

**THAÍS BOCCIA DA COSTA**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS T REGULADORAS GERADAS *IN VITRO*  
NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE**

**Dissertação apresentada ao Departamento  
de 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.

**THAÍS BOCCIA DA COSTA**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS T REGULADORAS GERADAS *IN VITRO*  
NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE**

**Dissertação apresentada ao  
Departamento de Imunologia do  
Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências**

**Área de concentração: Immunoregulação**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo**

**SÃO PAULO**

**2010**

## Ficha catalográfica

**Autorização para reprodução  
FORMULÁRIO NO SITE DO ICB**

## **Parecer comitê de ética**

*À minha mãe, por acreditar em mim desde o primeiro momento além de me dar todo incentivo que precisei até hoje, e aos meus amigos por estarem sempre comigo.*

*Muito obrigada!*

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, o Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo pela oportunidade de fazer parte de um laboratório tão importante não só para a realização dos inúmeros experimentos do grupo, mas também repleto de pessoas que foram importantíssimas para a minha formação acadêmica e pessoal. Muito obrigada pelas conversas durante as reuniões e por confiar no meu potencial.

Ao Laboratório de Imunologia Clínica e seus integrantes: Alessandra, Jean, Luiz, Julieta, Wesley, Eliana, Christina, Áurea e a todos os que já passaram por lá. Vocês foram muito importantes para mim. Também agradeço ao Laboratório de Biologia Celular do Prof. Gustavo, não só por compartilharmos desde reagentes até espaço físico, mas também pela descontração que este compartilhamento me proporcionou. Não teria sido da mesma forma se não dividíssemos o anexo!

Dentre os integrantes do “lab”, tenho muito a agradecer ao Luizão, por todo apoio nos experimentos e por me ensinar tanta coisa em tão pouco tempo. Agradeço também ao Jean e à Alessandra pelas inúmeras conversas sobre tudo, inclusive ciência, e por tornar o ambiente de trabalho mais divertido. À Julieta por toda a ajuda desde o primeiro dia que cheguei ao “lab” e também pelas discussões de resultados, inúmeras também.

Ao amigo Rafael Larocca que foi mais do que importante para a minha formação tanto na parte profissional como pessoal, e às minhas queridas amigas Julia e Esther por sempre estarem ao meu lado durante todos os experimentos, aulas e todas as festas, baladinhas, congressos e qualquer reunião sobre assuntos acadêmicos. Adoro vocês!

Aos professores Niels e Anderson, aos meus amigos do Departamento de Imunologia, Maíra, Lorena, Renato, Lucas, Érica, Alexandra, Zé, Patrícia, Renata, e a todos que pude conhecer por meio destes, espero tê-los como amigos a vida toda.

Ao meu amigo irmão Guilherme que sempre acreditou em mim e sempre foi o meu maior companheiro, mesmo morando em inúmeros continentes.

À minha família pelo suporte e apoio em todos os sentidos, e principalmente à minha mãe que foi, é e será sempre imprescindível nesta jornada.

Muito obrigada a TODOS!!!

*“Certa palavra dorme na sombra  
de um livro raro.*

*...*

*Vou procurá-la.*

*...*

*Procuro sempre, e minha procura  
ficará sendo  
minha palavra.”*

*Carlos Drummond de Andrade*

*“In a dark place we find ourselves... and a little more knowledge might light our way.”*

*Master Yoda*

*“The best way to get a good idea is to have a lot of ideas”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígeno do sistema imune, e há evidências recentes de seu envolvimento na manutenção da tolerância imunológica pela interação com células apoptóticas e a população de células T reguladoras. Neste estudo avaliamos as alterações ocorridas na população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> após co-cultura de células de linfonodo com DCs derivadas de células da medula óssea de camundongos BALB/c, ativadas ou não com LPS, na presença de timócitos alogênicos ou singênicos em apoptose. Após cultura na presença de células alogênicas a população de Tregs mostra-se aumentada quando comparada com a cultura com timócitos singênicos, e essa expansão é dependente de contato entre a DC e o linfócito T, uma vez que o isolamento das células por membrana transwell diminuiu drasticamente a expressão destes marcadores. A internalização de células em apoptose em ambos os contextos pelas DCs foi capaz de induzir caráter tolerogênico nestas com baixa expressão de moléculas co-estimuladoras e resistência à maturação por LPS. A produção de IL-2 e TGF- $\beta$  mostrou-se aumentada nas culturas com células alogênicas em apoptose, podendo ser o motivo da maior expansão de Tregs neste contexto juntamente com o fenótipo tolerogênico induzido nas DCs. As células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* por DCs pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose foram capazes de conter a proliferação *in vitro* de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados por esplenócitos de C57BL/6 irradiados até uma diluição de 1:50 (reguladora:respondedora). As células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> também foram capazes de regular a proliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com anti-CD3 e esplenócitos de BALB/c DO11.10 estimulados com OVA, mas nestes casos a supressão foi observada quando as Tregs estavam em maior concentração. No ensaio *in vivo*, as Tregs geradas *in vitro* também foram capazes de suprimir a proliferação de células respondedoras quando transferidas para animais Nude, impedindo também o infiltrado inflamatório no estômago, cólons, fígado e rins, sendo assim capazes de suprimir a resposta imune tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

**Palavras chave:** Células dendríticas, apoptose, linfócito T regulador, Foxp3, imunossupressão

## ABSTRACT

The dendritic cell (DC) plays a very important role in antigen presentation in the immune system and recent articles have shown the involvement of the DCs in maintaining peripheral tolerance, probably because of their interactions with apoptotic cells and regulatory T cells (Tregs). Here we evaluated the changes in the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> after co culture of tolerogenic DCs with lymph node cells. Dendritic cells were generated *in vitro* from bone-marrow cells removed from the femurs of BALB/c mice and cultured in the presence of GM-CSF and in the presence or not of LPS. Apoptosis was induced in thymocytes from BALB/c and C57BL/6 and co-cultured with the DCs before co-culture with lymph-node cells. Our results show an increase of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells after co-culture and this increase occurs in the presence of allogeneic and syngeneic apoptotic cells, however it is greater when DCs are pulsed with the alloantigen. Furthermore, the dendritic cells did not change the pattern of co-stimulatory molecules expression due to phagocytosis of syngeneic or allogeneic apoptotic cells and further stimulation with LPS. The amount of IL-2 and TGF- $\beta$  found in the supernatant of the co-culture with allogeneic and syngeneic apoptotic cells was greater when the DCs are pulsed with the alloantigen rather than in the presence of syngeneic apoptotic cells, thus making the tolerogenic DCs able to expand Tregs. The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells sorted from the *in vitro* culture of DCs pulsed with alloantigen, and lymph-node cells were able to suppress the proliferation of splenocytes *in vitro* in a specific (spleen cells from BALB/c mice and irradiated spleen cells from C57BL/6 mice) and non-specific manner (spleen cells from BALB/c mice stimulated with  $\alpha$ CD3 and spleen cells from BALB/c DO11.10 mice stimulated with OVA). As expected, in the *in vivo* model, the transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to Nude mice induced autoimmunity with cell infiltrate in the stomach, colon, liver and kidneys. The co-transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, both sorted from the *in vitro* culture, was able to control the cell infiltrates in the target organs and the total cell count in the lymph-nodes. Thus, the Tregs expanded *in vitro* are able to suppress the immune response in *in vitro* and *in vivo* assays.

**Keywords:** Dendritic cells, apoptosis, regulatory T cells, Foxp3, immunosuppression

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AIRE** - Gene regulador da autoimunidade

**APC** - Célula apresentadora de antígeno

**BrdU** - Bromo desoxiuridina

**CD** - Grupo de diferenciação

**cDC** - Célula dendrítica convencional

**CEA** - Comissão de Ética no uso de Animais

**CFA** - Adjuvante completo de Freund

**CFSE** - do inglês carboxyfluorescein succinimidyl ester

**CTLA-4** - do inglês cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

**DC**- Célula dendrítica

**DTR** - Receptor para toxina diftérica

**ELISA** - Ensaio imunoenzimático

**GFP** - Proteína verde fluorescente

**GITR** - Receptor da família TNF induzido por corticóides

**GM-CSF** - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

**HEL** - Lisozima presente em ovos de galinha

**HFS** - Solução hipotônica fluorescente

**IBD** - Doença inflamatória dos cólons

**ICB** - Instituto de Ciências Biomédicas

**iDC** - Célula dendrítica imatura

**IDO** - Indoleamina 2, 3-dioxigenase

**IFN** - Interferon

**IL**- Inteleucina

**LMCV** - Vírus causador da coriomeningite linfocítica

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**mDC** - Célula dendrítica madura

**MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade

**MIF** - Média de intensidade de fluorescência

**MLR** - Reação leucocitária mista

**OVA** - Albumina de ovo de galinha

**PAMP** - Padrão molecular associado a patógenos

**pDC** - Célula dendrítica plasmacitóide

**PDCA** - Antígeno específico de célula dendrítica plasmacitóide

**PI** - Iodeto de propídeo

**PRR** - Receptor de reconhecimento de padrões associados a patógenos

**RAG** - Gene ativador da enzima recombinase

**SBCAL** - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

**SCID** - Imunodeficiência combinada grave

**TCR** - Receptor de linfócitos T

**TGF- $\beta$**  - Fator de crescimento tumoral  $\beta$

**TLR** - Receptores do tipo Toll

**Treg** - Linfócito T regulador

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Protocolo experimental utilizado para a derivação de células dendríticas e posterior cultura com linfócitos T.

**Figura 2:** Porcentagem de células  $CD4^+CD25^+$  e  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  determinada após citometria de fluxo. LN Naïve: porcentagem de células  $CD4^+CD25^+$ ,  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  presentes nos linfonodos de animais BALB/c naïve. iDC: cultura de DCs imaturas e células de linfonodo. iDC ALO: cultura de células de linfonodo com DCs imaturas pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose. iDC SIN: cultura de células de linfonodo com DCs imaturas pulsadas com timócitos singênicos em apoptose Dados representativos de 6 experimentos.

**Figura 3.** Análise das diferentes populações celulares determinadas por citometria de fluxo. Células de linfonodo foram cultivadas juntamente com células dendríticas imaturas (iDC), células dendríticas imaturas pulsadas com células em apoptose (iDC+APO), células dendríticas maduras (estimuladas com  $1\mu\text{g/mL}$  de LPS) (mDC) ou células dendríticas maduras (estimuladas com  $1\mu\text{g/mL}$  de LPS) e pulsadas com células em apoptose (mDC+APO). A: comparação entre a população de células  $CD4^+CD25^+$  geradas com a utilização de timócitos alogênicos e singênicos em apoptose. B: Comparação entre a população de células  $CD25^+Foxp3^+$  geradas com a utilização de timócitos alogênicos e singênicos em apoptose. Dados analisados com o teste estatístico de Student T. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , #  $p < 0,005$  para a comparação pareada alo X sin.

**Figura 4.** Análise da expressão de CD25, Foxp3, CD122, CD69, CD44, CTLA-4, GITR e CD62L pelas células  $CD4^+$  da cultura de iDCs pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose e co-cultivadas com células de linfonodo.

**Figura 5.** Análise da viabilidade das células estimuladas com dexametasona ( $10^{-7}\text{M}$ ). A: Porcentagem de timócitos de BALB/c positivos para a marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo (PI) após 4 horas de estímulo com dexametasona ( $10^{-7}\text{M}$ ). B: Porcentagem de timócitos de BALB/c positivos para a marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo (PI) após 18 horas de estímulo com dexametasona ( $10^{-7}\text{M}$ ). C: Porcentagem de timócitos de C57BL/6 positivos para a marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo (PI) após 4 horas de estímulo com dexametasona ( $10^{-7}\text{M}$ ). D: Porcentagem de timócitos de C57BL/6 positivos para a marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo (PI) após 18 horas de estímulo com dexametasona ( $10^{-7}\text{M}$ ).

**Figura 6.** Análise da viabilidade das células estimuladas com dexametasona ( $10^{-7}\text{M}$ ). A: Porcentagem de timócitos de BALB/c positivos para a marcação com iodeto de propídeo (PI) após 4 horas de estímulo com dexametasona ( $10^{-7}\text{M}$ ) e tratamento com solução hipotônica

(HFS). B: Porcentagem de timócitos de BALB/c positivos para a marcação com iodeto de propídeo (PI) após 18 horas de estímulo com dexametasona ( $10^{-7}M$ ) e tratamento com solução hipotônica (HFS). C: Porcentagem de timócitos de C57BL/6 positivos para a marcação com iodeto de propídeo (PI) após 4 horas de estímulo com dexametasona ( $10^{-7}M$ ) e tratamento com solução hipotônica (HFS). D: Porcentagem de timócitos de C57BL/6 positivos para a marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo (PI) após 18 horas de estímulo com dexametasona ( $10^{-7}M$ ).

**Figura 7.** Análise do estado de ativação das células dendríticas após co-cultivo com timócitos alogênicos e singênicos em apoptose e estimulação com LPS. Células dendríticas imaturas foram incubadas com timócitos alogênicos ou singênicos em apoptose por 18 horas, estimuladas com 1  $\mu g/mL$  de LPS por 24 horas e marcadas para citometria de fluxo para as moléculas de ativação CD80, CD86, CD40 e MHC II. A partir de células CD11c+, foram analisadas DCs imaturas incubadas com timócitos alogênicos em apoptose (iDC+ALO), timócitos singênicos em apoptose (iDC+SIN), estimuladas por 24h com 1  $\mu g/mL$  de LPS (mDC), DCs imaturas incubadas com timócitos alogênicos em apoptose e estimuladas com LPS (iDC+ALO+LPS), timócitos singênicos em apoptose e estimuladas com LPS (iDC+SIN+LPS). Histogramas feitos a partir de gate de células CD11c+. Dados representativos de 3 experimentos. Quadro cinza (células não marcadas), iDC (---), amostras (- - -). MFI correspondente representada dentro de cada histograma .

**Figura 8.** Análise da produção de IL-2 no sobrenadante das culturas celulares. A: Quantidade de IL-2 em ng/mL produzida no sobrenadante de cultura de células dendríticas. B: Quantidade de IL-2 em ng/mL produzida no sobrenadante de cultura de células dendríticas co-cultivadas com células de linfonodo. C: Quantidade de IL-2 em ng/mL produzida no sobrenadante de cultura de células dendríticas pulsadas com timócitos singênicos ou alogênicos em apoptose e co-cultivadas com células de linfonodo. (iDC: cultura de células dendríticas imaturas, iDC+ALO: células dendríticas imaturas pulsadas com células alogênicas em apoptose, mDC: células dendríticas maduras (estimuladas com 1  $\mu g/mL$  de LPS) (mDC), mDC+ALO: células dendríticas maduras (estimuladas com 1  $\mu g/mL$  de LPS), pulsadas com células alogênicas em apoptose). Teste estatístico de Student T. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .

**Figura 9.** Análise da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  no sobrenadante das culturas celulares. A: Quantidade em ng/mL de IL-10 dosada no sobrenadante de cultura de células dendríticas imaturas, pulsadas com timócitos alogênicos e singênicos em apoptose, co-cultivadas com células de linfonodo. B: Quantidade em ng/mL de TGF- $\beta$  dosada no sobrenadante de cultura de células dendríticas (dados representam produção da citocina acima do basal detectado

na cultura com meio de cultura contendo soro fetal bovino). C: Quantidade em ng/mL de TGF- $\beta$  dosada no sobrenadante de cultura de células dendríticas imaturas co-cultivadas com células de linfonodo. (iDC: cultura de células dendríticas imaturas, iDC+ALO: células dendríticas imaturas pulsadas com células alogênicas em apoptose, mDC: células dendríticas maduras (estimuladas com 1  $\mu$ g/mL de LPS) (mDC), mDC+ALO: células dendríticas maduras (estimuladas com 1  $\mu$ g/mL de LPS), pulsadas com células alogênicas em apoptose). Teste estatístico de Student T. \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005.

**Figura 10.** Análise da produção de IL-6 (A) e IL-17 (B) no sobrenadante das culturas celulares. Quantidade em ng/mL de IL-6 dosada no sobrenadante de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), células dendríticas imaturas pulsadas com células alogênicas ou singênicas em apoptose (iDC<sup>+</sup>ALO ou iDC<sup>+</sup>SIN), células dendríticas maduras (estimuladas com 1  $\mu$ g/mL de LPS) (mDC) ou células dendríticas maduras (estimuladas com 1  $\mu$ g/mL de LPS) e pulsadas com células alogênicas ou singênicas em apoptose (mDC<sup>+</sup>APO ou mDC<sup>+</sup>SIN) e com a adição de células de linfonodo (DC LT). Teste estatístico de Student T. \*p<0,05 \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005

**Figura 11.** Porcentagem da população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nas diferentes condições experimentais. Alo: cultura de células dendríticas, pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose, juntamente com células de linfonodo. Sin: cultura de células dendríticas, pulsadas com timócitos singênicos em apoptose, juntamente com células de linfonodo. Transwell Alo: cultura de células dendríticas, pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose, separada da cultura de células de linfonodo por membrana de 24 mm transwell (Corning® NY, EUA). Transwell Sin: cultura de células dendríticas, pulsadas com timócitos singênicos em apoptose, separada da cultura de células de linfonodo por membrana de 24 mm transwell (Corning® NY, EUA).

**Figura 12.** Sorting de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodo de BALB/c naïve, supressão da proliferação por células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodo de BALB/c naïve e análise da produção de TGF- $\beta$  (ng/mL) nas culturas celulares na presença de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodo de BALB/c naïve. nTregs: Análise da proliferação de esplenócitos de BALB/c frente a estímulo alogênico com esplenócitos de C57Bl/6 irradiados em diferentes concentrações diferentes de células respondedoras e alvo (1:1, 1:2 e 1:4) e também em concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25). CD4: Análise da proliferação de esplenócitos de BALB/c CD4<sup>+</sup> frente a estímulo alogênico com esplenócitos de C57Bl/6 irradiados em diferentes concentrações de células respondedoras e alvo (1:1, 1:2 e 1:4) e também em concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25). TGF- $\beta$ : Produção de TGF- $\beta$  em ng/mL em diferentes

concentrações de células respondedoras e alvo (1:1, 1:2 e 1:4) e também em concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25). Teste estatístico de Student T e ANOVA. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .

**Figura 13.** Sorting de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodo de BALB/c naíve e análise do potencial modulador das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro*. BALB/c X B6: Proliferação de esplenócitos de BALB/c estimulados com esplenócitos de C57Bl/6 irradiados (em diferentes concentrações respondedora:alvo 1:1, 1:2, 1:4) em MLR com células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* também em diferentes concentrações (reguladora:respondedora 1:5, 1:10, 1:25, 1:50).  $\alpha$ CD3: Proliferação de esplenócitos de BALB/c estimulados com 0,5  $\mu$ g de  $\alpha$ CD3 em MLR com células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* em diferentes concentrações (reguladora:respondedora 1:5, 1:10, 1:25). DO11.10<sup>+</sup>OVA: Proliferação de esplenócitos de DO11.10 estimulados com 50  $\mu$ g/mL de OVA em MLR com células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* em diferentes concentrações (reguladora:respondedora 1:5, 1:10, 1:25). Supressão Tregs: Porcentagem de supressão da proliferação com a adição das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro*. \*  $p = 0,0124$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , ###  $p = 0,0007$ . Teste estatístico de ANOVA.

**Figura 14.** Produção de TGF- $\beta$  em ng/mL nos diferentes ensaios de supressão. A: Produção de TGF- $\beta$  nas diferentes concentrações de células respondedoras e alvo (1:1, 1:2 e 1:4) e também em concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10, 1:25 e 1:50). B: Produção de TGF- $\beta$  nas condições do ensaio de supressão com  $\alpha$ CD3 nas concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25). C: Produção de TGF- $\beta$  nas condições do ensaio de supressão com esplenócitos de DO11.10 estimulados com OVA nas concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25). Teste estatístico de Student T e ANOVA. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ .

**Figura 15.** Avaliação da capacidade reguladora das Tregs isoladas da cultura *in vitro*. A: Monitoramento do ganho de peso dos camundongos Nude que receberam a transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $0,2 \times 10^5$  por animal) e os animais que não receberam nenhum inóculo de células (CTL). B e C: 12 semanas após a transferência de células os linfonodos inguinais e poplíteos (B, e baço (C) foram retirados para contagem de células totais. Teste estatístico de Student T. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

**Figura 16.** Cortes histológicos dos órgãos dos camundongos Nude que receberam a transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $0,2 \times 10^5$  por animal) e os animais que não receberam nenhum

inóculo de células, somente PBS. A, B e C: Cortes histológicos do estômago dos animais que receberam PBS (A), células CD4+CD25<sup>-</sup> (B) e células CD4+CD25<sup>-</sup> e CD4+CD25<sup>+</sup> (C). D, E, F: Cortes histológicos do intestino dos animais que receberam PBS (D), células CD4+CD25<sup>-</sup> (E) e células CD4+CD25<sup>-</sup> e CD4+CD25<sup>+</sup> (F). G, H, I: Cortes histológicos do fígado dos animais que receberam PBS (G), células CD4+CD25<sup>-</sup> (H) e células CD4+CD25<sup>-</sup> e CD4+CD25<sup>+</sup> (I). J, K, L: Cortes histológicos dos rins dos animais que receberam PBS (J), células CD4+CD25<sup>-</sup> (K) e células CD4+CD25<sup>-</sup> e CD4+CD25<sup>+</sup> (L). Cortes em aumento de 200x.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Média da intensidade de fluorescência das células CD11c+ para as diferentes moléculas co-estimuladoras expressas em DCs após os diferentes tratamentos.

## SUMÁRIO

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>21</b>  |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>34</b>  |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL.....   | 34         |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 34         |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>36</b>  |
| 3.1      | ANIMAIS .....   | 36         |
| 3.2      | GERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS .....  | 36         |
| 3.3      | OBTENÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS.....  | 37         |
| 3.4      | CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E TIMÓCITOS EM APOPTOSE.....   | 37         |
| 3.5      | CO-CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COM CÉLULAS DE LINFONODO .....  | 37         |
| 3.6      | CITOMETRIA DE FLUXO .....   | 38         |
| 3.7      | ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS.....   | 39         |
| 3.8      | SORTING DE CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> .....   | 40         |
| 3.9      | ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO .....   | 40         |
| 3.10     | AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE SUPRESSORA DAS CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> EM MODELO <i>IN VIVO</i> .....                        | 43         |
| 3.11     | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 43         |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>45</b>  |
| 4.1      | EXPRESSÃO DE CD25 E FOXP3 NAS CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> .....  | 45         |
| 4.2      | CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> GERADAS EM CULTURA <i>IN VITRO</i> .....                                | 48         |
| 4.3      | AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EM TIMÓCITOS .....  | 50         |
| 4.4      | AVALIAÇÃO DO ESTADO DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS CO-CULTIVADAS COM TIMÓCITOS EM APOPTOSE .....                                   | 53         |
| 4.5      | ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELAS CÉLULAS EM CULTURA .....   | 56         |
| 4.6      | AVALIAÇÃO DA NECESSIDADE DE CONTATO CÉLULA-CÉLULA PARA A GERAÇÃO DE CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> ..... | 62         |
| 4.7      | AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE SUPRESSORA DAS CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ISOLADAS DE LINFONODOS DE ANIMAIS NAÏVE .....         | 64         |
| 4.8      | AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE SUPRESSORA DAS CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> <i>IN VITRO</i> .....                                 | 66         |
| 4.9      | AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE SUPRESSORA DAS CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> <i>IN VIVO</i> .....                                  | 70         |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | <b>75</b>  |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | <b>90</b>  |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>92</b>  |
| <b>8</b> | <b>ANEXOS</b> .....   | <b>112</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é um sistema de reconhecimento molecular que tem como função a manutenção da homeostasia, em situações infecciosas ou fisiológicas. O sistema é composto pela imunidade inata, que em última instância é responsável pelo controle inicial de uma infecção, além de gerar condições propícias para que a imunidade adquirida entre em ação. A imunidade adquirida, por sua vez tem o papel ativo de eliminar a infecção de modo específico envolvendo células e anticorpos produzidos em resposta específica ao microrganismo em questão.

