

LILIAN SALLY CHIN

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA POR DIFERENTES
COMBINAÇÕES DE CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS**

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

São Paulo
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LILIAN SALLY CHIN

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO LINFOCITÁRIA POR DIFERENTES
COMBINAÇÕES DE CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto

São Paulo
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de agosto de 2008.

PARECER 850/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 87ª reunião realizada em 25.08.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Avaliação da ativação Linfocitária por diferentes combinações de células apresentadoras de Antígenos*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25 de agosto de 2009.**

Atenciosamente,

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

Ilma. Sra.
LÍLIAN SALLY CHIN
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Aos meus pais, Fook e Kim, e minha irmã Priscila por todo o suporte emocional, físico e financeiro durante mais esta importante etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor incondicional, carinho e incentivo constante a minha educação.

À minha irmã por todo apoio, principalmente mental e emocional.

Ao meu namorado Davison por estar comigo desde o início desta fase, sempre me dando força para continuar seguindo.

À minha guinguim e tia Ludovina por todo apoio e ajuda nos momentos que mais precisamos.

Ao meu tio Eduardo (*in memoriam*) por ter lutado até o final sempre muito alegre e bem humorado.

À minha vó (pó) por ainda estar lutando e estar presente em minha vida durante a conclusão de mais esta etapa.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto pela oportunidade de vivenciar a ciência com humanidade e sabedoria.

Ao Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz e a todos os doadores de sangue, pela doação das câmaras de leucorredução, da qual extraí as células utilizadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Paula Lepique por ter me dado sugestões durante a qualificação que foram essenciais para a realização deste trabalho, além de ter me ajudado inúmeras vezes com as contas dos experimentos.

À Profa. Dra. Vera Calich por ter me auxiliado na qualificação e por todo o conhecimento adicionado.

À Profa. Dra. Maria Sato pelas sugestões valiosas dadas na qualificação.

À Profa. Dra. Maristela Camargo por ter cedido os anticorpos e reagentes utilizados para a marcação de citocinas intracelulares, essenciais para a conclusão deste trabalho.

À todos professores do departamento pelas aulas ministradas.

Aos grandes amigos que adquiri durante o período que estive no laboratório Bruna, Célia, Isabella, Giovana Cechim, Graziela, Otávio e Rodrigo pelo apoio intelectual, emocional e pelas conversas e momentos divertidíssimos que tivemos dentro e fora do laboratório. Levarei estes momentos comigo para sempre.

Aos amigos de laboratório de Imunologia de Tumores Ana Carolina, Ana Paula, Bruno, Cristiano, Gabriela, Giovana, João Paulo, Karen, Márcio, Murilo, Patrícia Bergami, Renato, Roberta e Roberto pelas ajudas e pelos ótimos momentos que passei no laboratório.

Ao Otávio, em especial, pois sem a ajuda dele, a conclusão deste trabalho não seria possível.

À Célia por toda ajuda no laboratório, sempre me socorrendo na falta de algum reagente.

A todos meus colegas de departamento que me ajudaram nas discussões imunológicas, principalmente no cursão.

Às minhas amigas Bárbara, Beatriz, Lila e Luciana que sempre estiveram ao meu lado desde sempre me ouvindo, apoiando e dando brinca quando necessário.

Aos amigos Jotelma, Amanda, Thiago, Eni, Celso e Amarildo (*in memoriam*) pela ajuda nas questões burocráticas.

Aos amigos da portaria Milton, Octacílio, Roberto, Odair e Ailton.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

E à todas as pessoas que ajudaram na realização deste trabalho de forma direta ou indireta.

Obrigada a todos!

A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.

(Albert Einstein)

RESUMO

CHIN, L. S. **Avaliação da ativação linfocitária por diferentes combinações de diferentes células apresentadoras de antígenos.** 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A ativação de linfócitos T (LT) por células apresentadoras de antígenos (APC) é etapa central na definição do padrão de resposta do sistema imune. Acredita-se que as células dendríticas (DCs) sejam as mais eficientes e únicas capazes de ativar LT naive. Com a possibilidade de geração *in vitro* deste tipo celular, inúmeros protocolos clínicos explorando este potencial vêm sendo desenvolvidos, principalmente em abordagens imunoterapêuticas para o câncer. Todavia, em situações fisiológicas a apresentação antigênica dificilmente ocorre por um tipo celular único. Desta forma, o presente projeto investigou os padrões de resposta induzidos por DCs maduras derivadas de monócitos (cultivados na presença de IL-4 e GM-CSF e estimulados com TNF- α - mDCs) em combinação com diferentes APCs, incluindo linfócitos B (LB), monócitos, macrófagos (Macr) e DCs imaturas (iDCs). LT foram estimulados com as diferentes APCs isoladas (razão 10 LT:1 APC) ou com outras APCs combinadas por mDCs (razão 1 outra APC: 10 mDC). O fenótipo e a proliferação de LT, bem como as marcações intracelulares para citocinas e FOXP3 foram analisadas por citometria de fluxo. Além disso, a produção de citocinas extracelulares foi medida por ELISA e BIOPLEX. Quando as diferentes APCs foram usadas isoladamente para estímulo de LT alogênicos, mDCs apresentaram o maior poder de estimulação, seguidas, na ordem, por iDCs, Macr e LB. Quando combinadas, notou-se, de modo geral, que todas as combinações tendem a diminuir a resposta induzida pelas mDCs, principalmente de LT CD4⁺. Interessantemente, iDCs interferiram mais na estimulação de mDCs do que as outras APCs. A análise da produção de citocinas mostrou que IL-2 foi produzida somente quando mDCs estavam presentes como estimuladoras. Esta produção foi diminuída na presença de todas as outras APCs e, de novo, foi mais afetada quando iDCs estavam presentes nas co-culturas. Contrastando com este dado, a produção de IFN- γ aumentou na presença de iDCs, Macr e LB. A produção de IL-10 foi afetada apenas na presença de LB (foi aumentada), enquanto a produção de IL-4 não foi afetada na presença de outras APCs. Além disso, a adição de outras APCs às

co-culturas de mDCs com LTs levou a um leve aumento da geração/ proliferação de linfócitos T reguladores. Deste modo, os dados confirmam o efeito das interações de APCs na estimulação de LT e podem prover ferramentas para o refinamento de abordagens imunoterapêuticas.

Palavras-chave: Células Dendríticas. Células Apresentadoras de Antígenos. Linfócitos T.

ABSTRACT

CHIN, L. S. **Evaluation of lymphocyte activation by different combinations of antigen presenting cells.** 2010. 103 p. Master thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The activation of T lymphocytes (TL) by antigen presenting cells (APC) is a crucial step in the definition of immune response patterns. Dendritic cells (DC) are the main APC and, since they may be generated *in vitro*, many clinical protocols based on their immunostimulatory potential are currently underway, mainly in immunotherapeutic approaches for cancer. In physiological conditions, however, other APC may participate in antigen presentation, thus influencing the immune response pattern developed. Therefore, the aim of this study was to evaluate the response patterns induced *in vitro* by different combinations of APC, including B lymphocytes (BL), monocytes, *in vitro* GM-CSF-stimulated monocytes (Macr), immature (iDC) and mature (mDC) monocyte-derived DC (differentiated under IL-4 and GM-CSF and matured by TNF-alpha treatment during the last 2 days of a 7-day culture). TL were stimulated with the different isolated APC (at a 10:1 ratio of T:APC) or with each other APC combined mDC (at a 1:10 ratio of "other cell":mDC). TL proliferation was accessed by CFSE dilution and cytokine production by ELISA and/or Multiplex flow immunoassay. As expected, when different APC were used alone to stimulate allogeneic TL, mDC presented the highest capacity of stimulation, followed by iDC, Macr, monocytes, and BL, in this order. When combined with mDC, all other APC caused a slight decrease in the overall response, but a clearly more intense decrease among CD4⁺ T cells. Among CD8⁺ T cells, the effect of other APC was less evident. Interestingly, iDC interfered more on the mDC stimulation than the other APC. Cytokine production analysis showed that IL-2 was only present when mDC were present as stimulators. The level of IL-2 production decreased with the presence of all other and, again, was more intensely affected by iDC. Contrastingly, IFN-γ production was enhanced by the presence of iDC, macrophages and BL. IL-10 production was only affected by the presence of BL, which increased its production, while IL-4 production was not affected by the presence of any other APC. Moreover, the addition of other APC to mDC co-cultures caused a slight increase of regulatory T cells generation/ proliferation. These data confirm the effects of APC interactions upon TL stimulation and response patterns. If well defined, these APC combinations

may provide a tool for fine-tuning of immune response induction in immunotherapeutic approaches.

Key words: Dendritic cell. Antigen Presenting Cells. T Lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fotomicrografias de culturas para diferenciação de monócitos em diferentes APCs	48
Figura 2 -	Método de análise de monócitos, macrófagos, iDCs e mDCs ...	49
Figura 3 -	Caracterização das diferentes APCs	50
Figura 4 -	Caracterização das diferentes APCs (porcentagem de células positivas)	52
Figura 5 -	Caracterização das diferentes APCs (MFI)	53
Figura 6 -	Caracterização das diferentes APCs (índice de expressão)	54
Figura 7 -	Separação de monócitos por microesferas marcadas com anticorpo anti-CD14	55
Figura 8 -	Caracterização de células diferenciadas a partir de monócitos por incubação com GM-CSF	56
Figura 9 -	Método de análise de linfócitos B	57
Figura 10 -	Pureza da população de linfócitos B separados de células não-aderentes por diferentes métodos	57
Figura 11 -	Caracterização de linfócitos B separados por diferentes métodos	58
Figura 12 -	Figuras representativas do efeito estimulador das diferentes APCs sobre linfócitos T alogênêicos	59
Figura 13 -	Capacidade linfoestimuladora das diferentes APCs alogênêicas	60
Figura 14 -	Índice de proliferação de células T induzida pelas diferentes APCs isoladamente	61
Figura 15 -	Índice de proliferação de células T induzida pelas combinações de APCs	62
Figura 16 -	Índice relativo da proliferação de linfócitos T estimulados por diferentes APCs isoladamente	63
Figura 17 -	Índice relativo da proliferação de linfócitos T estimulados pelas combinações de APCs	63

Figura 18 -	Quantificação da produção de IFN-γ, presente no sobrenadante das co-culturas, por ELISA	65
Figura 19 -	Quantificação da produção de IFN-γ, presente no sobrenadante das co-culturas, por BIOPLEX	66
Figura 20 -	Quantificação da produção de IL-10, presente no sobrenadante das co-culturas, por ELISA	67
Figura 21 -	Quantificação da produção de IL-10, presente no sobrenadante das co-culturas, por BIOPLEX	68
Figura 22 -	Quantificação da produção de IL-10, presente no sobrenadante das co-culturas, por BIOPLEX	69
Figura 23 -	Quantificação da produção de IL-4, presente no sobrenadante das co-culturas, por BIOPLEX	70
Figura 24 -	Detecção de IL-2, IL-5 e IL-6 por BIOPLEX	71
Figura 25 -	Detecção de IL-13, IL-17 e TNF-α por BIOPLEX	72
Figura 26 -	Quantificação da produção de IFN-γ, presente no interior de células que estavam em co-cultura	74
Figura 27 -	Marcação de FOXP3	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Anticorpos utilizados para análise por citometria de fluxo	37
------------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Funções das moléculas analisadas por citometria de fluxo	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AET	2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CCR7	Receptor de quimiocina 7
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CTL	Linfócito T citotóxico
DMSO	Dimetilsulfóxido
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano-DR
iDCs	Células dendríticas imaturas
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IP	Índice de proliferação
LB	Linfócitos B
LME	Leucina metil éster
LPS	Endotoxina lipopolissacarídica
LT	Linfócitos T
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
Macr	Monócitos estimulados com GM-CSF por 7 dias
M1	Macrófagos do tipo 1
M2	Macrófagos do tipo 2
mDCs	Células dendríticas maduras
MFI	Intensidade mediana de fluorescência
MHC- I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC- II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
Mono	Monócitos
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
Pha	Fitohemaglutinina A
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio

R-10	RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino
SFB	Soro fetal bovino
TGF-β	Fator de transformação do crescimento β
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
Treg	Linfócitos T reguladores
TRIS	Tri-hidroximetil-aminometano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Casuística	35
3.2 Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos do periférico <i>in vitro</i>	35
3.3 Análise de marcadores por Citometria de Fluxo	36
3.4 Moléculas marcadas para análise por citometria de fluxo	38
3.5 Método para análise de monócitos, macrófagos, iDCs e mDCs	39
3.6 Separação de linfócitos B	39
3.7 Método para análise dos linfócitos B	40
3.8 Separação de linfócitos T	40
3.9 Ensaio de proliferação alogênico	41
3.10 Índices de proliferação de linfócitos T	41
3.11 Marcação para FOXP3	42
3.12 Métodos para análise de células marcadas para FOXP3	42
3.13 Marcação para citocinas intracelulares (IL-4 e IFN-γ)	43
3.14 Detecção da produção de citocinas por BIOPLEX	43
3.15 Detecção da produção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)	43
3.16 Índices de produção de citocinas	44
3.17 Análise estatística	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Caracterização fenotípica de monócitos, macrófagos, DCs imaturas e maduras	47
4.2 Separação de monócitos do sangue periférico por microesferas magnéticas marcadas com anticorpo anti-CD14 ..	55
4.3 Separação e caracterização de Linfócitos B	56

4.4 Avaliação da atividade aloestimuladora das Células Dendríticas maduras, imaturas, Monócitos, Monócitos+GM-CSF e Linfócitos B	59
4.5 Avaliação da produção de citocinas nos sobrenadantes das co-culturas	64
4.6 Avaliação da presença de citocina intracelular das células colocadas em co-cultura	73
4.7 Avaliação da presença de células FOXP3⁺	74
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Para que ocorra uma resposta imune adequada contra patógenos, é necessária que haja a ativação adequada de linfócitos T (LT) naive. O conjunto de estímulos recebidos pelo sistema imune pode direcionar a resposta dos linfócitos a diferentes padrões, sendo estes diversos para cada patógeno. Para a ativação efetiva destes linfócitos acredita-se que sejam necessários “dois” sinais. O “primeiro sinal” consiste no reconhecimento do complexo de MHC-peptídeo nas células apresentadoras de antígenos (APCs), pelos receptores dos linfócitos T (TCR) específicos para o antígeno (SCHWARTZ, 2003). Já o “segundo sinal” parece ser constituído pela interação de moléculas co-estimuladoras B7 (CD80 e CD86) expressas pelas APCs com seus ligantes expressos nos LT (CD28 e CTLA-4) (YOUNG et al., 1992; GUERMONPREZ et al., 2002). Na ausência deste “segundo sinal”, os linfócitos podem se tornar anérgicos aos antígenos em questão (REDMOND et al., 2005), podem ser eliminados (HARDING et al., 1992), ou podem se diferenciar em linfócitos T reguladores (Tregs – $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$) (BECKER et al., 2006; BAECHER-ALLAN et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 2010).

Sabe-se que o “segundo sinal” deve acontecer em local e hora certa entre o linfócito e uma APC adequada. Existem inúmeras moléculas de superfície que podem mediar o co-estímulo em linfócitos T, dentre estas, a molécula CD28 destaca-se como a mais relevante. A CD28 encontra-se presente na membrana de LT $CD4^+$ e na maioria de LT $CD8^+$ (ACUTO e MICHEL, 2003). Esta molécula possui como ligantes, nas APCs, o CD80 e o CD86. Estas últimas apresentam-se em baixa expressão em APCs em repouso, enquanto que ao serem ativadas, passam a possuir maior quantidade destas moléculas em superfície, bem como de moléculas de MHC-II. Por este motivo, as APCs são as células capazes de prover tanto o “primeiro”, quanto o “segundo sinal” de ativação de LT (SHARPE e FREEMAN, 2002).

Desde a identificação de CD28, muitos grupos vêm estudando o evento bioquímico crítico iniciado por esta molécula na ativação de linfócitos T impedindo que este se torne anérgico (ACUTO e MICHEL, 2003). Uma consequência que pode ocorrer quando há a ligação da molécula CD28 é a potencialização, bem como o prolongamento, do sinal gerado pelo complexo TCR. No entanto, o mecanismo pelo qual este efeito ocorre, ainda permanece desconhecido, podendo depender da estabilização da interação TCR/ APC, da diminuição da reciclagem de CD28, ou do

recrutamento de moléculas efetoras que atuam de forma sinérgica (ACUTO e MICHEL, 2003).

Outra importante molécula encontrada na superfície de linfócitos T é a CTLA-4 (CD152). Esta molécula possui um papel fisiológico importante para a regulação da ativação de LT. Uma vez que a resposta linfocitária se inicia, a presença desta molécula torna-se maior na superfície do LT (PERKINS et al., 1996). Existem muitas outras que possuem mesmo papel fisiológico, no entanto é a CTLA-4 que recebe maior destaque na literatura (TIVOL et al., 1995; WATERHOUSE, 1995). Esta molécula faz parte da família CD28, porém possui afinidade muito maior para as moléculas B7 que a CD28. Desta forma, a grande quantidade de CTLA-4 na superfície linfocitária, promove uma diminuição da ligação de CD28 com seus ligantes (por competição), impedindo a estimulação de uma resposta efetora de LT (CARRENO et al., 2000). Contudo, a função de CTLA-4 não é apenas a de competir com CD28 por seus ligantes, esta também transduz sinais, participando ativamente da regulação da atividade linfocitária (LIN et al., 1998; MATELLER et al., 2000).

Além destes dois sinais necessários para a ativação de LT, foi descrito recentemente que a geração de uma resposta imune necessita de DCs ou LT estimulados que tenham recebido um “terceiro sinal”. Este “terceiro sinal” consiste na interação de moléculas de CD40-ligante (CD40L ou CD154) em LT com a molécula CD40, localizada na superfície da DC ativada (maturas) (COOLS et al., 2007). LT CD8⁺ quando ativados na ausência deste “terceiro sinal” passam a possuir uma expansão clonal limitada e uma função efetora (atividade lítica e a habilidade de produzir IFN- γ) inadequada. Vários estudos sugerem que a produção de uma variedade de citocinas pro-inflamatórias, como o IFN tipo I, IL-6 e IL-12, pelas DCs podem dar sustentação a este “terceiro sinal” para a indução de uma resposta de LT eficiente (CURTSINGER et al., 1999; CURTSINGER et al., 2003; HUGUES, 2010).

Após a ativação, há um direcionamento da resposta efetora de LT CD4⁺ para, pelo menos, três subtipos já descritos na literatura: T *helper* 1 (Th1), Th2 e Th17 (REINHARDT et al., 2006; TATO e O'SHEA, 2006; HARRINGTON et al., 2006). De maneira geral, as citocinas IL-12 e IFN- γ promovem a indução de linfócitos Th1, enquanto que IL-4 induz Th2 e IL-6 (juntamente com TGF- β) promove a indução de linfócitos Th17 (MURPHY e REINER, 2002; SZABO, et al., 2003; HARRINGTON et

al., 2006; REINHARDT et al., 2006; VELDHOEN et al., 2006; BETTELLI et al., 2006; TATO e O'SHEA, 2006). Para cada subtipo de linfócitos Th, parece haver um fator de transcrição essencial. O T-bet é um regulador crítico para as células com perfil Th1. Este atua promovendo responsividade das células ativadas à IL-12 através do aumento do receptor IL-12R β 2 nestas células, promovendo diretamente a expressão de IFN- γ (MULLEN et al., 2001; AFKARIAN et al., 2002; AVNI et al., 2002; MULLEN et al., 2002). No caso das células Th2, o fator de transcrição geral é o GATA-3 (ZHENG e FLAVELL, 1997; PAI et al., 2004; ZHU et al., 2004). Este fator de transcrição está envolvido diretamente na ativação de *clusters* gênicos de citocinas de padrão Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5), promovendo o crescimento seletivo de linfócitos Th2 em resposta à citocina IL-4 (HUTCHINS et al., 2002; LEE et al., 2003; LEE e RAO, 2004). O fator de transcrição responsável pelo comprometimento de linfócitos T em Th17 é o ROR γ t, o qual é induzido sinergicamente pelas citocinas IL-6 e TGF- β . Ambas citocinas contribuem para a indução da expressão do receptor para IL-23, permitindo que esta citocina promova a manutenção de Th17, embora a expressão deste receptor não seja conhecidamente dependente de ROR γ t (IVANOV et al., 2006; MANGAN et al., 2006)

O padrão de resposta induzido pelos linfócitos do tipo Th1 é caracterizado pela secreção de IFN- γ . Este subtipo celular também é um importante ativador de macrófagos, células NK e LT CD8⁺ (SZABO et al., 2003), importantes na resposta contra patógenos intracelulares. A citocina IL-12 é importante para a indução deste tipo celular, mas também altamente relevante para a sobrevivência, proliferação e aumento da expressão gênica (NAPOLITANI et al., 2005). Já os linfócitos do tipo Th2 são responsáveis pela secreção das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-25, possuindo função essencial na defesa de superfícies epitelial e mucosa. Além disso, este tipo celular pode ativar outras células como eosinófilos, basófilos, mastócitos e também alguns tipos de macrófagos (VOEHRINGER et al., 2006). Para a manutenção, sobrevivência, proliferação e ação destas células, é necessária a presença das citocinas IL-4, IL-25 e IL-33.

Uma citocina crítica para a manutenção das células Th17 é a IL-23, no entanto não é uma citocina necessária para promover a indução destas células (MANGAN et al., 2006). Os linfócitos Th17 produzem IL-17A, IL-17F, IL-6 e TNF- α e são responsáveis pela regulação da inflamação aguda (LANGRISH et al., 2005).

Este subtipo de LT atua em conjunto com neutrófilos e são importantes para a defesa contra bactérias extracelulares. (HAPPEL et al., 2005; MANGAN et al., 2006; VELDHONEN et al., 2006; BETTELLI et al., 2006; IVANOV et al., 2006).

Um outro subtipo de linfócitos que pode ser induzido é o LT regulador (Treg). Podem ser identificados dois tipos de Tregs: os Tregs naturais (nTreg) gerados originalmente no timo, sendo subdivididos em nTreg FOXP3⁺ e Tregs naturais produtoras de IL-10 (Tr1) (RONCAROLO et al., 2006) e TGF- β (Th3) (FARIA e WEINER, 2005); e células T reguladoras FOXP3⁺ induzíveis (iTregs) (CHEN et al., 2003). As nTregs, as quais possuem fenótipo CD4⁺CD25⁺ (KRONENBERG e RUDENSKY, 2005), são as principais células envolvidas no processo de equilíbrio homeostático, compreendendo entre 5-10% dos LT CD4⁺ circulantes. Estes LT CD4⁺ especializados em suprimir a resposta imune desempenham papel essencial na regulação da resposta e na eliminação ou inativação destas, podendo resultar no desenvolvimento de doenças auto-imunes e acentuação de resposta imune a aloantígenos e a tumores (SAKAGUCHI et al., 2001; SHEVACH, 2002). O fator de transcrição FOXP3 foi descrito como característico da população de nTregs (HORI et al., 2003; FONTENOT et al., 2003) e tem a capacidade de programar o desenvolvimento e função de linfócitos Tregs, culminando na supressão da resposta imune, principalmente, através do contato célula-célula (SCHUBERT et al., 2001; COFFER e BURGERING, 2004). Outra característica destas células é a de não responderem à estimulação pelo TCR como uma célula efetora, no entanto, necessitam da ativação por esta via para se tornarem supressoras e exercerem sua função (THORNTON e SHEVACH, 1998; SHEVACH, 2002). A ação das Tregs sobre os linfócitos ativados é antígeno-inespecífica e dependente do contato célula-a-célula (THORNTON e SHEVACH, 2000; SHEVACH, 2002; DIECKMANN et al., 2002). Acredita-se que estas células podem agir sobre as APCs de modo a diminuir a expressão de MHC-II e das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a produção de IL-10 (SHEVACH, 2009). As células Tregs atuam sobre os outros subtipos de linfócitos, influenciando principalmente na função destes, através de aumento da expressão de receptor de TGF- β e redução da capacidade proliferativa, induzindo anergia, apoptose e ainda, a conversão destas células em um fenótipo regulador (CHOILEAIN e REDMOND, 2006).

