. 329-335, 2008.

ZHANG, H. G.; GRIZZLE, W. E. Aging, immunity, and tumor susceptibility. **Immunol. Allergy Clin. North Am.**, v. 23, n. 1, p. 83-102, vi, 2003.

ZHENG, B. et al. Immunosenescence and germinal center reaction. **Immunol. Rev.**, v. 160, n. p. 63-77, 1997.

ZUGEL, U.; KAUFMANN, S. H. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 1, p. 19-39, 1999.

ZUO, J. et al. Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, n. 11, p. 7557-7568, 1994.

## **ANEXOS**

**ANEXO A – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida H<sub>III</sub> inoculada com a proteína nativa.**



**Instituto Veterinário de Imagem**

Consultório Veterinário De Martin - CNPJ 00.600.199/0001-99

Rua Agissé, 128 - Vila Madalena - 05439-010 - São Paulo

http://www.ivi.vet.br - e-mail: info@ivi.vet.br

☎ (0XX11) 3034-5447

Radiologia - Ultra-sonografia com "doppler" colorido - Citologia Aspirativa guiada pelo Ultra-som  
Laboratório Clínico - Microbiologia - Imunofluorescência - Necropsia e Histopatologia - Cardiologia  
Eletrcardiografia - Ecodopplercardiografia colorido - Oncologia - Citologia  
Endoscopia e Colonoscopia - Medicina Nuclear (consultório)

No. do Exame: 001213075

Data de Coleta: 14/06/2010

Espécie: *Mus musculus* (Linhagem H<sub>III</sub> - inoculada com 2,5 µg Hsp65r WT)

Idade: 1 ano

Gênero: fêmea

Médico Vet.: Cláudia Ferreira.

**LAUDO HISTOPATOLÓGICO**

Avaliação macroscópica: enviados várias amostras de órgãos; inclusão total da amostra, 1 bloco e 12 fragmentos. Técnica histológica: Hematoxilina-eosina.

Avaliação microscópica:

- *Fígado*: presença de hepatócitos arranjados em trabéculas, por vezes evidenciando células grandes com nucléolo grande arredondado, cromatina grosseira e nucléolos evidenciados (megalócitos) e várias células binucleadas. Nota-se discreta degeneração vacuolar difusa, dilatação vascular portal e discreto infiltrado inflamatório multifocal com predomínio de linfócitos em zona 3;
- *Baço*: presença de algumas células hematopoiéticas imaturas e reatividade em centros germinativos com atividade mitótica e linfoblastos;
- *Rim*: presença de discreta degeneração epitelial tubular, por vezes com material amorfo e eosinofílico intraluminal; infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e poucos macrófagos intersticial multifocal;
- *Coração*: presença de discreta congestão;
- *Pulmão*: presença congestão discreta e focos de pigmentação acastanhada no citoplasma de células de septos alveolares (hemossiderina);

**Conclusão:** hepatite crônica multifocal discreta; hematopoiese extramedular esplênica e hiperplasia linfóide discreta; nefrite intersticial crônica e nefrose.

Responsável pelo laudo: Dra. Cláudia Ferreira dos Santos

Fone: 9868-3337

E-mail: [claufesan@uol.com.br](mailto:claufesan@uol.com.br)

Dra. Claudia F. Santos  
CRMV/SP 9231

## ANEXO B – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida L<sub>III</sub> inoculada com a proteína nativa



### Instituto Veterinário de Imagem

Consultório Veterinário De Martin - CNPJ 00.600.199/0001-99

Rua Agissé, 128 - Vila Madalena - 05439-010 - São Paulo

http://www.ivi.vet.br - e-mail: info@ivi.vet.br

☎(0XX11) 3034-5447

Radiologia - Ultra-sonografia com "doppler" colorido - Citologia Aspirativa guiada pelo Ultra-som  
Laboratório Clínico - Microbiologia - Imunofluorescência - Necropsia e Histopatologia - Cardiologia  
Eletrcardiografia - Ecodopplercardiografia colorido - Oncologia - Citologia  
Endoscopia e Colonoscopia - Medicina Nuclear (consultório)

No. do Exame: 001213076

Data de Coleta: 14/06/2010

Espécie: *Mus musculus* (Linhagem L<sub>III</sub> - inoculada com 2,5 µg Hsp65r WT)

Idade: 1 ano

Gênero: fêmea

Médico Vet.: Cláudia Ferreira.