Fazem parte da imunidade inata, vários tipos celulares, dentre eles as células dendríticas que são indispensáveis para o desenvolvimento da resposta imunológica. As DCs são responsáveis pela captura, processamento e apresentação de antígenos para células da imunidade adquirida, os linfócitos T. Sendo assim, as DCs são chamadas de APCs profissionais (do inglês “antigen presenting cells) e são especializadas nos processos que envolvem a apresentação de antígenos para os linfócitos T (Banchereau & Steinman, 1998, Sallusto & Lanzavecchia, 1999). Sua descoberta foi feita por Steinman e Cohn no início dos anos 70 (Steinman & Cohn, 1973), no entanto, sua completa caracterização e identificação só foram publicadas na segunda metade dos anos 70 (Steinman & Witmer 1978, Steinman & Nussenzweig, 1980). A partir do momento em que foi comprovada a importância das DCs nas reações leucocitárias mistas (do inglês MLR – mixed leukocyte reaction), como potente estimuladora de leucócitos e participação na rejeição de transplantes, os trabalhos sobre estas células tornaram-se mais frequentes (Steinman & Inaba, 1985). Sabe-se que hoje as DCs estão presentes em praticamente todos os tecidos do organismo desde o sangue até os órgãos linfóides para que possam funcionar como sentinelas do sistema imune, fagocitando e processando antígenos provenientes de todas as estruturas do organismo (Banchereau et al., 2000, Mellman, 2005, Ueno et al., 2007).

Em camundongos, as DCs podem ser divididas em subpopulações que são diferenciadas pela expressão de marcadores de superfície. Uma dessas subpopulações

é a de DCs convencionais (cDC antigamente chamadas de DCs mielóides e linfóides) que, por sua vez, pode ser dividida em duas categorias: 1) cDCs migratórias cuja função principal envolve a migração do tecido periférico para os linfonodos e apresentação de antígenos para células T, como as células de Langerhans. E 2) cDCs residentes no tecido linfóide como as DCs tímicas e esplênicas. Em camundongos, as DCs são fenotipicamente caracterizadas pela expressão da molécula CD11c e em alguns casos a molécula CD8, CD4, CD11b, PDCA (do inglês, plasmacytoid dendritic cell antigen) entre outros marcadores. Ainda há a subpopulação de DCs plasmacitóides (pDCs) que pode ser considerada como uma população precursora de cDC, caracterizada fenotipicamente pela expressão de marcadores como B220, PDCA e em resposta a antígenos virais, as pDCs secretam altas concentrações de IFN do tipo I (Shortman & Liu, 2002, Shortman & Naik, 2007).

Durante processos infecciosos, ou na lesão tecidual, as DCs fagocitam os microrganismos invasores, processam os antígenos provenientes deste microrganismo e migram para os linfonodos onde os antígenos processados serão apresentados aos linfócitos T. Com este estímulo, dependendo da natureza do antígeno fagocitado e processado, inicia-se o processo de maturação das DCs e, além do aumento da expressão de moléculas do MHC II, também aumenta a expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40. Para a apresentação dos antígenos, as DCs, e todas as outras APCs, utilizam as moléculas do MHC para apresentar os antígenos processados na membrana (Bach et al., 1975, Shortman & Liu, 2002).

Além da divisão entre cDCs e pDCs, podemos classificar as DCs quanto ao seu estado de ativação como maduras e imaturas (mDC e iDC respectivamente). As iDC são assim classificadas pela baixa expressão de MHC II e de outras moléculas co-estimuladoras (B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) e CD40) e relacionadas à migração (CCR7) além da alta capacidade fagocítica (Villadangos & Schnorrer, 2007). Dentre as substâncias que podem causar este tipo de estímulo ativador de iDC podemos citar moléculas exógenas, como o LPS (lipopolisacarídeo presente na parede celular de bactérias gram negativas), RNA dupla fita, peptidoglicano, ou endógenas como

citocinas inflamatórias, imunoglobulinas através de receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (FcRs), bradisininas entre outras (Guermonprez et al., 2002).

Uma vez que a iDC inicia o processo de maturação por algum estímulo, ela se torna mDC e perde parte da capacidade de internalizar, processar antígenos e ganha a capacidade de apresentá-los e ativar linfócitos T. Esse fato pode ser explicado pela mudança funcional e fenotípica, envolvendo expressão de genes importantes para o transporte do antígeno para a membrana e expressão de moléculas importantes para a apresentação antigênica (Guermonprez et al., 2002). Estudos também comprovam que a migração das DCs ativadas para o linfonodo é muito mais eficiente uma vez que a DC se transformou em mDC (Guermonprez et al., 2002). Por outro lado, Steinman & Nussenweig (2002) comprovam a capacidade de DCs de migrar para órgãos linfóides secundários e apresentar antígenos mesmo na ausência de sinais de maturação, sugerindo que as DCs migrariam para os linfonodos para apresentar antígenos próprios, coletados de um possível dano tecidual, e manter a tolerância periférica.

Uma das etapas na apresentação de antígenos é a discriminação entre padrões moleculares de agentes exógenos e padrões moleculares próprios, de estruturas presentes no organismo. Uma vez que a DC consegue fazer a distinção entre o próprio e o não próprio, ela pode dar início à resposta imune. Alguns mecanismos fazem parte dessa distinção como o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs do inglês pathogen associated molecular patterns) por receptores específicos (PRRs do inglês pathogen recognition receptors) (Fearon & Locksley, 1996, Hoffman et al., 1999). Se houver falha na distinção entre próprio e não próprio, uma resposta imune contra componentes de estruturas do próprio organismo pode ser iniciada levando ao desenvolvimento de doenças autoimunes.

Para o controle das doenças auto-imunes o sistema imunológico conta com vários mecanismos de tolerância ao próprio. O mecanismo mais importante, e que ocorre mais cedo durante o desenvolvimento do sistema imune, é a tolerância central que envolve o timo. Este órgão linfóide primário é responsável por garantir que os linfócitos que irão popular os órgãos linfóides secundários não são autorreativos, ou seja, não possuem TCR (do inglês T cell receptor) que reconhece estruturas próprias.

No timo, há APCs que apresentam antígenos próprios, que precisam ser reconhecidos pelo TCR dos linfócitos T com baixa afinidade para poderem ser selecionados positivamente, e migrarem para a periferia do sistema imune. Para que as células do timo expressem antígenos próprios no timo, é preciso que haja a expressão de um gene chamado AIRE (do inglês, autoimmune regulator) que garante a expressão promíscua de antígenos presentes em tecidos diversos do organismo (Derbinski et al., 2005, Anderson et al., 2005) Os linfócitos T que reconhecem os antígenos próprios com alta afinidade sofrem deleção clonal para que não migrem para a periferia e iniciem resposta contra o antígeno que reconheceram no timo (Kiewski & Derbinski, 2004).

Após a seleção clonal que ocorre no timo, os linfócitos migram para os órgãos linfóides secundários como o baço, linfonodos, placa de Peyer, entre outros. Apesar da fina seleção pela qual os linfócitos passam no timo, há a possibilidade de alguns clones autorreativos escaparem desta seleção negativa e migrarem para a periferia. Para que os clones possivelmente patogênicos não iniciem resposta contra o antígeno para o qual são específicos, há diversos mecanismos de tolerância periférica que mantêm a homeostasia do sistema imune.

A ignorância imunológica é o mecanismo de tolerância periférica no qual os auto antígenos são ignorados pelos linfócitos T específicos que escaparam da seleção negativa. Este fato pode ser comprovado pelo estudo de Ohashi et al. (2001) que utiliza camundongos com TCR específico para uma glicoproteína encontrada no vírus causador da coriomeningite linfocítica (LCMV do inglês lymphocytic choriomeningitis virus), e camundongos transgênicos que expressam essa glicoproteína nas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas. A transferência de células do animal com TCR específico para a glicoproteína para o animal que a expressa no pâncreas não leva ao desenvolvimento de resposta imune contra as células  $\beta$ . A falta de resposta das células inoculadas pode ser revertida com a indução da expressão desta glicoproteína no animal com TCR transgênico, por meio de infecção do camundongo com LMCV, o que demonstra que o mecanismo de tolerância não envolve deleção de clones autorreativos ou anergia, mas sim o fato de o linfócito não ter sido previamente exposto à glicoproteína. O estudo de Bianchi et al. (2009) demonstra que a transferência de

células T provenientes de camundongos OT-I e OT-II, com TCR específico para OVA para camundongos com expressão de OVA em queratinócitos induzida por um promotor de queratina, não desenvolvem autoimunidade, apesar de haver proliferação destas células nos órgãos linfóides. Assim como o estudo de Ohashi et al. (2001), o estudo de Bianchi et al. (2009) sugere que a ignorância do linfócito T ao antígeno para o qual é específico evita a ação deste linfócito na periferia, sendo assim um mecanismo de tolerância periférica. Outro evento que pode ocorrer dentro dos órgãos linfóides secundários é a apresentação de auto antígenos pelas células estromais dos linfonodos. A apresentação de auto antígenos requer a expressão de AIRE, que faz com que estas células estromais CD45<sup>-</sup> apresentem auto antígenos tanto no contexto de MHC I quanto MHC II de maneira não imunogênica, contribuindo assim para a manutenção da tolerância periférica (Lee et al., 2007).

Ao processo de não responsividade funcional ao reconhecimento do antígeno próprio damos o nome de anergia clonal, que pode ser induzida de várias maneiras, porém as vias mais estudadas são as interações de moléculas inibidoras como CTLA-4 (do inglês cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) e PD-1 (do inglês programmed cell death 1). A molécula CTLA-4 é um homólogo estrutural do CD28 só que apresenta maior afinidade por B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) quando comparado com a interação destas com o CD28. A expressão de CTLA-4 é considerada tardia, pois ocorre longos períodos após a ativação do linfócito T, apesar de desempenhar importante papel na contrarregulação da progressão do ciclo celular (Walunas et al., 1994, Krummel & Allison, 1996). Os animais deficientes em CTLA-4 apresentam linfoproliferação espontânea de células T e autoimunidade (Waterhouse et al., 1995, Tivol et al., 1995). A molécula PD-1 funciona como uma segunda molécula contrarreguladora que está relacionada com a indução e manutenção da tolerância, já que a deleção dos genes que codificam tanto PD-1 quanto os seus ligantes (PDL-1 e PDL-2) leva ao desenvolvimento de autoimunidade sistêmica (Nishimura et al., 1999, Freeman et al., 2000, Keir et al., 2006).

A deleção clonal também é importante para a manutenção da tolerância periférica, uma vez que a ativação crônica de linfócitos autorreativos leva à morte

destes por apoptose como resultado de uma combinação de eventos moleculares. Basicamente há a ligação do receptor Fas com o seu ligante FasL que leva a morte celular mitocondrial dependente da molécula Bim (Marrack & Kappler, 2004). A deficiência de moléculas como Fas em camundongos é responsável por doenças linfoproliferativas e autoimunidade acarretadas pela falta do sinal indutor de morte nos linfócitos T (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). As células T dos camundongos Bim deficientes também são resistentes à apoptose e além disso, os animais desenvolvem doenças linfoproliferativas e glomerulonefrite induzida pelo depósito de imunocomplexos nos rins (Bouillet et al., 1999).

A importância das DCs no desenvolvimento da resposta imune já foi descrita anteriormente, mas a capacidade destas células na indução da tolerância periférica ainda não está muito clara. Existem evidências que sugerem que uma forma de maturação incompleta de DCs é capaz de induzir caráter tolerogênico para estas células. Para tentar elucidar este fenômeno, o grupo de Nussenzweig desenvolveu um anticorpo monoclonal associado à HEL (do inglês hen egg lysozyme) que induz a fagocitose deste antígeno, entretanto não induz a maturação das DCs. A apresentação destes antígenos de HEL para células 3A9 (linfócitos T com TCR específico para HEL) não levou à proliferação destas células e nem a produção de citocinas que indicassem que a célula T foi ativada, como IFN- $\gamma$ . Além de não proliferarem pela apresentação do antígeno pela DC, uma segunda estimulação com HEL foi realizada e não houve resposta por parte das células 3A9 (Hawiger et al., 2001). Resultados semelhantes foram observados com células T CD8<sup>+</sup> após contato com DCs esplênicas expostas a células em processo de morte. O antígeno OVA foi introduzido por choque osmótico em esplenócitos em processo de morte, e estas células foram cultivadas com DCs. Quando estas DCs foram co-cultivadas com linfócitos T CD8<sup>+</sup> com TCR específico para OVA (OT-II), não houve ativação e proliferação destes linfócitos, sugerindo que na ausência de estímulos inflamatórios, as DCs apresentam antígenos de forma não imunogênica, gerando assim tolerância (Liu et al., 2002).

Há ainda outro tipo de seleção que ocorre com os linfócitos que reconhecem o antígeno próprio com alta afinidade no timo. Estes são selecionados positivamente e

migram para a periferia, mas com outra função diferente dos outros linfócitos selecionados por baixa afinidade. A função destes linfócitos T cujos TCRs reconhecem antígenos próprios com alta afinidade seria regular a resposta imune contra os antígenos para os quais são específicos. Vários trabalhos já demonstraram que o timo produz células autorreativas e que elas migram para a periferia para regular a resposta a antígenos próprios (Itoh et al., 1999 e Jordan et al., 2001). Apesar de estar comprovado que estas células autorreativas migram para a periferia, muitos dos mecanismos que envolvem essa seleção positiva ainda não estão bem explicados. A ação dos linfócitos T reguladores faz parte dos mecanismos imunológicos de tolerância periférica, que fazem com que as células que possivelmente escaparem da seleção negativa no timo possam ser mantidas em constante vigilância ou até serem eliminadas dependendo da situação.

Os estudos de Nishizuka et al. (1969), descreveram que a timectomia neonatal de camundongos fêmeas levavam à atrofia do ovário e esterilidade das mesmas. Já nos machos esse fenômeno não era observado em relação aos testículos. A reconstituição do timo nestes animais pouco tempo após a timectomia era capaz de reverter o quadro de esterilidade. Com isso, foi levantada a hipótese de que o timo gerava algo capaz de suprimir a doença observada nas fêmeas. No início dos anos 70, um grupo de pesquisadores chegou à conclusão que um tipo de célula T era capaz tanto de intensificar quanto de diminuir uma resposta imune. Este grupo também percebeu que esse tipo celular era diferente das células T auxiliares que já eram conhecidas (Gershon & Kondo, 1970). A partir deste ponto, as chamadas “células T supressoras” tornaram-se foco de vários estudos pelo mundo inteiro e já nos anos 80, foram sugeridos mecanismos para o poder supressor deste subtipo de células T, como secreção de substâncias imunossupressoras que seriam descritas posteriormente como IL-10 e TGF- $\beta$  (Chen et al., 1994, Nakamura et al., 2001 Cools et al., 2007). Estudos foram feitos para fenotipar estas células e relacionar algum tipo de marcador de superfície celular com o poder de inibir ou intensificar a autoimunidade. Dentre as moléculas estudadas até hoje está o CD4 e o CD25, cadeia  $\alpha$  do receptor para IL-2 expresso em células T ativadas (Sakaguchi et al., 1995). As células T reguladoras

possuem algumas características exclusivas, que não são observadas nas outras células do sistema imune, já que uma vez ativadas via TCR não proliferam (Itoh et al., 1999), possuem TCR autorreativo (Jordan et al., 2001), não produzem IL-2 como os outros linfócitos ativados (Takahashi et al., 2000), além de terem a capacidade de suprimir a proliferação de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> *in vitro* (Suri-Payer et al., 1998).

Outra molécula relacionada ao subtipo de linfócitos T com capacidade reguladora é o CD45RB. Os trabalhos de Powrie et al. (1993) e Powrie et al. (1995) comprovaram que as células CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> são capazes de modular a colite induzida pela transferência de células CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> em animais linfopênicos SCID. A transferência de células CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> era capaz de induzir colite inflamatória pela falta de mecanismos que conseguissem regular a resposta Th1 induzida pelas bactérias presentes no trato gastrointestinal, uma vez que a transferência conjunta de células CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> foi capaz de prevenir a indução de colite nestes animais.

O estudo de Sakaguchi et al. (1995) demonstra que a co-transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> é capaz de impedir o desenvolvimento de autoimunidade em camundongos atímicos Nude. A transferência de células de baço e linfonodo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> induziu vários focos de autoimunidade, sugerindo que estas células, que populam a periferia do sistema imune de camundongos, possuem TCR específico para antígenos próprios. Como há células autorreativas na periferia, é necessário que haja algum tipo de mecanismo que seja capaz de manter as células potencialmente patogênicas em constante vigilância. A prevenção da autoimunidade foi atingida quando foram transferidas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, sugerindo que as células que expressam estas moléculas são dotadas de alguma capacidade de impedir que as células patogênicas ajam. Estas células seriam responsáveis pela manutenção da homeostasia periférica.

Mais recentemente, outra molécula passou a ser associada às Tregs, o fator de transcrição Foxp3 que codifica a proteína scurfín. Este fator de transcrição intracelular foi classificado como indispensável para a diferenciação e manutenção das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Hori et al., 2003, Fontenot et al., 2003, Roncador et al., 2005). Estudos mais antigos revelaram que a ausência deste fator de transcrição, tanto em

camundongos, quanto em humanos, causa uma doença proliferativa no sistema imune como consequência de ativação crônica de células T. Por outro lado, a expressão excessiva de Foxp3 leva a redução da população madura de linfócitos T e diminuição da função da mesma em modelos murinos (Khattari et al., 2001). Os estudos de Hori et al. (2003) e Fontenot et al. (2003) também demonstram que a expressão ectópica de Foxp3 confere à célula capacidade reguladora, capaz até de impedir o desenvolvimento de IBD (do inglês inflammatory bowel disease) quando transferidas para animais linfopênicos. Recentemente o trabalho de Lipscomb et al. (2009) demonstrou que a expressão ectópica de Foxp3 em células não linfóides como as DCs também é capaz de conferir capacidade reguladora, impedindo o desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1, e aumentando a população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> que modulam a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como a produção de IFN- $\gamma$ .

A criação do camundongo Foxp3 GFP (do inglês green fluorescent protein) permitiu que o estudo das células reguladoras pudesse ser mais específico, já que a marcação das células Foxp3<sup>+</sup> impedia a utilização posterior destas células para ensaios de supressão, uma vez que, para a marcação do fator de transcrição, era necessário que as células fossem permeabilizadas. O camundongo Foxp3 GFP knock in possui uma inserção no DNA que faz com que a expressão de Foxp3 leve à expressão de GFP permitindo assim a identificação da célula em tecidos linfóides e a separação para utilização da população reguladora em ensaios celulares (Fontenot et al., 2005). Este mesmo estudo mostra a necessidade da sinalização da citocina IL-2 para a manutenção das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> *in vivo*, pois ela regula a expressão de genes envolvidos com o crescimento celular e metabolismo. Além disso, o mesmo estudo comprova que timócitos de camundongos knock out para IL-2 e a cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2 (CD25) são capazes de expressar Foxp3 e também as células Foxp3<sup>+</sup> isoladas da periferia do sistema imune possuem capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos T *in vitro*. Até então a IL-2 era tida como uma citocina indispensável para o desenvolvimento e função das células T reguladoras. O estudo de Setoguchi et al. (2005) demonstra que *in vivo*, a IL-2 é necessária para a manutenção das células T

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, mas não para o desenvolvimento das mesmas, ou seja, no timo a sinalização da IL-2 não é necessária, mas na periferia sim.

Outro camundongo foi criado para o estudo da função do Foxp3 com o auxílio das técnicas moleculares de Cre-Lox para a inserção de uma sequência de DNA, que codifica o receptor para a toxina diftérica (DTR) no locus genético do Foxp3. Assim, quando a célula expressasse Foxp3, também expressaria o DTR e pode ser eliminada com a administração de toxina diftérica. Assim foi criado um modelo de depleção de células Foxp3<sup>+</sup> que permite que este procedimento seja feito em qualquer momento da vida do animal, seja na fase neonatal, ou no animal adulto. Com a criação deste animal, o trabalho de Kim et al. (2007) sugere que o Foxp3 é necessário para o monitoramento de clones autorreativos tanto na fase neonatal quanto na vida adulta do animal. Quando a depleção de Foxp3 foi induzida, houve a quebra da tolerância periférica e o animal desenvolveu autoimunidade, demonstrando que os clones autorreativos gerados durante o desenvolvimento linfocitário não são totalmente eliminados durante a seleção tímica, podendo migrar para a periferia. Migrando para a periferia, estes linfócitos autorreativos são monitorados por células Foxp3<sup>+</sup> que garantem a integridade do organismo. Um dos mecanismos estudados seria o controle da proliferação e geração de DCs por parte das células Foxp3<sup>+</sup>. O número de DCs que proliferam nos órgãos linfóides aumenta, e a geração destas células a partir de precursores da medula óssea também aumenta nos animais depletados de Foxp3, sugerindo que haja uma regulação desta proliferação e geração por parte das células Foxp3<sup>+</sup>.

Segundo Yamazaki et al. (2006), as DCs são mais eficientes na geração de Tregs quando amadurecidas com produtos bacterianos como o CFA (adjuvante completo de Freund). Neste mesmo estudo, foi provada a baixa eficácia de macrófagos e linfócitos B em expandir células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e também a importância de APCs CD80/CD86<sup>+</sup> para a conversão em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Apesar da importância destas moléculas para a ativação de linfócitos T, as APCs CD80/CD86<sup>-</sup> ainda são capazes de induzir Tregs, embora em quantidades muito baixas. Até hoje, todos os estudos com interação de DCs e células T sugerem que o contato entre essas duas células é indispensável para que ocorra a ativação da célula T e a posterior expressão

de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Yamazaki et al., 2003, Hara et al., 2001, Giorgini & Noble, 2007, Jiang et al., 2003).

Atualmente o “clearance” de células em apoptose é considerado muito importante para a manutenção da tolerância periférica, e boa parte dos estudos mostra a importância das DCs neste processo. O trabalho de Voll et al. (1997) foi o primeiro trabalho a mostrar a importância das células apoptóticas na indução da imunossupressão aumentando a produção de IL-10 e diminuindo a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12 por monócitos humanos, sendo independente do estímulo para o início da apoptose. A fagocitose de células em apoptose também pode modular a expressão de moléculas co-estimuladoras pelas APCs, não só mantendo DCs imaturas, mas ativamente induzindo resistência à maturação (Galucci et al., 1999, Sauter et al., 2000, Steinmann et al., 2000,). Também foi relatado que as DCs que fagocitam células em apoptose diminuem a capacidade de estimular e ativar linfócitos T, e essa perda na capacidade de ativação estaria relacionada com os efeitos inibitórios observados como a diminuição na expressão de moléculas co-estimuladoras, mas não seria um defeito na apresentação de antígenos, uma vez que as DCs que fagocitam células em apoptose continuam apresentando antígenos destas células via moléculas do MHC (Urban et al., 2001, Stuart et al., 2002).

Ainda, as células em apoptose, por terem a capacidade de impedir a maturação das DCs, podem induzir a expansão de células com capacidade reguladora, uma vez que iDCs são mais eficientes na expansão de células Foxp3<sup>+</sup> quando comparadas às DCs expostas a estímulos de maturação (Marguti et al., 2009). Os estudos de Kushwah et al. (2009) e Kushwah et al. (2010) mostram que as DCs que fagocitaram DCs em apoptose são capazes de expandir populações de células com propriedades reguladoras *in vitro*. Nesse caso houve expansão de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> que produzem altas quantidades de TGF- $\beta$  e suprimem a proliferação de células CD4<sup>+</sup> *in vitro*, demonstrando a capacidade das células apoptóticas na indução de imunossupressão.