Além das respostas efetoras de LT CD4⁺, pode-se citar também a resposta efetora de LT CD8⁺. Estas células também são produtoras de IFN- γ e de grânulos citotóxicos (perforina e granzimas). Os produtos tóxicos e pró-inflamatórios dos LT CD8⁺ efetores regulam a magnitude da expansão e contração da resposta deste tipo celular (BADOVINAC et al., 2000). A indução de resposta destes linfócitos depende dos mesmos sinais que a resposta efetora de LT CD4⁺, ligação MHC-peptídeo/ TCR, incluindo moléculas co-estimuladoras e citocinas. No entanto o MHC envolvido na ativação de LT CD8⁺ é o MHC-I. O fator de transcrição responsável pelo comprometimento destas células é o mesmo das células Th1, o T-bet, o qual possui a mesma função nestas células também (SULLIVAN et al., 2003; JUEDES et al., 2004). Outro fator de transcrição, altamente homólogo ao T-bet, que também é expresso nos LT CD8⁺ efetores antígeno específicos é o *Eomesodermin* (Eomes). Alguns trabalhos têm observado que T-bet e Eomes podem possuir algumas funções redundantes e outras não na programação de células citotóxicas efetoras e de memória (PEARCE et al., 2003; SULLIVAN et al., 2003; JUEDES et al., 2004; INTLEKOFER et al., 2005).

Considerando esta variedade de sinais necessários para a ativação e regulação da resposta, não surpreende que diferentes tipos celulares sejam capazes de realizar a função de APC, mas que um tipo especializado o faça com evidente superioridade: as células dendríticas. As DCs foram identificadas por Steinman e Cohn, em 1973, e têm origem de células da medula óssea, que dão origem a precursores circulantes, principalmente os monócitos, que vão para os tecidos, onde podem se diferenciar em iDCs com alta capacidade endocítica (INABA et al., 1993; LANDMANN et al., 2001). Após dano tecidual, as iDCs, que capturam os antígenos presentes em seu microambiente, mudam seu padrão de receptores e recebem sinais de maturação (CAUX et al., 1994; AUSTYN et al., 1996). Essa maturação é caracterizada por: perda de receptores endocíticos/ fagocitários (SALLUSTO et al., 1995), aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras, como CD80, CD86 e CD40 (CAUX et al., 1994) e do “marcador de ativação” CD83 (ZHOU e TEDDER, 1995), e também aumento da expressão do receptor para quimiocina CCR7 (ROAKE et al., 1995; YANAGIHARA et al., 1998) com conseqüente migração para a região T de órgãos linfóides secundários, onde podem dar início uma resposta específica (AUSTYN et al., 1996; BANCHEREAU e STEINMAN, 1998). O sinal mediado por CD86 em células dendríticas (DCs) parece ser o mais crítico para a

amplificação da resposta dos LT (CAUX et al., 1994). Alguns autores propõem a existência de diferenças na expressão das moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), apesar de possuírem funções semelhantes. A molécula CD86 possui expressão constitutiva em baixos níveis em monócitos (Mono), DCs imaturas (iDCs) e linfócitos B (LB) em repouso (FREEMAN, 1993a; FREEMAN 1993b; HATHCOCK et al., 1994), que é rapidamente aumentada após a ligação da DC com o LT. Já a expressão de CD80 é induzida e ocorre devido ao aumento de expressão de CD86. Além disso, há evidências de que as moléculas CD80 e CD86 possuem maior afinidade pelo receptor CTLA-4 que pelo CD28 (HATHCOCK et al., 1994; LARSEN et al., 1994), e que CD80 se ligue a ambos os receptores mais avidamente que CD86 (LINSLEY et al., 1994).

A capacidade de desencadear a resposta imune específica também depende do aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (ZHOU e TEDDER, 1995), característico das DCs maduras (mDC), que ocorre devido ao aumento da vida média destas moléculas em sua superfície. Para o reconhecimento do “dano tecidual”, as DCs apresentam, em sua superfície, um repertório de receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), dentre eles as lectinas tipo C (DC-SIGN) e os TLR, podendo modular a resposta imune de acordo com os padrões reconhecidos por esses receptores (VAN KOOYK e GEIJTENBEEK, 2003).

De modo geral, o modelo mais simples aceito para explicar a ativação da resposta imune propõe que, uma vez ativadas, as iDCs, sofrendo o processo de maturação e migração para os órgãos linfóides secundários, apresentam os antígenos capturados em seu microambiente de origem aos LT, de forma imunogênica, dando, assim, origem à resposta imune. Dentro deste modelo, permanece em aberto, porém, o papel das iDCs na fisiologia do sistema imune. Num estado basal, a maioria das DCs, nos tecidos periféricos possui o fenótipo imaturo (STEINMAN et al., 2003), capturando continuamente antígenos aí presentes, por processos que vão da fagocitose à macropinocitose (WILSON et al., 2004). Devido à baixa expressão de moléculas co-estimuladoras têm-se proposto que a interação de LT virgens com as iDCs resulta na indução de tolerância (PROBST et al., 2005; STEINMAN et al., 2003) de um modo intrínseco à LT (ex. anergia, deleção) ou extrínseco (ex. via Tregs ou citocinas) (STEINBRINK et al., 1997; LUTZ e

SCHULER, 2002; STEINMAN et al., 2003; PROBST et al., 2005; SAKAGUCHI, 2004).

Por outro lado, alguns estudos propõem a hipótese de que mDCs, e não as iDCs, estariam envolvidas na indução da tolerância (HUANG et al., 2000; SCHEINECKER et al., 2002; RAVENEY e MORGAN, 2007), pela estimulação de linfócitos Tregs (AKBARI et al., 2001; VERHASSELT et al., 2004; BARNEJEE et al., 2006). Outros estudos ainda sugerem que diferenças no estímulo de maturação resultam em diferentes estágios de maturação da DC levando a diferentes padrões de resposta de LT. De fato, moléculas derivadas de produtos bacterianos, como o LPS, ou virais, assim como citocinas pro-inflamatórias (fator de necrose tumoral- α – TNF- α e IFN- γ) e sinais celulares, como CD40L promovem a produção de citocinas, como a IL-12p70 e interferon- α (IFN- α), pelas DCs induzindo, preferência em padrão Th1 de resposta (SCHULZ et al., 2000; VIEIRA et al., 2000). Em contraste, outras moléculas “antiinflamatórias”, como a IL-10, a prostaglandina E2 (PGE2) e corticosteróides podem promover as respostas de padrão Th2 (KALINSKI et al., 1997; KALINSKI et al., 2001; FONG e ENGLEMAN, 2000) ou de Tregs (COOLS et al., 2007; LI et al., 2007). Entretanto, tem sido demonstrado que as DCs têm um papel relevante não só na indução de respostas imunes, como descrito acima, mas também na indução da tolerância periférica, sendo esta complementar à tolerância central, na função de preservação dos tecidos próprios. As DCs estão continuamente captando e processando antígenos, inclusive antígenos próprios, que, no contexto sem inflamação ou infecção, isto é, sem “sinais de perigo”, são apresentados aos LT nos tecidos linfóides secundários pelas DCs em um estado imaturo e indutor de tolerância. Desta forma, o estado de maturação das DCs é determinante para indução de imunogenicidade ou tolerância (STEINMAN et al., 2000; STEINMAN et al., 2003). De fato, na condição de estado basal, a DC fica imatura e tecido residente, expressando somente pequenas quantidades de MHC-II e moléculas co-estimuladoras (SCHWARTZ, 2003).

Neste quadro ainda é necessário acrescentar outros tipos celulares com função de APC. Os monócitos são células efetoras do sistema imune, e possuem receptores para quimiocina e de adesão que medeiam a migração da célula do sangue para o tecido injuriado. Além da capacidade de produzir citocinas inflamatórias, os monócitos, podem também capturar células e moléculas tóxicas.

Durante um processo inflamatório, e em menor grau, num estado basal, são estas células as capazes de se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas (SERBINA et al., 2008). Estes também são capazes de apresentar antígenos e ativar linfócitos T, já que possuem moléculas co-estimuladoras e moléculas de MHC-II, mesmo que em baixa quantidade (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; GEISSMANN, 2010).

Por sua vez, tanto macrófagos (RHODES, 1975; RANDOLPH et al., 2008) quanto linfócitos B (LB) (ISSEKUTZ et al., 1982; LANZAVECCHIA, 1985a; ZOUALI, 2008) são células capazes de apresentar antígenos e influenciar significativamente na resposta imune a eles dirigida. Acredita-se que macrófagos estejam envolvidos na homeostase do tecido em estado basal, realizando o *clearance* de células apoptóticas e necróticas, bem como produção de fatores de crescimento, sendo também responsáveis pelo reconhecimento de estímulos de diferenciação e morte de outras células. Estes possuem alta capacidade fagocítica, principalmente pelo fato de possuírem diversos receptores de patógenos, produzindo também grandes quantidades de citocinas inflamatórias (GORDON, 2002), como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, TNF- α e IL-10, e quimiocinas. Os macrófagos atuam diretamente sob a influência de outras células do sistema imune, como DCs e linfócitos. Esse tipo celular são os maiores responsáveis por eliminar patógenos intracelulares, como a *Mycobacterium* (VERRECK et al., 2004). Contudo, são também responsáveis um habitat ótimo para a sobrevivência destas no meio intracelular. Este papel contraditório dos macrófagos é devido às diferentes possíveis polarizações. É descrito na literatura que macrófagos podem ser polarizados em macrófagos do tipo 1 (M1) e do tipo 2 (M2). Os M1 são conhecidos por possuir perfil pró-inflamatório (produção de IL-12 e principalmente de IL-23) e diferenciados quando colocados em cultura com o Fator de Crescimento de Colônia de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), enquanto que os M2 possuem perfil antiinflamatório (produção de IL-10) e são diferenciados na presença de Fator de Crescimento de Colônia de Macrófagos (M-CSF) (SMITH et al., 1998; VERRECK et al., 2004; XU et al., 2007). Uma vez que este tipo celular possui grande heterogeneidade, é relevante levar em conta que estes podem interferir na resposta imune. Além disso, um estudo recente demonstrou que macrófagos podem modular a resposta inflamatória pela produção

de espécies reativas de oxigênio (ROS) e que podem gerar linfócitos T reguladores ROS-dependentes (KRAAIJ et al., 2010).

Os LB também podem mediar a resposta imune bem como os macrófagos. Podem realizar apresentação de antígenos via MHC-II e reconhecimento pelo receptor de LB (BCR). No entanto, esta APC não possui capacidade fagocítica como DCs e macrófagos, sendo responsável pela apresentação de antígenos solúveis, capturados por endocitose/ pinocitose. Na verdade, realçando o potencial destas células, vale lembrar a hipótese de Matzinger (1994), para explicar os fenômenos de tolerância de alta e de baixa dose de antígenos (DRESSER e MITCHISON, 1968; LANZAVECCHIA, 1985b). Esta hipótese sustenta que LB apresentam antígenos de forma tolerogênica aos LT naive. Ao se administrar uma alta dose de um antígeno, com o qual o indivíduo ainda não teve contato prévio, a indução de tolerância ocorreria pela apresentação deste antígeno ao LT naive por LB não-específicos ocasionando a indução de uma resposta tolerogênica. Já em casos de administração de doses muito baixas, a apresentação seria também por LB antígeno-específicos, devido à maior afinidade de seus receptores pelo antígeno. Em ambos os casos, a apresentação de antígeno sendo preferencialmente realizada por LB, levaria à tolerância.

Existem vários mecanismos, pelos quais o LB pode gerar resposta tolerogênica. Os LB podem induzir tolerância de linfócitos T direta e indiretamente. A tolerância direta se deve ao reconhecimento do antígeno pelas células T CD8⁺ apresentadas pelos LB MHC-I, e devido a baixa presença de moléculas co-estimuladoras, há a deleção ou anergia do LT, podendo haver também o desenvolvimento de células T supressoras CD8⁺ (ASHOUR e SEIF, 2007). Além disso, existem no mínimo 5 vias pelo qual o LB pode influenciar no desenvolvimento da tolerância de células T indiretamente. Primeiramente, os LB podem apresentar antígenos de uma maneira tolerogênica, pela via de MHC-II, às células Th CD4⁺ antígeno-específica, levando à geração células Th CD4⁺ tolerantes, que não poderão ajudar as células T CD8⁺. Outra possibilidade é a de que LB podem inibir a proliferação e a diferenciação de células Th CD4⁺. Uma terceira possibilidade é a persistente apresentação de antígenos pelas células B que podem levar à preferência por resposta tolerogênica à imunogênica. Outro modo, pelo qual o LB pode gerar uma resposta tolerogênica é o fato destas células poderem regular a

atividade de DCs (pela produção de IL-10 ou anticorpos), conferindo a habilidade de induzir uma resposta tolerogênica. E por fim, os linfócitos B podem secretar fatores supressores, que tem um efeito inibitório diretamente em células Th e nas CTL (ASHOUR E SEIF, 2007).

Neste contexto, portanto, torna-se claro que a “composição” da população de APCs envolvidas na apresentação de um determinado antígeno pode influenciar, de maneira muito significativa, o padrão e a evolução da resposta imune ao mesmo. Todavia, com a recente possibilidade de geração *in vitro* de DCs, e frente à grande eficácia deste tipo celular como APC, perdeu-se de vista, relativamente, a situação mais fisiológica, acreditamos, em que uma resposta imune é induzida por uma população heterogênea de APC. Assim, nosso objetivo com este projeto foi testar, *in vitro*, o efeito da apresentação de antígenos conhecidos por populações constituídas por diferentes tipos celulares capazes de o fazerem. Com isto, pretendeu-se contribuir para a compreensão desta etapa fundamental da resposta imune e, eventualmente, modular de maneira mais controlada a resposta induzida em protocolos de imunização que exploram a possibilidade de geração *in vitro* das diferentes APCs.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, o padrão de resposta de linfócitos T, induzido por populações heterogêneas de APC (células dendríticas maduras (mDC) em combinação com células dendríticas imaturas (iDC), monócitos (Mono), macrófagos (Macr) e linfócitos B (LB)).

2.2 Específicos

- Avaliar a capacidade estimuladora de diversas combinações e diferentes proporções de APCs na ativação de linfócitos T alogênêicos. Na resposta dos linfócitos T foram avaliados:
 - o O tipo de linfócito T ativado através da identificação de marcadores extracelulares (CD3, CD4, CD8 e CD25) e intracelular (FOXP3);
 - o Detecção de citocinas presentes nos sobrenadantes das co-culturas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, TNF- α , IFN- γ);
 - o Detecção de citocinas intracelulares (IL-4 e IFN- γ) de linfócitos mantidos em co-culturas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Parecer 850/CEP). Amostras de sangue periférico para obtenção de células mononucleares foram obtidas a partir de câmaras de leucorredução de aférese para coleta de plaquetas, de doadores saudáveis do Hospital Oswaldo Cruz, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos do periférico *in vitro*

Monócitos foram separados de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), obtidas a partir de câmaras de leucorredução de aférese para coleta de plaquetas. Para a purificação das células mononucleares, o sangue diluído em PBS (salina tamponada com fosfato) (1:1) foi colocado em tubos plásticos cônicos de 50 mL, aos quais foram acrescentados, no fundo do tubo, 12 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). O material foi centrifugado a 900 g a 18 °C por 30 minutos. A camada de células mononucleares formada foi retirada, colocada em outro tubo juntamente com RPMI-1640 e centrifugada a 600 g por 10 minutos. As células foram lavadas por mais duas vezes a 300 g e a 200 g, respectivamente, para eliminação das plaquetas. O botão celular foi coletado, as células quantificadas, ressuspensas em meio R-10 (RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino) e colocadas em cultura na concentração de 10^7 células/mL. Uma alíquota destas foi congelada para a obtenção de monócitos para a co-cultura no 7º dia das culturas de macrófagos, iDCs e mDCs. As células foram mantidas na estufa para a aderência a 37 °C e 5% de CO₂ *overnight* (cerca de 14 horas).

Após a incubação, as células não aderentes presentes no sobrenadante foram removidas, quantificadas e congeladas para ensaio posterior. As células aderentes foram mantidas em cultura por cinco dias em meio R-10 acrescido de 50 ng/mL de IL-4 e 50 ng/mL de GM-CSF para a diferenciação dos monócitos em DCs. Após esse período, as células foram ativadas pela adição de 50 ng/mL de TNF- α . No sétimo dia, estas foram removidas utilizando-se RPMI-1640 gelado e uma alíquota

foi separada para contagem. Após centrifugação a 290 g por 10 minutos, as DCs maduras foram usadas em ensaios subseqüentes. No caso dos ensaios que envolveram a utilização de monócitos (PBMC descongeladas e plaqueadas *overnight*) macrófagos (monócitos cultivados com 50 ng/mL de GM-CSF por 7 dias) ou células dendríticas imaturas (sem ativação por TNF- α), estes foram retirados com auxílio de êmbolo de seringa ou *cell scraper*.

3.3 Análise de marcadores por Citometria de Fluxo

Para determinação do fenótipo de membrana de monócitos, macrófagos, iDCs e mDCs, essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais para as seguintes moléculas de membrana: CD1a, CD11c, CD14, CD40, CD68, CD80, CD83, CD86, CD123, CD206 e HLA-DR. Enquanto que para a fenotipagem de LB e LT foram utilizados anticorpos clonais para as moléculas de membrana: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD40, CD80 e HLA-DR. A listagem de anticorpos e fluorocromos utilizados, bem como clones e isotipos são apresentados na Tabela 1.

Após contagem, alíquotas de 1 a 2 x 10⁵ células obtidas das culturas foram colocadas em tubos plásticos de 1,5 mL e lavadas três vezes por centrifugação a 7949 g a 4 °C por 10 segundos com 200 μ L de tampão para citometria (PBS suplementado com 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica), obtendo-se um botão celular, ao qual foram adicionados os anticorpos específicos para os marcadores de interesse. As células foram incubadas ao abrigo da luz por 20 minutos a 4 °C. Após esse período, adicionaram-se 200 μ L de tampão para citometria e o material foi lavado mais uma vez nas mesmas condições e ressuspenso com 200 μ L de tampão para citometria contendo 2% de formaldeído, para a fixação das células. Em seguida, as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo (FACSCalibur) com o *software* CellQuest (BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados com o *software* FlowJo 7.2.5 (Tree Stars Inc.).

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para análise por citometria de fluxo

Molécula	Clone	Isótipo	Fluorocromo
CD1a	HI149	IgG1, k	PE-Cy5
CD3	HIT3a	IgG2a, k	FITC
	HIT3a	IgG2a, k	APC
CD4	RPA-T4	IgG1, κ	FITC
	RPA-T4	IgG1, κ	PE
CD8	SK1	IgG1, κ	PerCP
CD8	RPA-T8	IgG1, κ	PE-Cy5
CD11c	B-ly6	IgG1, k	PE
CD14	M5E2	IgG2a, k	FITC
	M5E2	IgG2a, k	PE
CD19	HIB19	IgG1, k	PE-Cy5
CD25	2A3	IgG1, κ	APC
CD40	5C3	IgG1, k	PE
CD40	5C3	IgG1, k	PE-Cy5
CD56	NCAM16.2	IgG2b, k	FITC
CD68	Y1/82A	IgG2b, κ	PE
CD80	L307.4	IgG1, κ	FITC
CD80	L307.4	IgG1, k	PE-Cy5
CD83	HB15e	IgG1, k	PE-Cy5
CD86	2331 (FUN-1)	IgG1, k	PE
CD123	9F5	IgG1, k	PE-Cy5
CD206	19.2	IgG1, κ	PE-Cy5
IL-4	8D4-8	IgG1, κ	PE
IFN-γ	B27	IgG1, κ	APC
FOXP3	259D/C7	IgG1	PE
HLA-DR	L243 (G46-6)	IgG2a, k	APC

3.4 Moléculas marcadas para análise por citometria de fluxo

Quadro 1 – Funções das moléculas analisadas por citometria de fluxo

Marcadores	Expressão Celular Principal	Principais funções atribuídas
CD1a	Timócitos, células dendríticas (incluindo células de Langerhans)	Apresentação de antígenos não-peptídicos (lipídicos e glicolipídicos) a algumas células T
CD3	Linfócitos T e timócitos	Transdução de sinal do TCR
CD4	Subpopulações de linfócitos T timócitos, monócitos e macrófagos	Co-receptor de sinalização e adesão de linfócitos T
CD8	Subpopulações de linfócitos T timócitos	Co-receptor de sinalização e adesão de linfócitos T
CD11c	Monócitos, macrófagos, granulócitos, células dendríticas, células NK	Integrina; adesão de monócitos ao endotélio e às proteínas da matriz extracelular, principal integrina de macrófagos e células dendríticas
CD14	Monócitos, macrófagos e granulócitos	Receptor de LPS; liga-se ao complexo de LPS, com a proteína de ligação LPS, necessária para a ativação do macrófago induzida por LPS
CD19	Maioria dos linfócitos B	Superfamília das imunoglobulinas; ativação de linfócitos B, forma um complexo co-receptor com CD21 e CD81 para liberar sinais que sinergizam com sinais do complexo receptor de antígenos do linfócito B
CD25	Linfócitos T e B ativados, macrófagos ativados	Receptor da cadeia α de IL-2; liga-se a IL-2, subunidade de IL-2R
CD40	Linfócitos B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais	Família TNF-R; liga-se ao CD154 (ligante de CD40); papel na ativação de linfócitos B dependente de linfócitos T, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais
CD56	Células NK, subpopulações de linfócitos T e B, cérebro	Superfamília das imunoglobulinas; Adesão homotípica
CD68	Monócitos, macrófagos, células dendríticas, granulócitos, linfócitos T ativados, subpopulação de linfócitos B	Mucina; receptor <i>scavenger</i>
CD80	Células dendríticas, linfócitos B e macrófagos ativados	Superfamília das imunoglobulinas; co-estimulador para ativação de linfócitos T, ligante para CD28 e CD152 (CTLA-4)
CD83	Células dendríticas, células de Langerhans, linfócitos B do centro germinativo	Superfamília das imunoglobulinas; Liga-se ao ácido siálico, tem expressão aumentada em células dendríticas maduras
CD86	Linfócitos B, monócitos, células dendríticas, alguns linfócitos T	Superfamília das imunoglobulinas; co-estimulador para ativação de linfócitos T, ligante para CD28 e CD152 (CTLA-4)
CD123	Monócitos, macrófagos, megacariócitos	Cadeia α do receptor de IL-3; Liga-se a IL-3 e em associação com CD131, medeia efeitos biológicos de IL-3
CD206	Macrófagos, células dendríticas epidermais	Receptor de manose humano; envolvida no <i>clearance</i> de glicoproteínas endógenas
HLA-DR	Monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B	Moléculas de classe II do MHC

Fonte: Abbas et al. (2003); Lee et al. (2002).