### LAUDO HISTOPATOLÓGICO

Avaliação macroscópica: enviados várias amostras de órgãos; inclusão total da amostra, 1 bloco e 8 fragmentos. Técnica histológica: hematoxilina-eosina.

#### Avaliação microscópica:

- *Fígado*: presença de hepatócitos arranjados em trabéculas, raramente evidenciando células grandes com nucléolo grande arredondado, cromatina grosseira e nucléolos evidenciados (megalócitos) e algumas células binucleadas. Nota-se dilatação vascular portal e em zona 3, além de mínimo infiltrado inflamatório focal de linfócitos em zona 3;
- *Baço*: presença de algumas células hematopoiéticas imaturas e hipoplasia folicular;
- *Rim*: presença de discreta congestão e dilatação vascular cortical; foco de infiltrado inflamatório linfocitário em pelve;
- *Pulmão*: presença de congestão discreta;
- *Coração*: presença de discreta congestão;

**Conclusão:** hepatite crônica focal discreta; hematopoiese extramedular esplênica; pielite crônica focal; congestão pulmonar.

Responsável pelo laudo: Dra. Cláudia Ferreira dos Santos

Fones: 9868-3337

E-mail: [claufesan@uol.com.br](mailto:claufesan@uol.com.br)

Dra. Claudia F. Santos  
CRMV/SP 9231

**ANEXO C – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida H<sub>III</sub> pertencente ao grupo controle.**



**Instituto Veterinário de Imagem**

Consultório Veterinário De Martin - CNPJ 00.600.199/0001-99

Rua Agissé, 128 - Vila Madalena - 05439-010 - São Paulo

http://www.ivi.vet.br - e-mail: info@ivi.vet.br

☎ (0XX11) 3034-5447

Radiologia - Ultra-sonografia com "doppler" colorido - Citologia Aspirativa guiada pelo Ultra-som  
Laboratório Clínico - Microbiologia - Imunofluorescência - Necropsia e Histopatologia - Cardiologia  
Eletrcardiografia - Ecodopplercardiografia colorido - Oncologia - Citologia  
Endoscopia e Colonoscopia - Medicina Nuclear (consultório)

No. do Exame: 001215070

Data de Coleta: 14/06/2010

Espécie: *Mus musculus* (Linhagem H<sub>III</sub> – grupo controle)

Idade: 1 ano

Gênero: fêmea

Médico Vet.: Cláudia Ferreira.

**LAUDO HISTOPATOLÓGICO**

Avaliação macroscópica: enviados várias amostras de órgãos; inclusão total da amostra, 1 bloco e 8 fragmentos. Técnica histológica: Hematoxilina-eosina.

Avaliação microscópica:

- *Fígado*: presença de hepatócitos arranjados em trabéculas, por vezes evidenciando células grandes com nucléolo grande arredondado, cromatina grosseira e nucléolos evidenciados (megalócitos) e várias células binucleadas. Nota-se discreta degeneração vacuolar difusa, dilatação vascular portal e mínimo infiltrado inflamatório focal com predomínio de linfócitos em zona 3;
- *Rim*: presença discreto infiltrado inflamatório de linfócitos intersticial multifocal e na região de pelve renal;
- *Coração*: presença de discreta congestão;
- *Pulmão*: presença congestão discreta e focos de pigmentação acastanhada no citoplasma de células de septos alveolares (hemossiderina).
- *Baço*: presença de algumas células hematopoiéticas imaturas e discreta congestão.