Nesse contexto, estudos anteriores no nosso laboratório mostraram um aumento expressivo da porcentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> quando células totais do

linfonodo foram co-cultivadas com DCs imaturas ou maduras previamente incubadas ou não com células alogênicas em apoptose (Marguti et al., 2009). Apesar da observação de que todas as condições experimentais levaram à expansão da população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, quando comparadas à população de células Treg do linfonodo, a maior eficácia na expansão destas células foi vista quando as iDCs pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose, foram cultivadas com células dos linfonodos. No entanto, apesar da significativa expansão dessas células *in vitro*, não há dados sobre a capacidade reguladora das mesmas. Sendo assim nos propomos a caracterizar funcionalmente essa população de Tregs geradas *in vitro* na modulação da resposta imune *in vitro* e *in vivo*.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade supressora de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas a partir de co-cultura de células dendríticas com células de linfonodo, ambas de camundongo BALB/c, na presença de células alogênicas (camundongo C57BL/6) em apoptose, na modulação da resposta imune *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Gerar células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> a partir da co-cultura de células dendríticas, pulsadas com timócitos em apoptose no contexto alogênico e singênico, com células de linfonodo de camundongos BALB/c;
- Determinar a necessidade de contato entre as células dendríticas e as células de linfonodo para a indução de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>;
- Análise da produção de citocinas nas condições experimentais de geração de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>;
- Determinar a capacidade supressora das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* em ensaios de proliferação frente a estímulos específicos e inespecíficos.
- Determinar a capacidade supressora das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* na modulação da resposta imune *in vivo* em ensaios de transferência adotiva de células para animais linfopênicos.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/c, C57BL/6, BALB/c DO11.10 e BALB/c Nude fêmeas, todas de seis a oito semanas de vida, obtidas e mantidas no biotério de animais isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA).

#### **3.2 Geração de células dendríticas**

Camundongos BALB/c fêmeas foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e tiveram seus fêmures retirados e mantidos em meio de cultura DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium – Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA). As células da medula óssea foram retiradas com jatos de meio de cultura com o auxílio de seringa e agulha. As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura DMEM completo, suplementado com 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 0,1mM de vitaminas, 2mM de L-glutamina, 100µg/mL de gentamicina, 0,05mM de 2-mercaptoetanol, 1mM de piruvato de sódio, todos da Gibco BRL (Rockville, USA) e 5% de soro fetal bovino (Hyclone, USA). A concentração das células foi ajustada de modo a obter-se 2x10<sup>6</sup> células por mL e 5 mL dessa suspensão foram colocados por poço de placas de 6 poços. Foram adicionados a cada poço 10ng/mL de GM-CSF recombinante murino (Pharmigen, San Diego, CA, EUA). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias. Após 4 dias, foi adicionada nova dose de 10ng/mL de GM-CSF em 4 mL de meio de cultura novo. Quando necessário para as diferentes condições experimentais, as células dendríticas foram estimuladas no sexto dia com 1µg/mL de LPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

### **3.3 Obtenção de células apoptóticas**

Foram retirados timos de camundongos C57BL/6 e BALB/c fêmeas de três semanas de idade. Os timos foram macerados, as células contadas e suspensão celular foi plaqueada. Foi adicionado a cada um dos poços  $10^{-7}$  de dexametasona e as células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Passado este período, as células foram lavadas com meio de cultura para completa remoção da dexametasona.

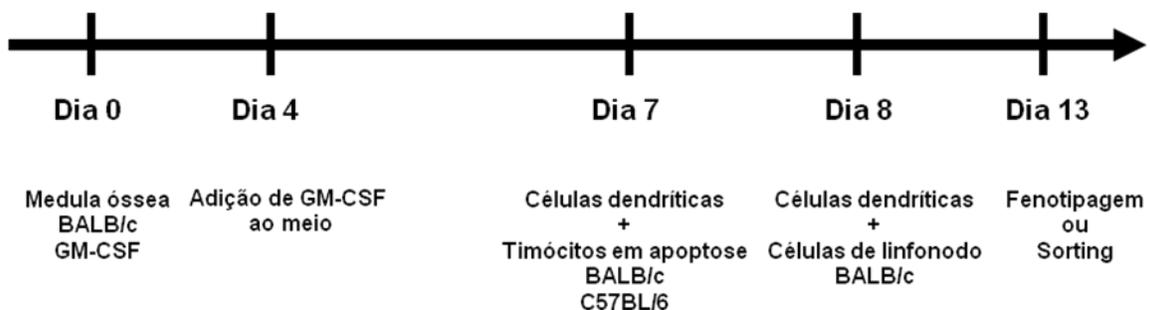
Para a análise da apoptose, foram utilizados  $5 \times 10^5$  timócitos 4 horas após o tratamento com dexametasona e após 18 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram ressuspensas em condições para marcação com Anexina-V – PI (iodeto de propídeo) e HFS (Hypotonic Fluorescent. Solution, contendo de iodeto de propídeo) para determinação da apoptose no citômetro de fluxo.

### **3.4 Cultura de células dendríticas e timócitos em apoptose**

Após a lavagem para remoção da dexametasona,  $10^7$  timócitos em apoptose (alogênicos ou singênicos) foram adicionados a cada poço contendo as células dendríticas derivadas de células da medula óssea (proporção 1:5 DC:timócitos). A placa foi mantida a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 18 horas.

### **3.5 Co-cultura de células dendríticas com células de linfonodo**

A cultura de células dendríticas incubadas com células em apoptose foi lavada com meio DMEM, para a retirada das células em apoptose, e depois de centrifugadas e ressuspensas em meio DMEM completo, as células dendríticas foram co-cultivadas com  $1 \times 10^7$  células de linfonodo singênico na proporção de 1:5 (célula dendrítica: célula linfóide) por 5 dias. A cultura foi feita com o método convencional e transwell (Corning® NY, EUA), para determinar na necessidade de contato entre as DCs e as células de linfonodo para a geração e expansão de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>.



**Figura 1.** Protocolo experimental utilizado para a derivação de células dendríticas e posterior cultura com linfócitos T.

### 3.6 Citometria de fluxo

Para a avaliação de moléculas de superfície, as células obtidas da co-cultura de células dendríticas e células de linfonodo foram incubadas com 80µL de sobrenadante de cultura do hibridoma 24G2 contendo anticorpos anti-CD16/32 (bloqueador de receptor Fc) por trinta minutos a 4°C. Após trinta minutos, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo (FITC, PE ou Cy) específicos para as moléculas de superfície anti-CD11c-PE, anti-CD40-FITC, anti-CD80-FITC, anti-CD86-FITC, anti-MHC classe II (I-A<sup>d</sup>)-FITC anti-CD4-Cy, anti-CD25-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD44-PE, anti-CTLA-4-PE, anti-CD69-PE, anti-CD122-PE, anti-GITR-PE, anti-CD62L-FITC, todos na concentração de 0,5µg/10<sup>6</sup> células.

Para a análise de Foxp3 intracelular pelas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foi utilizado o kit comercial “PE anti-mouse/rat Foxp3” (ebioscience, San Diego, CA, EUA). As células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4-Cy, anti-CD25-FITC utilizando o mesmo protocolo descrito acima. Após a marcação dos receptores de superfície CD4 e CD25, as células foram fixadas e permeabilizadas de acordo com as orientações do fabricante. Após esse processo as células foram marcadas com o anticorpo monoclonal anti-Foxp3-PE. Passado o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 3% de soro fetal bovino e ressuspendidas em 300µL de PBS. A aquisição e análise das amostras foram feitas em citômetro de fluxo FACScalibur e FACScanto (Becton & Dickinson, Mountain View, CA, EUA), com aquisição de 200 mil eventos dentro do “gate” de linfócitos, e analisadas utilizando o software F<sup>low</sup>Jo (Tree Star).

### 3.7 Análise da produção de citocinas por células dendríticas

A análise da produção de IL-10 e IL-2 foi realizada utilizando-se o kit comercial BD OptEIA da BD Biosciences (San Diego, CA, EUA). Placas com propriedade de alta ligação (Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas com 50µL do anticorpo de captura diluído em tampão fosfato de sódio (pH 6,5) por 18 horas a 4°C . Após esse período, os poços foram bloqueados por 1 hora com 100µL de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e 10% de soro fetal bovino. Após o bloqueio, as placas foram lavadas oito vezes com PBS-T e em cada poço foram adicionados 50µL das amostras ou do recombinante murino (IL-10 e IL-2) em diluições seriadas a partir de 4000 pg/mL para IL-10 e 1000 pg/mL para IL-2 em meio DMEM suplementado. As placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e após o período de incubação, foram realizadas oito lavagens com PBS-T. Aos poços foram adicionados 50µL de uma solução contendo o anticorpo de detecção biotilado e estreptoavidina conjugada à peroxidase, permanecendo por um período de 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas oito vezes com PBS-T e 50µL da solução TMB (Pharmigen, San Diego, USA), foram adicionados a cada poço, seguido de 30 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50µL de solução 1M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm.

Para a análise da produção de TGF-β, foi utilizado o kit TGF-β1 E<sub>MAX</sub> Immunoassay System (Promega, Madison, WI, USA) segundo as instruções do fabricante. Placas com propriedade de alta ligação (Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas com 100µL do anticorpo de captura diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1M (pH 9,6) por 16 horas a 4°C . Após esse período, a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20) os poços foram bloqueados por 1 hora, a temperatura ambiente, com 200µL do tampão “TGF-β Block Buffer” fornecido pelo fabricante. As amostras foram tratadas com 1 µL de HCl 1N e após 15 minutos, foram neutralizadas com 1 µL de NaOH 1N. Esse tratamento é necessário para que o TGF-β inativo seja convertido em sua forma ativa, reconhecida pelos anticorpos presentes no kit. As amostras foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente e lavadas três vezes com tampão de lavagem.

Após as lavagens, foram adicionados 100µL por poço do anticorpo secundário anti-TGF-β (diluído 1:1000 no tampão “TGF-β sample Buffer”, fornecido pelo fabricante) e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente, após o período de incubação, a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem. A seguir, foram adicionados 100µL por poço do anticorpo de detecção conjugado à peroxidase (diluído 1:100 no tampão “TGF-β sample Buffer”, fornecido pelo fabricante). A placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem e 100 µL da solução TMB (Pharmigen, San Diego, USA), foram adicionados a cada poço, seguido de 30 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50µl de solução 1N de HCl. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm.

O limite de detecção para as citocinas foram de 0,01 ng/mL para a IL-2, 0,032 ng/mL para a IL-10, 0,097 ng/mL para o TGF-β, 0,098 ng/mL para a IL-6 e 0,021 ng/mL pra a IL-17.

### **3.8 Sorting de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>**

A separação das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* e isoladas de linfonodo de animais naïve foi realizada por meio da utilização do citômetro de fluxo FACSvantage (Becton & Dickinson, Mountain View, CA, EUA). As células provenientes da cultura de células dendríticas imaturas, pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose, e posteriormente co-cultivadas com células de linfonodo foram incubadas com anticorpos para a marcação das moléculas de superfície CD4 e CD25 como protocolo descrito anteriormente. Estas células foram ressuspensas em meio DMEM completo para posterior separação das frações CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Para a coleta das frações CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> foi utilizado meio DMEM completo com 10% de soro fetal bovino (Hyclone, USA).

### **3.9 Ensaios de proliferação**

Para determinação do potencial supressor das células foi utilizado um ensaio de proliferação envolvendo células respondedoras de camundongos BALB/c e células alvo

de C57BL/6. Para isso realizamos a marcação das células respondedoras com CFSE (do inglês Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl Ester) segundo protocolo descrito abaixo.

Baços de camundongos BALB/c foram retirados e as células foram ressuspensas em tampão de lise para as hemácias com 0,83% tris-amônio clorídrico e após 4 minutos em temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS. As células foram ressuspensas em meio DMEM sem soro fetal bovino. Foi adicionado CFSE para concentração final de 2 $\mu$ M para o total de células do baço. As células foram incubadas a 37°C e após 15 minutos foram lavadas com meio DMEM 5% SFB. As células foram ressuspensas em meio DMEM 5% SFB e incubadas a 37°C e após 10 minutos foram lavadas com meio DMEM 5% SFB. Após o protocolo de marcação com CFSE as células foram ressuspensas em DMEM completo e mantidas no gelo para posterior utilização no ensaio de proliferação.

Baços de camundongos C57BL/6 foram retirados e as células foram ressuspensas em tampão de lise para as hemácias com 0,83% tris-amônio clorídrico e após 4 minutos em temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS. Para impedir a proliferação das células alvo, estas foram irradiadas em fonte de radiação gama (3000 rad). Após o protocolo de irradiação as células foram ressuspensas em DMEM completo e mantidas no gelo para posterior utilização no ensaio de proliferação.

Foram adicionados em cada poço de placa de 96 poços em fundo U (Costar, Cambridge, MA, USA) o máximo de 6 x 10<sup>5</sup> células somando a quantidade de células respondedoras, alvo e Tregs nas devidas proporções. Para o ensaio de alorreatividade, as proporções de células respondedoras e alvo (BALB/c e C57BL/6 respectivamente) foram 1:1, 1:2 e 1:4 enquanto a proporção de células respondedoras e Tregs foram de 1:5, 1:10 e 1:25.

Para o ensaio policlonal na ausência de antígeno com  $\alpha$ CD3, foram utilizadas 2,5 x 10<sup>5</sup> células de camundongos BALB/c em proporção de 1:5, 1:10 e 1:25 com as Tregs (respondedora DO11.10 : reguladora). Também foi adicionado à cultura 0,5 $\mu$ g/mL de anticorpo  $\alpha$ CD3 murino (cedido pelo Prof. Gustavo Pessini Amarante-Mendes).

Para o ensaio na presença de antígeno inespecífico foram utilizadas  $2,5 \times 10^5$  células de camundongos DO11.10 com TCR transgênico para OVA em proporção de 1:5, 1:10 e 1:25 com as Tregs (respondedora DO11.10 : reguladora). Também foi adicionado à cultura 100 $\mu$ L de solução de OVA na concentração de 50 $\mu$ g/mL.

Visando o melhor aproveitamento das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas da cultura *in vitro*, utilizamos o método de avaliação da proliferação Cell Proliferation Biotrak ELISA (GE Healthcare Life Sciences, USA). Como obtivemos um número menor de células da cultura *in vitro*, a utilização de CFSE não nos permitiria avaliar a modulação da proliferação exercida pelas Tregs, portanto nos ensaios com as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro*, foi utilizado outro método para a avaliação da proliferação, o método de marcação com BrdU. Após o período de 72 horas de cultivo celular foram adicionados a cada poço 10 $\mu$ L BrdU 0,01mM diluído em meio de cultura DMEM seguido de incubação de 2 h a 37°C. Ao final deste período, a placa foi centrifugada e os sobrenadantes foram removidos. Foram adicionados 200 $\mu$ L/poço da solução fixadora e as placas foram mantidas por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, a solução fixadora foi removida e adicionados 200  $\mu$ L do reagente bloqueador (diluído na razão 1/10 em solução Tris/HCl 50mM, contendo NaCl 150mM, pH= 7,4) e feita nova incubação por 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi centrifugada para remoção do reagente bloqueador e adição de 100 $\mu$ L da solução contendo BrdU-peroxidase diluído 1/100, e incubada por mais 90 min à temperatura ambiente. As placas foram centrifugadas e lavadas três vezes com solução fornecida no kit por 15 min. Após as lavagens, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço de TMB proveniente do kit e a placa foi recoberta com papel alumínio por 5 min à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 25 $\mu$ L/poço da solução de ácido sulfúrico 1M e lida em filtro de 450 nm em espectrofotômetro.

### **3.10 Avaliação da capacidade supressora das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> em modelo *in vivo***

Para determinar a capacidade supressora das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* na modulação da resposta imune *in vivo*, estabelecemos um modelo de autoimunidade utilizando camundongos BALB/c Nude fêmeas (seis semanas de vida) para a transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas da cultura *in vitro*. Três meses após a transferência das células (12 semanas), os órgãos-alvo de autoimunidade como estômago, intestino grosso, rins e fígado, foram retirados para análise histológica, via coloração das lâminas com hematoxilina e eosina, para a identificação do infiltrado celular nos mesmos. Os grupos experimentais realizados foram: camundongos que receberam apenas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal), camundongos que receberam células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $0,2 \times 10^5$  por animal) e os animais que não receberam nenhum inóculo de células. Todas as células utilizadas para a transferência foram geradas *in vitro*, passaram por sorting em citômetro de fluxo FACS Vantage (Becton & Dickinson, Mountain View, CA, EUA), e foram inoculadas por via intravenosa pelo plexo ocular.

### **3.11 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente com o teste Student T e ANOVA, com pós-teste de Tukey, com auxílio do programa Graphpad Prism 5.0.

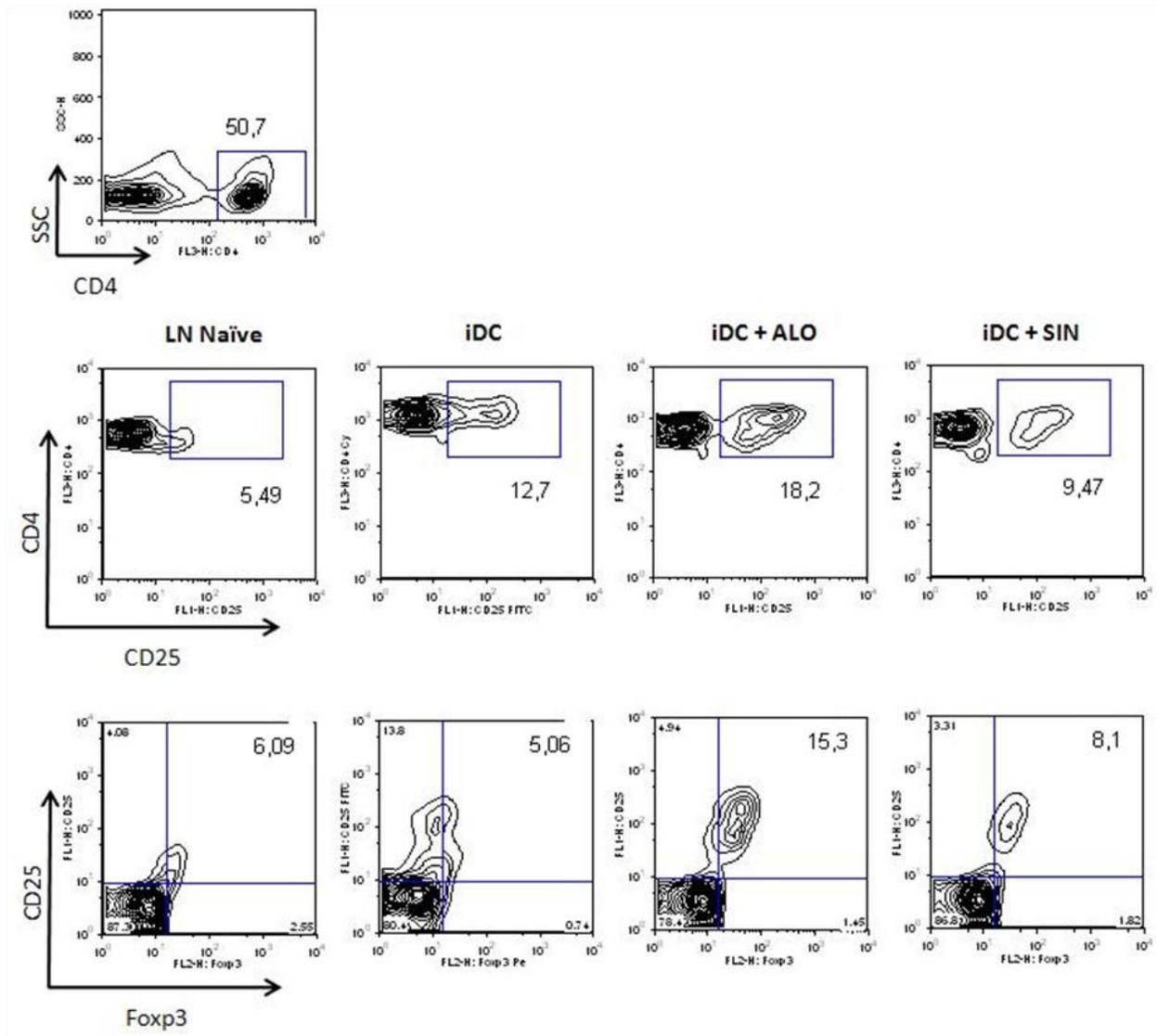


## 4 RESULTADOS

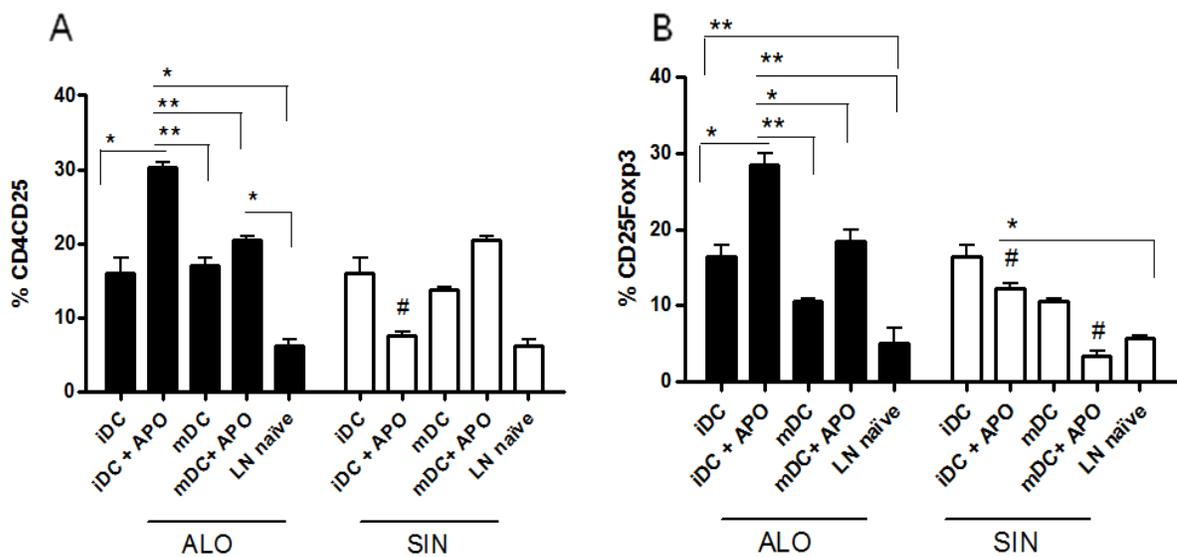
### 4.1 Expressão de CD25 e Foxp3 nas células CD4<sup>+</sup>

Como já demonstrado por dados preliminares obtidos em nosso laboratório, há aumento na população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> após cultivo das células dendríticas pulsadas com aloantígeno, com células totais de linfonodo. Aqui também demonstramos o aumento da população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> em todas as condições experimentais quando comparadas à mesma população de células do linfonodo do animal naïve. Entretanto as células dendríticas imaturas na presença do aloantígeno foram as mais eficientes em expandir a população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. A figura 2 mostra o aumento da população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> na cultura de iDCs pulsadas com timócitos singênicos e alogênicos em apoptose quando comparada com as mesmas populações presentes nos linfonodos do animal naïve (BALB/c) e também com a cultura de DCs imaturas com as células de linfonodo, sem estímulo com células em apoptose.

Para determinar se a natureza do antígeno com o qual as DCs foram pulsadas é capaz de influenciar a geração de células com fenótipo regulador, foram utilizados timócitos singênicos (BALB/c) em apoptose como fonte de antígeno para as células dendríticas. Como demonstrado pela figura 2, houve aumento na população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> quando as DCs foram pulsadas com timócitos singênicos em apoptose, todavia em menor quantidade, quando comparados aos ensaios com timócitos alogênicos. A figura 2 mostra a comparação entre a população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> gerada somente com iDCs, com a utilização de antígenos alogênicos, singênicos e a população já existente no linfonodo naïve. Na geração de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> no contexto singênico observamos que este aumento não é estatisticamente significativo, sendo próximo da porcentagem das Tregs já existentes no linfonodo naïve (figura 3). Na figura 3 observamos a capacidade das células alogênicas em expandir as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> em todas as condições experimentais utilizadas com diferente estimulação das DCs indicando a maior eficiência do contexto alogênico para a geração e expansão de células com fenótipo regulador.