3.5 Método para análise de monócitos, macrófagos, iDCs e mDCs

Para análise de monócitos e macrófagos, em gráfico de tamanho (FSC – *forward scatter*) por granulosidade (SSC – *side scatter*), delimitou-se por um *gate* a população que possuía estes parâmetros característicos dos monócitos, ou macrófagos e dentre as células aí presentes, analisou-se a população CD14⁺ para a expressão das moléculas de interesse. No caso da fenotipagem de iDCs e mDCs, consideraram-se as células que, dentro do *gate* de tamanho e granulosidade característicos, eram HLA-DR⁺. O marcador de linhagem CD14 nesses casos funciona como controle de diferenciação e maturação celular.

3.6 Separação de linfócitos B

Foram utilizados três diferentes métodos de separação de LB. O primeiro método foi o de depleção de linfócitos T por formação de rosetas com eritrócitos de carneiro modificados e separados por gradiente de Ficoll-Paque. Para eliminação de células citotóxicas (células NK e linfócitos T CD8⁺), antes de serem incubadas com as hemácias de carneiro modificadas, as células foram incubadas por 45 minutos com leucina metil éster (LME) (THIELE e LIPSKY, 1992). O segundo método foi realizado utilizando-se seleção positiva em coluna imunomagnética com *MACS MultiSort MicroBeads* (Miltenyi Biotec). Foram então, selecionadas as células CD19⁺. No terceiro método, células mononucleares não aderentes foram utilizadas para isolamento de LB através de separação por seleção negativa em coluna imunomagnética com *MACS MultiSort MicroBeads* (Miltenyi Biotec). As células CD2⁺, CD14⁺, CD16⁺, CD36⁺, CD43⁺ ou CD235a⁺ (glicoforina A) foram isoladas por marcação com anticorpos específicos conjugados com esferas magnéticas. As células selecionadas pelas esferas foram descartadas, restando somente células CD19⁺. Uma alíquota das células separadas por cada método foi fenotipada por citometria de fluxo para a verificação de pureza da população (uso dos marcadores: CD56, CD14, CD3, CD4, CD8, CD19, HLA-DR, CD40 E CD80) e outra alíquota foi colocada em co-cultura com LT.

3.7 Método para análise dos linfócitos B

Para análise de LB, em gráfico de tamanho (FSC – *forward scatter*) por granulosidade (SSC – *side scatter*), delimitou-se por um *gate* a população que possuía estes parâmetros característicos dos linfócitos. Para identificação da população de LB, foram utilizados anticorpos anti-CD19 (PE-Cy5) e anti-HLA-DR (APC).

3.8 Separação de linfócitos T

Linfócitos T foram separados das amostras de PBMC por formação de rosetas com eritrócitos de carneiro (SAXON et al., 1976). Hemácias de carneiro foram colocadas em um tubo plástico estéril de 50 mL e centrifugadas a 887 g durante 10 minutos a 20 °C, e a seguir lavadas duas vezes, com mesma centrifugação, em tampão PBS. Estas hemácias foram tratadas com AET (2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide; Sigma) para mudar a carga elétrica da superfície das mesmas, possibilitando uma maior interação eletrostática com LT e a formação de rosetas estáveis. Para tanto, foram diluídos 0,5 g de AET em 12,5 mL de água bidestilada e deionizada, com ajuste final do pH para 9,0 utilizando-se NaOH 1,0 N. Após passagem em filtro de 0,22 µm (Millipore), 8 mL de solução de AET foram acrescentados a cada 2 mL de papa de hemácias de carneiro e mantidos durante 20 a 40 minutos a 37 °C.

A seguir, as hemácias foram lavadas com tampão PBS, pH 7,2 (centrifugação a 652 g por 10 minutos), até obtenção de sobrenadante claro, e ressuspensas em R-10 para uma suspensão a 4%.

Uma suspensão de linfócitos em concentração máxima de 1×10^7 células/mL foi preparada, misturada com soro fetal bovino e hemácias de carneiro pré-tratadas com AET (preparação AET-SRBC) como descrito anteriormente, numa proporção de 2:1:2 (suspensão celular: SFB: hemácias modificadas), centrifugada a 129 g por 5 minutos a 4 °C e incubada em gelo por 1 hora. Após a incubação, as células serão novamente ressuspensas e o número de rosetas contado. A suspensão foi submetida à centrifugação sobre Ficoll-Paque (887 g, 4 °C, 35 minutos).

Após a centrifugação, os LT encontraram-se no botão celular, no fundo do tubo, formando rosetas com as hemácias de carneiro modificadas. Os LT foram recuperados com tampão de lise de hemácias (tampão tris [170mM] – cloreto de amônio [160mM]) e lavados em meio de cultura (R-10), com centrifugação a 290 g, durante 10 minutos a 20 °C. Os linfócitos T foram ressuspensos em meio R-10, quantificados em câmara de Neubauer, e sua concentração ajustada.

3.9 Ensaio de proliferação alogênico

Para medir a eficiência da estimulação de LT pelas diferentes APCs foram realizados ensaios de linfoproliferação. Para que a análise pudesse ser feita pelo citômetro de fluxo, os LT foram incubados em tampão PBS-BSA 0,1%, contendo 5 µM de CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) (LYONS, 2000). A incubação foi feita a 37 °C, no escuro, por 10 minutos. Após este período, foram adicionados 5 mL de meio RPMI gelado, incubando as células no gelo, por mais 5 minutos. As células, então, foram lavadas 2 vezes em meio R-10. Estes linfócitos corados com CFSE foram estimulados pelos diferentes tipos de APCs nas proporções 1:5, 1:10, ou 1:30 (APC:LT). Posteriormente, as APCs usadas constituíram-se em misturas de mDCs com monócitos, macrófagos, iDCs ou LB. Nestes ensaios a quantidade de linfócitos T foi fixada em 10^5 células e de APCs em 10^4 . Entre as APCs, a relação entre mDCs:outras APCs foi de 5:1, 10:1, ou 30:1.

Após o período de cultura, as células foram retiradas, colocadas em tubos plásticos de 1,5 mL e centrifugadas a 7949 g a 4 °C por 10 segundos. O sobrenadante foi armazenado para dosagem de citocinas e as células foram submetidas à marcação com anticorpos monoclonais comerciais para CD4 e CD8 para posterior análise por citometria de fluxo (FACSCalibur BD, BD Biosciences).

3.10 Índices de proliferação de linfócitos T

Para representar os resultados de proliferação, foram calculados índices de proliferação (IP), em relação aos linfócitos sem estímulo (IP Absoluto) ou em relação à proliferação induzida por estímulo com mDC (IP Relativo). O IP Absoluto indica a

razão entre MFI de linfócitos T, corados com CFSE, sem estímulo de proliferação e MFI de linfócitos T, corados com CFSE, colocados com células estimuladoras (MFI linfócitos T sem estímulo/ MFI grupos experimentais); o IP Relativo indica a razão entre o IP Absoluto de cada grupo e o IP Absoluto do grupo (mDC + LT 1:10).

3.11 Marcação para FOXP3

Para a marcação de FOXP3, células mantidas em co-cultura por 5 dias foram retiradas e foi realizada, primeiramente, a marcação das moléculas de superfície CD4 (FITC) e CD25 (APC), como descrito no item 3.3. Em seguida, a marcação de FOXP3 (PE) foi realizada através da utilização de *kit PE Anti-Human Foxp3 Staining Set* (eBioscience – cod. 72-5774-40), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, células que permaneceram durante 5 dias em co-cultura foram retiradas, contadas, e dispensadas em tubos de 1,5 mL (cerca de 1×10^5 células por tubo). Após centrifugação dos tubos a 290 g por 5 minutos, as células foram ressuspensas em 500 μ L/tubo de solução *Perm Fix* diluída 1:4 e incubadas por 45 minutos a 4 °C no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão de permeabilização 1X a 290 g por 5 minutos. O anticorpo anti-FOXP3 foi então adicionado, seguido de nova incubação por 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas por mais duas vezes, ressuspensas em tampão para citometria, lidas imediatamente no citômetro de fluxo (FACSCanto II) com o *software* FACSDiva (BD Biosciences) e analisadas posteriormente com o *software* FlowJo 7.2.5 (Tree Stars Inc.). Como controle negativo foi utilizada marcação com anticorpo monoclonal IgG1k de especificidade não relacionada às células.

3.12 Método para análise de células marcadas para FOXP3

Para análise de LT marcados com anticorpo anti-FOXP3, em gráfico de tamanho (FSC – *forward scatter*) por granulosidade (SSC – *side scatter*), delimitou-se por um *gate* a população que possuía estes parâmetros característicos dos linfócitos. Dentro deste, foi delimitado um *gate* na população de células CD4⁺ e então foi verificada a presença de células CD25⁺FOXP3⁺.

3.13 Marcação para citocinas intracelulares (IL-4 e IFN- γ)

Para a marcação de citocinas intracelulares, células mantidas em co-cultura durante 5 dias foram retiradas e centrifugadas a 300 g por 10 minutos a 4 °C. O botão celular foi ressuspenso em 250 μ L de meio de cultura a cada 2×10^5 células. Em seguida as células foram estimuladas durante 4 horas em geladeira (4 °C – 8 °C) com ionomicina (10 μ M) e PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) (10 ng/mL) adicionando-se também 0,25 μ L de *Golgi Stop*[™] (BD – cod. 554724). Após esse período, as células foram centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 300 g. O sobrenadante foi descartado e então foi seguido o protocolo para a marcação das moléculas CD4 (FITC) e CD8 (PerCP), como descrito no item 3.3. Após a marcação extracelular, as células foram ressuspendidas em 500 μ L/tubo de solução Perm Fix diluída 1:4 e incubadas por 45 minutos a 4 °C no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão de permeabilização 1X a 290 g por 5 minutos. Os anticorpos anti-IL-4 (PE) e anti-IFN- γ (APC) foram então adicionados, seguindo-se nova incubação por 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas por mais duas vezes, ressuspendidas em tampão para citometria, lidas imediatamente no citômetro de fluxo (FACSCanto II) com o *software* FACSDiva (BD Biosciences) e analisadas posteriormente com o *software* FlowJo 7.2.5 (Tree Stars Inc.). Como controle negativo foi utilizada marcação com anticorpo monoclonal IgG1k de especificidade não relacionada às células.

3.14 Detecção da produção de citocinas por BIOPLEX

Sobrenadantes das co-culturas de um dos experimentos foram submetidos ao ensaio de detecção da produção das citocinas: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, TNF- α , IFN- γ , pela técnica de BIOPLEX. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante (Multiplex, Millipore).

3.15 Detecção da produção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para detecção das citocinas (IL-4, IL-10, IFN- γ) nos sobrenadantes das culturas foram utilizados os *kits* BD OptEIA[™] para citocinas (BD, BD Biosciences).

Neste método, placas de 96 poços Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com 50 μL /poço do anticorpo (Ac) de captura para cada citocina, diluído em tampão NaCO_3 (pH 9,5) e mantidas a 4 °C *overnight*. Após 3 lavagens com 200 μL / poço de tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20, pH 7,2), as placas foram bloqueadas com 200 μL /poço de tampão de bloqueio (PBS com 10% de soro fetal bovino) por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, após 3 lavagens, as amostras e a curva-padrão foram incubadas por um período de 2h em temperatura ambiente. Para a curva-padrão, as citocinas recombinantes foram incubadas em duplicatas de 45 μL por poço das diluições seriadas, conforme recomendações do fabricante. Após 5 lavagens, foram adicionados 50 μL /poço de Ac de detecção diluído em tampão de bloqueio, juntamente com estreptoavidina, seguindo-se uma nova incubação por 1h, à temperatura ambiente, no escuro.

Após esse período a placa foi lavada 7 vezes e adicionaram-se 50 μL / poço de substrato (H_2O_2) e tetrametilbenzidina (cromógeno) (BD Biosciences) foram adicionados, com incubação de 30 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 50 μL / poço de H_2SO_4 (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. O cálculo das concentrações foi feito com auxílio do *software* Softmax Pro, através da equação de regressão linear com base na curva padrão e a análise de dados foi executada com auxílio do *software* Prisma.

3.16 Índices de produção de citocinas

Índices de produção de citocinas foram calculados para que os resultados de diferentes repetições dos experimentos fossem melhor comparados: Índice Absoluto (IA) representa o valor detectado no sobrenadante das diferentes co-culturas, dividido pela somatória dos valores detectados nos sobrenadantes das células isoladas e Índice-mDC representa a razão entre o IA das diferentes misturas de APCs e o IA das co-culturas de LT apenas com mDCs.

3.17 Análise estatística

Os dados obtidos quanto à fenotipagem de monócitos, macrófagos, iDCs, mDCs e LB foram, inicialmente, analisados quanto à homogeneidade da variância, utilizando-se o Teste de Bartlett. Após este teste, as amostras foram avaliadas pelo teste de análise da variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, neste caso os gráficos apresentam as médias dos grupos. No caso de uma distribuição não-Gaussiana, foi utilizado para análise o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (gráficos apresentando a mediana dos grupos), considerando-se o nível de significância $\alpha = 0,05$. Apenas gráficos com diferenças significativas apresentam os resultados da análise estatística.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica de monócitos, macrófagos, DCs imaturas e maduras

As células dendríticas e macrófagos foram originados a partir de monócitos de sangue periférico de doadores saudáveis, tratados com GM-CSF e IL-4 ou apenas GM-CSF, respectivamente, por sete dias para diferenciação. Para gerar mDCs, no quinto dia da cultura adicionou-se TNF- α para a ativação das células. Células das culturas que não receberam TNF- α no quinto dia, foram utilizadas para a obtenção iDCs, que foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo. Os monócitos foram obtidos, como células aderentes, após descongelamento e plaqueamento de PBMC *overnight*, e foram também submetidos à avaliação das mesmas moléculas. O aspecto morfológico representativo das células de uma cultura realizada em meio R-10 está representado nas fotos da Figura 1. É possível notar que as células da cultura denominada de macrófagos, apresentaram-se bem aderidas à placa (Figura 1B), da mesma forma que as iDCs, no entanto pode-se notar que a adição de IL-4 à cultura, modifica a morfologia da célula, apresentando prolongamentos característicos (Figura 1C). Já DCs que receberam TNF- α como estímulo de ativação no quinto dia, as mDCs, perderam adesão à placa, conferindo às células morfologia mais circular ao microscópio de luz (Figura 1D), embora na observação detalhada se possam perceber os prolongamentos celulares (“dendritos”).

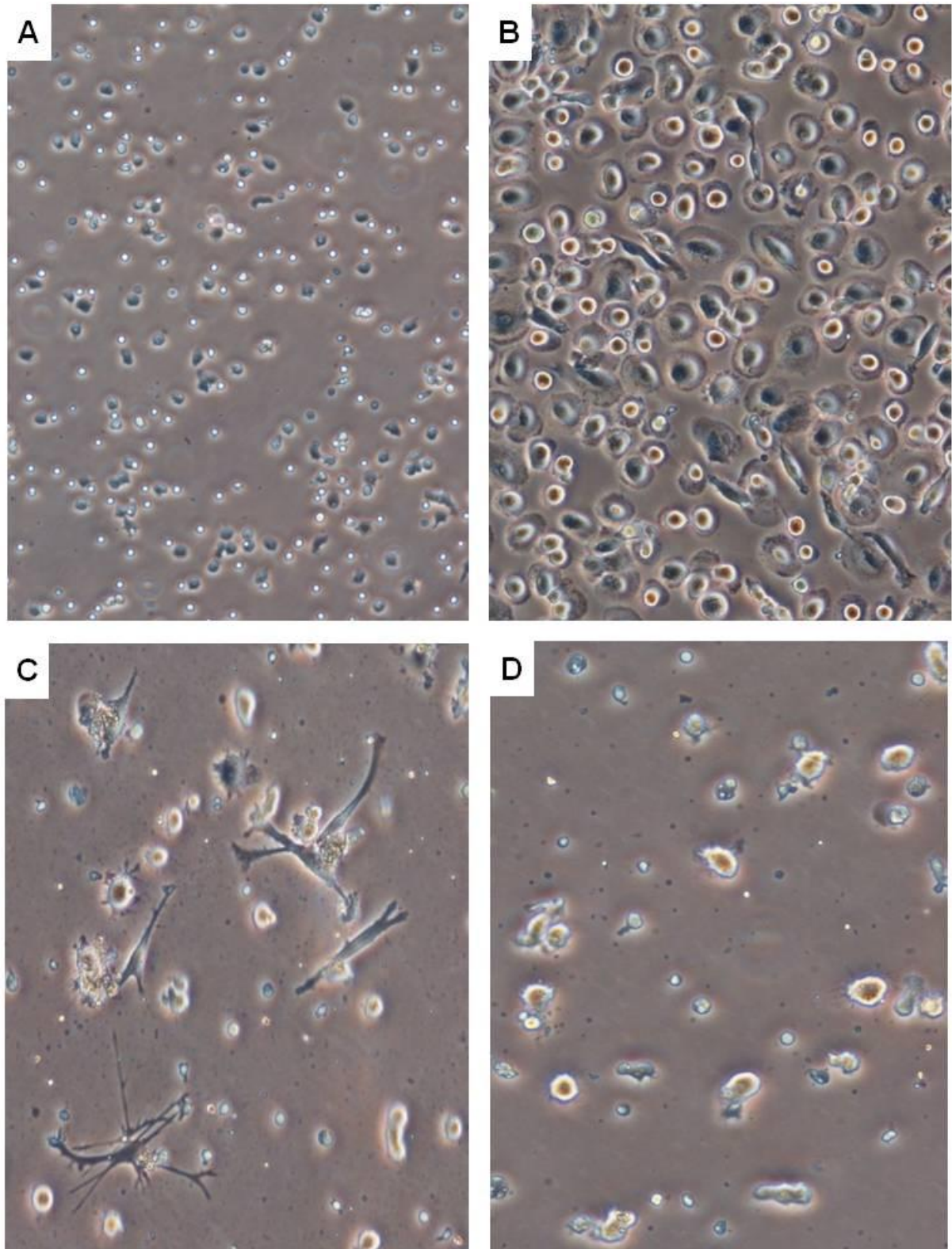


Figura 1 – Fotomicrografias de culturas para diferenciação de monócitos em diferentes APCs. Monócitos (A), foram cultivados em diferentes condições, de maneira a induzir sua diferenciação em macrófagos (B), iDCs (C) e mDCs (D). Culturas realizadas em meio de cultura R-10 e fotomicrografias em contraste de fase com objetiva 20x e ocular 10x.

As células também foram analisadas quanto à expressão de moléculas de superfície CD14, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD123, CD1a, CD40, CD83, CD68 e CD206 (como descrito no item 3.3). O método de análise (item 3.5) está representado nos gráficos pseudo-coloridos (Figura 2), no qual foram feitos *gates* específicos, dentro dos quais foram analisadas a presença das moléculas de superfície citadas acima.

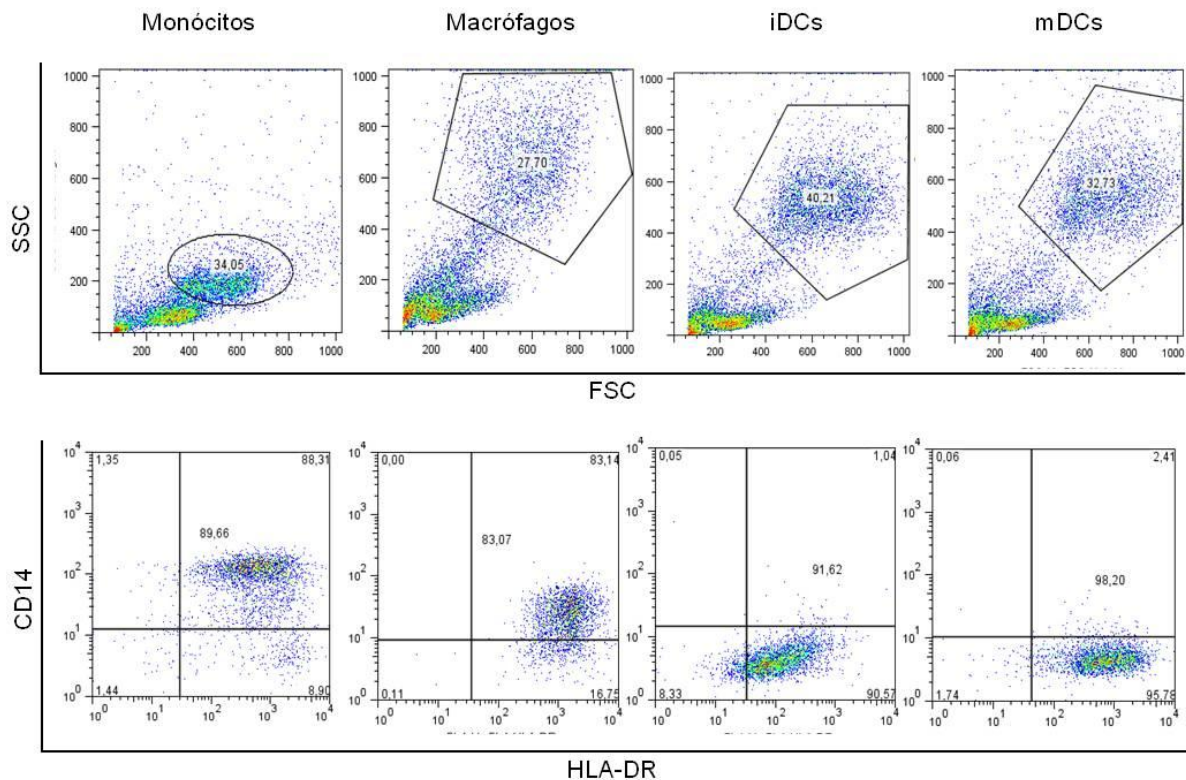


Figura 2 – Método de análise de monócitos, macrófagos, iDCs e mDCs. Monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas (iDCs) e maduras (mDCs) foram retirados da cultura para diferenciação destas APCs e caracterizados fenotipicamente por citometria de fluxo. Topo: Gráficos pseudo-coloridos de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC), em que se delimitou um *gate* para seleção da população com tamanho e granulosidade característicos das células em análise. Base: Gráficos pseudo-coloridos de CD14 por HLA-DR dentro dos *gates* de tamanho e granulosidade característicos das células em análise, em que se delimitou, no caso de monócitos e macrófagos, *gate* para as células CD14⁺ e, no caso de iDCs e mDCs, *gate* para as células HLA-DR⁺, nos quais as análises fenotípicas foram realizadas.

Ainda é possível observar na Figura 3 que a diferenciação das diferentes APCs, a partir de monócitos, foi realizada com sucesso, notando-se o perfil característico destas células para os marcadores CD14 e CD80. No entanto, ao se observar a

população, chamada de “macrófagos”, nota-se que esta não mostrou fenótipo característico, uma vez que a população apresenta baixa expressão de CD14.

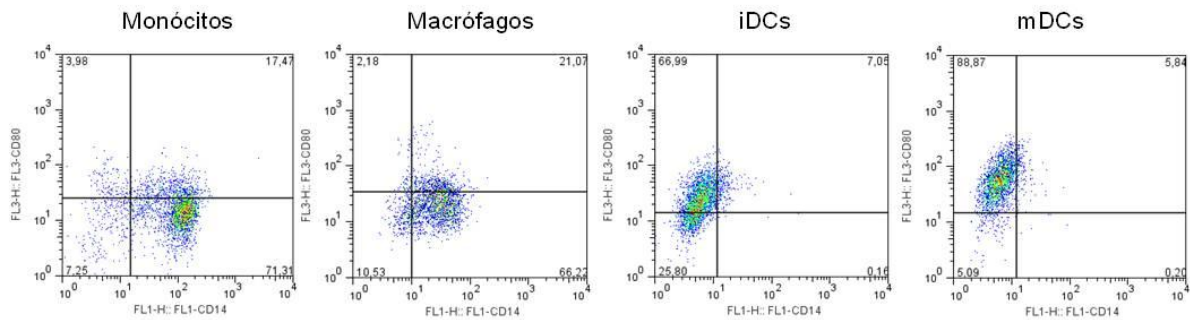


Figura 3 – Caracterização das diferentes APCs. Monócitos, “macrófagos”, células dendríticas imaturas (iDCs) e maduras (mDCs) foram retirados da cultura para diferenciação destas APCs para caracterização fenotípica por citometria de fluxo. Gráficos pseudo-coloridos de CD14 por CD80 dentro dos *gates* de tamanho (FSC) e granulose (SSC) característicos das células em análise.