**Conclusão:** hepatite crônica multifocal discreta; nefrite intersticial crônica; congestão pulmonar e cardíaca.

Responsável pelo laudo: Dra. Cláudia Ferreira dos Santos

Fones: 9868-3337

E-mail: [claufesan@uol.com.br](mailto:claufesan@uol.com.br)

Dra. Claudia F. Santos  
CRMV/SP 9231

**ANEXO D – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida L<sub>III</sub> pertencente ao grupo controle.**



**Instituto Veterinário de Imagem**

Consultório Veterinário De Martin - CNPJ 00.600.199/0001-99  
Rua Agissé, 128 - Vila Madalena - 05439-010 - São Paulo  
http://www.ivi.vet.br - e-mail: info@ivi.vet.br  
☎ (0XX11) 3034-5447

Radiologia - Ultra-sonografia com "doppler" colorido - Citologia Aspirativa guiada pelo Ultra-som  
Laboratório Clínico - Microbiologia - Imunofluorescência - Necropsia e Histopatologia - Cardiologia  
Eletrcardiografia - Ecodopplercardiografia colorido - Oncologia - Citologia  
Endoscopia e Colonoscopia - Medicina Nuclear (consultório)

No. do Exame: 001215071

Data de Coleta: 14/06/2010

Espécie: *Mus musculus* (Linhagem L<sub>III</sub> – grupo controle)

Idade: 1 ano

Gênero: fêmea

Médico Vet.: Cláudia Ferreira.

**LAUDO HISTOPATOLÓGICO**

Avaliação macroscópica: enviados várias amostras de órgãos; inclusão total da amostra, 1 bloco e 7 fragmentos. Técnica histológica: Hematoxilina-eosina.

Avaliação microscópica:

- *Fígado*: presença de hepatócitos arranjados em trabéculas, por vezes evidenciando células grandes com nucléolo grande arredondado, cromatina grosseira e nucléolos evidenciados (megalócitos) e várias células binucleadas. Nota-se discreta degeneração vacuolar difusa, dilatação vascular portal e discreto infiltrado inflamatório multifocal com predomínio de linfócitos em zona 3 e portal;
- *Rim*: presença infiltrado inflamatório discreto de linfócitos intersticial multifocal e na região de pelve renal; discreta degeneração do epitélio tubular renal;
- *Coração*: presença de discreta congestão;
- *Pulmão*: presença congestão discreta e focos de pigmentação acastanhada no citoplasma de células de septos alveolares (hemossiderina);
- *Baço*: presença de algumas células hematopoiéticas imaturas e reatividade em centros germinativos com atividade mitótica e linfoblastos; discreta congestão.

**Conclusão:** hepatite crônica multifocal discreta; nefrite intersticial crônica e nefrose; hiperplasia linfóide discreta e hematopoiese extramedular; congestão pulmonar e cardíaca.

Responsável pelo laudo: Dra. Cláudia Ferreira dos Santos

Fones: 9868-3337

E-mail: [claufesan@uol.com.br](mailto:claufesan@uol.com.br)

Dra. Claudia F. Santos  
CRMV/SP 9231

**ANEXO E – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida H<sub>III</sub> inoculada com a proteína mutante.**



**Instituto Veterinário de Imagem**

Consultório Veterinário De Martin - CNPJ 00.600.199/0001-99  
Rua Agissé, 128 - Vila Madalena - 05439-010 - São Paulo  
http://www.ivi.vet.br - e-mail: info@ivi.vet.br  
☎ (0XX11) 3034-5447

Radiologia - Ultra-sonografia com "doppler" colorido - Citologia Aspirativa guiada pelo Ultra-som  
Laboratório Clínico - Microbiologia - Imunofluorescência - Necropsia e Histopatologia - Cardiologia  
Eletrcardiografia - Ecodoppler cardiografia colorido - Oncologia - Citologia  
Endoscopia e Colonoscopia - Medicina Nuclear (consultório)

No. do Exame: 001215072

Data de Coleta: 14/06/2010

Espécie: *Mus musculus* (Linhagem H<sub>III</sub> – grupo inoculado com 2,5 µg/mL de Hsp65r K<sup>409</sup> A)

Idade: 1 ano

Gênero: fêmea

Médico Vet.: Cláudia Ferreira.

**LAUDO HISTOPATOLÓGICO**

Avaliação macroscópica: enviados várias amostras de órgãos; inclusão total da amostra, 1 bloco e 11 fragmentos. Técnica histológica: Hematoxilina-eosina.