**Figura 2.** Porcentagem de células  $CD4^+CD25^+$  e  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  determinada após citometria de fluxo. **LN Naïve:** porcentagem de células  $CD4^+CD25^+$ ,  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  presentes nos linfonodos de animais BALB/c naïve. **iDC:** cultura de DCs imaturas e células de linfonodo. **iDC ALO:** cultura de células de linfonodo com DCs imaturas pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose. **iDC SIN:** cultura de células de linfonodo com DCs imaturas pulsadas com timócitos singênicos em apoptose. Dados representativos de 6 experimentos.



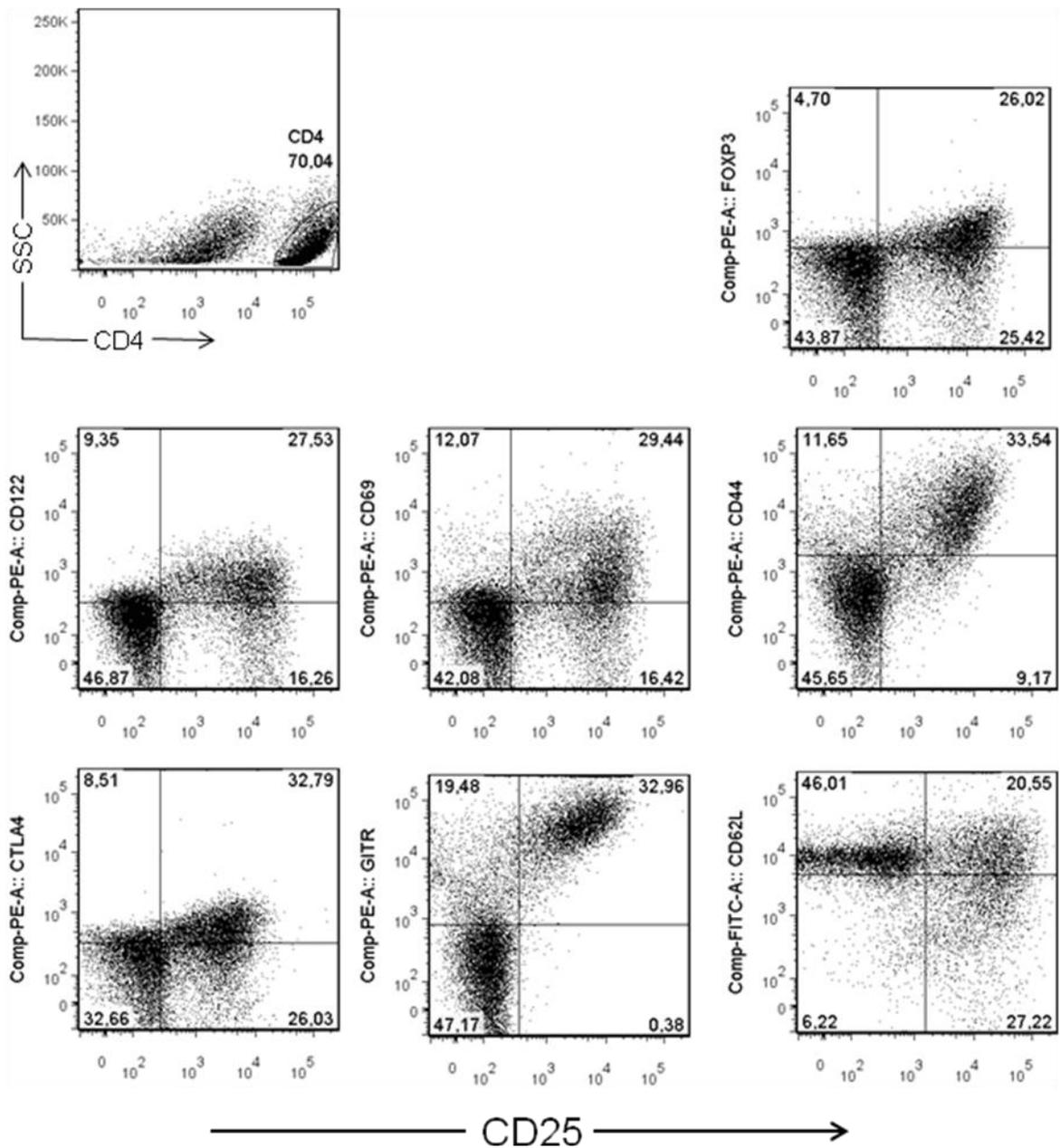
**Figura 3.** Análise das diferentes populações celulares determinadas por citometria de fluxo. Células de linfonodo foram cultivadas juntamente com células dendríticas imaturas (iDC), células dendríticas imaturas pulsadas com células em apoptose (iDC<sup>+</sup>APO), células dendríticas maduras (estimuladas com 1 µg/mL de LPS) (mDC) ou células dendríticas maduras (estimuladas com 1 µg/mL de LPS) e pulsadas com células em apoptose (mDC<sup>+</sup>APO). **A:** comparação entre a população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas com a utilização de timócitos alogênicos e singênicos em apoptose. **B:** Comparação entre a população de células CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> geradas com a utilização de timócitos alogênicos e singênicos em apoptose. Dados analisados com o teste estatístico de Student T. \*p<0,05, \*\*p<0,005, # p<0,005 para a comparação pareada alo X sin.

## 4.2 Caracterização das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas em cultura *in vitro*

Como as células T obtidas da cultura de DCs pulsadas com células alogênicas em apoptose apresentaram alta expressão de marcadores de células T reguladoras como o CD25 e Foxp3, avaliamos também a expressão de outros marcadores de ativação de células T e de células reguladoras como CD122, CD69, CD62L, CD44, CTLA-4 e GITR.

Na figura 4 podemos observar, a partir de células CD4<sup>+</sup>, a alta expressão de CD122, cadeia  $\beta$  do receptor para a IL-2, tanto nas células CD25<sup>high</sup> quanto nas CD25<sup>low</sup>, indicando a expressão de parte do receptor de alta afinidade para a IL-2 por estas células geradas *in vitro*. A expressão de CD69 também se mostrou alta nas células CD25<sup>+</sup>, indicando fenótipo de ativação celular precoce. O fenótipo de ativação pode ser confirmado pela alta expressão de CD44 também nas células CD25<sup>+</sup>. O marcador CD62L mostrou-se presente nas células CD4<sup>+</sup> tanto CD25<sup>+</sup> quanto CD25<sup>-</sup>, mas a população CD25<sup>+</sup> apresenta uma variação da expressão deste marcador, populações CD62L<sup>high</sup> e CD62L<sup>low</sup>. As células CD25<sup>+</sup> também apresentaram expressão de CTLA-4 e GITR, marcadores típicos de células reguladoras.

Com estes resultados podemos dizer que além da expressão de CD4, CD25 e Foxp3, as células geradas *in vitro* possuem fenótipo de células ativadas, sugerindo que o modelo experimental utilizado é capaz de gerar tanto células com fenótipo de ativação precoce e tardia, quanto células com fenótipo regulador.

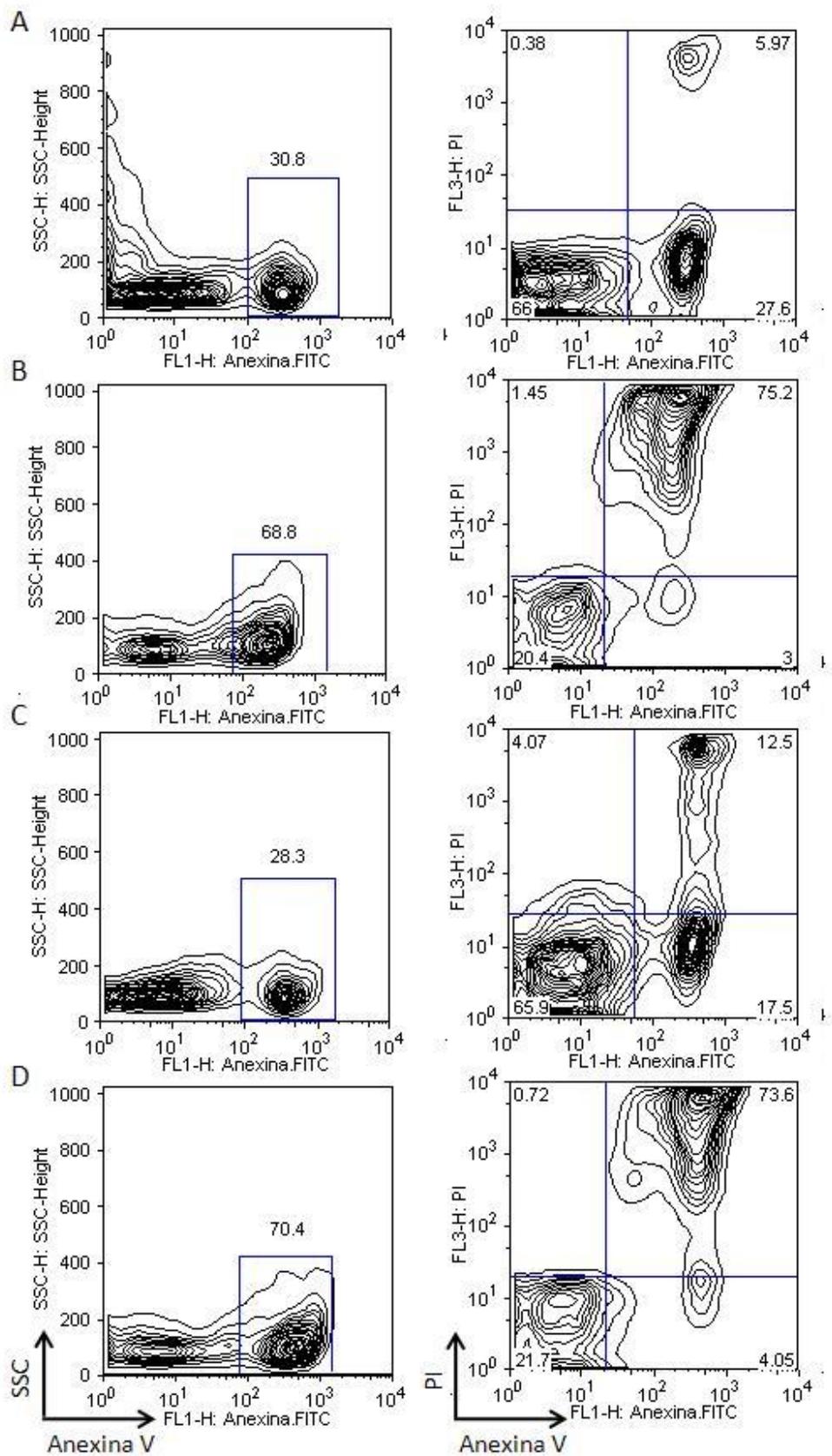


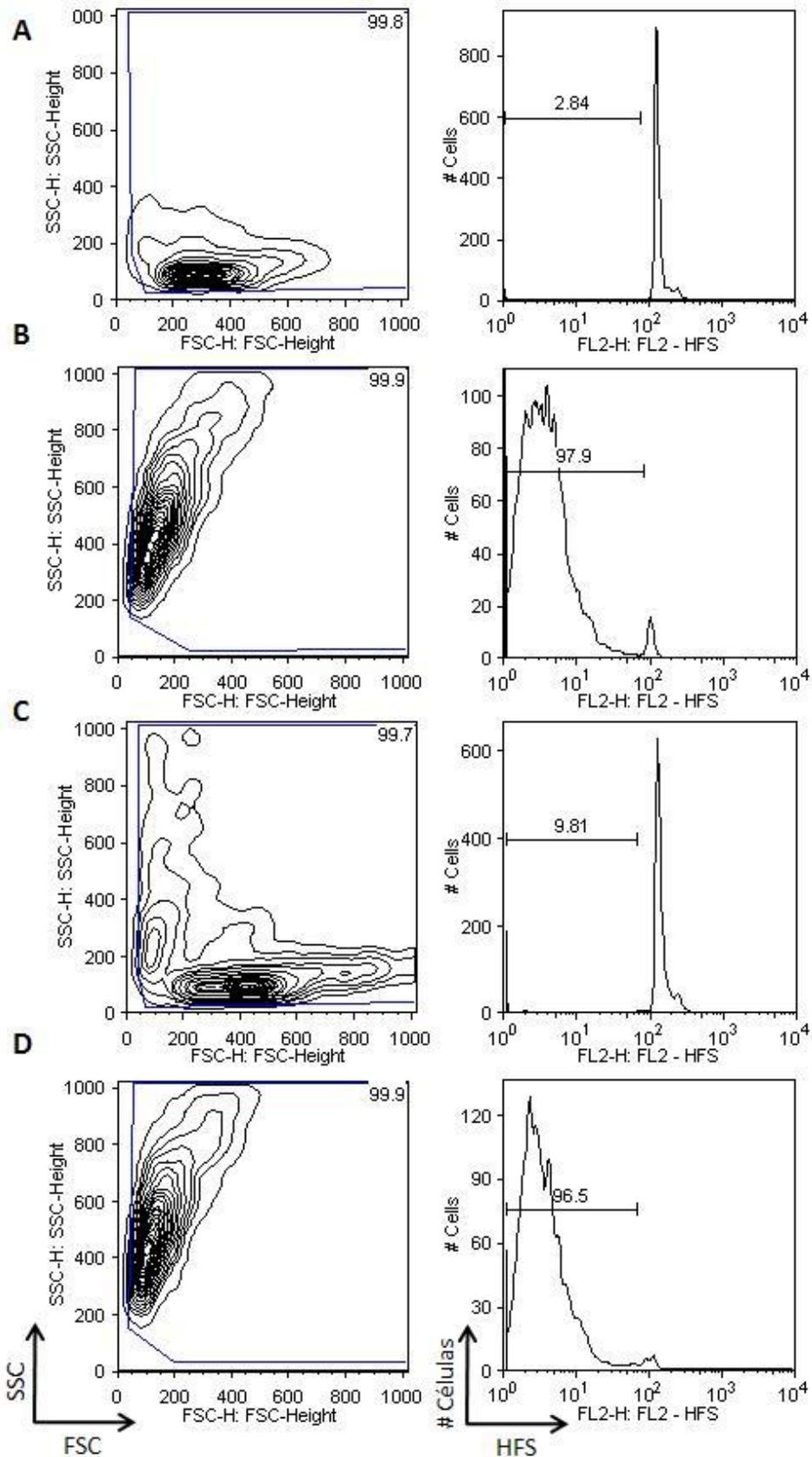
**Figura 4.** Análise da expressão de CD25, Foxp3, CD122, CD69, CD44, CTLA-4, GITR e CD62L pelas células CD4<sup>+</sup> da cultura de iDCs pulsadas com timócitos alógenos em apoptose e co-cultivadas com células de linfonodo.

### 4.3 Avaliação da apoptose em timócitos

Para determinar a viabilidade dos timócitos singênicos e alogênicos adicionados à cultura de células dendríticas, utilizamos métodos de determinação da apoptose como a marcação com Anexina-V juntamente com iodeto de propídeo, e HFS. A figura 5 mostra que após a incubação de 4 horas com a dexametasona aproximadamente 30% dos timócitos singênicos iniciam a externalização da camada de fosfatidilserina da membrana plasmática, indicando eventos iniciais da apoptose. Neste mesmo momento, 28% dos timócitos alogênicos se mostram positivos para a marcação com Anexina-V. Para garantir que durante a co-cultura com as células dendríticas, os timócitos estavam realmente em apoptose, após o estímulo com dexametasona, realizamos diversas lavagens com meio DMEM e deixamos os timócitos em cultura por 18 horas, período pelo qual as DCs ficam em contato com os timócitos, e fizemos a mesma marcação com Anexina-V-PI, HFS e PI. Após as 18 horas de cultura, aproximadamente 70% dos timócitos de ambas as linhagens murinas eram positivos para Anexina-V, garantindo que durante a cultura com as DCs os timócitos entram em apoptose e podem ser fagocitados.

A marcação com HFS e PI é capaz de confirmar outro evento da apoptose, a fragmentação de DNA, apesar de ser um evento mais tardio deste processo de morte celular. Nas primeiras 4 horas de estímulo com a dexametasona, pouco mais de 2% dos timócitos singênicos apresentavam fragmentação de DNA, e dos timócitos alogênicos, aproximadamente 10% mostravam este evento da apoptose. Após as 18 horas de cultura, mais de 90% dos timócitos apresentavam fragmentação de DNA, confirmando que estas células entraram em apoptose (Figura 6). Com estes resultados podemos confirmar que os timócitos estimulados com dexametasona estão em apoptose quando adicionados à cultura de DCs, garantindo a fagocitose de células em processo de morte celular programada em ambos os contextos.





#### **4.4 Avaliação do estado de ativação das células dendríticas co-cultivadas com timócitos em apoptose**

O estudo de Steinman et al. (2000) demonstra que DCs que internalizam corpos apoptóticos não passam pelo processo de amadurecimento que consiste no aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras como B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), CD40 e MHC II. Para determinar se a diferença na expansão de células com fenótipo regulador nos diferentes contextos alogênico e singênico era dependente do padrão de expressão de moléculas co-estimuladoras induzidas nas DCs por cada tipo de antígeno, realizamos análises de citometria de fluxo para avaliar o padrão de expressão de B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), CD40 e MHC II pelas células dendríticas após o co-cultivo com timócitos alogênicos e singênicos em apoptose.

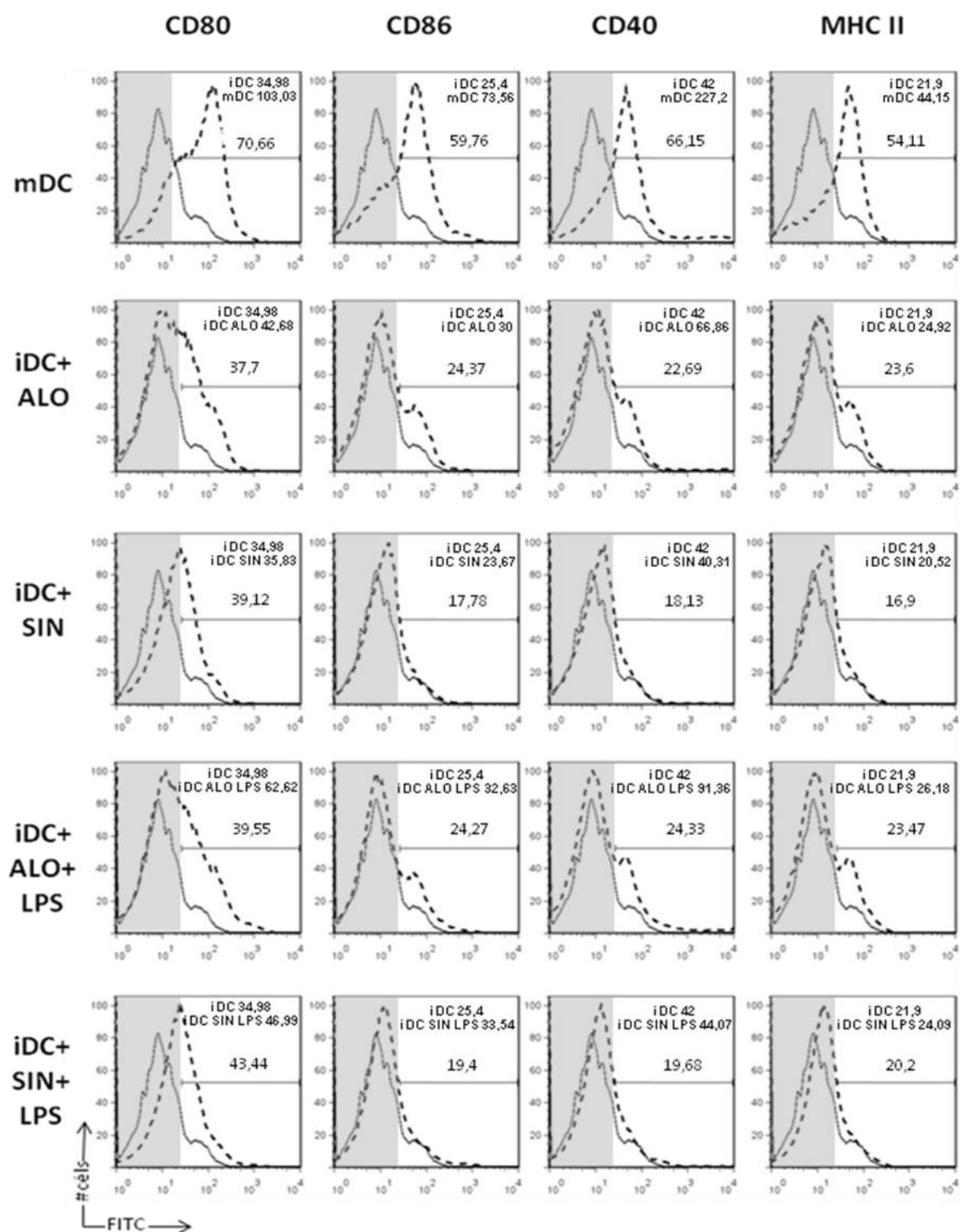
Nossos resultados demonstram que a incubação das DCs com timócitos em apoptose não modifica o padrão de expressão de moléculas co-estimuladoras (figura 7 e tabela 1). Este fenômeno é observado tanto com a incubação com timócitos alogênicos quanto com os timócitos singênicos em apoptose. As DCs que foram incubadas com timócitos em apoptose mostram padrão de expressão de moléculas co-estimuladoras semelhante ao das DCs imaturas, mostrando que as células apoptóticas, tanto alogênicas quanto singênicas têm a capacidade de não induzir o processo de maturação nas células dendríticas.

Neste experimento também demonstramos que a internalização de corpos apoptóticos pelas DCs é capaz de conferir um caráter tolerogênico às mesmas, fato que pode ser comprovado pela resistência à maturação pelo LPS. As iDCs foram incubadas por 18 horas com timócitos em apoptose, em ambos os contextos, e após este período, adicionamos 1 µg/mL de LPS. Após 24 horas, recolhemos as células e realizamos a marcação para moléculas co-estimuladoras. Podemos ver que as DCs que fagocitaram células em apoptose não alteram a expressão de marcadores de co-estimulação e, mesmo com a estimulação com LPS, não houve aumento destes mesmos marcadores (figura 7). A tabela 1 mostra a média de intensidade de fluorescência (MIF) das diferentes moléculas co-estimuladoras nas diferentes condições de cultura das DCs. A

diferença apresentada pela figura de histogramas fica mais evidenciada com a MIF, uma vez que as DCs que fagocitaram corpos apoptóticos não aumentam a expressão das moléculas co-estimuladoras analisadas. Estes resultados sugerem que as células apoptóticas são capazes de induzir DCs tolerogênicas e este poderia ser o mecanismo pelo qual as DCs conseguem expandir células com propriedades reguladoras.

**Tabela 1.** Média da intensidade de fluorescência das células CD11c<sup>+</sup> para as diferentes moléculas co-estimuladoras expressas em DCs após os diferentes tratamentos.