As moléculas de superfície foram marcadas com anticorpos monoclonais e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células positivas para as diferentes moléculas e intensidade mediana de fluorescência (MFI) para os diferentes ensaios estão agrupados nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Na Figura 6, está representado o índice de expressão (porcentagem de células positivas x MFI) dessas moléculas, tornando-se mais nítido o fenômeno ocorrido com cada uma dessas moléculas nos diferentes tipos celulares. A frequência de células expressando CD11c, característica de células dendríticas de origem mielóide, e HLA-DR (MHC-II), permaneceram elevadas durante todos os estágios de diferenciação e maturação (Figura 4), enquanto a expressão da molécula CD14, marcadora de monócitos e macrófagos foi significativamente reduzida ($p < 0,0001$) (Figura 4). Nota-se aumento significativo ($p < 0,0001$) do índice de expressão da molécula co-estimuladora CD80 de acordo com o estado de maturação da célula (Figura 6). A molécula CD86, por se tratar de uma molécula co-estimuladora constitutiva, mostrou-se expressa em elevada porcentagem de células desde a fase inicial (monócitos), porém é possível notar que sua distribuição não é homogênea (Figura 4). As moléculas indicadoras de ativação de DCs, CD40 e CD83, apresentaram comportamento diferenciado. Enquanto, a molécula CD83 apresentou aumento significativo do índice de expressão ($p < 0,01$) no decorrer da maturação da célula (Figura 6), a molécula CD40 pareceu não variar durante as fases de

maturação, inclusive com os índices de expressão mostrando-se diminuídos nas iDCs e mDCs quando comparados ao dos monócitos (Figura 6). Houve aumento significativo tanto do índice de expressão ($p < 0,001$) (Figura 6), quanto da porcentagem de células ($p < 0,001$) expressando CD1a (Figura 4), molécula apresentadora de lipídeos e glicolipídeos, consistente com o fato das células serem cultivadas em meio R-10.

Como se pode confirmar nas figuras 4, 5 e 6, o protocolo de diferenciação de monócitos em macrófagos (cultura na presença de GM-CSF por 7 dias) nem sempre induziu o aparecimento de células com fenótipo típico destes últimos, uma vez que, ao final da cultura, em média, apenas 60% das células apresentaram positividade para CD14 e 26%, para CD68, um receptor *scavenger* característico de macrófagos (Figura 4). Por outro lado, a molécula CD206, um receptor de manose, envolvida no *clearance* de glicoproteínas endógenas (LEE et al., 2002), também característica de macrófagos, apresentou-se altamente expressa tanto nos macrófagos quanto nas iDCs e mDCs.

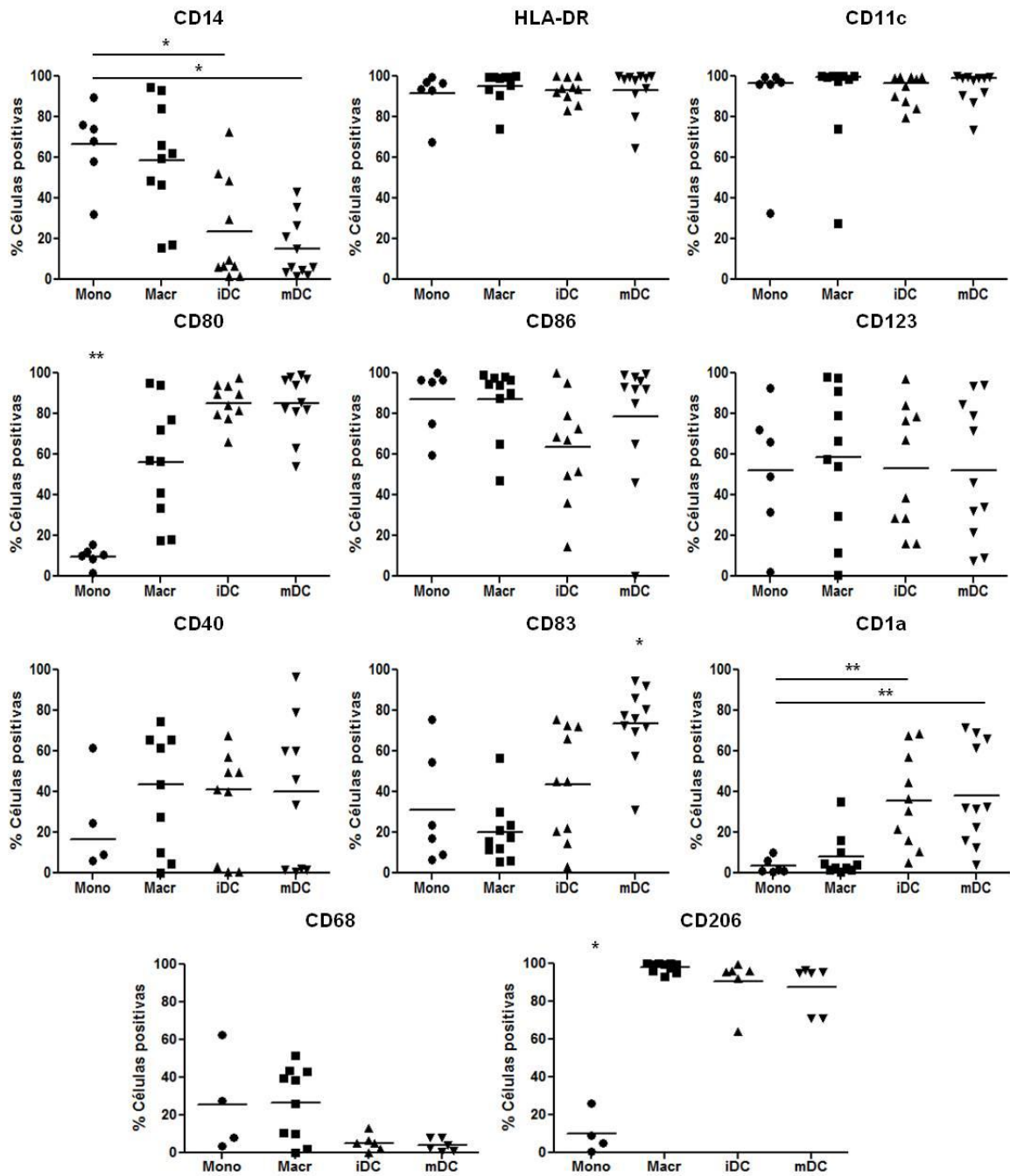


Figura 4 – Caracterização das diferentes APCs (porcentagem de células positivas). Gráficos de dispersão mostrando as médias/ medianas da porcentagem de células positivas para os dos marcadores de superfície CD14, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD123, CD40, CD83, CD1a, CD68 e CD206 em monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas e maduras. Para análise das moléculas CD11c e CD40 foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Para as outras moléculas foi utilizado ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. * $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$ ($n = 11$).

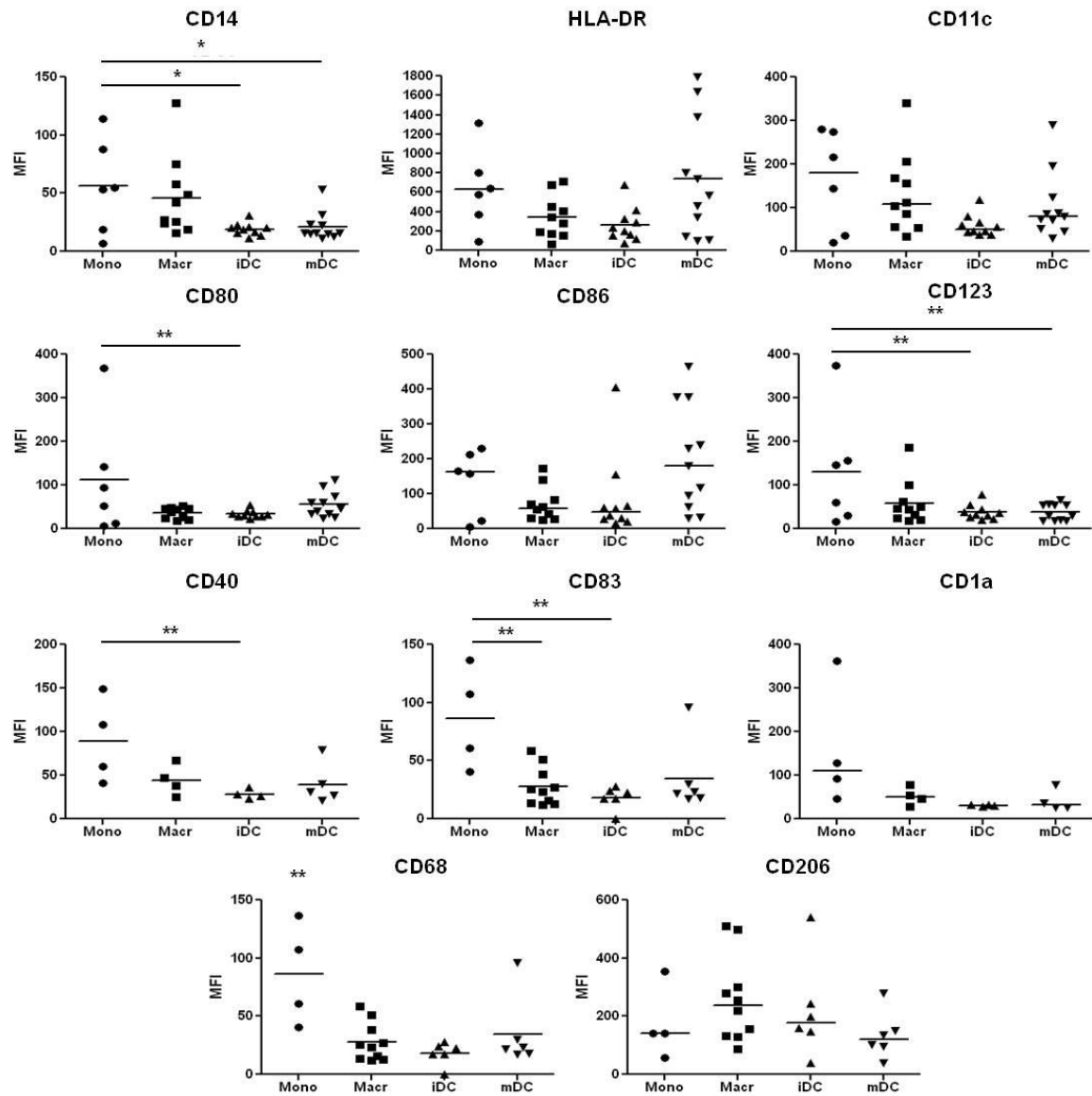


Figura 5 – Caracterização das diferentes APCs (MFI). Gráficos de dispersão mostrando as médias/medianas da intensidade mediana de fluorescência (MFI) para os dos marcadores de superfície CD14, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD123, CD40, CD83, CD1a, CD68 e CD206 em monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas e maduras. Para análise das moléculas CD11c, CD86, CD1a e CD206 foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, para as outras moléculas foi utilizado ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$ ($n = 11$).

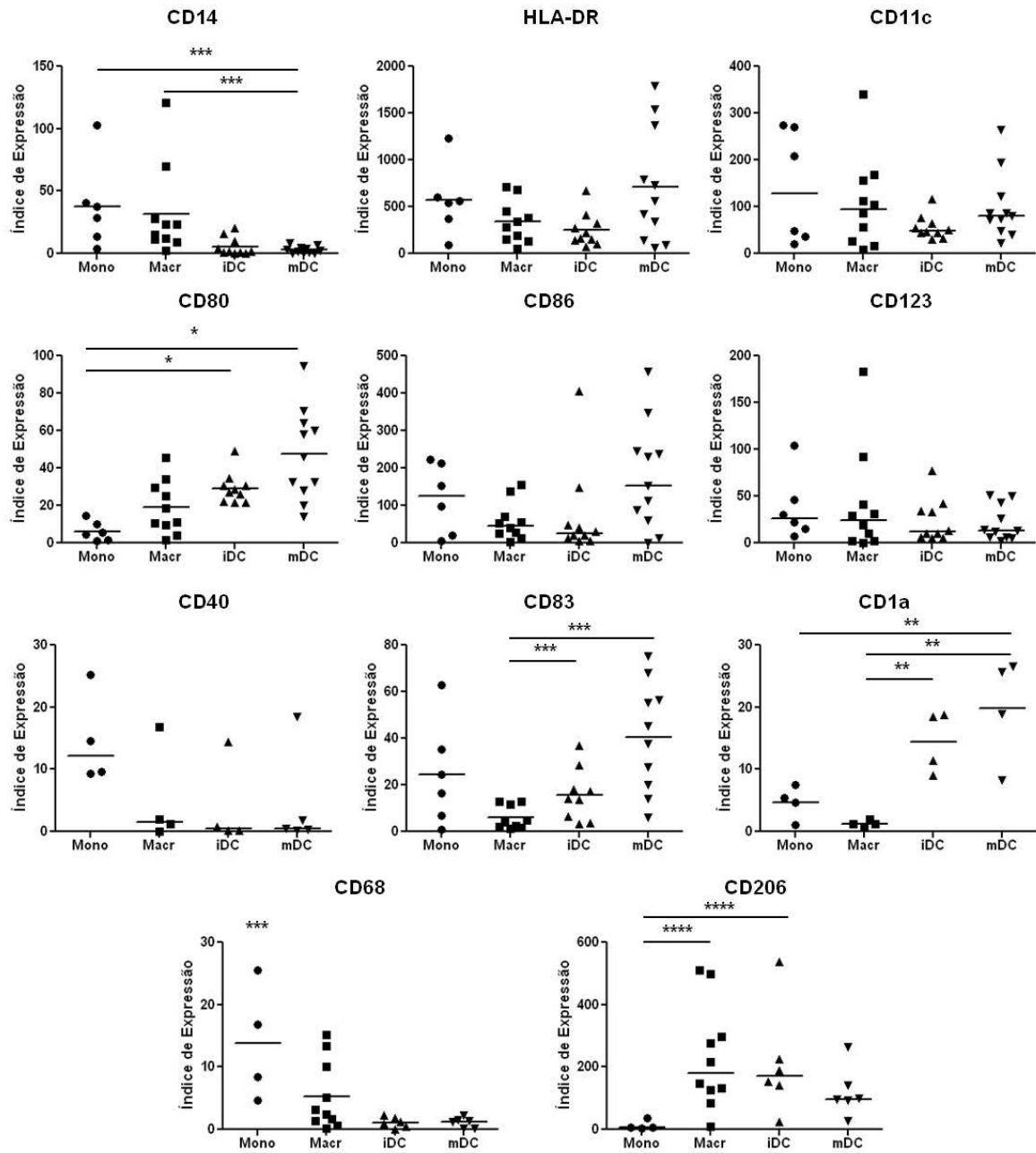


Figura 6 – Caracterização das diferentes APCs (índice de expressão). Gráficos de dispersão mostrando as médias/ medianas do índice de expressão (% células positivas x MFI) para os dos marcadores de superfície CD14, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD123, CD40, CD83, CD1a, CD68 e CD206 em monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas e maduras. Para análise das moléculas CD11c, CD86, CD40, CD123 e CD206 foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, para as outras moléculas foi utilizado ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. * $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,05$ (n=11).

4.2 Separação de monócitos do sangue periférico por microesferas magnéticas marcadas com anticorpo anti-CD14

Uma vez que a população de macrófagos não apresentou o fenótipo esperado (alta expressão de CD14, CD68 e CD206), foi realizada a separação de monócitos, a partir de PBMCs, utilizando-se a técnica de separação por microesferas magnéticas conjugadas a anticorpos anti-CD14, para eliminar uma possível interferência de outras células na diferenciação de macrófagos. Pode-se notar, na Figura 7, que, de fato, a separação foi eficiente, com quase 90% da população expressando a molécula CD14. No entanto, o enriquecimento desta população não interferiu no fenótipo obtido (Figura 8), já que não houve alteração em nenhum dos marcadores. Desta forma, a população celular até então identificada como sendo de “macrófagos”, passou a ser denominada de “monócitos+GM-CSF” e abreviada como “Macr”.

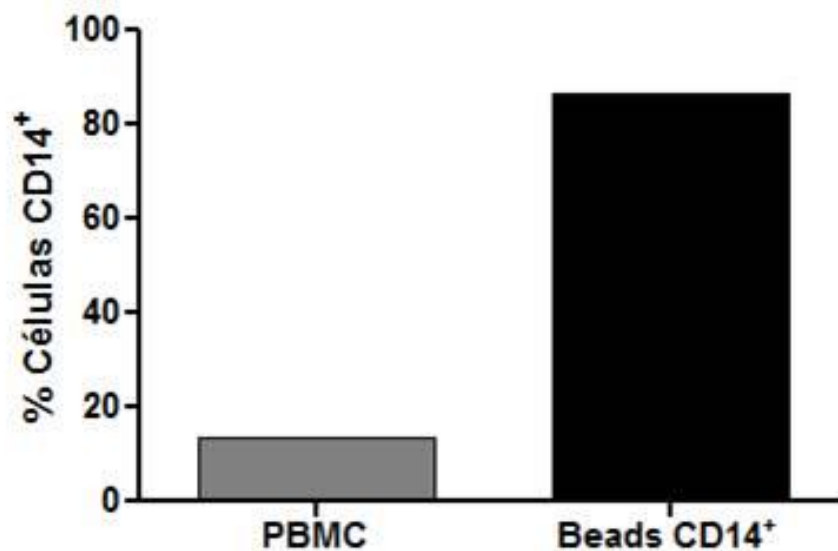


Figura 7 – Separação de monócitos por microesferas marcadas com anticorpo anti-CD14. Gráficos de barras representando a comparação da pureza da população de monócitos separada apenas por adesão à placa plástica (esquerda) e separada por microesferas magnéticas marcadas com anticorpo anti-CD14 (n=1).

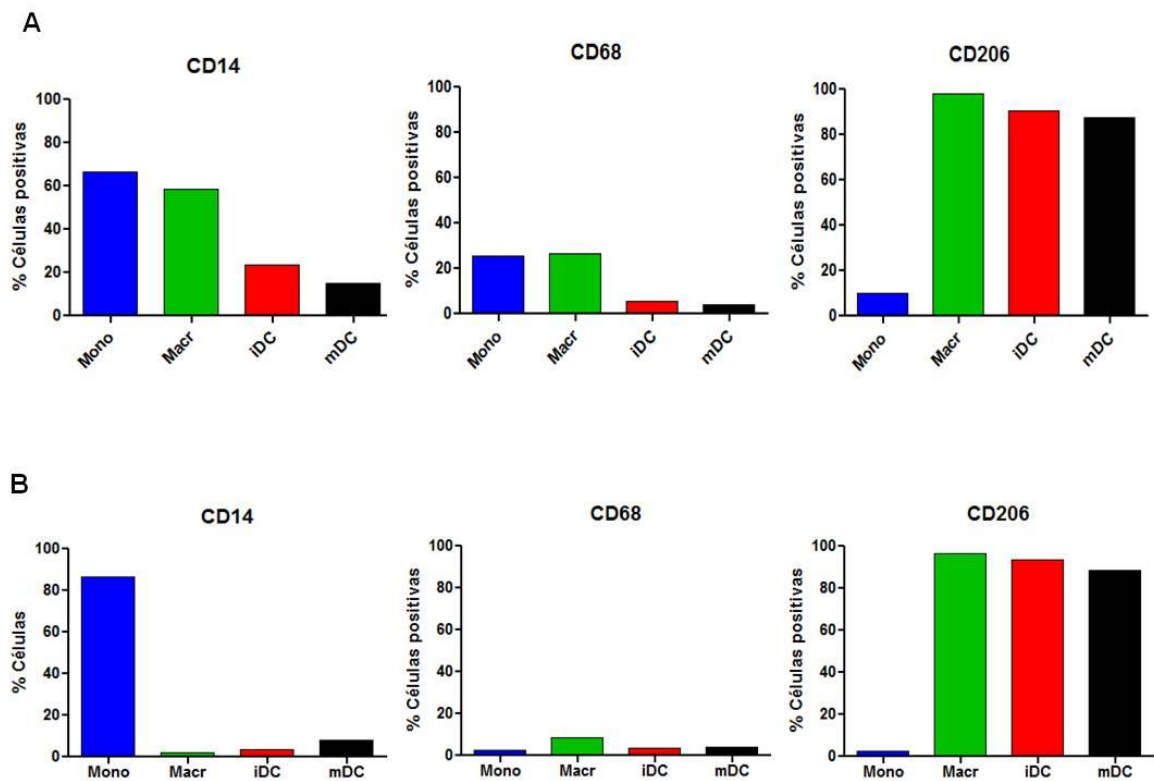


Figura 8 – Caracterização de células diferenciadas a partir de monócitos por incubação com GM-CSF. Expressão de marcadores por células diferenciadas a partir de: A: monócitos separados apenas por adesão à placa plástica; B: monócitos separados por microesferas magnéticas marcadas com anticorpo anti-CD14 (n=1).

4.3 Separação e caracterização de Linfócitos B

Após o plaqueamento de PBMCs, foram obtidas as células aderentes (monócitos) e as células não aderentes. Estas foram congeladas e armazenadas para posterior separação de linfócitos T e/ou B. A separação de LB foi feita por três diferentes técnicas: separação por formação de rosetas com eritrócitos de carneiro modificadas, seleção positivas por *esferas* magnéticas conjugadas com anticorpo anti-CD19 e seleção negativa por *esferas* conjugadas com anticorpos anti-CD2, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD36, anti-CD43 e anti-CD235a. As células separadas foram fenotipadas quanto aos marcadores de superfície CD56, CD14, CD3, CD4, CD8, CD19, HLA-DR, CD40 e CD80. Na Figura 9, pode-se observar o método utilizado para a análise da população de linfócitos B (item 3.7). Representado em gráfico de dispersão, pode-se observar que a separação realizada, a partir de células não aderentes (CNA) descongeladas, por seleção negativa por esferas magnéticas

aumentou significativamente o enriquecimento da população CD19⁺ ($p < 0,0001$) HLA-DR⁺ ($p < 0,01$), quando comparada às técnicas de separação pela formação de rosetas formadas por hemáceas de carneiro modificadas e de separação por seleção positiva por esferas magnéticas conjugadas ao anticorpo anti-CD19 (Figura 10).

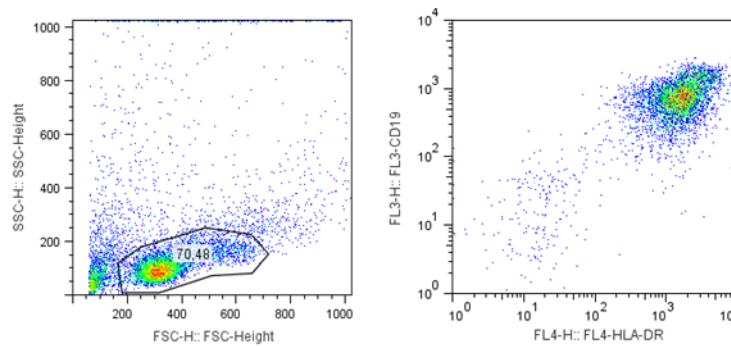


Figura 9 – Método de análise de linfócitos B. Esquerda: Gráfico pseudo-colorido de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC), em que se delimitou um *gate* para seleção da população com tamanho e granulosidade característicos dos linfócitos, no qual as análises fenotípicas foram realizadas. Direita: Gráfico pseudo-colorido de CD19 por HLA-DR dentro do *gate* de tamanho e granulosidade, mostrando a população característica de LB.