Avaliação microscópica:

- *Fígado*: presença de hepatócitos arranjados em trabéculas, por vezes evidenciando várias células binucleadas. Nota-se discreta degeneração vacuolar difusa, dilatação vascular portal e discreto infiltrado inflamatório multifocal com predomínio de linfócitos em zona 3 e portal; foco de pigmento acastanhado no citoplasma de alguns hepatócitos;
- *Rim*: presença de discreta degeneração do epitélio tubular renal;
- *Coração*: presença de discreta congestão;
- *Pulmão*: presença congestão discreta e focos de pigmentação acastanhada no citoplasma de células de septos alveolares (hemossiderina);
- *Baço*: presença de algumas células hematopoiéticas imaturas e discreta congestão.

**Conclusão:** hepatite crônica multifocal discreta; nefrose; hematopoiese extramedular esplênica; congestão pulmonar e cardíaca.

Responsável pelo laudo: Dra. Cláudia Ferreira dos Santos

Fones: 9868-3337

E-mail: [claufesan@uol.com.br](mailto:claufesan@uol.com.br)

Dra. Claudia F. Santos  
CRMV/SP 9231

**ANEXO F – Laudo histopatológico de fêmea envelhecida L<sub>III</sub> inoculada com a proteína mutante.**



**Instituto Veterinário de Imagem**

Consultório Veterinário De Martin - CNPJ 00.600.199/0001-99  
Rua Agissé, 128 - Vila Madalena - 05439-010 - São Paulo  
http://www.ivi.vet.br - e-mail: info@ivi.vet.br  
☎ (0XX11) 3034-5447

Radiologia - Ultra-sonografia com "doppler" colorido - Citologia Aspirativa guiada pelo Ultra-som  
Laboratório Clínico - Microbiologia - Imunofluorescência - Necropsia e Histopatologia - Cardiologia  
Eletrcardiografia - Ecodopplercardiografia colorido - Oncologia - Citologia  
Endoscopia e Colonoscopia - Medicina Nuclear (consultório)

No. do Exame: 001215074

Data de Coleta: 14/06/2010

Espécie: *Mus musculus* (Linhagem L<sub>III</sub> – grupo inoculado com 2,5 µg/mL de Hsp65r K<sup>409</sup> A)

Idade: 1 ano

Gênero: fêmea

Médico Vet.: Cláudia Ferreira.

**LAUDO HISTOPATOLÓGICO**

Avaliação macroscópica: enviados várias amostras de órgãos; inclusão total da amostra, 1 bloco e 11 fragmentos. Técnica histológica: Hematoxilina-eosina.

Avaliação microscópica:

- *Fígado*: presença de hepatócitos arranjados em trabéculas, por vezes evidenciando células grandes com nucléolo grande arredondado, cromatina grosseira e nucléolos evidenciados (megalócitos) várias células binucleadas. Nota-se discreta degeneração vacuolar difusa, dilatação vascular portal e mínimo infiltrado inflamatório multifocal com predomínio de linfócitos em zona 3 e portal; foco de pigmento acastanhado no citoplasma de alguns hepatócitos; hiperplasia biliar focal;
- *Rim*: presença de discreta degeneração do epitélio tubular renal;
- *Coração*: presença de discreta congestão;
- *Pulmão*: presença congestão discreta e focos de pigmentação acastanhada no citoplasma de células de septos alveolares (hemossiderina);
- *Baço*: presença de algumas células hematopoiéticas imaturas e alguns macrófagos com pigmento dourado intracitoplasmático (hemossiderina).

**Conclusão:** hepatite crônica multifocal discreta e hiperplasia biliar focal; nefrose; hematopoiese extramedular esplênica; congestão pulmonar e cardíaca.

Responsável pelo laudo: Dra. Cláudia Ferreira dos Santos

Fones: 9868-3337

E-mail: [claufesan@uol.com.br](mailto:claufesan@uol.com.br)

Dra. Cláudia F. Santos  
CRMV/SP 9231



# 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](#)