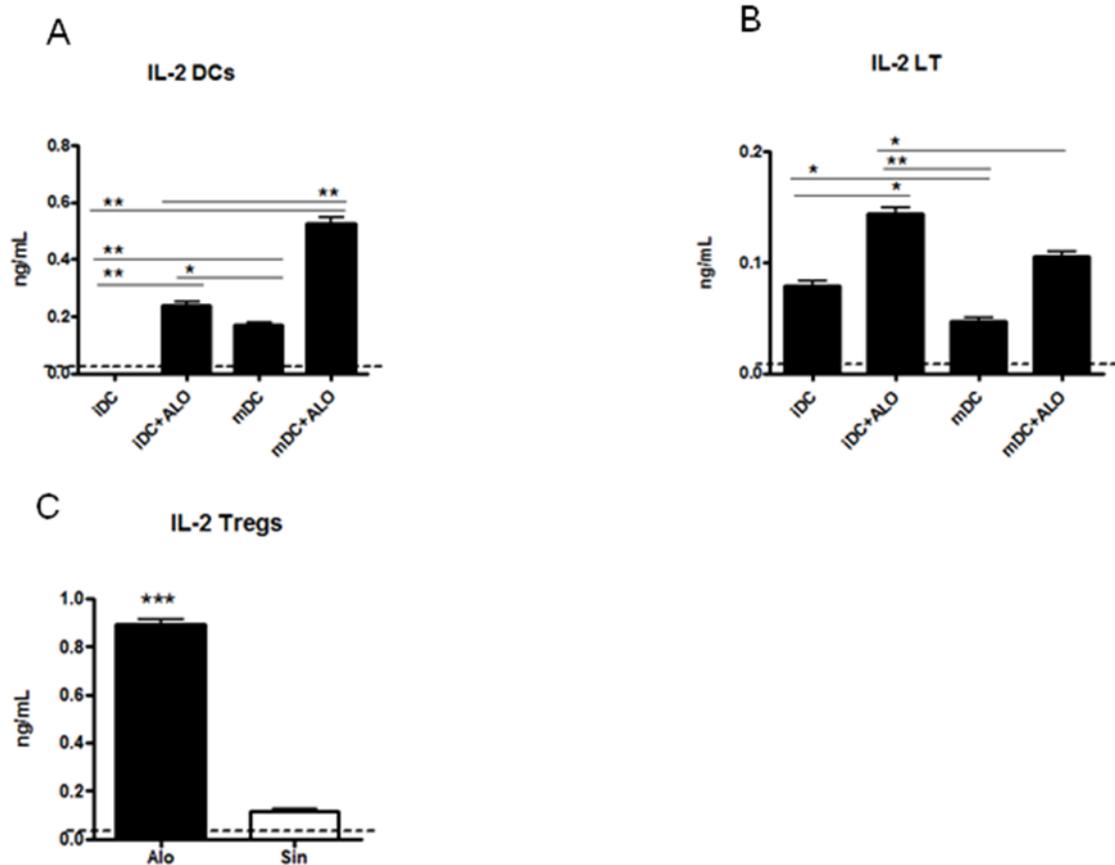
| Cultura de DCs | Média de intensidade de fluorescência (MIF) | Cultura de DCs                             | Média de intensidade de fluorescência (MIF) |
|----------------|---|--|---|
| iDC CD80       | 34,98                                       | iDC+SIN CD80                               | 35,83                                       |
| iDC CD86       | 25,4  | iDC+SIN CD86                               | 23,67                                       |
| iDC CD40       | 42  | iDC+SIN CD40                               | 40,31                                       |
| iDC MHC II     | 21,9  | iDC SIN MHC II                             | 20,52                                       |
| mDC CD80       | 103,03                                      | iDC <sup>+</sup> ALO <sup>+</sup> LPS CD80 | 62,62                                       |
| mDC CD86       | 73,56                                       | iDC+ALO+LPS CD86                           | 32,63                                       |
| mDC CD40       | 227,2                                       | iDC+ALO+LPS CD40                           | 91,36                                       |
| mDC MHC II     | 44,15                                       | iDC+ALO+LPS MHC II                         | 26,18                                       |
| iDC+ALO CD80   | 42,68                                       | iDC+ SIN+LPS CD80                          | 46,99                                       |
| iDC+ALO CD86   | 30  | iDC+ SIN+LPS CD86                          | 33,54                                       |
| iDC+ALO CD40   | 66,86                                       | iDC+ SIN+LPS CD40                          | 44,07                                       |
| iDC+ALO MHC II | 24,92                                       | iDC+ SIN+LPS MHC II                        | 24,09                                       |



#### 4.5 Análise da produção de citocinas pelas células em cultura

A produção de IL-2 foi analisada na cultura de células dendríticas antes e após a adição de células de linfonodo total. A figura 8 mostra que na cultura de células dendríticas imaturas não foi detectada a produção da citocina, mas quando as células dendríticas entraram em contato com células alogênicas em apoptose ou foram estimuladas para maturação com a adição de LPS, houve aumento na produção da mesma. Este aumento foi maior na condição na qual as células dendríticas maduras, já estimuladas com LPS, receberam células alogênicas em apoptose. No sobrenadante das co-culturas de células dendríticas com células de linfonodo há uma queda na produção de IL-2 em todas as condições, exceto nas dendríticas imaturas onde há aumento nessa produção, o que nos leva a crer que haja consumo desta pelos linfócitos presentes, e que esta citocina pode estar envolvida com a expansão das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>.

A produção de IL-2 também foi analisada após co-cultura de iDCs, pulsadas com antígenos alogênicos ou singênicos, com células de linfonodo. A condição experimental que apresentou a maior concentração de IL-2 foi a cultura na qual as iDCs haviam sido pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose, como mostra a figura 8. A fonte da produção de IL-2 não foi analisada, mas podemos especular que os antígenos alogênicos podem ativar os linfócitos T naïve e induzir a produção de IL-2, visto que a produção de desta citocina no contexto singênico é bem menor.



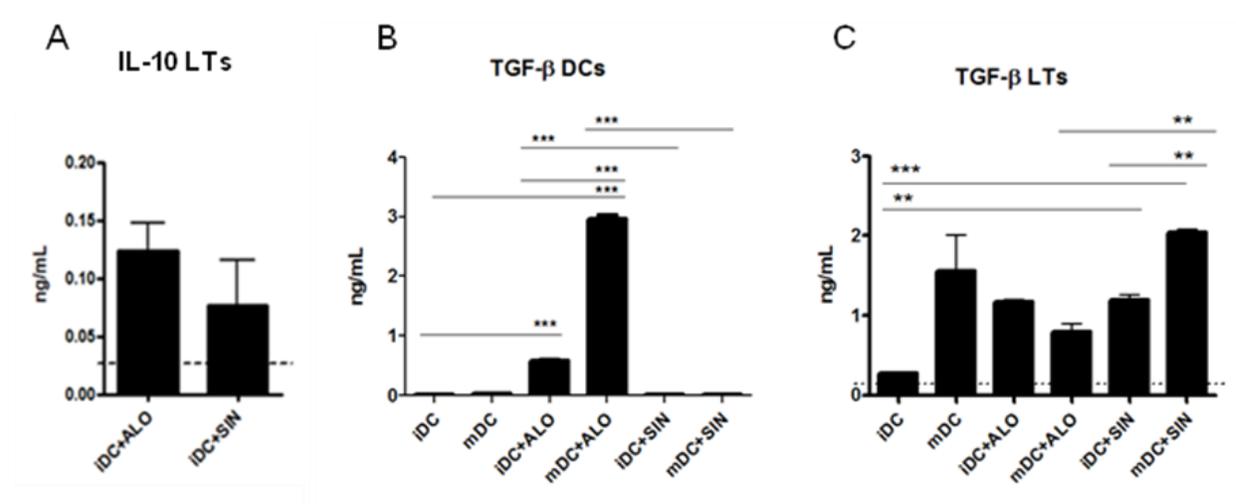
**Figura 8.** Análise da produção de IL-2 no sobrenadante das culturas celulares. **A:** Quantidade de IL-2 em ng/mL produzida no sobrenadante de cultura de células dendríticas. **B:** Quantidade de IL-2 em ng/mL produzida no sobrenadante de cultura de células dendríticas co-cultivadas com células de linfonodo. **C:** Quantidade de IL-2 em ng/mL produzida no sobrenadante de cultura de células dendríticas pulsadas com tímócitos singênicos ou alogênicos em apoptose e co-cultivadas com células de linfonodo. (iDC: cultura de células dendríticas imaturas, iDC<sup>+</sup>ALO: células dendríticas imaturas pulsadas com células alogênicas em apoptose, mDC: células dendríticas maduras (estimuladas com 1 µg/mL de LPS) (mDC), mDC<sup>+</sup>ALO: células dendríticas maduras (estimuladas com 1 µg/mL de LPS), pulsadas com células alogênicas em apoptose). Teste estatístico de Student T. \*p<0,05, \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0001.

Os linfócitos T reguladores são conhecidos por sua capacidade supressora que engloba desde mecanismos imunossupressores diretamente nas células auto-reativas como a produção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ , importantes para manutenção da auto-tolerância, até a indução de outras células com capacidade reguladora (Qiao et al., 2007). Ainda, o microambiente de citocinas pode determinar o destino das células ali presentes, podendo direcionar a diferenciação e expansão de certos tipos celulares. Para saber se no microambiente de expansão de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> havia a produção de citocinas imunossupressoras, tanto produzidas pelas DCs quanto pelos linfócitos adicionados à cultura, fizemos a dosagem de IL-10 e TGF- $\beta$  no sobrenadante da cultura de DCs nas diferentes condições experimentais e no sobrenadante da cultura de DCs já com os linfócitos T.

A produção de IL-10 foi analisada nas culturas de células dendríticas imaturas pulsadas com antígenos alogênicos ou singênicos. Não houve diferença significativa entre a produção de IL-10 nos dois contextos, sugerindo que esta citocina não estaria relacionada com a expansão diferencial de células com fenótipo regulador nos diferentes contextos. Já a produção de TGF- $\beta$  mostrou diferenças nos diferentes contextos e também quando comparamos as culturas somente de DCs e a cultura de DCs com linfócitos T (figura 9).

A produção de TGF- $\beta$  foi analisada no sobrenadante das culturas de DCs nos diferentes estados de ativação e nos diferentes contextos. Quando observamos a produção desta citocina acima do basal detectado nas culturas na presença de soro fetal bovino, podemos ver a maior detecção da citocina quando as DCs foram estimuladas com 1 $\mu$ g/mL de LPS e co-cultivadas com timócitos alogênicos em apoptose. Quando foram adicionados os antígenos singênicos, a produção de TGF- $\beta$  na cultura de células dendríticas imaturas foi abaixo do limite de detecção. Já na cultura de DCs com linfócitos, a produção total de TGF- $\beta$  diminuiu um pouco (em ng/mL) em todas as condições, mas mesmo assim ainda há diferenças entre os contextos singênico e alogênico. Com a adição de linfócitos à cultura, houve produção de TGF- $\beta$  na cultura com as DCs imaturas pulsadas com timócitos singênicos em apoptose. Entretanto, com

a metodologia utilizada não conseguimos distinguir qual célula produz qual citocina (figura 9).

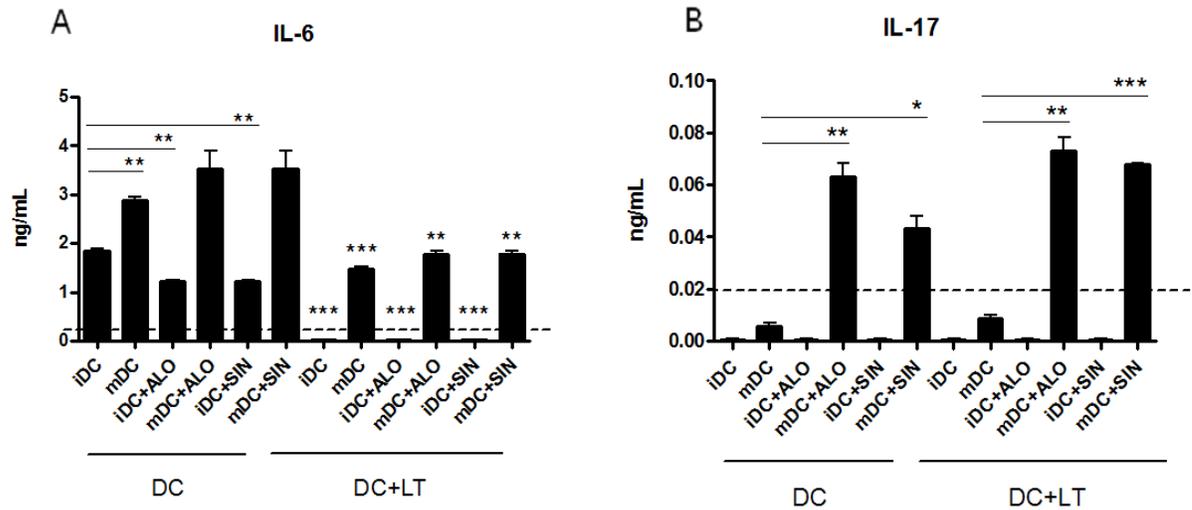


**Figura 9.** Análise da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  no sobrenadante das culturas celulares. **A:** Quantidade em ng/mL de IL-10 dosada no sobrenadante de cultura de células dendríticas imaturas, pulsadas com timócitos alogênicos e singênicos em apoptose, co-cultivadas com células de linfonodo. **B:** Quantidade em ng/mL de TGF- $\beta$  dosada no sobrenadante de cultura de células dendríticas (dados representam produção da citocina acima do basal detectado na cultura com meio de cultura contendo soro fetal bovino). **C:** Quantidade em ng/mL de TGF- $\beta$  dosada no sobrenadante de cultura de células dendríticas imaturas co-cultivadas com células de linfonodo. (iDC: cultura de células dendríticas imaturas, iDC<sup>+</sup>ALO: células dendríticas imaturas pulsadas com células alogênicas em apoptose, mDC: células dendríticas maduras (estimuladas com 1  $\mu$ g/mL de LPS) (mDC), mDC<sup>+</sup>ALO: células dendríticas maduras (estimuladas com 1  $\mu$ g/mL de LPS), pulsadas com células alogênicas em apoptose). Teste estatístico de Student T. \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$ .

Com a estimulação de células dendríticas com LPS, ocorre o processo de maturação que faz com que a DC seja preparada para ativação do linfócito T. Uma vez estimulada com LPS, a DC passa a produzir várias citocinas, dentre elas a IL-6 que é uma citocina pró-inflamatória produzida em resposta ao reconhecimento de PAMPs por PRRs na DC. Alguns desses PRRs envolvem os Toll like receptors que reconhecem o LPS da parede celular de bactérias entre outros componentes de patógenos (Medzhitov & Janeway, 2002).

Apesar do fato das células em apoptose não alterarem o padrão de expressão de moléculas co-estimuladoras pelas células dendríticas, a adição de timócitos em apoptose estimula a produção de IL-6 tanto no contexto singênico quanto no alogênico. Entretanto, a produção desta citocina é maior quando as células dendríticas foram previamente estimuladas com 1µg/mL de LPS por 24h. Quando são adicionados os linfócitos T à cultura, há diminuição na detecção de IL-6 nas culturas de células dendríticas imaturas, sendo detectável somente quando as DCs foram estimuladas com LPS.

Foi relatado recentemente um novo subtipo de linfócito T, o chamado linfócito Th17 que produz altas quantidades de IL-17. Após vários estudos sobre esse tipo celular, foi demonstrado que a diferenciação desta célula era dependente de TGF-β e IL-6 (Betteli et al., 2006). Para determinar se o modelo experimental utilizado para geração de células T reguladoras era capaz também de induzir a produção de IL-17, uma vez que há produção tanto de IL-6 quanto TGF-β, realizamos a dosagem de IL-17 nas diferentes culturas celulares. A produção de IL-17 só mostrou-se aumentada nas condições experimentais nas quais as células dendríticas foram estimuladas com LPS e pulsadas com timócitos em apoptose, assim como a produção de IL-6. Nas demais condições não foram observadas quantidades significantes da citocina. Comparando a produção da citocina no sobrenadante das DCs maduras, estimuladas com LPS somente, há pouca produção de IL-17. Entretanto, quando co-cultivamos as DCs com timócitos em apoptose, tanto singênicos quanto alogênicos, a produção da citocina aumenta bastante, indicando que as células em apoptose são capazes de induzir mais de um subtipo de células, os linfócitos T reguladores e algum subtipo celular produtor de IL-17.



**Figura 10.** Análise da produção de IL-6 (A) e IL-17 (B) no sobrenadante das culturas celulares. Quantidade em ng/mL de IL-6 dosada no sobrenadante de cultura de células dendríticas imaturas (iDC), células dendríticas imaturas pulsadas com células alogênicas ou singênicas em apoptose (iDC<sup>+</sup>ALO ou iDC<sup>+</sup>SIN), células dendríticas maduras (estimuladas com 1µg/mL de LPS) (mDC) ou células dendríticas maduras (estimuladas com 1 µg/mL de LPS) e pulsadas com células alogênicas ou singênicas em apoptose (mDC<sup>+</sup>APO ou mDC<sup>+</sup>SIN) e com a adição de células de linfonodo (DC LT). Teste estatístico de Student T. \*p<0,05 \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005

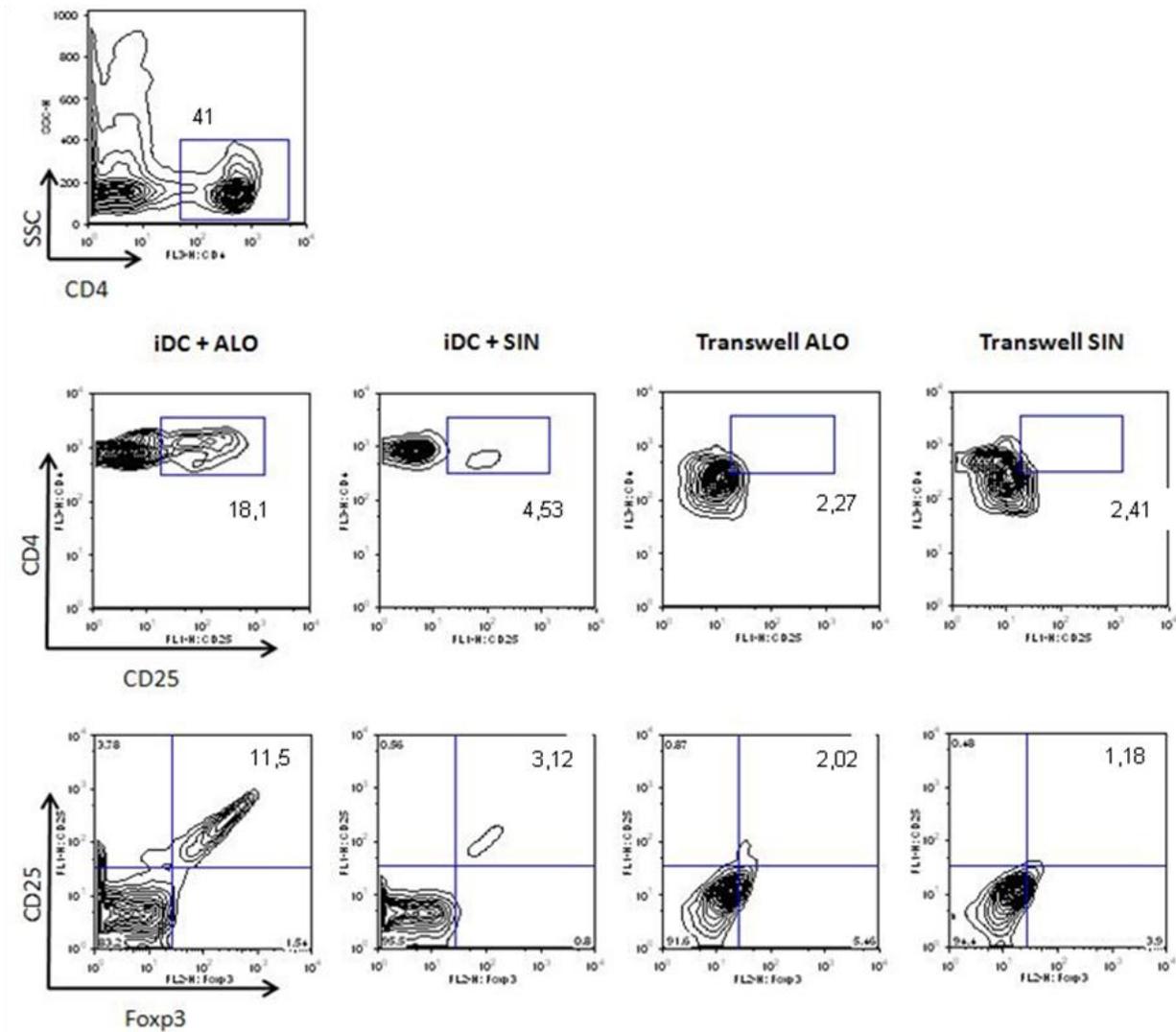
#### **4.6 Avaliação da necessidade de contato célula-célula para a geração de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>**

Para que haja a montagem da resposta imune, é preciso que haja a interação entre vários tipos celulares, dentre eles a ativação de linfócitos T que requer contato entre o linfócito e a célula apresentadora de antígenos. Ainda, sem a participação de moléculas co-estimulatórias, o linfócito T pode não se ativar por completo (Dustin, 1998). Existem trabalhos na literatura que demonstram a capacidade de algumas citocinas como a IL-2, a sinalização via STAT 5 e TGF- $\beta$  de induzir a expressão de Foxp3 independente da ativação do linfócito T via TCR (Zorn et al., 2006, Schramm et al., 2004). Estes fatos nos levaram à hipótese de que as células com fenótipo regulador poderiam ser expandidas na ausência de contato com a APC, se houvessem as citocinas necessárias para a indução dos marcadores em questão.

Para determinar se a população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> poderia ser expandida na ausência de contato com a DC, utilizamos o método Transwell (Corning NY, EUA) no qual pudemos separar as células dendríticas imaturas, pulsadas com timócitos alogênicos ou singênicos em apoptose, das células de linfonodo. As membranas do transwell possuem poros de 0,4  $\mu$ m que permitem a passagem de citocinas, mas impedem o contato próximo entre as células em cada compartimento do poço.

Como podemos ver na figura 11, quando houve a separação das células dendríticas e das células de linfonodo, a expansão de células com fenótipo regulador foi diminuída drasticamente tanto no contexto alogênico quanto no contexto singênico. Esta diminuição pode ser observada tanto na população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> como na população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Podemos ver, também, a perda de parte da expressão destes marcadores CD4, CD25, e Foxp3 nas células provenientes do linfonodo, sugerindo que essa expressão constitutiva nas células T é dependente de contato com APCs. Quando isolamos as culturas, a porção de DCs e outras APCs presentes nas células do linfonodo podem não ser suficientes para manter a expressão destes

marcadores. A dosagem de IL-10 e TGF- $\beta$  nas condições de isolamento das culturas utilizadas foi abaixo do limite de detecção.



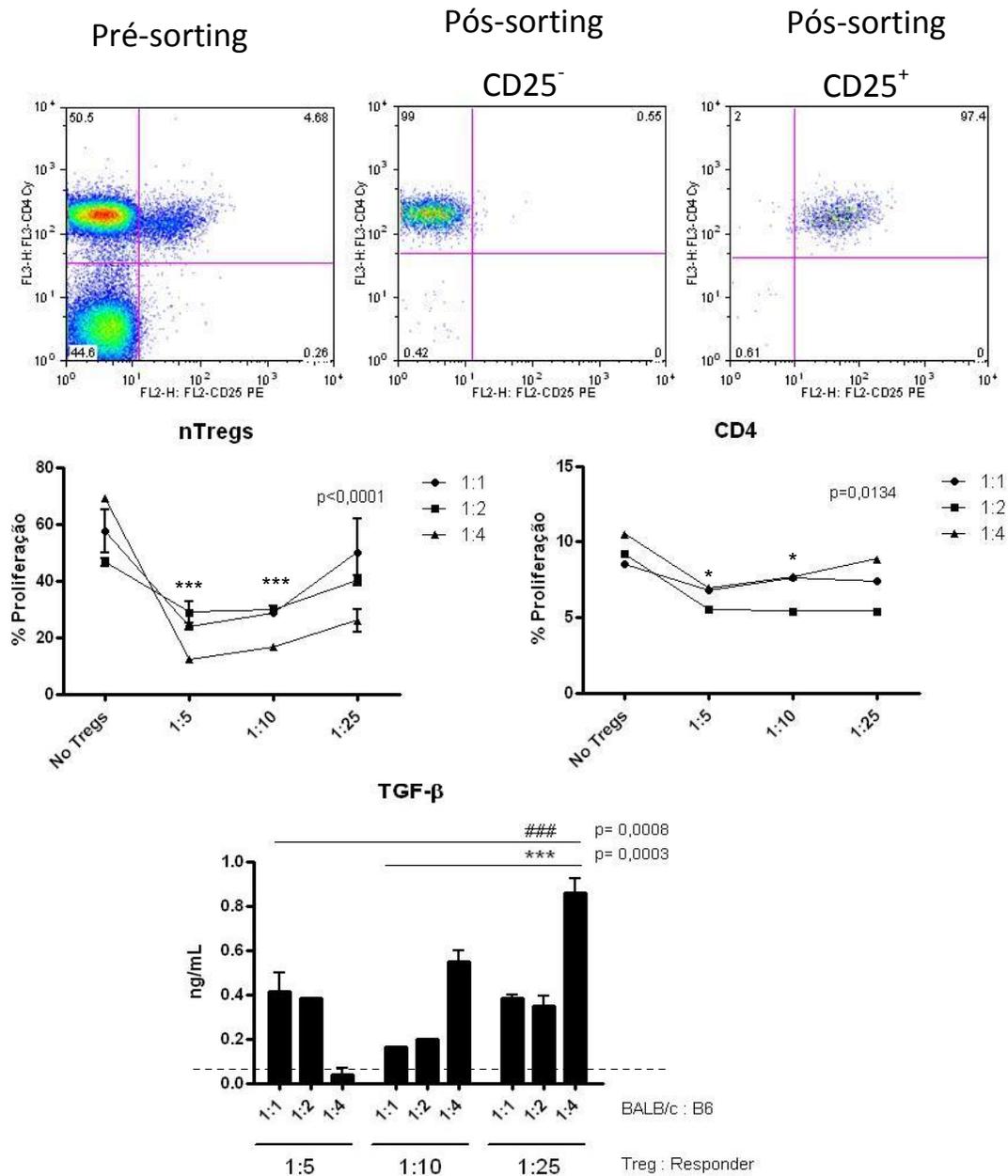
**Figura 11.** Porcentagem da população  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  nas diferentes condições experimentais. **Alo:** cultura de células dendríticas, pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose, juntamente com células de linfonodo. **Sin:** cultura de células dendríticas, pulsadas com timócitos singênicos em apoptose, juntamente com células de linfonodo. **Transwell Alo:** cultura de células dendríticas, pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose, separada da cultura de células de linfonodo por membrana de 24 mm transwell (Corning® NY, EUA). **Transwell Sin:** cultura de células dendríticas, pulsadas com timócitos singênicos em apoptose, separada da cultura de células de linfonodo por membrana de 24 mm transwell (Corning® NY, EUA).