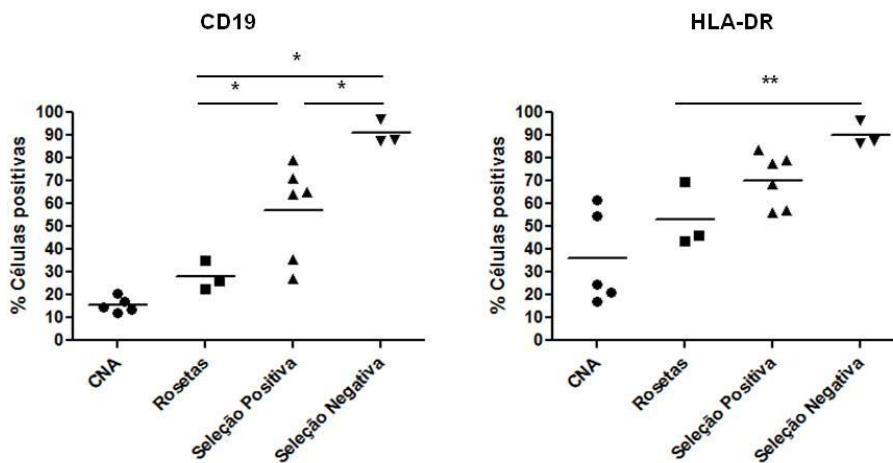


Figura 10 – Pureza da população de linfócitos B separados de células não-aderentes por diferentes métodos. Gráficos de dispersão comparando as médias das porcentagens de células positivas para as moléculas de superfície CD19 e HLA-DR em LB, submetidos à separação por formação de rosetas por hemáceas de carneiro modificadas, seleção positiva por esferas magnéticas conjugadas a anticorpo anti-CD19, ou seleção negativa por esferas magnéticas conjugadas aos anticorpos anti-CD2, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD36, anti-CD43 e anti-CD235a. Para análise foi utilizado ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. * $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$.

Pode-se observar também, que houve a diminuição de células de outras linhagens, como pode ser visto na Figura 11. Demonstrando que, de fato, a separação de LB realizada por seleção negativa por esferas magnéticas foi a mais eficaz, sendo, portanto, a adotada para o restante dos experimentos.

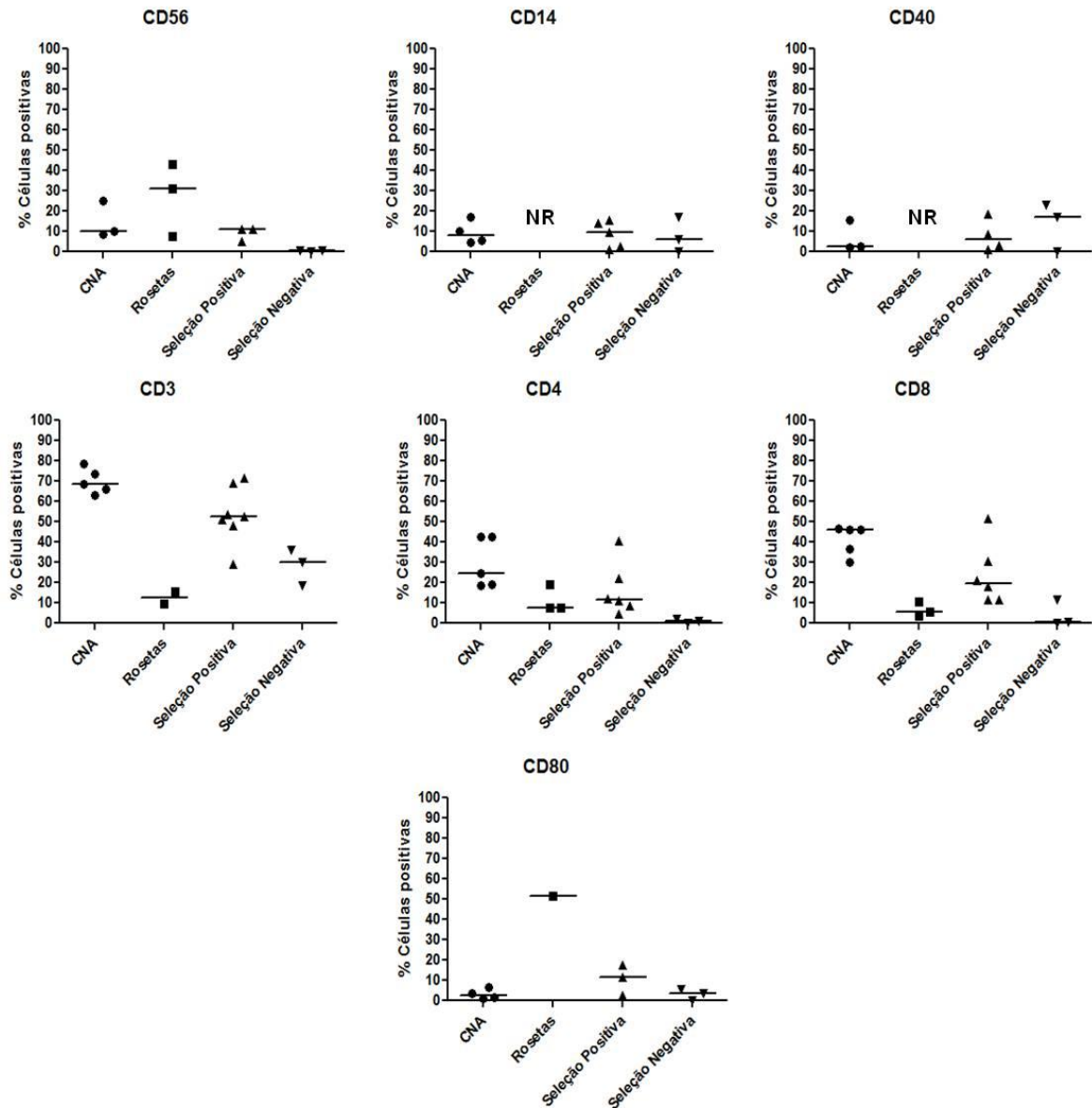


Figura 11 – Caracterização de linfócitos B separados por diferentes métodos. Gráficos de dispersão comparando as medianas das porcentagens de células positivas para as moléculas de superfície CD56, CD14, CD3, CD4, CD8, CD40, e CD80 em LB, submetidos à separação por formação de rosetas por hemáceas de carneiro modificadas, seleção positiva por esferas magnéticas conjugadas a anticorpo anti-CD19, ou seleção negativa por esferas magnéticas conjugadas aos anticorpos anti-CD2, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD36, anti-CD43 e anti-CD235a. NR – Não realizado.

4.4 Avaliação da atividade aloestimuladora das Células Dendríticas maduras, imaturas, Monócitos, Monócitos+GM-CSF e Linfócitos B

Para testar o protocolo de separação de LT e capacidade de linfoproliferação na mistura destes com as diferentes APCs alogênicas, co-culturas foram realizadas com monócitos, LB, monócitos+GM-CSF, iDCs, ou mDCs diferenciadas *in vitro* de acordo com protocolo já estabelecido em nosso laboratório. A população de linfócitos foi selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos (Figura 12A) e como controle positivo utilizou-se a estimulação pelo mitógeno fitohemaglutinina A (Pha) (Figura 12B).

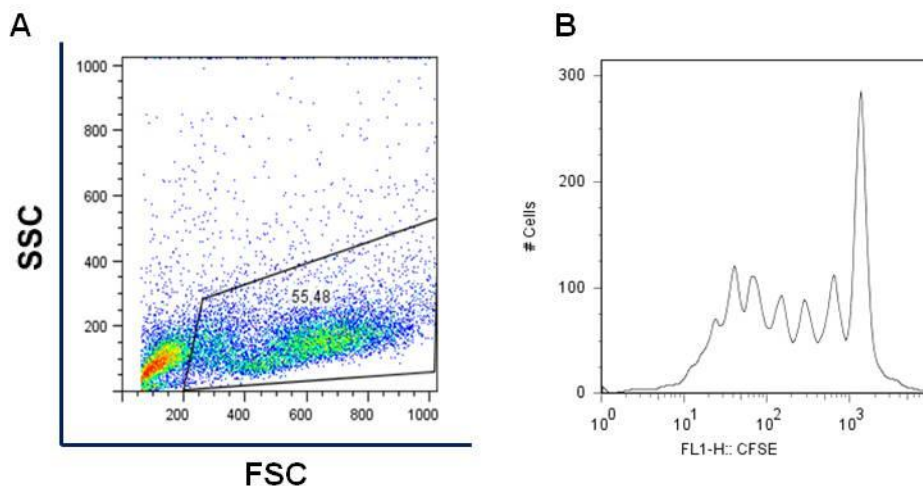


Figura 12 – Figuras representativas do efeito estimulador das diferentes APCs sobre linfócitos T alogênicos. A: Gráficos pseudo-coloridos de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC), em que se delimitou um *gate* para as células com tamanho e granulosidade característicos de linfócitos. B: Histograma representando a população de linfócitos T estimulados com fitohemaglutinina (Pha).

A proliferação, a qual é avaliada pela diluição do corante CFSE, foi analisada tanto para a população de linfócitos T CD4⁺ quanto de CD8⁺ (Figura 13), também por delimitação de um *gate* apenas nas células positivas para esses marcadores. A população total obteve o mesmo efeito da soma das populações CD4 e CD8. Desta forma, observou-se que tanto a proliferação de linfócitos T CD4⁺ quanto de CD8⁺ é maior quando linfócitos T alogênicos são estimulados por mDCs, seguido por iDCs, monócitos+GM-CSF e linfócitos B (Figura 13).

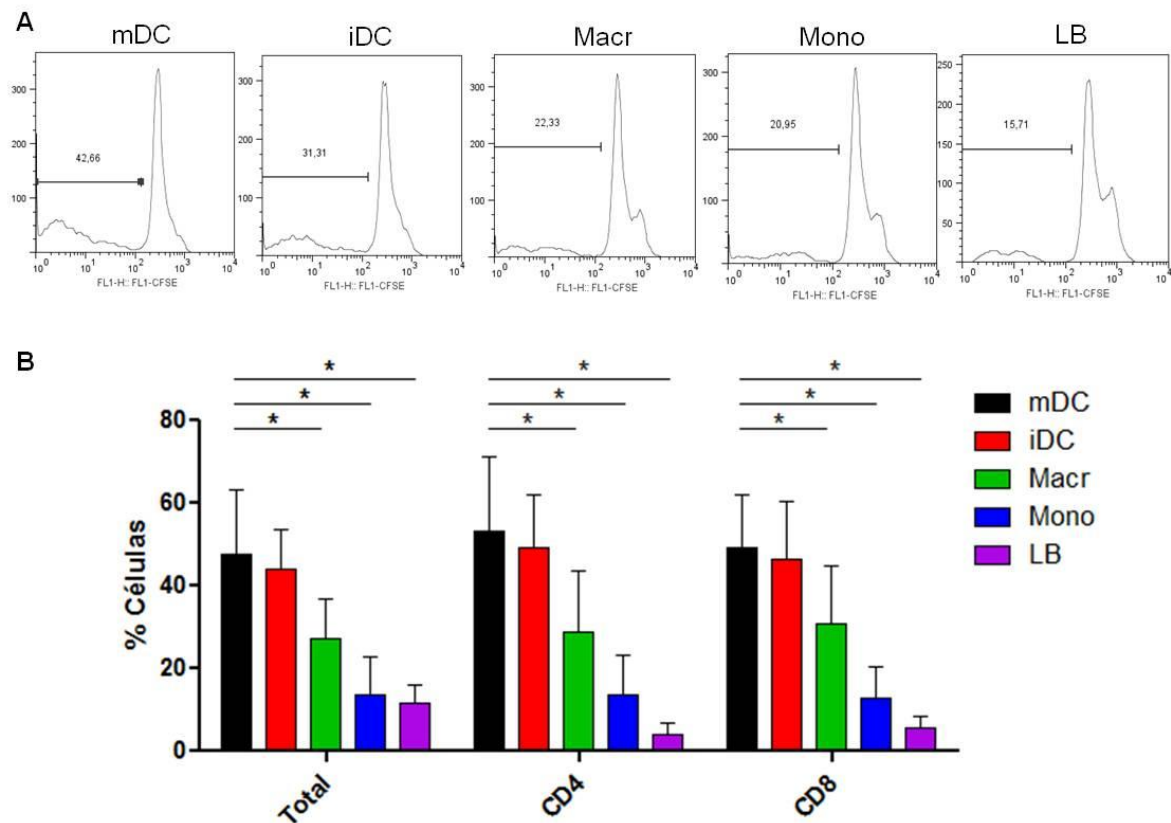


Figura 13 – Capacidade linfoestimuladora das diferentes APCs alogenêicas. Gráfico de barras indicativo da porcentagem de linfócitos que proliferaram, tanto total, quanto após delimitação de *gates* nas células T CD4⁺ e CD8⁺, induzida por diferentes APCs. Para análise da capacidade linfoestimuladora das diferentes APCs alogenêicas, foi utilizado ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. * $p < 0,0001$ (n=6).

Após esta constatação, passou-se para as misturas das mDCs com as outras APCs em diferentes proporções. Fixou-se a quantidade de linfócitos respondedores em 10^5 células e de APCs em 10^4 células por poço, variando-se a proporção de cada uma das APCs nas diferentes combinações. Assim, dentro das APCs variaram-se as proporções da seguinte forma: 5:1; 10:1; e 30:1 (mDCs:outra APC). Após experimentos-piloto, a proporção 10:1 foi a selecionada para a continuação dos experimentos.

Na Figura 14, um experimento típico mostra a variação observada nas respostas induzidas pelas diferentes APCs. Pode-se notar que LT estimulados apenas por mDCs alogenêicas na proporção 1:10, apresentaram uma proliferação de linfócitos T CD4⁺ 13 vezes maior que iDCs e 14 vezes maior que monócitos+GM-

CSF (Macr), monócitos (Mono) e LB. Fenômeno semelhante aconteceu quando se observou a proliferação de linfócitos T CD8⁺. Quando se acrescentaram outras APCs juntamente com mDCs houve uma leve diminuição da estimulação linfocitária, com exceção dos monócitos, os quais não influenciaram a estimulação de LT pelas mDCs (Figura 15). Com a adição de LB às co-culturas de mDCs houve diminuição da proliferação de linfócitos T CD8⁺, efeito não observado ao adicionar as outras APCs (Figura 16). Quando se analisam, no entanto, todas as repetições deste tipo de experimento, os efeitos não ficaram tão evidentes, como pode ser visto nas Figuras 16 e 17.

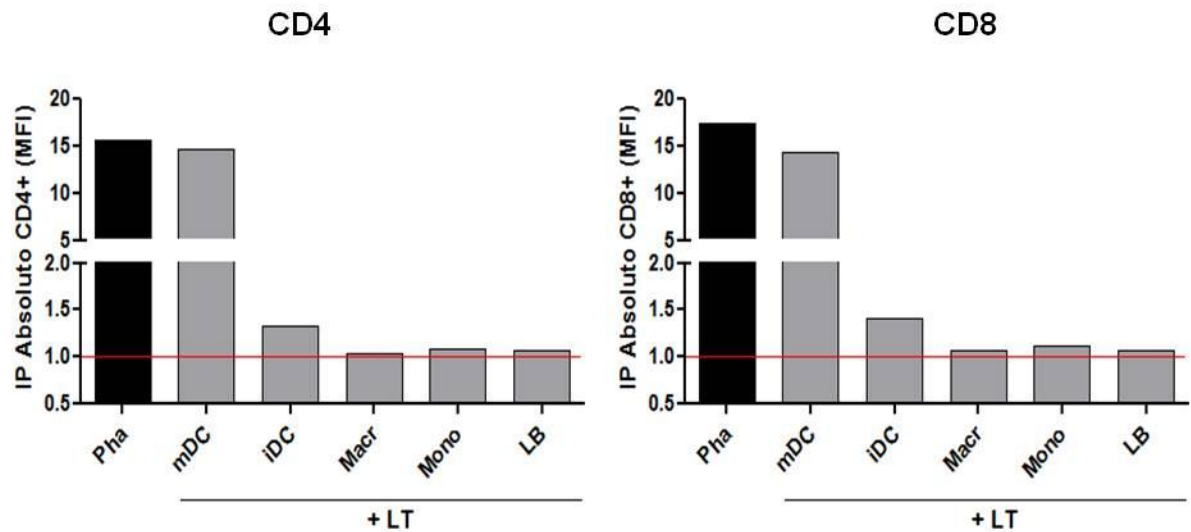


Figura 14 – Índice de proliferação de células T induzida pelas diferentes APCs isoladamente. Gráfico de barras indicativo do índice de proliferação (IP) absoluto da proliferação de linfócitos após a delimitação de *gates* nas células T CD4⁺ e CD8⁺, induzida por diferentes APCs, de um experimento representativo. IP Absoluto indica a razão entre MFI de linfócitos T, corados com CFSE, sem estímulo de proliferação e MFI de linfócitos T, corados com CFSE, colocados com células estimuladoras (MFI linfócitos T sem estímulo/ MFI grupos experimentais).

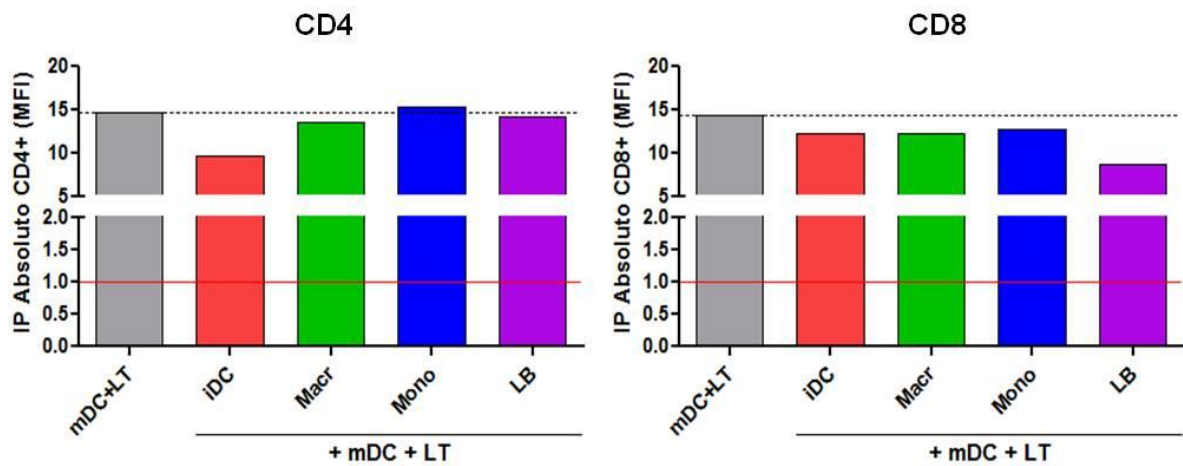


Figura 15 – Índice de proliferação de células T induzida pelas combinações de APCs. Gráfico de barras indicativo da proliferação de linfócitos após a delimitação de *gates* nas células T CD4⁺ e CD8⁺, induzida por diferentes combinações de mDC com outras APCs, na proporção 9:1, de um experimento representativo. IP Absoluto indica a razão entre MFI de linfócitos T, corados com CFSE, sem estímulo de proliferação e MFI de linfócitos T, corados com CFSE, colocados com células estimuladoras (MFI linfócitos T sem estímulo/ MFI grupos experimentais).

Por outro lado, ao analisar os resultados apresentados nas Figuras 16 e 17, pode-se notar que a proliferação de linfócitos T CD4⁺ foi mais dependente da presença de mDCs, o que não ocorreu com a proliferação de LT CD8⁺ que foram até mais estimulados quando as APCs foram as iDC. Nota-se também, que a indução de proliferação de LT CD4⁺ é diminuída quando iDCs são adicionadas à co-cultura de LT com mDCs (Figura 17). Pode-se notar também uma leve diminuição da proliferação de linfócitos T CD8⁺, quando são adicionados os monócitos às co-culturas onde as APCs são as mDCs (Figura 17).

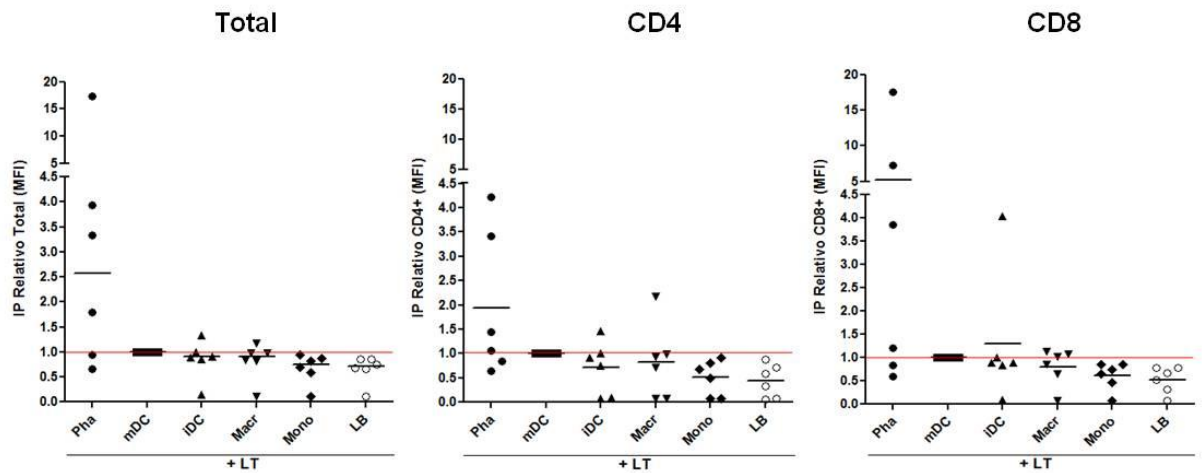


Figura 16 – Índice relativo da proliferação de linfócitos T estimulados por diferentes APCs isoladamente. Gráficos de dispersão indicativo da média/ mediana do índice de proliferação (IP) relativo da proliferação de linfócitos total e após delimitação de *gates* nas células T CD4⁺ e CD8⁺, induzida por diferentes APCs. IP Relativo indica a razão entre IP Absoluto grupo experimental e IP Absoluto mDC + LT 1:10 (IP Absoluto grupo experimental/ IP Absoluto mDC + LT 1:10). Para análise do IP Relativo Total e CD4⁺, dos grupos de linfócitos estimulados apenas por um tipo de APC, e IP Relativo CD4⁺ e CD8⁺, dos grupos de linfócitos estimulados por misturas de APC, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, para outros grupos foi utilizado ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$ (n=6).

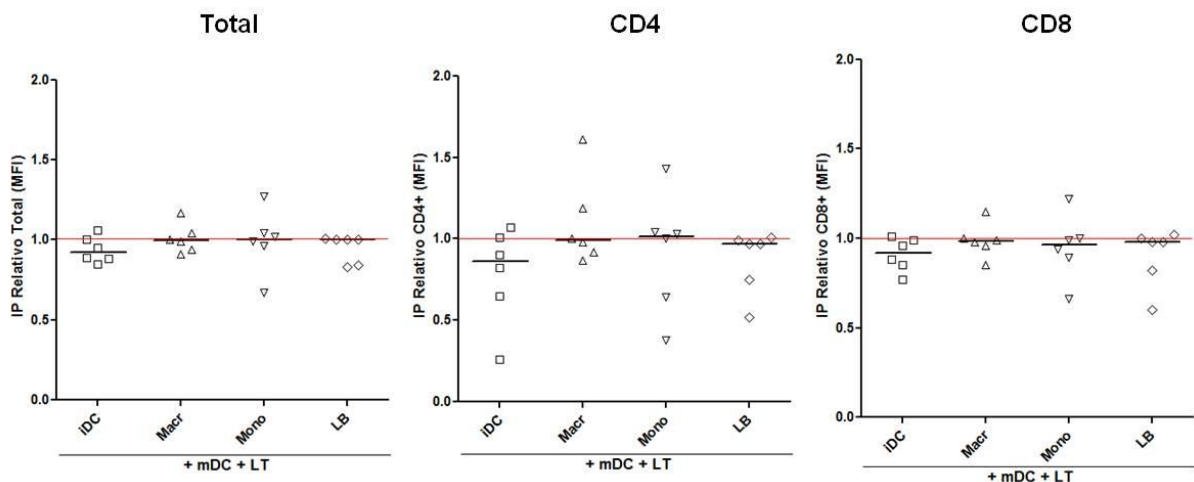


Figura 17 – Índice relativo da proliferação de linfócitos T estimulados pelas combinações de APCs. Gráficos de dispersão indicativo da média/ mediana do IP relativo da proliferação de linfócitos total e após delimitação de *gates* nas células T CD4⁺ e CD8⁺, induzida por diferentes combinações de mDC com outras APCs, na proporção 9:1. IP Relativo indica a razão entre IP Absoluto grupo experimental e IP Absoluto mDC + LT 1:10 (IP Absoluto grupo experimental/ IP Absoluto mDC + LT 1:10). Para análise do IP Relativo Total e CD4⁺, dos grupos de linfócitos estimulados apenas por um tipo de APC, e IP Relativo CD4⁺ e CD8⁺, dos grupos de linfócitos estimulados por misturas de APC, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, para outros grupos foi utilizado ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$ (n=6).

4.5 Avaliação da produção de citocinas nos sobrenadantes das co-culturas

Citocinas produzidas pelas células durante as co-culturas foram mensuradas. Para tanto, os sobrenadantes das co-culturas foram congelados em alíquotas no 5º dia de co-cultura. A quantificação de citocinas foi realizada por dois métodos: ELISA e BIOPLEX. A técnica de ELISA foi feita para IFN- γ , IL-10 e IL-4. Enquanto que no BIOPLEX foram investigadas IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-2, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-13, IL-17 e TNF- α . A técnica de BIOPLEX foi realizada apenas com amostras de um experimento, enquanto que o ELISA foi feito com sobrenadantes das amostras de seis experimentos, com exceção da IL-4 (quatro experimentos).

Pode-se notar que o perfil de produção de citocinas, de modo geral, detectado pelo BIOPLEX é o mesmo que o detectado pela técnica de ELISA. Na figura 18 é possível observar que co-culturas de LT com monócitos produzem maior quantidade de IFN- γ (mediana de 105,3 pg/mL), seguido por aquelas onde as células APCs foram iDCs e monócitos+GM-CSF. Contudo, ao colocar outras APCs às co-culturas com mDCs, a produção maior de IFN- γ ocorreu na co-cultura na qual o LT foi estimulado pela mDC juntamente com a iDC, fenômeno que pode ser melhor observado na Figura 18C. Como se pode notar nesta mesma figura, a adição de monócitos ou monócitos+GM-CSF provocou diminuição relativa da concentração de IFN- γ (Índice mDC=0,7 e 0,67 respectivamente). iDCs e LBs provocaram um aumento relativo da concentração desta citocina, como também pode ser visto na Figura 18C. Enquanto a Figura 18 representa a dosagem de IFN- γ detectada por ELISA, a Figura 19 representa a quantidade desta citocina detectada por BIOPLEX. Nesta figura é possível notar co-culturas realizadas com mDCs foram as que mais tiveram o produção desta citocina, seguidas pelas feitas com monócitos. No entanto, ao adicionar as outras APCs, às co-culturas de mDCs, a produção foi aumentada, principalmente no grupo que recebeu iDCs (de 139,22 pg/mL para 183, 16 pg/mL).

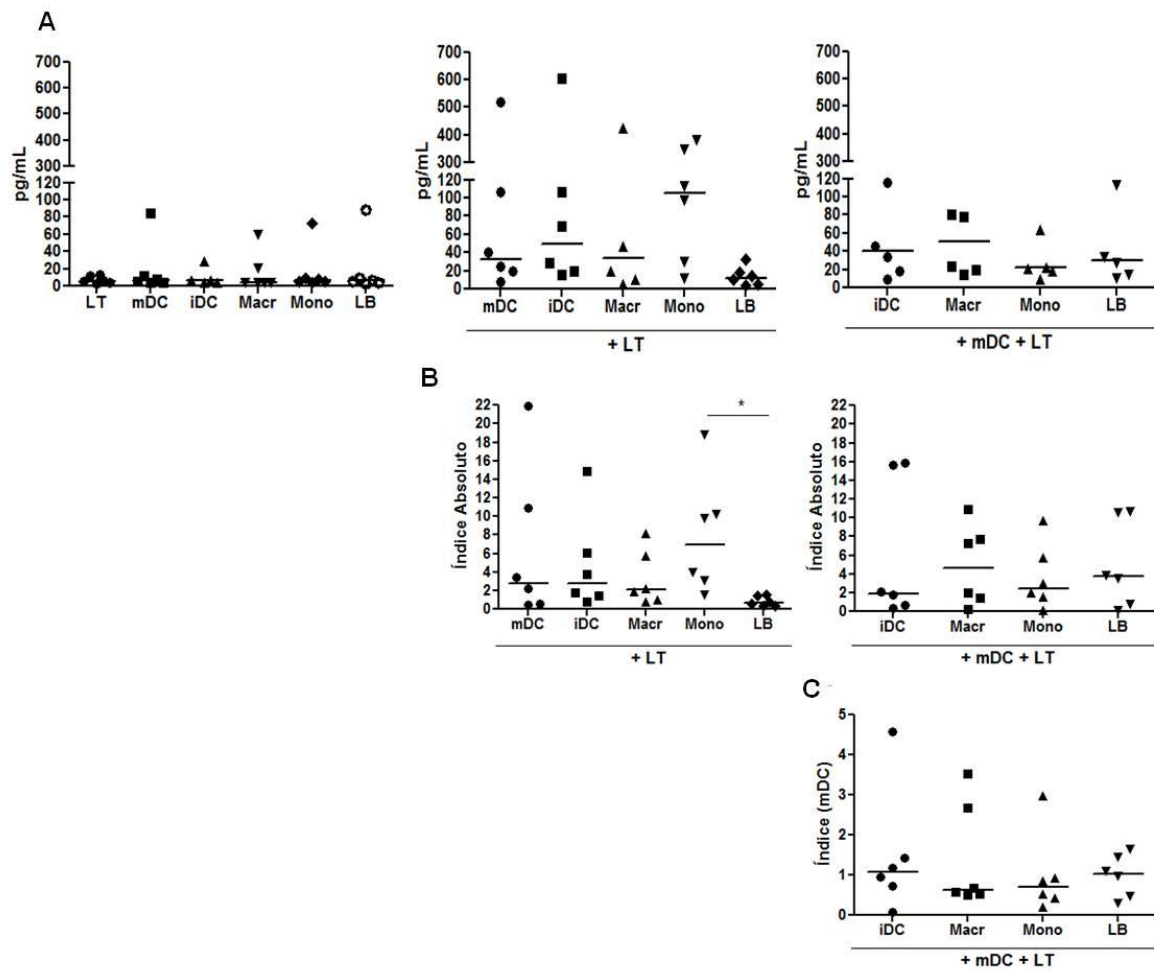


Figura 18 – Quantificação da produção de IFN- γ , presente no sobrenadante das co-culturas, por ELISA. A: Gráficos de dispersão representando a mediana da produção de IFN- γ , em pg/mL, por células colocadas em co-cultura por 5 dias. B: Gráficos de dispersão representando a mediana do índice absoluto da produção de IFN- γ por células colocadas em co-cultura por 5 dias. C: Gráficos de dispersão representando a mediana do índice (mDC) da produção de IFN- γ por células colocadas em co-cultura por 5 dias. O Índice Absoluto (IA) representa o valor detectado no sobrenadante dividido pela somatória dos valores detectados nos sobrenadantes das células isoladas. O Índice (mDC) representa a razão entre IA das misturas de APCs e IA das co-culturas de LT apenas com mDCs (n=6).

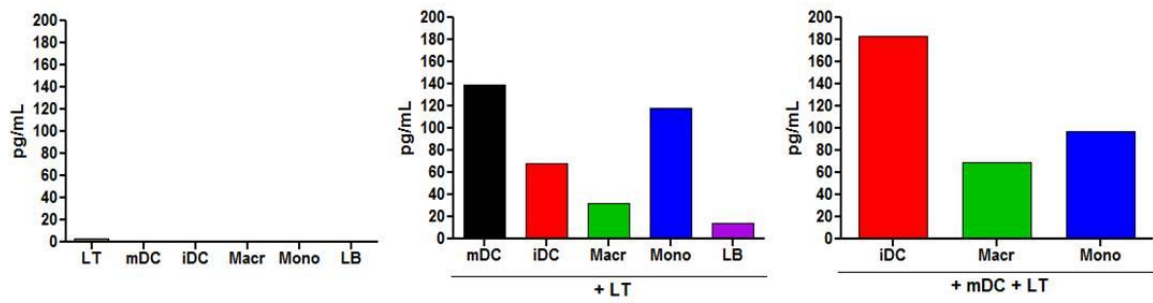


Figura 19 – Quantificação da produção de IFN- γ , presente no sobrenadante das co-culturas, por BIOPLEX. Gráfico de barras representando a mediana da produção de IFN- γ , em pg/mL, pelas células colocadas em co-cultura por 5 dias, detectado por BIOPLEX (n=1).

Na Figura 20B é possível observar que a co-culturas de LT estimulados com LB produzem menor quantidade de IL-10, no entanto ao adicionar LB às co-culturas com mDC, nota-se que há um aumento de 4 vezes na produção de IL-10 (de IA=0,6 para IA=1,65). Ainda, LT estimulados por monócitos+GM-CSF também seguem um perfil parecido, aumentando em quase 2 vezes a produção de IL-10 quando são adicionados às mDC em co-cultura (Figura 20B). O mesmo perfil é visto na detecção de IL-10 por BIOPLEX, no entanto, também é possível observar que a produção desta citocina pelo grupo estimulado apenas por iDCs, aumenta em quase 19 vezes a produção de IL-10 quando estas são adicionadas às co-culturas de LT estimulados por mDCs (Figura 21).

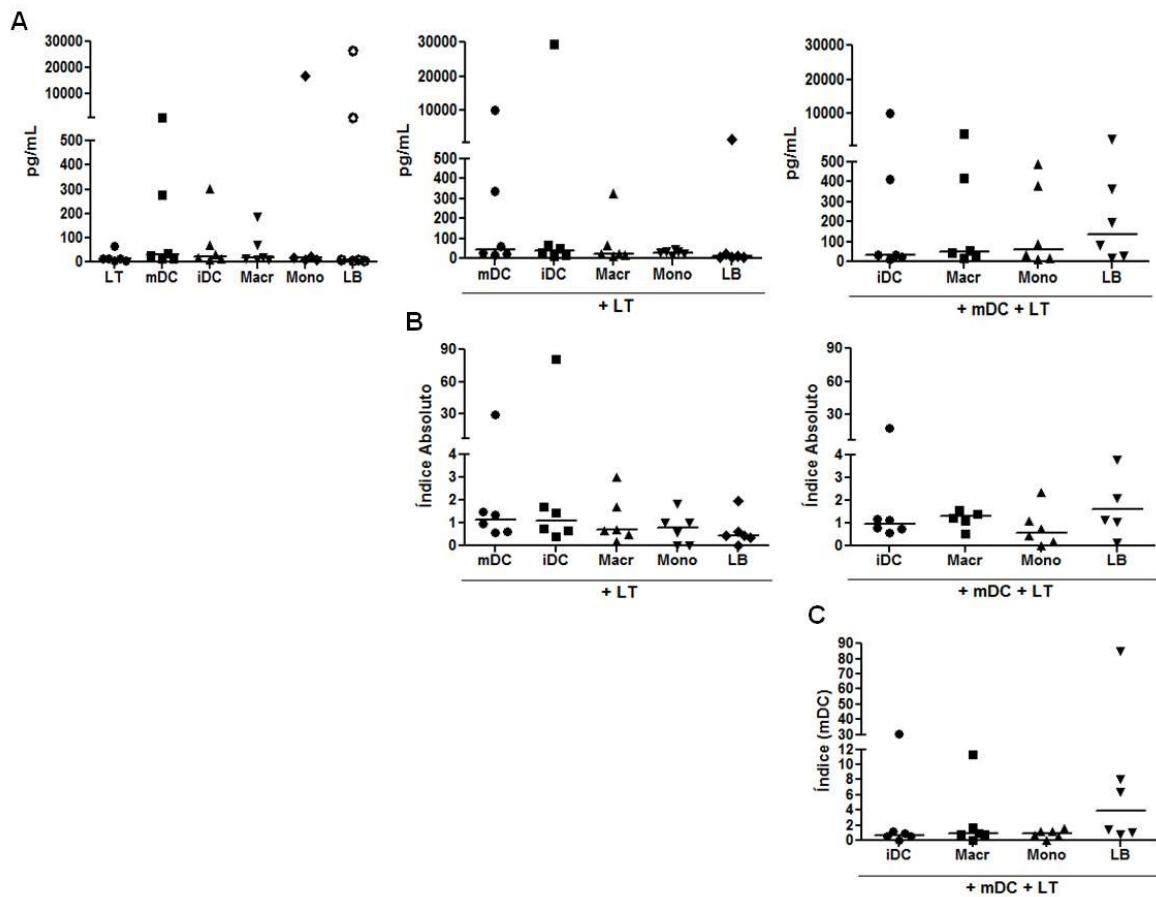


Figura 20 – Quantificação da produção de IL-10, presente no sobrenadante das co-culturas, por ELISA. A: Gráficos de dispersão representando a mediana da produção de IL-10, em pg/mL, por células colocadas em co-cultura por 5 dias. B: Gráficos de dispersão representando a mediana do índice absoluto da produção de IL-10 por células colocadas em co-cultura por 5 dias. C: Gráficos de dispersão representando a mediana do índice (mDC) da produção de IL-10 por células colocadas em co-cultura por 5 dias. O Índice Absoluto (IA) representa o valor detectado no sobrenadante dividido pela somatória dos valores detectados nos sobrenadantes das células isoladas. O Índice (mDC) representa a razão entre IA das misturas de APCs e IA das co-culturas de LT apenas com mDCs (n=6).

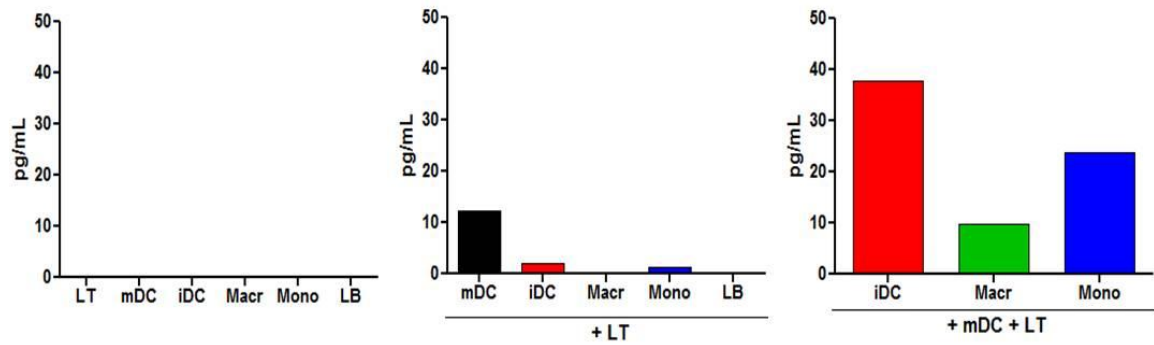


Figura 21 – Quantificação da produção de IL-10, presente no sobrenadante das co-culturas, por BIOPLEX. Gráfico de barras representando a mediana da produção de IL-10, em pg/mL, pelas células colocadas em co-cultura por 5 dias, detectado por BIOPLEX (n=1).

A citocina IL-4 apresentou-se em quantidades mais altas quando LT foram co-cultivados com mDC e iDCs, já que a mDC e iDC sozinhas possuíram uma produção basal desta citocina. Nota-se que o sobrenadante da co-cultura de LT estimulados por apenas um tipo de APC, que não DCs, possuía baixas concentrações de IL-4. Não houve modificações significativas pela combinação das APCs (Figura 22). Por outro lado, ao observar a Figura 23, nota-se que ao realizar a dosagem por BIOPLEX, apenas os grupos estimulado por monócitos+GM-CSF produziram alta quantidade de citocina presente no sobrenadante das co-culturas.

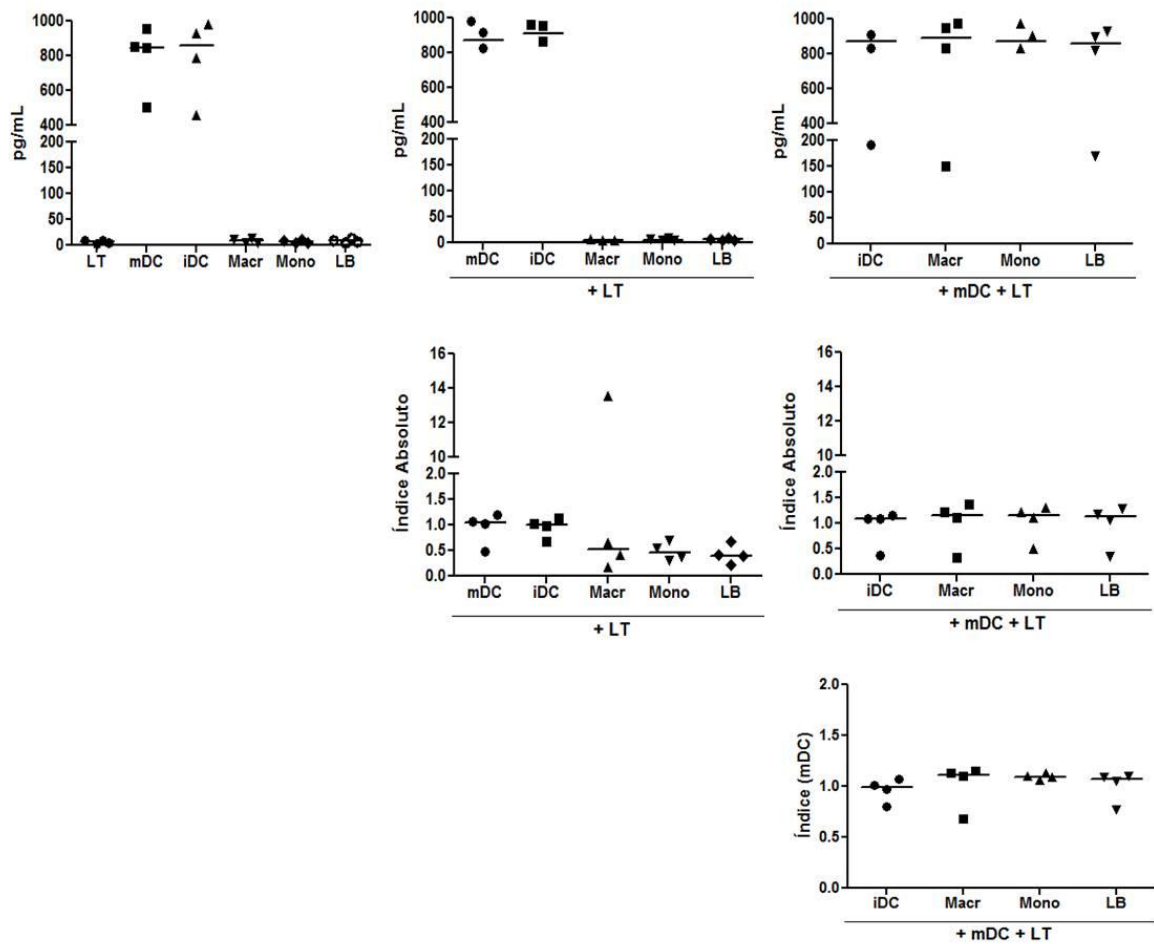


Figura 22 – Quantificação da produção de IL-4, presente no sobrenadante das co-culturas, por ELISA. A: Gráficos de dispersão representando a mediana da produção de IL-4, em pg/mL, por células colocadas em co-cultura por 5 dias. B: Gráficos de dispersão representando a mediana do índice absoluto da produção de IL-4 por células colocadas em co-cultura por 5 dias. C: Gráficos de dispersão representando a mediana do índice (mDC) da produção de IL-4 por células colocadas em co-cultura por 5 dias. O Índice Absoluto (IA) representa o valor detectado no sobrenadante dividido pela somatória dos valores detectados nos sobrenadantes das células isoladas. O Índice (mDC) representa a razão entre IA das misturas de APCs e IA das co-culturas de LT apenas com mDCs (n=4).

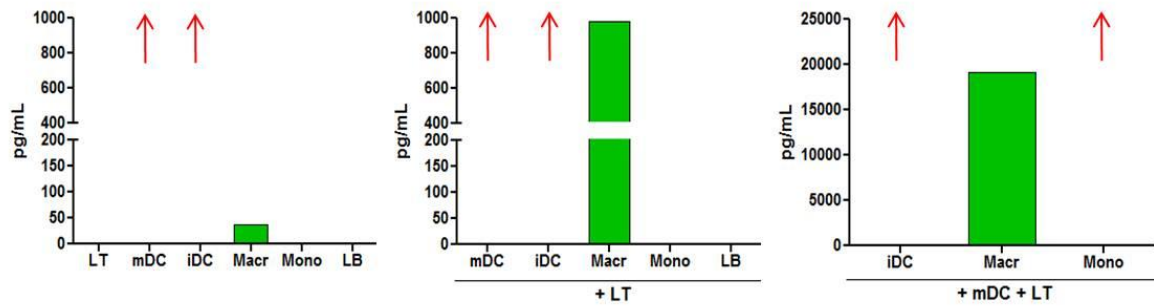


Figura 23 – Quantificação da produção de IL-4, presente no sobrenadante das co-culturas, por BIOPLEX. Gráfico de barras representando a mediana da produção de IL-4, em pg/mL, pelas células colocadas em co-cultura por 5 dias, detectado por BIOPLEX. As setas indicam valores que ficaram acima da curva detectada pelo leitor (n=1).

Pela técnica de BIOPLEX foi possível identificar a presença de outras citocinas como IL-2, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-13, IL-17 e TNF- α . Na Figura 24A, pode-se observar que só há a produção de IL-2 quando a mDC é a célula estimuladora. Quando há a adição de outras APCs juntamente com a mDC, há uma diminuição da produção de IL-2, fenômeno visto principalmente quando se adicionam iDCs. A presença de IL-5 também só é observada no sobrenadante das co-culturas que possuem a presença de mDCs (Figura 24B). Ao se observar a produção de IL-6, nota-se que há uma produção basal pelas células sozinhas, LT, mDC, iDC e monócitos. Quando estas são colocadas em co-cultura com LT, pode-se notar que apenas a mDC induz uma produção maior de IL-6 pelos LT. Porém, ao estimular LT com as misturas de mDCs com outras APCs, esta produção, que se mostrara maior, quando LT foram estimulados apenas com mDCs, aparece diminuída (Figura 24C).