#### **4.7 Avaliação da capacidade supressora das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodos de animais naïve**

Para determinar se as Tregs geradas *in vitro* eram capazes de modular a resposta imune, primeiramente decidimos verificar se células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodos de animais naïve eram capazes de regular um MLR (do inglês mixed leucocyte reaction) envolvendo alorreatividade. Para isso fizemos o sorting de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de pool de linfonodos do animal naïve e adicionamos ao ensaio de proliferação com esplenócitos de BALB/c e C57BL/6 irradiados (descrito em *Materiais e Métodos*). Para a determinação da proliferação, foi realizada a marcação dos esplenócitos de BALB/c com CFSE (do inglês carboxyfluorescein succinimidyl ester) e, após 72h, análise em citômetro de fluxo.

As células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodo de BALB/c naïve foram capazes de modular a resposta alogênica induzida nos esplenócitos de BALB/c pelos antígenos de C57BL/6 em concentrações diferentes de células respondedoras e alvo (1:1, 1:2 e 1:4) e também em concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25) ( $p < 0,0001$ ). Na concentração de 1:25 de células reguladoras : respondedoras, a proliferação começa a ser restaurada, mas ainda não chega ao pico atingido na ausência de Tregs. As Tregs isoladas do linfonodo do animal naïve também foram capazes de suprimir a proliferação de células CD4<sup>+</sup> presentes no MLR ( $p < 0,05$ ) (figura 12).

Também analisamos a produção de TGF- $\beta$  no sobrenadante das diferentes condições de supressão e os resultados mostram maior produção da citocina quando na concentração de 1:25 (reguladora:respondedora). Esta citocina poderia estar relacionada com a supressão encontrada nas diferentes concentrações utilizadas de células reguladoras : respondedoras. Com estes dados, pudemos estabelecer o ensaio de proliferação necessário para avaliar a função das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro*.



**Figura 12.** Sorting de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodo de BALB/c naïve, supressão da proliferação por células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodo de BALB/c naïve e análise da produção de TGF-β (ng/mL) nas culturas celulares na presença de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodo de BALB/c naïve. **nTregs:** Análise da proliferação de esplenócitos de BALB/c frente a estímulo alógeno com esplenócitos de C57Bl/6 irradiados em diferentes concentrações diferentes de células respondedoras e alvo (1:1, 1:2 e 1:4) e também em concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25). **CD4:** Análise da proliferação de esplenócitos de BALB/c CD4<sup>+</sup> frente a estímulo alógeno com esplenócitos de C57Bl/6 irradiados em diferentes concentrações de células respondedoras e alvo (1:1, 1:2 e 1:4) e também em concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25). **TGF-β:** Produção de TGF-β em ng/mL em diferentes concentrações de células respondedoras e alvo (1:1, 1:2 e 1:4) e também em concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25). Teste estatístico de Student T e ANOVA. \*p<0,05, \*\*\*p<0,0001.

#### 4.8 Avaliação da capacidade supressora das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *in vitro*

Inicialmente, o fenótipo regulador induzido pela co-cultura de células de linfonodo com dendríticas pulsadas com timócitos em apoptose não garante que essa população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> seja realmente de linfócitos T reguladores. Para isso, era preciso avaliar o potencial funcional destas células. Como descrito nos *Materiais e Métodos*, as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, expandidas pela co-cultura com células dendríticas imaturas pulsadas com aloantígenos, foram separadas por sorting e preparadas para avaliação da capacidade reguladora em ensaios de proliferação celular. Optamos por fazer a separação das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> da condição experimental descrita acima, por se tratar da condição na qual houve maior expansão de células com fenótipo regulador. Também fizemos o sorting das células somente pela marcação com CD4 e CD25, pois a marcação de Foxp3 é intracelular, e para isso é necessário que a célula seja permeabilizada, inutilizando-a para ensaios futuros.

Para avaliação do potencial modulador das células geradas *in vitro*, utilizamos um ensaio de proliferação que envolve alorreatividade entre esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 (descrito em *Materiais e Métodos*). Para detectar a proliferação, utilizamos um kit de incorporação de BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) que permite a detecção deste composto no DNA recém sintetizado.

No ensaio de alorreatividade, que seria o ensaio envolvendo antígenos específicos para as células geradas *in vitro*, as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> conseguiram regular a proliferação dos esplenócitos de BALB/c em diluições desde 1:5 até 1:50 (reguladora : respondedora), em diferentes concentrações de células respondedoras (BALB/c) e alvo (C57BL/6) (1:1, 1:2, 1:4 de respondedora : alvo). A maior supressão foi observada na condição na qual as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> estavam em menor quantidade, quando comparadas às células respondedoras e as células alvo (figura 13).

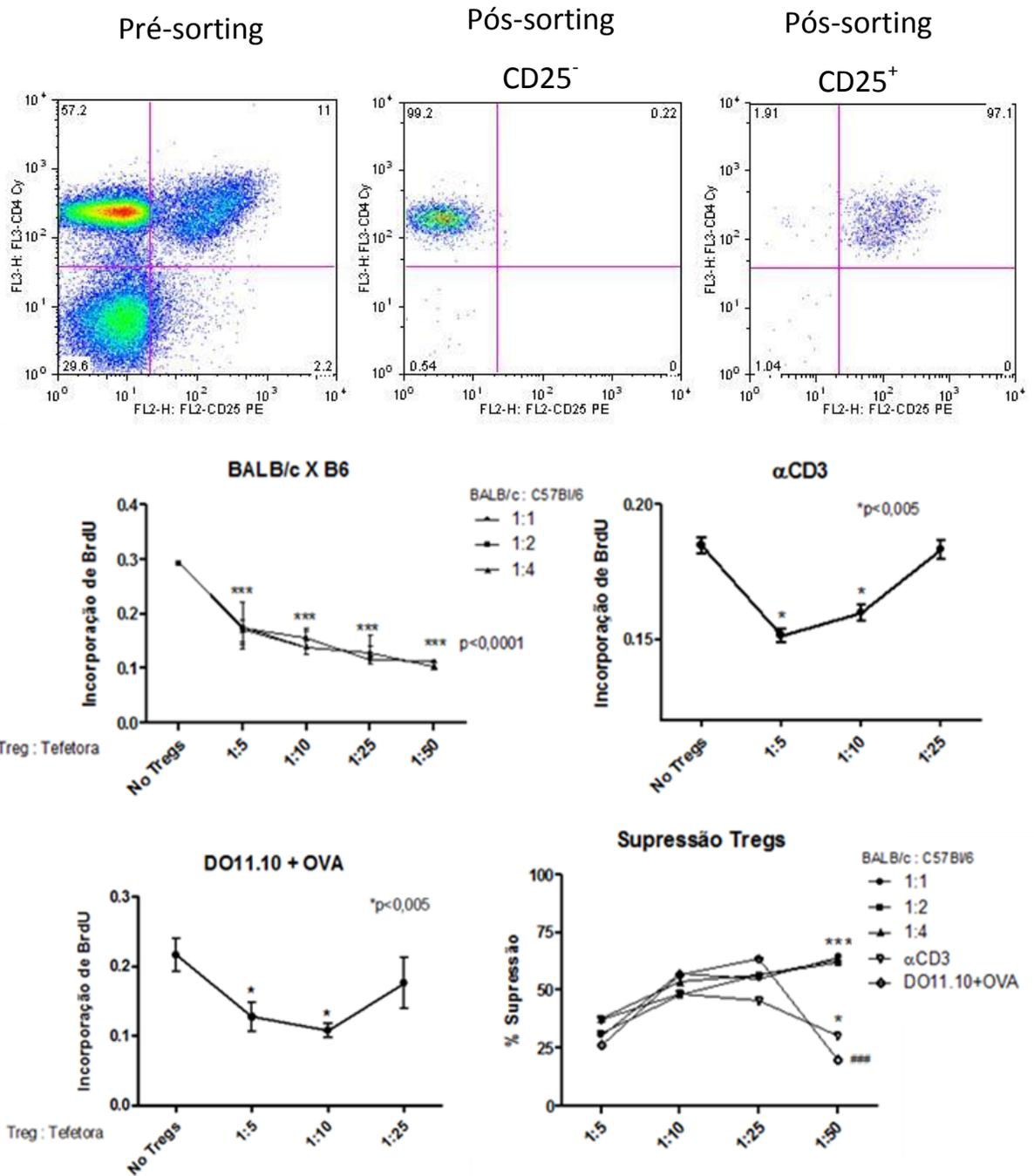
Também realizamos um ensaio para determinar a capacidade reguladora destas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* frente a um estímulo policlonal das células respondedoras. Com a estimulação com 0,5 µg de αCD3, houve proliferação das células de camundongo BALB/c, mas na presença de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, essa proliferação foi contida, mas conforme a concentração destas células diminuiu, de 1:5

para 1:25 (reguladora : respondedora), o poder regulador foi perdido, mostrando que as células geradas *in vitro* são capazes de regular de forma inespecífica a proliferação com estímulo policlonal (figura 13).

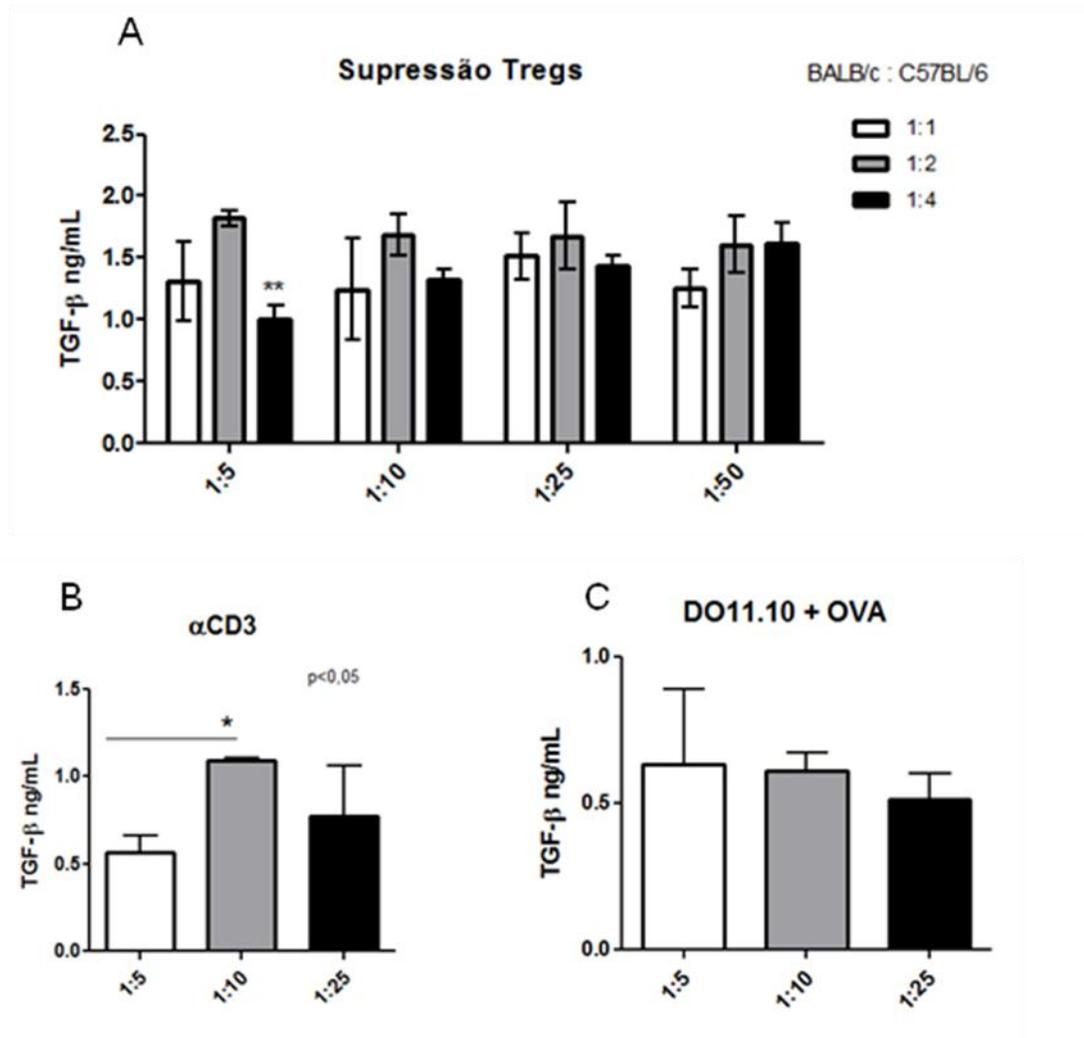
Para certificar que as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* são capazes de regular de forma inespecífica a proliferação celular, utilizamos esplenócitos de camundongos DO11.10, com TCR específico para OVA, e estimulamos com solução de 50 µg/mL de OVA na presença ou ausência das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> separadas por sorting. Assim como o ensaio de proliferação com αCD3, as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* foram capazes de regular a proliferação dos esplenócitos de DO11.10, mas desta vez as células reguladoras foram mais funcionais na diminuição da proliferação na condição intermediária de 1:10 (reguladora : respondedora) (figura 13).

Estes dados nos permitem dizer que as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* são capazes de modular a proliferação de células respondedoras de modo antígeno específico, com o ensaio de alorreatividade específico e também de modo inespecífico, uma vez que também suprimem a proliferação com estímulos policlonais e de especificidade diferente da qual foram geradas.

Também avaliamos a produção da citocina imunossupressora TGF-β no sobrenadante dos diferentes ensaios de supressão, e os resultados mostram que não houve diferença significativa na produção nas diferentes condições nos ensaios utilizados. O único ensaio a mostrar alguma diferença estatística foi o ensaio com αCD3, mas a condição na qual houve maior produção da citocina não condiz com a condição onde houve maior supressão da proliferação (figura 14). As outras condições dos ensaios de supressão mostraram a produção que quantidades similares de TGF-β o que nos sugere que esta citocina não está relacionada com o controle da proliferação pelas Tregs isoladas da cultura *in vitro*. Talvez as estas Tregs geradas no contexto alogênico *in vitro* sejam capazes de controlar a proliferação com o auxílio de outros mecanismos, provavelmente que envolvem contato entre a célula reguladora e efetora.



**Figura 13.** Sorting de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de linfonodo de BALB/c naïve e análise do potencial modulador das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro*. **BALB/c X B6:** Proliferação de esplenócitos de BALB/c estimulados com esplenócitos de C57Bl/6 irradiados (em diferentes concentrações respondadora:alvo 1:1, 1:2, 1:4) em MLR com células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* também em diferentes concentrações (reguladora:respondadora 1:5, 1:10, 1:25, 1:50). **αCD3:** Proliferação de esplenócitos de BALB/c estimulados com 0,5 µg de αCD3 em MLR com células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* em diferentes concentrações (reguladora:respondadora 1:5, 1:10, 1:25). **DO11.10+OVA:** Proliferação de esplenócitos de DO11.10 estimulados com 50 µg/mL de OVA em MLR com células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* em diferentes concentrações (reguladora:respondadora 1:5, 1:10, 1:25). **Supressão Tregs:** Porcentagem de supressão da proliferação com a adição das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro*. \* p=0,0124, \*\*\* p<0,0001, ### p=0,0007. Teste estatístico de ANOVA.



**Figura 14.** Produção de TGF- $\beta$  em ng/mL nos diferentes ensaios de supressão. A: Produção de TGF- $\beta$  nas diferentes concentrações de células respondedoras e alvo (1:1, 1:2 e 1:4) e também em concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10, 1:25 e 1:50). B: Produção de TGF- $\beta$  nas condições do ensaio de supressão com  $\alpha$ CD3 nas concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25). C: Produção de TGF- $\beta$  nas condições do ensaio de supressão com esplenócitos de DO11.10 estimulados com OVA nas concentrações diferentes de células reguladoras e respondedoras (1:5, 1:10 e 1:25). Teste estatístico de Student T e ANOVA. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ .

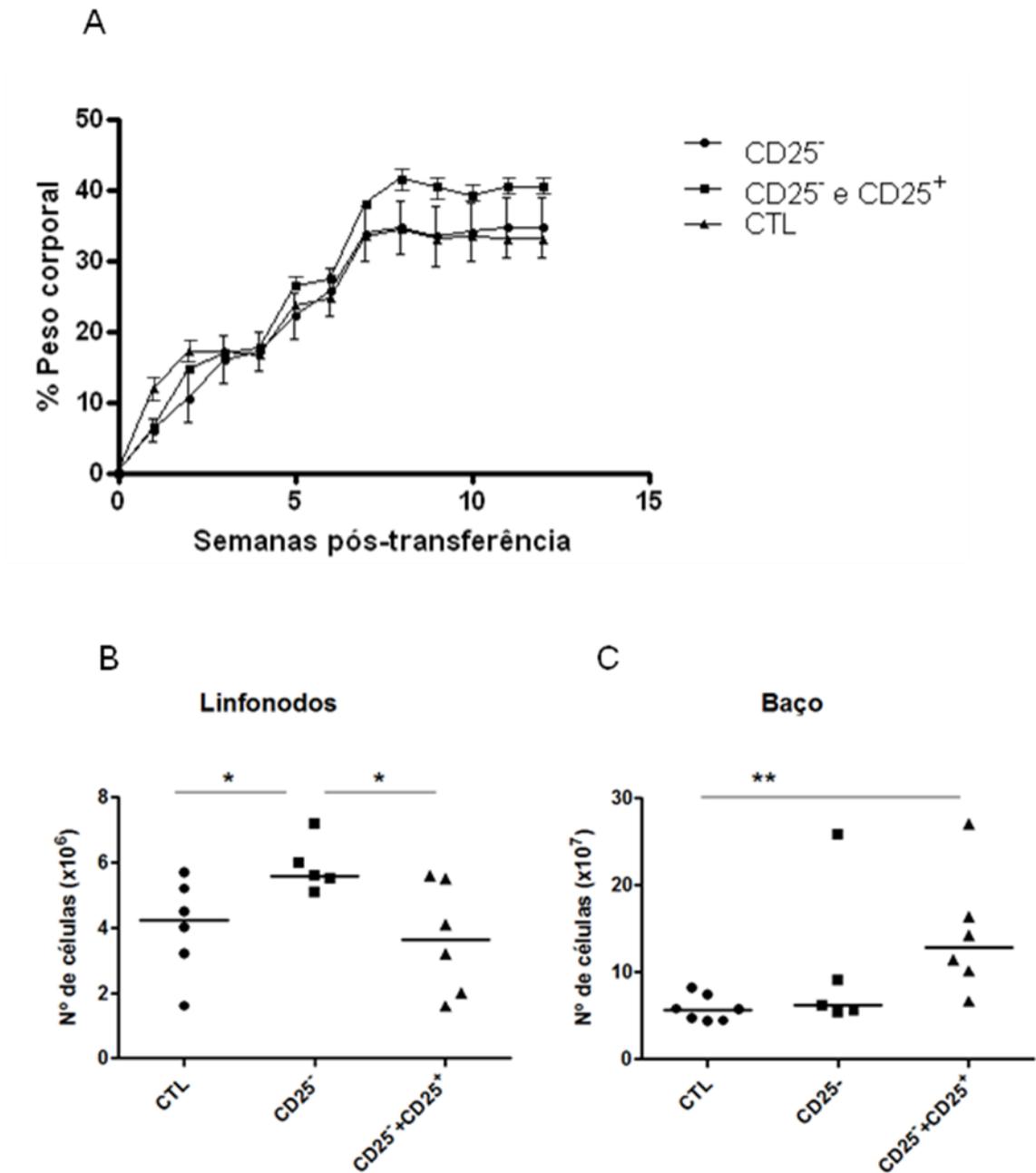
#### 4.9 Avaliação da capacidade supressora das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *in vivo*

Para avaliar o potencial regulador *in vivo* das Tregs isoladas da cultura *in vitro*, estabelecemos um modelo de autoimunidade com a transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> isoladas da cultura *in vitro* em camundongos linfopênicos BALB/c Nude. Os grupos experimentais realizados foram: camundongos que receberam apenas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal), camundongos que receberam células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $0,2 \times 10^5$  por animal) e os animais que não receberam nenhum inóculo de células.