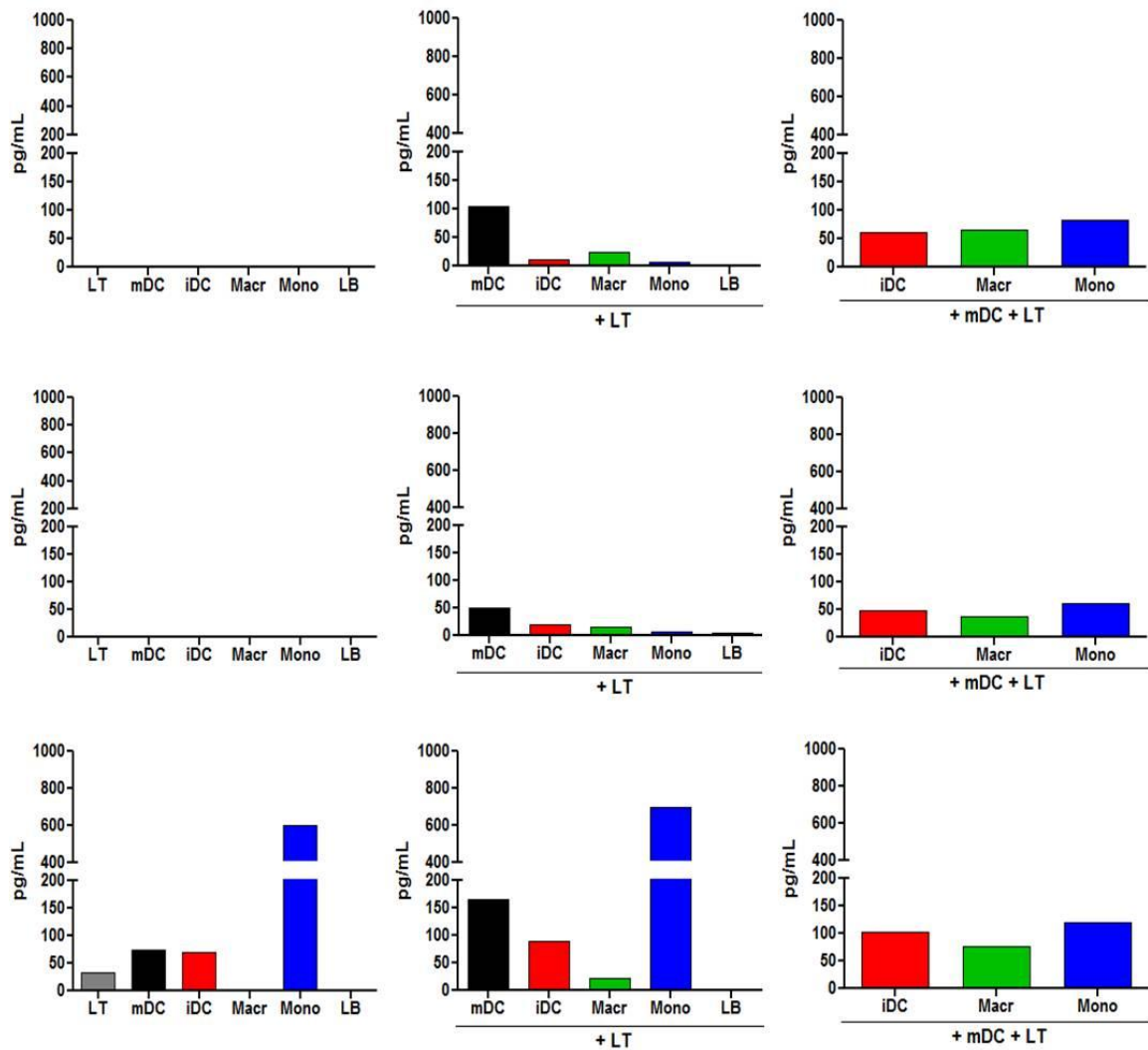


Figura 24 – Detecção de IL-2, IL-5 e IL-6 por BIOPLEX. A: Gráfico de barras representando a produção de IL-2, em pg/mL, por células colocadas em co-cultura por 5 dias, detectado por BIOPLEX. B: Gráfico de barras representando a produção de IL-5, em pg/mL, por células colocadas em co-cultura por 5 dias, detectado por BIOPLEX. C: Gráfico de barras representando a produção de IL-6, em pg/mL, por células colocadas em co-cultura por 5 dias, detectado por BIOPLEX. As setas indicam valores que ficaram abaixo da curva detectada pelo leitor (n=1).

Enquanto a presença de IL-12p70 não foi detectada em nenhuma das amostras, a produção de IL-13 foi maior quando LT foram estimulados por mDCs, seguido por iDCs e macrófagos/monócitos. Pode-se notar que ao adicionar mDC às co-culturas de LT com iDCs, macrófagos/monócitos e monócitos, a produção foi aumentada, chegando próxima à quantidade produzida por LT estimulados apenas por mDCs (Figura 25A). Não houve produção de IL-17 em nenhum dos grupos

(Figura 25B). Na Figura 25C é possível observar que mDCs, monócitos e LT, em menor quantidade, possuem um produção basal de TNF- α . Ao colocar os LT em contato com as APCs, nota-se aumento da produção de TNF- α , principalmente no caso das iDCs e macrófagos, já que só se pode notar a presença da citocina nos sobrenadantes das co-culturas destas com LT. Ao colocar mDCs juntamente com monócitos para estimular LT, pode-se observar aumento da produção de TNF- α , ao passo que as misturas de mDCs com iDCs ou macrófagos, levaram à uma produção próxima à quantidade produzida pela mDC isolada.

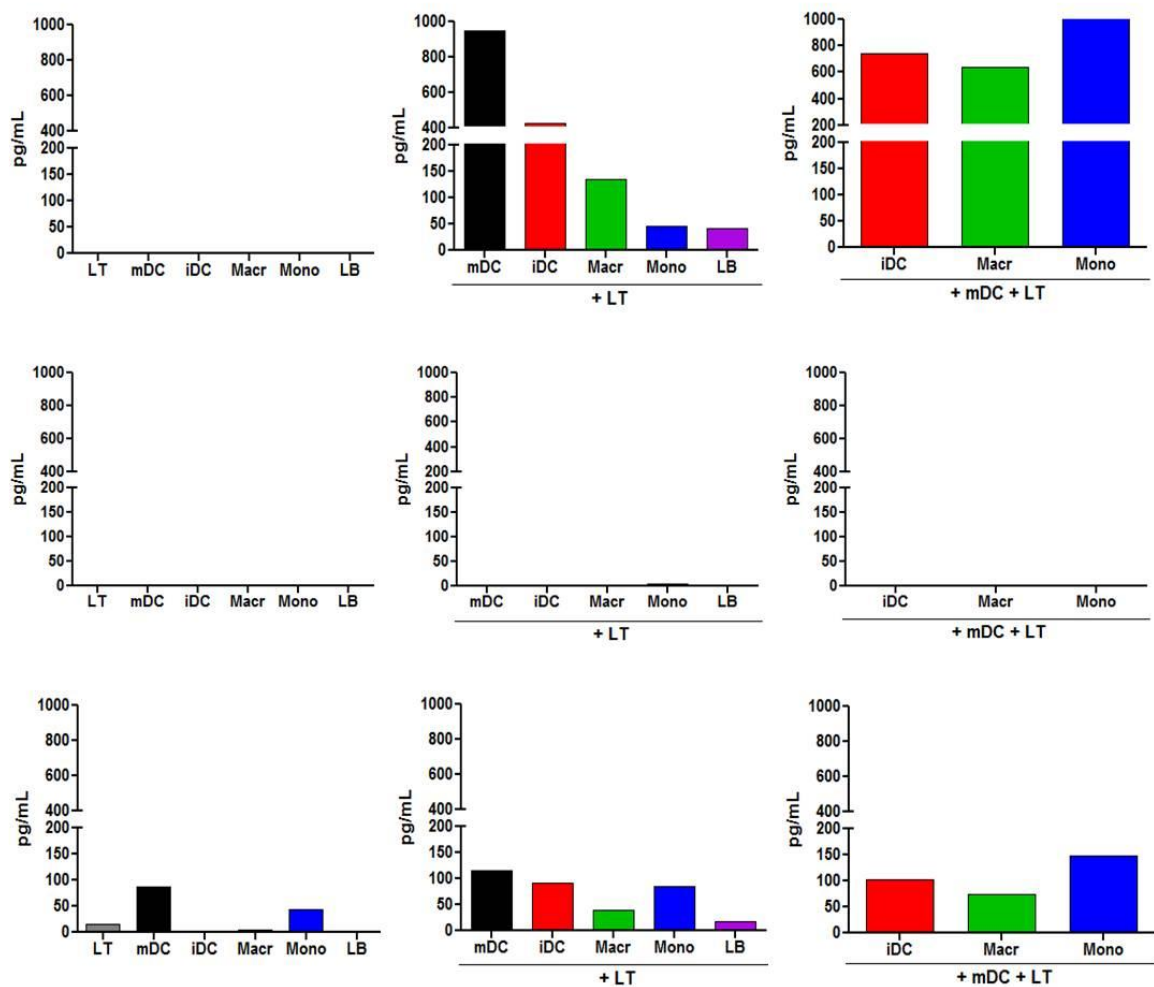


Figura 25 – Detecção de IL-13, IL-17 e TNF- α por BIOPLEX. A: Gráfico de barras representando a produção de IL-13, em pg/mL, por células colocadas em co-cultura por 5 dias, detectado por BIOPLEX. B: Gráfico de barras representando a produção de IL-17, em pg/mL, por células colocadas em co-cultura por 5 dias, detectado por BIOPLEX. C: Gráfico de barras representando a produção de TNF- α , em pg/mL, por células colocadas em co-cultura por 5 dias, detectado por BIOPLEX. As setas indicam valores que ficaram abaixo da curva detectada pelo leitor (n=1).

4.6 Avaliação da presença de citocina intracelular das células colocadas em co-cultura

Para a verificação da produção de IL-4 nas co-culturas de LTs estimulados pelas diferentes APCs e combinações foi realizada a marcação desta citocina intracelularmente, de modo a eliminar a possível interferência de IL-4 colocada na cultura para a diferenciação de monócitos em DCs. Foi feita também a marcação para a citocina intracelular IFN- γ , com o objetivo de verificar a eficiência da técnica. Para tanto, células retiradas no 5º dia de co-cultura foram estimuladas com PMA e ionomicina, adicionando-se também o reagente *Golgi Stop*TM, o qual impede que as citocinas que se encontram no Complexo de Golgi, sejam liberadas para o meio. Após o período de estimulação, as células foram marcadas para CD4 e CD8 (marcadores extracelulares – item 3.3), fixadas, permeabilizadas, marcadas intracelularmente para IL-4 e IFN- γ , como descrito no item 3.13. Como se pode notar na Figura 26A, de fato há a presença de uma população CD8⁺IFN- γ ⁺ em co-culturas de linfócitos T estimulados por mDCs. O mesmo fenômeno ocorreu nas co-culturas realizadas com as outras APCs, bem como com as combinações (Figura 26B), não havendo diferença significativa entre os grupos. Ao analisar a marcação de IL-4 não foi identificada nenhuma população positiva para esta citocina intracelular.

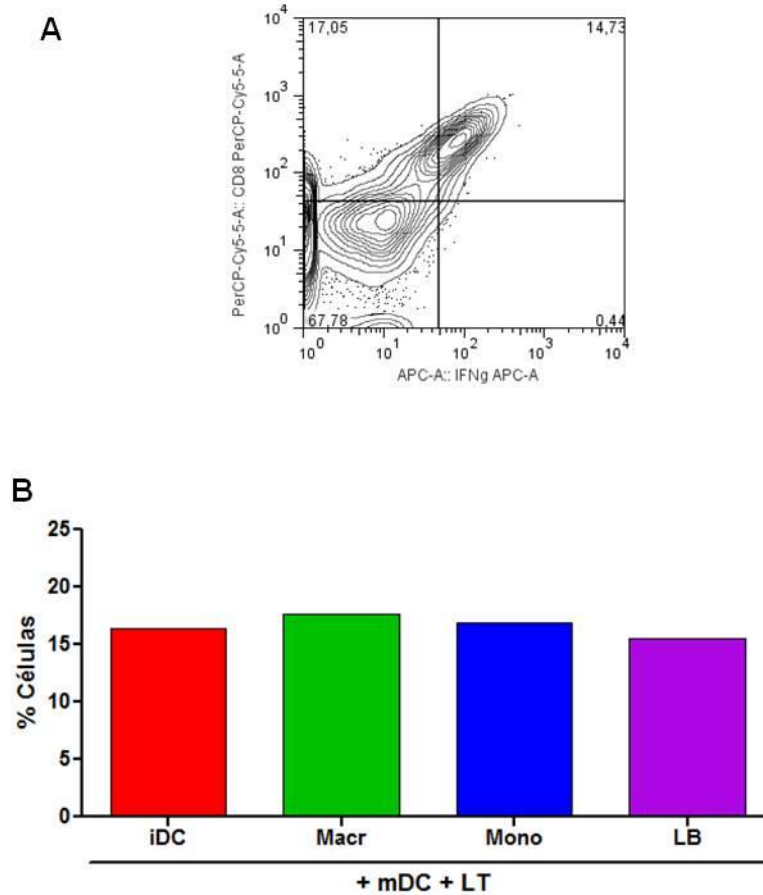


Figura 26 – Quantificação da produção de IFN- γ , presente no interior de células que estavam em co-cultura. A: Gráfico de contorno representando população linfócitos T que foram mantidos por 5 dias em co-cultura com mDCs e apresentaram positividade para as moléculas CD8 e IFN- γ . B: Gráfico de barras representando a porcentagem de linfócitos T, estimulados por 5 dias por combinações de APCs, que apresentaram marcação para CD8 e IFN- γ (n=1).

4.7 Avaliação da presença de células FOXP3⁺

Para verificar a estimulação/proliferação de linfócitos T reguladores (linfócitos T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺), as células mantidas em co-cultura por 5 dias foram marcadas intracelularmente para o fator de transcrição FOXP3 (item 3.11). Para análise foi feito um *gate* na população de tamanho e granulosidade característicos de linfócitos e em seguida, na população CD4⁺ (Figura 27A). Dentro deste, foi verificada a porcentagem de células duplo-marcadas para os anticorpos anti-CD25 e anti-FOXP3. Como resultado de um único experimento, é possível observar na Figura 27B que já há a presença de cerca de 3% destes linfócitos T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ na população linfocitária que não recebeu nenhum estímulo

alogenêico. Enquanto que a estimulação por mDCs, monócitos+GM-CSF e monócitos levou a uma leve diminuição desta população, a adição de iDCs e LBs induziu um leve aumento. Por outro lado, ao adicionar outras APCs à co-cultura de linfócitos T estimulados por mDCs, houve a indução de um leve aumento da porcentagem de células positivas para CD4, CD25 e FOXP3 em todos os grupos (Figura 27B).

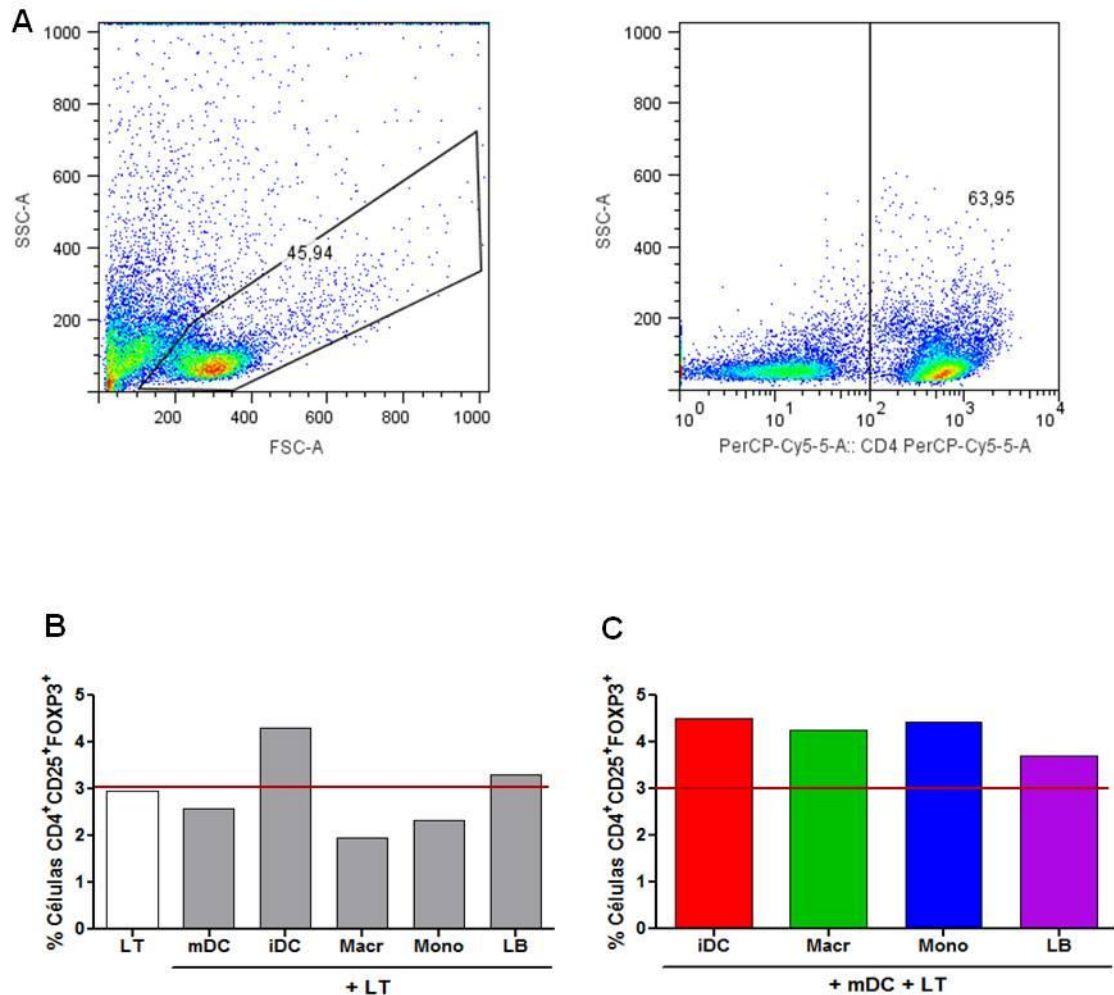


Figura 27 – Marcação de FOXP3. A: Gráficos pseudo-colorido de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC), em que se delimitou um *gate* para as células com tamanho e granulosidade característicos de linfócitos.T. Outro *gate* delimitou a população de linfócitos T CD4⁺ e dentro deste, foi analisada a presença de células CD25⁺FOXP3⁺. B: Gráfico de barras representando a porcentagem de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ que foram colocadas em co-cultura com diferentes tipos e combinações de APCs (n=1).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram estabelecidas técnicas de diferenciação de DCs maduras e imaturas, macrófagos, derivados de monócitos de doadores saudáveis e separação de LB e LT, para ensaios de linfoproliferação alogênicos e autólogos. Sabe-se que as células dendríticas possuem a capacidade única de conduzir um repertório de respostas imunológicas que provocam desde a resistência a infecções e câncer como também a tolerância. Diante disto, o desenvolvimento de técnicas que permitiram a diferenciação das DCs *in vitro* (CAUX et al., 1992; SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994; ROMANI et al., 1996) tornou esta célula, ferramenta de vários estudos promissores, gerando novas possibilidades para a imunoterapia do câncer (THURNER et al., 1999; BARBUTO et al., 2004; BALEEIRO et al., 2008; WANG et al., 2009; BOUWER et al., 2010). No entanto, sabe-se que fisiologicamente, a apresentação de antígenos não é feita somente por um único tipo celular e sim por uma população heterogênea de APCs, que podem influenciar a indução e a evolução de diferentes padrões de respostas de LT. Com o objetivo de verificar a interferência de outras APCs sobre a DC na capacidade estimuladora de LT, o presente trabalho propôs avaliar *in vitro* a atividade linfoestimuladora das diferentes APCs e das combinações de mDCs com iDCs, macrófagos, monócitos e LB. Para tanto, a diferenciação *in vitro* de macrófagos e DCs, e a separação de LB foram padronizadas e as populações caracterizadas quanto às moléculas de superfície.

De acordo com dados relatados na literatura, desde a primeira descrição das DCs feita por Steinman e Cohn (1973) até a geração de DCs *in vitro* através da cultura de células hematopoiéticas com GM-CSF e IL-4, as DCs são definidas como APCs que apresentam uma morfologia típica, que expressa níveis elevados de moléculas do MHC-I e MHC-II, baixos níveis de CD14, alta atividade estimuladora de linfócitos e aumento da sua eficiência com a adição de TNF- α (INABA et al., 1992; CAUX et al., 1992; SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994).

Desta forma, considerando os monócitos como um potencial precursor das DCs, vários fatores presentes no microambiente durante a diferenciação, como TNF- α , IL-3, IL-6, GM-CSF, IFNs, entre outros, podem determinar a heterogeneidade já relatada nas DCs. Mesmo *in vitro*, tal fato pode estar influenciando a expressão de moléculas co-estimuladoras e a produção de citocinas, resultando em interações diversas com outras células do sistema imune, causando ações que podem ir desde

tolerância até imunogenicidade. (CHOMARAT et al., 2003; CHOMARAT et al., 2000; ENCABO et al., 2004; PULENDRAN et al., 2000; ITO et al., 2001).

Assim, foi padronizado o protocolo de diferenciação com meio suplementado com IL-4, GM-CSF e TNF- α para geração DCs maduras a partir de PBMCs de doadores saudáveis com base nos protocolos já desenvolvidos em nosso laboratório. A diferenciação, inicialmente, foi determinada pela morfologia e pelo perfil fenotípico das células antes e depois da cultura, feita por meio da avaliação de vários marcadores que definem o fenótipo e o estado de maturação. Os resultados do presente trabalho mostraram que iDCs e mDCs diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico, apresentaram marcadores bem característicos, como alta expressão de HLA-DR (MHC-II), CD11c (molécula características de células de origem mielóide) e aumento gradativo das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 que acompanhou o estágio de maturação da célula, entre outras (Figuras 4, 5 e 6). Tais fenômenos concordam com os dados presentes na literatura (CAUX et al., 1994; ZHOU e TEDDER, 1995; BERGES et al., 2005; AHN e AGRAWAL, 2005; DEN DEKKER et al., 2008; STEINMAN e IDOYABA, 2010), mostrando que de fato, a diferenciação destas células foi realizada com sucesso. Contudo, pode-se observar grande variação na porcentagem de células positivas, obtidas em diferentes experimentos, demonstrando que há heterogeneidade das DCs diferenciadas *in vitro*. Este fenômeno também já foi relatado na literatura, levando à conclusão que é importante considerar que as DCs se apresentam como uma população heterogênea que desempenha papéis diferentes na resposta imune e que ainda são insuficientes as informações que definem melhor as subpopulações, bem como, suas funções (NAIK, 2008; VILLADANGOS e SCHNORRER, 2007). Não somente neste trabalho, mas também em muito outros, pode ser observada uma variação na expressão dos marcadores de superfície que caracterizam as DCs. Estas variações podem depender da heterogeneidade dos doadores, quando se lida com seres humanos, mas pode ser ainda influenciada por fatores ambientais, inclusive relacionados ao estado emocional dos doadores, uma vez que, em camundongos ao menos, já foi demonstrado que um estado de ansiedade pode afetar o fenótipo e a função das DCs (TOMIYOSHI et al., 2009).