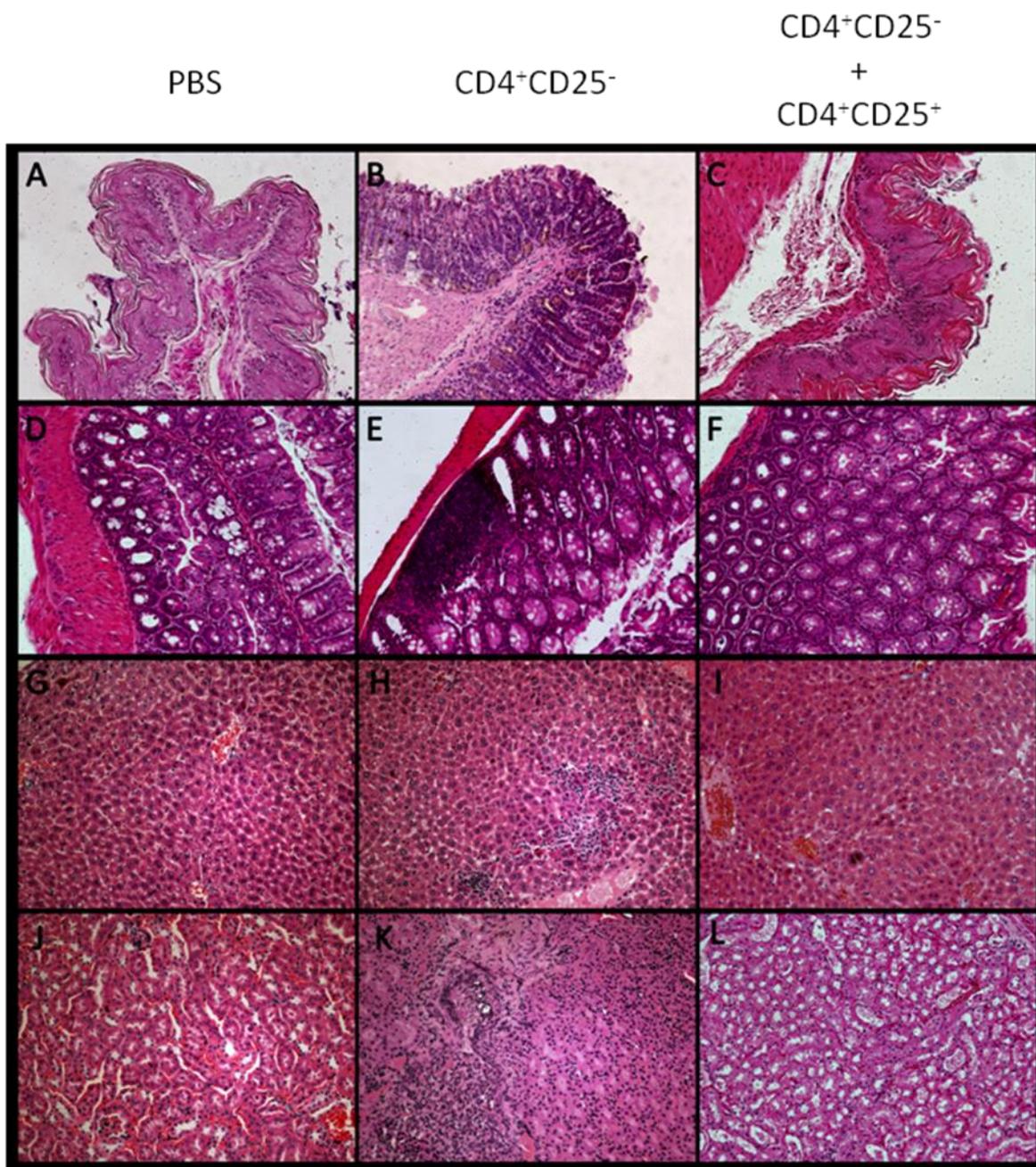
Após as 12 semanas de monitoramento dos animais, pudemos observar que os camundongos que receberam a transferência de células tanto efetoras (CD25<sup>-</sup>), quanto efetoras apresentaram ganho de peso semelhante aos animais controle pelo período de 12 semanas (figura 15A). Os camundongos que receberam somente células efetoras apresentaram sinais de autoimunidade como infiltrado celular no estômago, intestino grosso, rins e fígado (figura 16), mas não foi observada nenhuma mudança de peso significativa entre os grupos que receberam células tanto Tregs quanto efetoras, quando comparados ao grupo controle. Com o acúmulo de células mononucleares nos órgãos alvo, podemos dizer que o modelo de indução de autoimunidade foi estabelecido, apesar de os camundongos não apresentarem perda de peso decorrente da colite, causada pelo infiltrado celular no intestino grosso. Uma vez estabelecido, este modelo pode ser utilizado para a avaliação da capacidade supressora das Tregs geradas *in vitro*.

Com a inoculação conjunta de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, não houve mudança no ganho de peso dos animais que, novamente foi similar ao observado nos animais controle (figura 15A), mostrando que neste caso a presença ou não de Tregs não influenciou o ganho de peso dos animais. Na figura 16, podemos ver que a inoculação conjunta de Tregs e efetoras é capaz de impedir o acúmulo de células mononucleares nos órgãos alvo de autoimunidade. A presença das Tregs foi capaz de modular o infiltrado celular em todos os órgãos analisados, mostrando seu potencial regulador também em modelo *in vivo*. Também observamos a capacidade reguladora

das Tregs isoladas da cultura *in vitro*, quando comparamos o número total de células presentes nos linfonodos inguinais e poplíteos dos animais 12 semanas após a transferência de células (figura 15B). A presença das Tregs foi capaz de controlar o número de células presentes nos linfonodos, e a ausência destas mostra maior celularidade nestes órgãos. Já no baço, o resultado é o inverso, pois os camundongos que recebem células efectoras apresentam a mesma quantidade de células totais quando comparados aos animais controle (figura 15C). Já os animais que recebem as Tregs possuem mais células no baço, porém não apresentam infiltrado celular nos órgãos analisados. Os resultados obtidos com estes experimentos nos permitem concluir que as Tregs geradas *in vitro* no contexto alogênico são capazes de regular a resposta imune tanto em modelos de supressão *in vitro* quanto *in vivo*.



**Figura 15.** Avaliação da capacidade reguladora das Tregs isoladas da cultura in vitro. **A:** Monitoramento do ganho de peso dos camundongos Nude que receberam a transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $0,2 \times 10^5$  por animal) e os animais que não receberam nenhum inóculo de células (CTL). **B e C:** 12 semanas após a transferência de células os linfonodos inguinais e poplíteos (**B**, e baço (**C**) foram retirados para contagem de células totais. Teste estatístico de Student T. \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ .



**Figura 16.** Cortes histológicos dos órgãos dos camundongos Nude que receberam a transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $0,8 \times 10^5$  por animal) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $0,2 \times 10^5$  por animal) e os animais que não receberam nenhum inóculo de células, somente PBS. **A, B e C:** Cortes histológicos do estômago dos animais que receberam PBS (A), células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (B) e células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (C). **D, E, F:** Cortes histológicos do intestino dos animais que receberam PBS (D), células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (E) e células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (F). **G, H, I:** Cortes histológicos do fígado dos animais que receberam PBS (G), células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (H) e células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (I). **J, K, L:** Cortes histológicos dos rins dos animais que receberam PBS (J), células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (K) e células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (L). Cortes em aumento de 200x.



## 5 DISCUSSÃO

A interação de DCs com linfócitos T é indispensável para a montagem da resposta imune. Já a participação de DCs para a geração de células com propriedades reguladoras é um assunto interessante e muito estudado ultimamente. Estudos já comprovaram que as DCs não só são capazes de gerar células Foxp3<sup>+</sup> (Yamazaki & Steinman, 2009), mas são as APCs mais eficientes na expansão de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> comparadas com macrófagos e linfócitos B (Yamazaki et al., 2006b). O protocolo utilizado para expansão de células com fenótipo regulador foi capaz de expandir células com alta expressão de marcadores de ativação como CD122, CD69, CD44, CTLA-4, GITR (do inglês glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) e CD62L pelas células CD4<sup>+</sup>. A expressão de CTLA-4, CD122, CD62L e GITR estão de acordo com trabalhos publicados na literatura (Takahashi et al., 2000, Setoguchi et al., 2005, Fontenot et al., 2003, McHugh et al., 2002). Já a alta expressão de CD44 e CD69 sugere que o sistema utilizado para a expansão de células T reguladoras também é capaz de gerar células com fenótipo de ativação precoce e tardia.

Para determinar a importância dos processos de processamento e apresentação dos antígenos pelas células dendríticas reproduzimos o mesmo protocolo de expansão de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> já estabelecido (Marguti et al., 2009) só que utilizamos timócitos singênicos e alogênicos em apoptose. A apresentação de antígenos próprios pelas DCs para os linfócitos T em todas as condições analisadas diminui a expansão das células com fenótipo regulador, indicando que a natureza do antígeno em questão pode alterar o padrão de expansão de certos tipos celulares. Ainda, a apresentação de antígenos próprios para o linfócito T leva a deficiência na ativação clássica deste linfócito diminuindo assim a população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que seria a população com fenótipo de ativação celular. Em relação ao estado de ativação das células dendríticas, o trabalho de Yamazaki, et al. (2006) demonstra que a expansão de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> é maior quando são utilizadas DCs maduras, estimuladas com LPS, o que não confere com os resultados obtidos tanto no contexto singênico quanto no

alogênico onde a maior expansão deste tipo celular foi observada com a utilização de DCs imaturas.

Há na literatura trabalhos que mostram que há o aumento na população de Tregs no contexto singênico, com apresentação de antígenos próprios, e que esse aumento é dependente de IL-2 que, no caso é exógena. Este aumento na população reguladora proporcionado pelas DCs pode ser importante durante uma infecção na qual são expostos antígenos “self” e “non-self” e as células reguladoras teriam como função evitar o dano tecidual enquanto a infecção é contida (Yamazaki et al., 2006). O protocolo para obtenção das células  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  utilizado no presente trabalho não envolve a adição de IL-2 exógena apesar de que a presença desta citocina possa contribuir para o aumento e manutenção da população  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  tanto *in vitro* quanto *in vivo* e também a sua função supressora (de la Rosa et al., 2004, Thornton et al., 2004, Fontenot et al., 2005). O estudo de Liu et al. (2010) relata que a utilização de diferentes contextos entre as DCs e os linfócitos T é capaz de induzir a conversão de células  $CD4^+$  em células reguladoras sem a adição de citocinas exógenas.

Com a utilização de timócitos de diferentes linhagens de camundongos (BALB/c e C57BL/6, H-2<sup>d</sup> e H-2<sup>k</sup> respectivamente) o próximo passo foi descobrir se a natureza do antígeno fagocitado pelas células dendríticas era capaz de alterar o padrão de expressão de moléculas co-estimuladoras das DCs. O padrão de expressão destas moléculas induzido pela fagocitose de células apoptóticas não mudou com a incubação nos diferentes contextos, aliás, o estado de ativação das DCs não foi alterado, permaneceu igual ao das DCs imaturas, mesmo com a posterior estimulação com LPS.

A utilização de células em apoptose teve como intuito inicial prover as células dendríticas com antígenos exógenos para determinar a capacidade destes antígenos em expandir células com fenótipo regulador. Com a utilização dos dois contextos, alogênico e singênico, vemos que as células em apoptose exercem mais funções do que apenas agirem com fonte de antígenos para as DCs. Algum diferencial apresentado pelas células apoptóticas é capaz de induzir caráter tolerogênico às DCs impedindo que elas amadureçam e dando a elas a capacidade de expandir tipos celulares com propriedades reguladoras. O fenômeno observado de ausência de

maturação das DCs frente à fagocitose de células apoptóticas está de acordo com os experimentos de Steinman et al. (2000) que demonstram a ausência de expressão de marcadores de ativação após contato com células em apoptose, conferindo a esta DC a capacidade de ser tolerogênica e não induzir resposta aos antígenos presentes nas células em apoptose. Também a internalização de corpos apoptóticos é capaz de conferir a DC resistência à maturação por LPS (Galucci et al., 1999, Sauter et al., 2000 Liu et al., 2006, Peng et al., 2007). Entretanto, há evidências que sugerem o papel das células apoptóticas como estimuladoras da maturação de DCs e indução da produção de IL-17 (Fransen et al., 2009). O estudo de Kazama et al. (2008) comprova a falta de maturação das células dendríticas quando em contato com células apoptóticas, e sugere que as células em apoptose não liberam “sinais de perigo” (do inglês “danger signals”) como o HMGB1 (do inglês “<sup>High</sup>-mobility group box 1 protein) , normalmente liberado por células em necrose ou em dano tecidual, que induziriam a maturação da DC e indução de resposta imune.

Uma possível explicação para esse efeito das células apoptóticas nas DCs seria a interação com a camada de fosfatidilserina das células apoptóticas que é capaz de induzir a produção de TGF- $\beta$ 1 (Huynh et al., 2002) e modular a maturação de DCs humanas (Chen et al., 2004), possivelmente acarretando no aumento da população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Por outro lado, o uso de esplenócitos como células apoptóticas não foi capaz de aumentar a população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> *in vitro*, como observado por Kushwah et al. (2010), sugerindo a importância do tipo celular e não somente a interação com a camada de fosfatidilserina das células em apoptose. Outros grupos também relataram que essa interação da DC com a fosfatidilserina não é suficiente para a produção de TGF- $\beta$ 1 (Morelli, 2003, Takahashi, 2003, Chen, 2004). Os trabalhos de Kushwah et al. (2009) e Kushwah et al. (2010) demonstram a capacidade de DCs em apoptose em conferir caráter tolerogênico às DCs que as fagocitam e também a expansão de células CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> com propriedades reguladoras *in vitro*. Estes resultados demonstram mais uma vez a importância das células em apoptose para a manutenção da tolerância periférica por inúmeros mecanismos, seja a ação nas DCs ou na expansão de Tregs.

A alta expressão de GITR pelas Tregs geradas *in vitro* está de acordo com o trabalho de McHugh et al. (2002) que diz que tanto as Tregs quanto linfócitos T expressam constitutivamente este marcador. O fato das células T ativadas também expressarem altos níveis de GITR faz com que este marcador não seja exclusivo de células T reguladoras, assim como o CD25. Quanto ao ligante deste receptor (GITR Ligand) a sua expressão envolve desde DCs derivadas de medula óssea até macrófagos e linfócitos B (Kim et al., 2003, Tone et al., 2003, Stephens et al., 2004). A utilização de agonistas de GITR em co-culturas de Tregs e células respondedoras demonstrou que a estimulação de GITR é capaz de impedir a supressão por parte das Tregs (McHugh et al., 2002, Stephens et al., 2004). Como as Tregs do animal deficiente em GITR são funcionais (Ranchetti et al., 2004), o grupo de Shevach utilizou Tregs e linfócitos T respondedores para determinar o efeito da estimulação deste marcador nas diferentes populações celulares. Com este estudo, foi descoberto que a estimulação de GITR em linfócitos T respondedores é capaz de induzir a proliferação dos mesmos. Já a estimulação de GITR somente nas Tregs foi capaz de induzir a proliferação destas e aumentar a capacidade supressora (Stephens et al., 2004). Com estes resultados é possível concluir que a estimulação de GITR não é responsável pela inibição da supressão das Tregs, mas sim é capaz de estimular ambas as populações estudadas e aumentar a capacidade respectiva de cada população. Já que a estimulação deste marcador por um agonista solúvel é capaz de expandir e aumentar a função das Tregs, uma possível explicação para a expansão de Tregs *in vitro* por DCs pulsadas com células apoptóticas seria a ação do GITRL, presente nas DCs, no GITR presente nas células T adicionadas à cultura.

Outro aspecto analisado foi a produção de citocinas pelas células em cultura. A produção de citocinas em um microambiente consegue direcionar a resposta imune para inúmeros padrões diferentes, portanto para determinar se as citocinas produzidas nos diferentes contextos e diferentes condições experimentais poderiam ser responsáveis pela expansão dos tipos celulares analisados, analisamos a produção de várias citocinas que poderiam estar relacionadas com os tipos celulares encontrados após a cultura.

Já foi comprovado por Granucci et al. (2001) que as células dendríticas são capazes de produzir e secretar IL-2 e os nossos resultados demonstram que a produção de IL-2 na cultura de células dendríticas se mostrou alta, mas somente quando as células dendríticas foram estimuladas com LPS. A adição de timócitos alogênicos em apoptose foi capaz de induzir a produção da citocina tanto pelas DCs maduras quanto imaturas, mas esta produção é menor do que a observada com as DCs maduras. Com a adição das células de linfonodo, há a diminuição da dosagem da citocina, provavelmente pelo consumo desta pelos linfócitos T adicionados à cultura. Neste caso, a maior produção de IL-2 foi observada com a adição de timócitos alogênicos em apoptose às DCs imaturas, condição na qual são observadas as maiores quantidades de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Este aumento na produção de IL-2 na cultura exposta a antígenos alogênicos poderia elucidar o fato de que esta condição experimental é a mais eficiente na expansão de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, visto que as células com potencial regulador necessitam desta citocina para ativação e sobrevivência, uma vez que a sinalização intracelular da IL-2 é necessária para a expressão de genes envolvidos na regulação da resposta imune (Fontenot et al., 2005). Outros estudos também comprovam a necessidade de IL-2 para a ação supressora das células reguladoras (Thornton et al., 2004, Setoguchi et al., 2005, Bradenburg et al., 2008), como demonstra o estudo de de la Rosa et al. (2004), que sugere que uma das funções supressoras das células reguladoras seria o consumo de IL-2, visto que estas células apresentando alta expressão de CD25 – cadeia  $\alpha$  do receptor para IL-2 – poderiam privar as células respondedoras, outros linfócitos T, das quantidades de IL-2 necessária para a sua sobrevivência e proliferação.

A produção de IL-10 também foi analisada por ser uma citocina imunossupressora relacionada com as células reguladoras. A produção desta citocina foi analisada no sobrenadante de culturas de DCs imaturas pulsadas com timócitos alogênicos e singênicos em apoptose, mas não houve diferença na produção de IL-10 nos diferentes contextos, sugerindo que não há participação da citocina na expansão diferencial de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados por Barthlott et al. (2005) que relata haver baixa produção de

IL-10 na geração de células com fenótipo regulador *in vitro*. O estudo de Boonstra et al. (2006) sugere que as células dendríticas mielóides e macrófagos são capazes de produzir IL-10 em resposta à sinalização de Toll-like receptors (TLRs). Entretanto, não foi analisada a produção de IL-10 no sobrenadante de culturas de DCs estimuladas com LPS, podendo haver diferença na produção da citocina nas condições experimentais que utilizam DCs maduras.

Já foi descrito na literatura que a sinalização da citocina TGF- $\beta$  é capaz de induzir a expressão de Foxp3 juntamente com ativação via TCR em linfócitos T (Chen et al., 2003, Fantini et al., 2004, Fu et al., 2004, Schramm et al., 2004), entretanto, no nosso modelo, não sabíamos se o TGF- $\beta$  participava ativamente na expansão de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Para esclarecer um pouco o papel do TGF- $\beta$  na expansão destas células com fenótipo regulador, analisamos a produção desta citocina no sobrenadante de culturas de células dendríticas e após a adição de linfócitos T em ambos os contextos singênicos e alogênicos.

No contexto alogênico, a maior produção de TGF- $\beta$  foi observada quando as DCs foram estimuladas com LPS e pulsadas com aloantígeno. Neste caso as células em apoptose, apesar de entrarem em contato com DCs previamente ativadas, ainda sim puderam modular a produção de TGF- $\beta$ , uma citocina imunossupressora, talvez para impedir que a DC já ativada consiga montar a resposta contra os antígenos presentes na célula em apoptose. Este seria um segundo mecanismo de tolerância induzido pelas células apoptóticas. No contexto singênico, houve pouquíssima produção de TGF- $\beta$  quando as DCs imaturas foram pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose, provavelmente porque as células dendríticas já possuem o fenótipo necessário para a indução de tolerância e não precisariam de um segundo mecanismo.

Quando são adicionados linfócitos T à cultura, o padrão de produção de TGF- $\beta$  muda, pois há o consumo desta citocina pelos linfócitos T além da produção desta pelos linfócitos expandidos. Nas DCs estimuladas com LPS houve aumento na produção da citocina, mas esta produção deve ser dos linfócitos adicionados e que ativados na presença de TGF- $\beta$ , passariam a produzir esta citocina também. Não houve muita diferença entre os contextos alogênico e singênico, exceto pela alta produção na

cultura de DCs maduras pulsadas com timócitos singênicos em apoptose. Esta maior produção de TGF- $\beta$  pode ser atribuída ao mesmo motivo pelo qual há aumento na produção na cultura de DCs maduras, para prevenir a ativação de linfócitos T uma vez que a DC já está ativada. Apesar de haver diferenças na produção de TGF- $\beta$  nas condições experimentais utilizadas para expansão de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, com esta metodologia não conseguimos detectar qual célula produz qual citocina, portanto, mais estudos são necessários para entender a função do TGF- $\beta$  na expansão destas células com fenótipo regulador. O estudo de Floess et al. (2007) mostra que apesar de haver indução da expressão de Foxp3 pelas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> via sinalização do TGF- $\beta$  *in vitro*, essa indução pode não ser tão estável quanto a expressão deste fator de transcrição em células reguladoras naturais. As mudanças epigenéticas envolvidas como a metilação e acetilação de motivos CpG e modificações nas histonas do gene que codifica o Foxp3 não são iguais entre as Tregs naturais e as induzidas com TGF- $\beta$ , o éxon da região conservada do Foxp3 tem menos áreas metiladas nas Tregs naturais do que nas induzidas, dando a ideia de que o gene estaria mais ativo nas Tregs naturais.

A produção de IL-6 pelas células dendríticas foi analisada e mostrou-se aumentada sempre que as DCs foram estimuladas com LPS. Essa produção está de acordo com os dados encontrados na literatura, pois a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida por células da imunidade inata em resposta a reconhecimento de padrões moleculares pertencentes a patógenos por Toll-like receptors (Medzhitov & Janeway, 2002). Estudos comprovam que a presença de IL-6 inibe a indução de Foxp3 em linfócitos T naïve, inclusive o estudo de Dominitzki et al., 2007 demonstra que a sinalização pelo receptor solúvel de IL-6, chamada de *trans*-sinalização, bloqueia a indução da expressão de Foxp3 em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naïve. Talvez, a produção de IL-6 pelas células dendríticas maduras, estimuladas com LPS, tenha alguma influência na expansão de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, pois as condições de expansão que utilizam as células dendríticas maduras são as que menos conseguem expandir as células Foxp3<sup>+</sup>, tanto no contexto singênico quanto no alogênico. Outro trabalho também demonstra a necessidade da IL-6, juntamente com o TGF- $\beta$  para a geração de

linfócitos T produtores de IL-17, os Th17 (Betteli et al., 2006). No nosso modelo, a produção de IL-17 se mostra aumentada somente com a adição de timócitos em apoptose. Apesar de haver TGF- $\beta$  e IL-6 no sobrenadante das culturas com células dendríticas estimuladas com LPS, não houve grande produção de IL-17, quando comparada com as culturas com adição de células em apoptose. Estes dados estão de acordo com o trabalho de Fransen et al. (2009) que comprova que a fagocitose de corpos apoptóticos por células dendríticas leva à maturação das mesmas e à produção de IL-17. Entretanto, no nosso modelo de expansão de células com fenótipo regulador não observamos amadurecimento das DCs após fagocitose de corpos apoptóticos. O trabalho de Torchinski et al. (2009) também demonstra que a fagocitose de células apoptóticas por células dendríticas infectadas com bactérias leva à produção de IL-17.

Apesar de acreditar-se que a ativação de linfócitos requer contato entre o linfócito e a APC, há na literatura alguns trabalhos evidenciando a possibilidade de ativação do linfócito T apenas pela sinalização de fatores solúveis produzidos pela APC, como o estudo de MacEwan et al. (2005), Brodbeck et al. (2009) e Chan et al. (2009) que demonstram que há produção de IFN- $\gamma$  por uma população de linfócitos cultivada *in vitro* separadamente de macrófagos, pela utilização de membranas transwell. Para que houvesse a produção de IFN- $\gamma$ , os linfócitos T teriam que estar ativado, sugerindo que produtos solúveis produzidos pelos macrófagos da co-cultura pudessem atravessar a membrana do transwell até os linfócitos e sinalizar para a ativação dos mesmos.

Os nossos dados mostram a necessidade do contato entre a DC e o linfócito T para que haja a ativação deste com a diferenciação para célula T com fenótipo regulador, e estão de acordo com dados da literatura que assim sugerem (Dustin, 1998). Como esperado, o isolamento das culturas de DC e linfócitos T diminuiu drasticamente tanto a população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> quanto CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> em ambos os contextos utilizados. O trabalho de Kushwah et al. (2010) demonstra que o isolamento das culturas de DCs, pulsadas com células em apoptose, e linfócitos T ainda é capaz de gerar uma população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> mesmo sem o contato entre as APCs e linfócito T. O trabalho em questão sugere a produção de fatores solúveis que pudessem

induzir a conversão de células  $CD4^+CD25^-Foxp3^-$  em  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  como TGF- $\beta$  e IL-10. A dosagem destas citocinas nas condições de isolamento das culturas utilizadas no presente trabalho foi abaixo do limite de detecção.

Alguns trabalhos na literatura provam que o potencial regulador das células  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  é antígeno específico, sendo capaz de regular a resposta imune contra um antígeno restrito (Takahashi et al., 1998, Yamazaki et al., 2006), entretanto outros estudos também mostram que as Tregs conseguem suprimir respostas de forma inespecífica (Thornton & Shevach, 2000, Joetham et al., 2009). Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com os estudos citados, pois as células  $CD4^+CD25^+$  separadas por sorting foram capazes de suprimir a proliferação de esplenócitos de camundongo BALB/c de forma específica e não específica.

As Tregs isoladas de linfonodos dos camundongos BALB/c foram capazes de suprimir o ensaio de alorreatividade, apesar de não terem sido geradas neste contexto. Isso prova que as células reguladoras presentes no linfonodo do animal naíve são capazes de suprimir a resposta de forma inespecífica. Essa supressão pode ter sido mediada pelo TGF- $\beta$  produzido nas culturas com a presença de Tregs. Alguns trabalhos descrevem a ação supressora de linfócitos T reguladores mediada por TGF- $\beta$  (Nakamura et al., 2004, Marie et al., 2005) e este pode ser um mecanismo pelo qual as Tregs naturais agem.

No ensaio envolvendo alorreatividade as Tregs isoladas da cultura *in vitro* foram capazes de suprimir a proliferação de esplenócitos frente a estímulo alogênico, contexto no qual foram geradas, em diluições de até 1:50 (reguladora : respondedora). Neste caso as Tregs, por terem sido geradas no contexto alogênico, não precisariam estar em grandes quantidades para suprimir a MLR, já no caso do ensaio com  $\alpha CD3$ , onde o estímulo é policlonal na ausência de antígeno, as Tregs foram capazes de regular a proliferação, mas apenas nas menores diluições (1:5 e 1:10), recuperando a proliferação na concentração de 1:25 (reguladora : respondedora). No ensaio com esplenócitos de DO11.10 e estímulo com OVA, o contexto das células adicionadas à MLR é o mesmo, pois os esplenócitos são de camundongos BALB/c DO11.10, mas o estímulo para a proliferação não é o mesmo das Tregs geradas *in vitro*. Neste caso a

supressão também ocorre nas menores diluições, diminuindo com a maior diluição (1:25) (reguladora : respondedora). O que podemos concluir é que as Tregs geradas *in vitro* agem suprimindo a proliferação *in vitro* de forma antígeno específica e também de forma inespecífica.

Uma das hipóteses para o fato de as Tregs agirem em concentrações baixas seria a sua ação nas APCs. A Treg teria como regular a expressão de moléculas co-estimuladoras para prevenir a ativação de outros linfócitos T e assim conter a resposta imune. Há relatos na literatura de que as Tregs conseguem diminuir a capacidade das células dendríticas em apresentar antígenos e ativar linfócitos (Yamazaki et al., 2006, DiPaolo et al., 2007). Desta maneira, a Treg teria um mecanismo de contenção da resposta de maneira inespecífica, que não depende do reconhecimento de antígenos pelo TCR, mas um mecanismo que agiria antes da apresentação de antígenos. Agindo de forma inespecífica, uma quantidade baixa de Tregs seria capaz de regular a proliferação frente ao estímulo alogênico, mas sendo específica, a Treg consegue agir com mais eficiência diretamente na proliferação.

Outra hipótese para o potencial supressor das Tregs geradas *in vitro* seria a capacidade destas células, com alta expressão de CD25, de captar a IL-2 produzida por outros linfócitos T ativados. Evidências de que o consumo de IL-2 pela célula reguladora pode induzir apoptose no linfócito T respondedor foram observadas por Pandiyan et al. (2007), no estudo que demonstrou que a apoptose induzida pela célula T reguladora no linfócito T respondedor é mediada por proteínas pró-apoptóticas Bad e Bim, que induzem a ativação de caspases e a apoptose pela via intrínseca. Este fato leva a crer que a apoptose induzida pela célula T reguladora envolve a privação de citocinas, pois a apoptose mediada por Bad e Bim é resultado da privação de estímulo de sobrevivência, dentre eles a sinalização pela IL-2. Ainda o estudo de Pandiyan et al. (2007) mostrou que a célula reguladora não necessita de contato para que haja supressão da célula respondedora – como já sugerido anteriormente por Tang et al. (2006) - mas sim apenas a proximidade, pois desta maneira, há a possibilidade do consumo da IL-2 produzida pela célula respondedora, uma vez que a célula reguladora não produz IL-2 (Takahashi et al., 2000). Esta hipótese de que a célula reguladora não

depende de contato para que haja supressão já foi levantada anteriormente também por de la Rosa et al. (2004) e Barthlott et al. (2005). Outro mecanismo de ação das Tregs envolve a inibição da produção de IL-2 pela célula efetora (Thornton & Shevach, 1998), e esse mecanismo pode ser mediado pela transferência de cAMP (AMP cíclico) por junções do tipo GAP entre a Treg e a célula efetora, o que seria um mecanismo de supressão dependente de contato. O trabalho de Bopp et al. (2007), demonstra a diminuição de mRNA para IL-2 na célula efetora que entra em contato com a Treg, e também a diminuição da concentração de cAMP nas Tregs e subsequente aumento do segundo mensageiro na célula efetora.

Há muitos mecanismos de ação das Tregs descritos na literatura que envolvem a produção de citocinas imunossupressoras como a IL-10 e o TGF- $\beta$ . O trabalho de Asseman et al. (1999) demonstra que as Tregs precisam da ação da IL-10 para a maximizar a ação reguladora em modelos *in vivo* de colite. Entretanto, a depleção de IL-10 *in vivo* não leva ao desenvolvimento de autoimunidade espontânea, mas sim a uma inflamação nos cólons e pulmões de camundongos com hipersensibilidade induzida pela via aérea, sugerindo que a Treg dispõe de outros mecanismos para controlar as células autorreativas na periferia (Rubtsov et al., 2008).

A função do TGF- $\beta$  também já foi discutida quanto à capacidade desta citocina em promover a indução de Foxp3 em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, e a função da citocina como mecanismo de supressão das Tregs é um assunto muito estudado. Células que não conseguem responder ao TGF- $\beta$  não conseguem ser controladas por Tregs no modelo de IBD, sugerindo que a produção da citocina seria um mecanismo de supressão das Tregs (Fahlen et al., 2005). Ainda, o estudo de Nakamura et al. (2004) demonstra o papel do TGF- $\beta$ 1 *in vitro* em ensaios de proliferação de Tregs e células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> respondedoras. As Tregs foram capazes de suprimir a proliferação de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, mas quando foi utilizado um anticorpo neutralizante de TGF- $\beta$ 1 a supressão foi abolida. O mesmo estudo mostra que *in vitro*, as Tregs do animal TGF- $\beta$  *knock out* são capazes de suprimir a proliferação de células respondedoras, mas quando foi induzida colite no animal TGF- $\beta$  *knock out* este foi incapaz de regular a doença, sugerindo um papel importante da citocina na supressão de autoimunidade.

Esta citocina foi dosada no sobrenadante dos ensaios de supressão do presente trabalho e pudemos notar que o mecanismo de ação das Tregs geradas *in vitro* por não ser o TGF- $\beta$ , visto que a produção deste pelas Tregs não difere nas diferentes condições de supressão.

As Tregs também podem agir de maneira contato-dependente como sugere o trabalho de Reads et al. (2000) no qual foram utilizados anticorpos que bloqueiam a ação do CTLA-4 presente em grandes concentrações nas células T reguladoras (Read et al., 2000, Takahashi et al., 2000), e camundongos deficientes para essa molécula inibitória desenvolvem autoimunidade sistêmica devido à dificuldade em induzir anergia nos linfócitos T (Tivol et al., 1995). Ainda, o trabalho de Oderup et al. (2006) demonstra que o CTLA-4 pode modular a expressão de moléculas co-estimuladoras nas células dendríticas podendo assim modular a resposta imune. Por fim, o CTLA-4 ainda consegue induzir a expressão da enzima IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase) pelas células dendríticas. A IDO faz parte do metabolismo do triptofano que pode gerar metabólitos imunossupressores fazendo assim com que a resposta imune seja suprimida (Fallarino et al., 2003, Mellor & Munn, 2004).

Também pudemos observar que as Tregs geradas *in vitro* são capazes de regular a proliferação homeostática de linfócitos T em camundongos linfopênicos BALB/c Nude. A transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> isoladas da cultura *in vitro* foi capaz de induzir a proliferação de células no baço e nos linfonodos, e infiltrado inflamatório nos órgãos alvo de autoimunidade como estômago, intestino grosso, fígado e rins. Estes resultados estão de acordo com vários estudos com camundongos linfopênicos, incluindo os BALB/c Nude, SCID e RAG<sup>-/-</sup> e a transferência de células depletadas de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Sakaguchi, 1995, Setoguchi, 2005). Como esperado, no presente trabalho, a co-transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, ambas isoladas da cultura *in vitro*, foi capaz de impedir o acúmulo de células inflamatórias no estômago, intestino grosso, fígado e rins o que está de acordo com os dados publicados (Sakaguchi, 1995, Setoguchi, 2005). A co-transferência também conseguiu conter a proliferação de células nos linfonodos, mas não no baço. A retenção de clones autorreativos no baço de animais inoculados com células efetoras e Tregs já foi

demonstrada por Matejuk, et al. (2003), e pode elucidar a presença de maior quantidade de células no baço dos animais que receberam CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, ambas isoladas da cultura *in vitro*. Talvez a retenção de células no baço explique a ausência de infiltrado nos órgãos alvo de autoimunidade, e também a quantidade de células no baço dos animais que receberam apenas efetoras e que apresentam números semelhantes aos animais controle. Os animais que receberam somente células efetoras podem apresentar menor quantidade de células no baço, quando comparado aos que receberam ambas efetoras e Tregs, mas apresentam maior infiltrado inflamatório. Os animais que receberam células efetoras e Tregs apresentam menor quantidade de células nos linfonodos, e a capacidade das Tregs em conter a proliferação homeostática de células ativadas está de acordo com o estudo de Murakami, et al. (2002) que demonstra que a transferência de células com capacidade reguladora é capaz de impedir a proliferação de clones de linfócitos T ativados em animais linfopênicos.

Em todos os animais que receberam transferência de células, o ganho de peso durante as 12 semanas foi similar. O desenvolvimento de gastrite e colite nos animais que receberam a transferência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> não foi capaz de alterar o ganho de peso destes animais, sendo similar aos animais controle e aos que receberam Tregs e efetoras. Estes resultados já foram observados por Itoh et al. (1999) e os animais Nude que receberam CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> não apresentaram diferença no ganho de peso quando comparado com os controles. Apesar de serem compatíveis com estudos já publicados, nossos resultados não estão de acordo com diversos trabalhos que demonstram a capacidade de suspensões celulares depletadas de células com potencial regulador, em causar a perda de peso em animais linfopênicos como Nude, RAG<sup>-/-</sup> e SCID (Itoh, 1999, Powrie, 1993, Powrie, 1995, Read, 2000, Read & Powrie, 2001). Uma hipótese para a manutenção do peso dos Nude que recebem somente células efetoras seria a presença de infiltrado nos órgãos analisados dando início a uma resposta inflamatória tão intensa que geraria um edema generalizado, que compensaria a perda de peso induzida pela inflamação do trato gastrointestinal e deficiência na absorção de nutrientes.

Com todos estes dados podemos ver a importância das DCs tanto para o início da resposta imune como para a manutenção da tolerância periférica com auxílio das células apoptóticas. Também pudemos ver o papel das células T reguladoras que dispõem de inúmeros mecanismos para regular a resposta imune tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e que cada modelo gerado pode fornecer cada vez mais conhecimento sobre este subtipo de linfócitos T. O que é mais importante é que tanto as DCs, quanto as células apoptóticas e as células T reguladoras são indispensáveis para a homeostasia do organismo independente do mecanismo de ação de cada subtipo encontrado.



## 6 CONCLUSÕES

- ❖ As células dendríticas pulsadas com timócitos alogênicos em apoptose são mais eficazes na expansão de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> quando comparadas às células dendríticas pulsadas com timócitos singênicos.
- ❖ A expansão das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> é dependente de contato entre a célula dendrítica e a célula proveniente do linfonodo.
- ❖ O protocolo utilizado para a expansão de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> leva à produção de citocinas como IL-2, IL-6, IL-10, IL-17 e TGF-β. A produção diferencial destas citocinas pode estar relacionada com a expansão diferencial das células com potencial regulador.
- ❖ As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* são capazes de regular a resposta imune *in vitro* de forma específica e inespecífica.
- ❖ As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> geradas *in vitro* são capazes de regular a resposta imune *in vivo* modulando a proliferação de células nos órgãos linfóides e impedindo a infiltração de células nos órgãos alvo de autoimunidade.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 2005 Aug;23(2):227-39.

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999 Oct 4;190(7):995-1004.

Bach FH, Alter BJ, Schendel DJ, Segall M, Bach ML. Genetic and cellular control of in vitro models of allograft reactivity. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1975;11(1):467-76.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998 Mar 19;392(6673):245-52.

Barthlott T, Moncrieffe H, Veldhoen M, Atkins CJ, Christensen J, O'Garra A, et al. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells compete with naive CD4<sup>+</sup> T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol* 2005 Mar;17(3):279-88.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006 May 11;441(7090):235-8.

Bianchi T, Pincus LB, Wurbel MA, Rich BE, Kupper TS, Fuhlbrigge RC, et al. Maintenance of peripheral tolerance through controlled tissue homing of antigen-specific T cells in K14-mOVA mice. *J Immunol* 2009 Apr 15;182(8):4665-74.

Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, et al. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* 2006 Dec 1;177(11):7551-8.

Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007 Jun 11;204(6):1303-10.

Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999 Nov 26;286(5445):1735-8.

Brandenburg S, Takahashi T, de la Rosa M, Janke M, Karsten G, Muzzulini T, et al. IL-2 induces in vivo suppression by CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup>Foxp3<sup>(+)</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2008 Jun;38(6):1643-53.

Brodbeck WG, Macewan M, Colton E, Meyerson H, Anderson JM. Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion. *J Biomed Mater Res A* 2005 Aug 1;74(2):222-9.

Chang DT, Jones JA, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, Matsuda T, et al. Lymphocyte/macrophage interactions: biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. *J Biomed Mater Res A* 2008 Dec 1;87(3):676-87.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>. *J Exp Med* 2003 Dec 15;198(12):1875-86.

Chen X, Doffek K, Sugg SL, Shilyansky J. Phosphatidylserine regulates the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 2004 Sep 1;173(5):2985-94.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994 Aug 26;265(5176):1237-40.

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* 2007 Dec;82(6):1365-74.

de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004 Sep;34(9):2480-8.

Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenroth M, et al. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* 2005 Jul 4;202(1):33-45.

DiPaolo RJ, Brinster C, Davidson TS, Andersson J, Glass D, Shevach EM. Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells. *J Immunol* 2007 Oct 1;179(7):4685-93.

Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C, Nikolaev A, Galle PR, Scheller J, et al. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4<sup>+</sup>CD25 T cells. *J Immunol* 2007 Aug 15;179(4):2041-5.

Dustin ML. Making a little affinity go a long way: a topological view of LFA-1 regulation. *Cell Adhes Commun* 1998;6(2-3):255-62.

El-Sawy T, Miura M, Fairchild R. Early T cell response to allografts occurring prior to alloantigen priming up-regulates innate-mediated inflammation and graft necrosis. *Am J Pathol* 2004 Jul;165(1):147-57.

Fahlen L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2005 Mar 7;201(5):737-46.

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003 Dec;4(12):1206-12.

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4<sup>+</sup>. *J Immunol* 2004 May 1;172(9):5149-53.

Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996 Apr 5;272(5258):50-3.

Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007 Feb;5(2):e38.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003 Apr;4(4):330-6.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005 Nov;6(11):1142-51.

Fransen JH, Hilbrands LB, Ruben J, Stoffels M, Adema GJ, van de V, et al. Mouse dendritic cells matured by ingestion of apoptotic blebs induce T cells to produce interleukin-17. *Arthritis Rheum* 2009 Aug;60(8):2304-13.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000 Oct 2;192(7):1027-34.

Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, et al. TGF-beta induces Foxp3<sup>+</sup> T-regulatory cells from CD4<sup>+</sup> C. *Am J Transplant* 2004 Oct;4(10):1614-27.

Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999 Nov;5(11):1249-55.

Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970 May;18(5):723-37.

Giorgini A, Noble A. Blockade of chronic graft-versus-host disease by alloantigen-induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in nonlymphopenic hosts. *J Leukoc Biol* 2007 Nov;82(5):1053-61.

Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2001 Sep;2(9):882-8.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997 Oct 16;389(6652):737-42.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002;20:621-67.

Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, et al. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 2001 Mar 15;166(6):3789-96.

Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001 Sep 17;194(6):769-79.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999 May 21;284(5418):1313-8.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002 Jan;109(1):41-50.

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999 May 1;162(9):5317-26.

Jiang S, Camara N, Lombardi G, Lechler RI. Induction of allopeptide-specific human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells ex vivo. *Blood* 2003 Sep 15;102(6):2180-6.

Joetham A, Takeda K, Okamoto M, Taube C, Matsuda H, Dakhama A, et al. Antigen specificity is not required for modulation of lung allergic responses by naturally occurring regulatory T cells. *J Immunol* 2009 Aug 1;183(3):1821-7.

Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001 Apr;2(4):301-6.

Kazama H, Ricci JE, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of <sup>high</sup>-mobility group box-1 protein. *Immunity* 2008 Jul 18;29(1):21-32.

Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006 Apr 17;203(4):883-95.

Khatti R, Kasrowicz D, Cox T, Mortrud M, Appleby MW, Brunkow ME, et al. The amount of scurf protein determines peripheral T cell number and responsiveness. *J Immunol* 2001 Dec 1;167(11):6312-20.

Kim JD, Choi BK, Bae JS, Lee UH, Han IS, Lee HW, et al. Cloning and characterization of GITR ligand. *Genes Immun* 2003 Dec;4(8):564-9.

Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007 Feb;8(2):191-7.

Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 1996 Jun 1;183(6):2533-40.

Kushwah R, Oliver JR, Zhang J, Siminovitch KA, Hu J. Apoptotic dendritic cells induce tolerance in mice through suppression of dendritic cell maturation and induction of antigen-specific regulatory T cells. *J Immunol* 2009 Dec 1;183(11):7104-18.

Kushwah R, Wu J, Oliver JR, Jiang G, Zhang J, Siminovitch KA, et al. Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3<sup>(+)</sup> Treg. *Eur J Immunol* 2010 Jan 25.

Kyewski B, Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 2004 Sep;4(9):688-98.

Lee JW, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura AR, et al. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol* 2007 Feb;8(2):181-90.

Lipscomb MW, Taylor JL, Goldbach CJ, Watkins SC, Wesa AK, Storkus WJ. DC expressing transgene Foxp3 are regulatory APC. *Eur J Immunol* 2010 Feb;40(2):480-93.

Liu C, Wang Q, Liu F, Li H, Zhu F, Wang X, et al. The allogeneic but not syngeneic dendritic cells effectively generated regulatory T cells from total CD4<sup>+</sup> population without exogenous cytokines. *Scand J Immunol* 2010 Jan;71(1):12-9.

Liu G, Wu C, Wu Y, Zhao Y. Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation. *Scand J Immunol* 2006 Jul;64(1):1-9.

Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med* 2002 Oct 21;196(8):1091-7.

MacEwan MR, Brodbeck WG, Matsuda T, Anderson JM. Student Research Award in the Undergraduate Degree Candidate category, 30th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Memphis, Tennessee, April 27-30, 2005. Monocyte/lymphocyte

interactions and the foreign body response: in vitro effects of biomaterial surface chemistry. *J Biomed Mater Res A* 2005 Sep 1;74(3):285-93.

Marguti I, Yamamoto GL, da Costa TB, Rizzo LV, de Moraes LV. Expansion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells by bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology* 2009 May;127(1):50-61.

Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2005 Apr 4;201(7):1061-7.

Marrack P, Kappler J. Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol* 2004;22:765-87.

Matejuk A, Buenafe AC, Dwyer J, Ito A, Silverman M, Zamora A, et al. Endogenous CD4<sup>+</sup>B. *J Neurosci Res* 2003 Jan 1;71(1):89-103.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002 Feb;16(2):311-23.

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002 Apr 12;296(5566):298-300.

Mellman I. Antigen processing and presentation by dendritic cells: cell biological mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 2005;560:63-7.

Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004 Oct;4(10):762-74.

Morelli AE, Larregina AT. Apoptotic cell-based therapies against transplant rejection: role of recipient's dendritic cells. *Apoptosis* 2010 Feb 6.

Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, Marrack P. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells contribute to the control of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Jun 25;99(13):8832-7.

Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 2004 Jan 15;172(2):834-42.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001 Sep 3;194(5):629-44.

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999 Aug;11(2):141-51.

Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 1969 Nov 7;166(906):753-5.

Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in

CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006 Jun;118(2):240-9.

Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, et al. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991 Apr 19;65(2):305-17.

Pandiyani P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 2007 Dec;8(12):1353-62.

Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun* 2007 Dec;29(4):303-9.

Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 1993 Nov;5(11):1461-71.

Powrie F, Leach MW. Genetic and spontaneous models of inflammatory bowel disease in rodents: evidence for abnormalities in mucosal immune regulation. *Ther Immunol* 1995 Apr;2(2):115-23.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000 Jul 17;192(2):295-302.

Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F. CD38<sup>+</sup> CD45RB<sup>(low)</sup> CD4<sup>+</sup> T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur J Immunol* 1998 Nov;28(11):3435-47.

Read S, Powrie F. Induction of inflammatory bowel disease in immunodeficient mice by depletion of regulatory T cells. *Curr Protoc Immunol* 2001 May;Chapter 15:Unit.

Roncador G, Garcia JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Menarguez J, et al. FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Leukemia* 2005 Dec;19(12):2247-53.

Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, et al. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* 2004 Mar;34(3):613-22.

Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008 Apr;28(4):546-58.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.

Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 2007 Nov;37 Suppl 1:S116-S123.

Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000 May 26;101(5):455-8.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med* 1999 Feb 15;189(4):611-4.

Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000 Feb 7;191(3):423-34.

Schramm C, Huber S, Protschka M, Czochra P, Burg J, Schmitt E, et al. TGFbeta regulates the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *Int Immunol* 2004 Sep;16(9):1241-9.

Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 2005 Mar 7;201(5):723-35.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002 Feb;3(2):135-42.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002 Mar;2(3):151-61.

Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007 Jan;7(1):19-30.

Steinman RM, Inaba K. Stimulation of the primary mixed leukocyte reaction. *Crit Rev Immunol* 1985;5(4):331-48.

Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells: features and functions. *Immunol Rev* 1980;53:127-47.

Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000 Feb 7;191(3):411-6.

Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978 Oct;75(10):5132-6.

Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, Young DA, Luxenberg D, Carreno BM, et al. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2004 Oct 15;173(8):5008-20.

Sternadel Z, Karwan-Plonska A, Dipont-Meyer T. [Treatment of mycotic vulvovaginitis with gyno-dactarin]. *Ginekol Pol* 1978 Dec;49(12):1095-6.

Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* 2002 Feb 15;168(4):1627-35.

Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998 Feb 1;160(3):1212-8.

Takahashi M, Kobayashi Y. Cytokine production in association with phagocytosis of apoptotic cells by immature dendritic cells. *Cell Immunol* 2003 Dec;226(2):105-15.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998 Dec;10(12):1969-80.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000 Jul 17;192(2):303-10.

Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, Serra P, et al. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 2006 Jan;7(1):83-92.

Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell suppressor function. *J Immunol* 2004 Jun 1;172(11):6519-23.

Thornton AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998 Jul 20;188(2):287-96.

Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000 Jan 1;164(1):183-90.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995 Nov;3(5):541-7.

Tone M, Tone Y, Adams E, Yates SF, Frewin MR, Cobbold SP, et al. Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Dec 9;100(25):15059-64.

Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature* 2009 Mar 5;458(7234):78-82.

Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007 Oct;219:118-42.

Urban BC, Willcox N, Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 17;98(15):8750-5.

Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007 Jul;7(7):543-55.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997 Nov 27;390(6658):350-1.

Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994 Aug;1(5):405-13.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992 Mar 26;356(6367):314-7.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl $\alpha$ -4. *Science* 1995 Nov 10;270(5238):985-8.

Yamazaki S, Inaba K, Tarbell KV, Steinman RM. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. *Immunol Rev* 2006 Aug;212:314-29.

Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, et al. Direct expansion of functional CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003 Jul 21;198(2):235-47.

Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by dendritic

cells during the mixed leukocyte reaction. Proc Natl Acad Sci U S A 2006 Feb 21;103(8):2758-63.

Yamazaki S, Steinman RM. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. J Dermatol Sci 2009 May;54(2):69-75.

Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. Blood 2006 Sep 1;108(5):1571-9.



## 8 ANEXOS

# 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](#)