Embora a diferenciação de DCs tenha sido conseguida, a cultura na presença de GM-CSF para diferenciação de monócitos em macrófagos nem sempre induziu o

aparecimento de células características, $CD14^{\text{high}}CD68^+CD206^+$. Isto pode ter ocorrido pelo fato de haver células produtoras de IL-4 que ficaram na cultura durante a diferenciação celular, interferindo na diferenciação do monócito em macrófago. Tal fato sugere que estas tenham ficado num estágio intermediário entre macrófago e DCs, mesmo possuindo morfologia similar à de macrófagos (Figura 1B). Na verdade, DCs e macrófagos parecem fazer decorrer da diferenciação de um precursor comum (GEISSMANN et al., 2010), o que poderia, em determinadas situações, levar à dificuldade de separação fenotípica entre estes dois tipos celulares. Assim, em nossos experimentos, obtivemos células com morfologia próxima à de macrófagos, expressando molécula característica, o CD206, mas com baixa expressão de CD14 e CD68. A molécula CD206 é o receptor de manose de macrófagos e está envolvida no *clearance* de glicoproteínas endógenas e tem expressão aumentada durante o processo inflamatório (LEE et al., 2002). Há também relatos de que esta molécula é um marcador de macrófagos anti-inflamatórios (PORCHERAY et al., 2005). Em nossos experimentos, além dela ter sido altamente expressa nos monócitos+GM-CSF, ela esteve também presente na membrana de iDCs e mDCs, o que é esperado e parece estar relacionado ao tratamento dos monócitos com IL-4 (DEN DEKKER et al., 2008).

Tentando eliminar a possibilidade de produção de outros fatores capazes de influir na diferenciação dos monócitos produzidos por outras células presentes na cultura, foi realizada a cultura para diferenciação de macrófagos a partir de monócitos separados de PBMCs por microesferas magnéticas conjugadas a anticorpo anti-CD14. De fato, a separação eliminou grande parte de células contaminantes, havendo um enriquecimento da população, atingindo-se 90% de células $CD14^+$. No entanto, a redução da contaminação por células que poderiam interferir na diferenciação de macrófagos, não alterou o fenótipo das células resultantes da diferenciação dos monócitos na presença de GM-CSF, ao menos com relação aos marcadores específicos CD14 e CD68. Observamos, na verdade até diminuição da porcentagem de células positivas para ambas as moléculas. Estes dados sugerem que a falha na obtenção de macrófagos típicos parece não depender da contaminação da população inicial por outros tipos celulares além dos monócitos, embora a pequena porcentagem remanescente ainda pudesse ser responsável pelo desvio desta diferenciação.

A separação de LB foi feita por três métodos diferentes. Primeiramente foi feita a separação por formação de rosetas com eritrócitos de carneiro modificados e separados por gradiente de Ficoll-Paque, após incubação com LME, para eliminação de células citotóxicas (THIELE e LIPSKY, 1992). Pode-se observar que tal método não foi capaz de enriquecer a preparação em células CD19⁺HLA-DR⁺ (Figura 10), passando-se, portanto para o método por separação por microesferas magnéticas, utilizando-se o *kit MACS MultiSort MicroBeads* (Miltenyi Biotec). Foram realizadas 2 tipos de separação, a positiva (CD19⁺) e a negativa (eliminação de células CD2⁺, CD14⁺, CD16⁺, CD36⁺, CD43⁺ ou CD235a⁺). Pode-se observar que a separação por seleção negativa com microesferas magnéticas (item 3.6) mostrou-se mais eficaz, já que apresentou maior porcentagem de células CD19⁺HLA-DR⁺ e menor quantidade de células de outras linhagens (Figura 11), sendo esta a técnica adotada para o restante dos experimentos. Contudo, é possível observar na Figura 11 que ainda há a presença de cerca de 30% de células CD3⁺, podendo ser resultado de artefato na compensação da interferência dos fluorocromos PE-Cy5 (CD19) e APC (CD3).

Outras moléculas também foram identificadas na membrana do LB, como CD40 e CD80. No entanto, estas se apresentaram pouco expressas, corroborando o fato destas células serem APCs menos eficientes que mDCs, uma vez que tais moléculas são necessárias para o engatilhamento do “segundo sinal” para a ativação de LT (YOUNG et al., 1992; GUERMONPREZ et al., 2002). A baixa expressão de moléculas como CD80, CD86 e CD40 podem acarretar um perfil tolerogênico, como foi visto por Torres-Aguilar et al. (2010).

Durante os passos iniciais do presente trabalho foram realizados ensaios de linfoproliferação alogênicos com as APCs isoladamente em co-culturas com LT. Diferentes proporções de APC:LT foram testadas (1:5, 1:10 e 1:30), selecionando-se a proporção 1:10, que demonstrou respostas linfoproliferativas mais altas (dados não mostrados). Desta forma, pode-se notar que de fato a mDC é a APC que melhor estimula LTs tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ (Figura 13), dado coerente com o relatado por AHN e AHRAWAL (2005). A seguir, foram realizadas co-culturas com a adição de iDCs, monócitos+GM-CSF, monócitos e LB às mDCs. Foram testadas três diferentes proporções de mDC:”outra APC” (5:1, 10:1 e 30:1). No entanto, apenas o grupo 10:1 foi representado no presente trabalho e também selecionado para que se desse

andamento aos experimentos. Desta forma, pode-se fazer uma análise mais refinada dos resultados.

As co-culturas de mDCs que receberam a adição de outra APC não apresentaram diferença significativa entre as combinações, no entanto é possível notar que a ausência de mDCs nas culturas, interfere na proliferação, principalmente de LT CD4⁺, sugerindo que estes são mais dependentes do contato de mDCs, já que possuem maior expressão de HLA-DR (MHC-II), comprovando o fato destas serem conhecidas como melhores APCs. Além disso, pode-se notar que, apenas quando há adição de iDCs às co-culturas houve diminuição da proliferação de LT tanto CD4⁺ quanto CD8⁺. Tal dado sugere que iDCs possam estar influenciando a ativação de LT, tanto por competição, quanto pelo próprio contato com os LT, uma vez que estas células encontram-se num estágio imaturo, sendo incapazes de ativar estes linfócitos adequadamente (YOUNG et al., 1992; GUERMONPREZ et al., 2002), podendo levar à anergia (REDMOND et al., 2005) ou tolerância (TORRES-AGUILAR et al., 2010).

Para identificar o padrão de resposta induzido pela estimulação de linfócitos T alogênicos pelas diferentes APCs e combinações, foi feita a detecção de citocinas nos sobrenadantes das co-culturas. A análise de citocinas produzidas nas co-culturas das diferentes APCs com os linfócitos T alogênicos foi realizada por dois métodos diferentes, ELISA e BIOPLEX. Com a técnica de ELISA foi possível identificar, nos sobrenadantes das co-culturas, as citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4, enquanto que com o BIOPLEX foram investigadas IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-2, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-13, IL-17 e TNF- α . Na figura 18, foi possível observar que co-culturas de LT com monócitos produziram maior quantidade de IFN- γ , seguido por aquelas onde as APCs foram iDCs e monócitos+GM-CSF. Contudo, ao colocar a mDC com as outras APCs, a produção maior de IFN- γ ocorreu na co-cultura na qual o LT foi estimulado pela mDC juntamente com a iDC (Figura 18C). Pode-se notar que a adição de monócitos ou monócitos+GM-CSF provocou diminuição relativa da concentração de IFN- γ , enquanto que iDCs e LBs provocaram um aumento relativo da concentração desta citocina.

Ao se observar IL-10, pode-se notar que a citocina foi mais produzida em co-culturas que tiveram monócitos+GM-CSF ou LB. Tal dado é coerente com a

possibilidade destas estarem levando ou à anergia ou à tolerância de LT (AHN e AGRAWAL, 2005). A IL-4 foi detectada nas co-culturas que tiveram a presença de mDCs e iDCs, porém não houve modificações significativas pela combinação das APCs. Há a possibilidade de estar ocorrendo o carregamento desta citocina pelas DCs, já que estas foram diferenciadas na presença desta. Tal dado oferece suporte à realização de futuros estudos visando a fenotipagem das células, com relação a receptores de citocinas, de modo a esclarecer tais questões.

Foi observado, pela técnica de BIOPLEX, que só houve produção de IL-2 quando a mDC foi a célula estimuladora. Quando houve a adição de outras APCs juntamente com a mDC, houve uma diminuição da produção desta citocina, fenômeno visto principalmente quando se adicionaram iDCs, corroborando o fato desta APC ter interferido mais na proliferação de LT CD4⁺. A presença de IL-5 também só é observada no sobrenadante das co-culturas que possuem a presença de mDCs. A citocina IL-6 mostrou-se diminuída ao adicionar outras APCs juntamente com a mDC, com exceção das co-culturas com monócitos, na qual detectou-se uma quantidade maior da citocina do que nas com apenas mDCs. Ao misturar mDCs com monócitos, a produção foi diminuída em seis vezes. As citocinas IL12p70 e IL-17 não foram detectadas em nenhuma das amostras. A produção de IL-13 foi maior quando LT foram estimulados por mDCs, seguido por iDCs e monócitos+GM-CSF. Pode-se notar que ao adicionar iDC ou monócitos+GM-CSF às co-culturas de LT com mDCs, a produção foi aumentada, o que não ocorreu ao se adicionar monócitos, havendo um leve aumento da quantidade de IL-13 nos sobrenadantes das co-culturas. A produção de TNF- α seguiu o mesmo padrão da produção de IL-13, no entanto em quantidades menores.

Uma vez que a identificação de IL-4 pode ter sofrido interferência da IL-4 colocada na cultura de diferenciação de DCs, para elucidar o padrão de resposta de linfócitos que estava sendo gerado nas co-culturas, foram realizadas marcações intracelulares para as citocinas IL-4 e IFN- γ . A marcação intracelular para IL-4 e IFN- γ foi realizada duas vezes. Na primeira tentativa, foi utilizada uma concentração final de 40 ng/mL de PMA para estimular as células retiradas no 5º dia de co-cultura. Tal concentração pode ter sido demasiadamente alta, levando todas as células à morte, não sendo possível então investigar a presença de citocinas no interior destas. Numa segunda tentativa, foi utilizada a concentração final de 10 ng/ mL de PMA, 4

vezes menor que na primeira tentativa, havendo então a possibilidade de análise destas células. Deste modo, foi possível verificar que o surgimento de uma população duplo-positiva para $CD8^+IFN-\gamma^+$ em todos os grupos, tanto quando LT foram estimulados pelas APCs sozinhas, quanto pelas combinações. No entanto, não foi possível observar nenhuma diferença entre os grupos. Também, não foi possível a identificação de populações $CD4^+IFN-\gamma^+$ e nem $CD4^+IL-4^+$. Tal ausência pode ter sido devido ao modelo experimental utilizado, no entanto, não se pode descartar a possibilidade de ter ocorrido erro na realização da técnica. Contudo, pode-se notar que, de fato, mDCs ativam pouco mais de 15% linfócitos T $CD8^+$ produtores de IFN- γ , levando a um perfil de resposta do tipo Th1 (SCHULZ et al., 2000; VIEIRA et al., 2000).

Além disso, foi feita também marcação intracelular para o fator de transcrição FOXP3, característico de linfócitos T reguladores (AKBARI et al., 2001; VERHASSELT et al., 2004; BARNEJEE et al., 2006). A marcação intracelular do fator de transcrição FOXP3 (item 3.11) foi analisada através da confecção de um *gate* na população de linfócitos e dentro deste foi feito ainda outro na população $CD4^+$. Dentro deste último foi verificada a presença de linfócitos $CD25^+FOXP3^+$. Os resultados desta análise mostram que na população de LT não estimulados, já há a presença de cerca de 3% de células triplo-positivas. Tal dado é condizente com trabalhos na literatura que mostram que de 30% LT $CD4^+CD25^+$ do sangue periférico, apenas de 1 a 2% apresentam positividade para FOXP3 (BAECHER-ALLAN et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 2010). Pode-se observar que há um aumento da população de linfócitos $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, quando LT foram colocados em co-cultura principalmente iDCs. O efeito também ocorre quando a APC é o LBs, mas o fenômeno mostra-se bem mais discreto. Estes dados corroboram o fato destes dois tipos celulares serem APCs indutoras de uma resposta mais tolerogênica, uma vez que possuem uma quantidade menor de moléculas co-estimuladoras, não ativando LT de forma adequada (YOUNG et al., 1992; GUERMONPREZ et al., 2002; TORRES-AGUILAR et al., 2010) ou até mesmo levando estes à anergia (REDMOND et al., 2005). As co-culturas de LTs com as outras APCs induziram uma diminuição desta população de LTs triplo-positivas. Contudo, ao adicionar as “outras APCs” à co-cultura de LTs com mDCs, houve leve aumento da população de Tregs (de 3% para cerca de 4,5%), não havendo

diferença significativa entre os grupos, uma vez que foi realizada apenas uma tentativa de marcação do fator de transcrição FOXP3. Todavia, é necessário destacar que, mesmo sendo pequeno, o aumento da porcentagem de Tregs torna-se “significativo”, uma vez que esta população representa apenas 10% dos LT CD4⁺. Pode-se notar que, apesar da diferença não ter sido grande, a adição de LBs à cocultura de LTs com mDCs foi a que menos alterou a geração dessas células reguladoras, uma vez que a porcentagem celular pareceu bem similar ao grupo de LTs que foram estimulados por LBs (3,31% e 3,7%, respectivamente).

O dados do presente trabalho mostram que a diferenciação de células dendríticas maduras e imaturas foi bem sucedida, bem como a separação de LB por uso de microesferas magnéticas conjugadas a anticorpo anti-CD19, uma vez que esta técnica mostrou-se mais eficiente no enriquecimento deste tipo celular. No entanto, a técnica de diferenciação de macrófagos ainda precisa ser aprimorada, uma vez que a técnica realizada não gerou células com fenótipo característico desta população celular. Deste modo, fica clara a necessidade de mais estudos, testando outras proporções de APCs bem como as vias de sinalização dos linfócitos estimulados, de modo a enriquecer os dados do trabalho.

6 CONCLUSÕES

Os dados deste trabalho mostraram que a capacidade linfoestimuladora das mDCs foi influenciada quando colocadas juntamente com outras APCs. Uma vez que as diferentes APCs quando usadas isoladamente para estímulo de LT alogênêicos, mDCs apresentaram o maior poder de estimulação, seguidas, na ordem, por iDCs, Macr e LB. Enquanto que ao combinar mDCs com as outras APCs, notou-se, de modo geral, que todas as combinações tendem a diminuir a resposta induzida pelas mDCs, principalmente de LT CD4⁺. Interessantemente, iDCs interferiram mais na estimulação de mDCs do que as outras APCs. A análise da produção de citocinas mostrou que IL-2 foi produzida somente quando mDCs estavam presentes como estimuladoras. Esta produção foi diminuída na presença de todas as outras APCs e, de novo, foi mais afetada quando iDCs estavam presentes nas co-culturas. Contrastando com este dado, a produção de IFN- γ aumentou na presença de iDCs, Macr e LB. A produção de IL-10 foi afetada apenas na presença de LB (foi aumentada), enquanto a produção IL-4 não foi afetada na presença de outras APCs. Além disso, a adição de outras APCs às co-culturas de mDCs com LTs levou a um leve aumento da geração/proliferação de linfócitos Treg.

Desta forma, os dados confirmam o efeito das interações de APCs na estimulação de LT e podem prover ferramentas para o refinamento de abordagens imunoterapêuticas. No entanto, ainda é necessário uma maior investigação, testando outras proporções, bem como vias de sinalização dos linfócitos estimulados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 544 p.

ACUTO, O.; MICHEL F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 12, p. 939–951, 2003.

AFKARIAN, M.; SEDY, J. R.; YANG, J.; JACOBSON, N. G.; CEREB, N.; YANG, S. Y.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 549–557, 2002.

AHN, J. S.; AGRAWAL, B. IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. **Int. Immunol.**, v. 17, n. 10, p. 1337–1346, 2005.

AKBARI, O., DEKRUYFF, R. H., UMETSU, D. T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 725–731, 2001.

ASHOUR, H. M.; SEIF, T. M. The role of B cells in the induction of peripheral T cell tolerance. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, n. 5, p. 1033-1039, 2007.

AUSTYN, J. M. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 1287–1292, 1996.

AVNI, O.; LEE, D.; MACIAN, F.; SZABO, S. J.; GLIMCHER, L. H.; RAO, A. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 643–651, 2002.

BADOVINAC, V. P.; TVINNEREIM, A. R.; HARTY, J. T. Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. **Science**, v. 290, p.1354–1358, 2000.

BAECHER-ALLAN, C.; BROWN, J. A.; FREEMAN, G. J.; HAFLER, D. A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 167, n. 3, p. 1245-1253, 2001.

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

BALEEIRO R. B.; ANSELMO, L. B.; SOARES, F. A.; PINTO, C. A.; RAMOS, O.; GROSS, J. L.; HADDAD, F.; YOUNES, R. N.; TOMIYOSHI, M. Y.; BERGAMI-SANTOS P. C.; BARBUTO, J. A. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha in lung cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 57, n. 9, p. 1335–1345, 2008.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245–252, 1998.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BANERJEE, D. K.; DHODAPKAR, M. V.; MATAYEVA, E.; STEINMAN, R. M.; DHODAPKAR, K. M. Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. **Blood**, v. 108, p. 2655–2661, 2006.

BARBUTO, J. A.; ENSINA, L. F.; NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P.; LEITE, K. R.; MARQUES, R.; COSTA, F.; MARTINS, S. C.; CAMARA-LOPES, L. H.; BUZAID, A. C. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 12, p. 1111–1118, 2004.

BECKER, C.; STOLL, S.; BOPP, T.; SCHMITT, E.; JONULEIT, H. Regulatory T cells: present facts and future hopes. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 195, n. 3, p. 113–124, 2006.

BERGES, C.; NAUJOKAT, C.; TINAPP, S.; WIECZOREK, H.; HOH, A.; SADEGHI, M.; OPELZ, G.; DANIEL, V. A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 333, n. 3, p. 896–907, 2005.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, p. 235–238, 2006.

BOUWER, A. L.; NETTER, P.; KEMP, R. A.; MCLELLAN, A. D. A defined serum-free medium useful for monitoring anti-melanoma responses induced by dendritic cell immunotherapy. **J. Immunol. Methods**, v. 352, n. 1–2, p. 178–181, 2010.

CARRENO, B. M.; BENNETT, F.; CHAU, T. A.; LING, V.; LUXENBERG, D.; JUSSIF, J.; BAROJA, M. L.; MADRENAS, J. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. **J. Immunol.**, v. 165, n. 3, p. 1352–1356, 2000.

CAUX, C. ; DEZUTTER-DAMBUYANT, C. ; SCHMITT, D. ; BANCHEREAU, J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. **Nature**, v. 360, n. 640, p. 258–261, 1992.

CAUX, C.; VANBERVLIET, B.; MASSACRIER, C.; AZUMA, M.; OKUMURA, K.; LANIER, L. L.; BANCHEREAU, J. B70/ B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1841–1847, 1994.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1875–1886, 2003.

CHOILEAIN, N. N.; REDMOND, H. P. Regulatory T-cells and autoimmunity. **J. Surg. Res.**, v. 130, p. 124-35, 2006.

CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J.; DAVOUST, J.; PALUCKA, A. K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. **Nat. Immunol.**, v. 1, n. 6, p. 510-514, 2000.

CHOMARAT, P.; DANTIN, C.; BENNETT, L.; BANCHEREAU, J.; PALUCKA, A. K. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 171, n. 5, p. 2262-2269, 2003.

COFFER, P. J.; BURGERING, B. M. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 889–899, 2004.

COOLS, N.; PONSARTS, P.; VAN TENDELOO, V. F. I.; BERNEMAN, Z. N. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, p. 1365–1374, 2007.

CURTSINGER, J. M.; LINS, D. C.; MESCHER, M. F. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 9, p. 1141-1151, 2003.

CURTSINGER, J. M.; SCHMIDT, C. S.; MONDINO, A.; LINS, D. C.; KEDL, R. M.; JENKINS, M. K.; MESCHER, M. F. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **J. Immunol.**, v. 162, n. 6, p. 3256-3262, 1999.

DEN DEKKER, E.; GREFTE, S.; HUIJS, T.; TEN DAM, G. B.; VERSTEEG, E. M.; VAN DEN BERK, L. C.; BLADERGROEN, B. A.; VAN KUPPEVELT, T. H.; FIGDOR, C. G.; TORENSMA, R. Monocyte cell surface glycosaminoglycans positively modulate IL-4-induced differentiation toward dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 180, n. 6, p. 3680-3688, 2008.

DIECKMANN, D.; BRUETT, C. H.; PLOETTNER, H.; LUTZ, M. B.; SCHULER, G. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory, contact dependent T cells induce interleukin 1-producing, contact independent type 1-like regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 247–253, 2002.

DRESSER, D. W.; MITCHISON, N. A. The mechanism of immunological paralysis. **Adv. Immunol.**, v. 8, p. 129-181, 1968.

ENCABO, A.; SOLVES, P.; MATEU, E.; SEPULVEDA, P.; CARBONELL-UBEROS, F.; MINANA, M. D. Selective generation of different dendritic cell precursors from CD34⁺ cells by interleukin-6 and interleukin-3. **Stem Cells**, v. 22, n. 5, p. 725-740, 2004.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 206, p. 232–259, 2005.

FONG, L.; ENGLEMAN, E. G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 245–273, 2000.

FONTENOT, A. P.; GHARAVI, L.; BENNETT, S. R.; CANAVERA, S. J.; NEWMAN, L. S.; KOTZIN, B. L. CD28 costimulation independence of target organ versus circulating memory antigen-specific CD4⁺ T cells. **J. Clin. Invest.** v. 112, n. 5, p. 776-84, 2003.

FREEMAN, G. J.; BORRIELLO, F.; HODES, R. J.; REISER, H.; HATHCOCK, K. S.; LASZLO, G.; McKNIGHT, A. J.; KIM, J.; DU, L.; LOMBARD, D. B.; GRAY, G. S.; NADLER, L. M.; SHARPE, A. H. Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice. **Science**, v. 262, p. 907–909, 1993a.

FREEMAN, G. J.; GRIBBEN, J. G.; BOUSSIOTIS, V. A.; NG, J. W.; RESTIVO JR, V. A.; LOMBARD, L. A.; GRAY, G. S.; NADLER, L. M. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. **Science**, v. 262, p. 909–911, 1993b.

GEISSMANN, F.; GORDON, S.; HUME, D. A.; MOWAT, A. M.; RANDOLPH, G. J. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 6, p. 453–460, 2010.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927–930, 2002.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 621–667, 2002.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 621–667, 2002.

HAPPEL, K. I.; DUBIN, P. J.; ZHENG, M.; GHILARDI, N.; LOCKHART, C.; QUINTON, L. J.; ODDEN, A. R.; SHELLITO, J. E.; BAGBY, G. J.; NELSON, S.; KOLLS, J. K. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. **J. Exp. Med.**, v. 202, p. 761–769, 2005.

HARDING, F. A.; MCARTHUR, J. G.; GROSS, J. A.; RAULET, D. H.; ALLISON, J. P. CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones. **Nature**, v. 356, n. 6370, p. 607–609, 1992.

HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; WEAVER, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, p. 349–356, 2006.

HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; WEAVER, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, p. 349–356, 2006.

HATHCOCK, K. S.; LASZLO, G.; PUCILLO, C.; LINSLEY, P.; HODES, R. J. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 631–640, 1994.

HORI, S. NOMURA, T. SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-1061, 2003.

HUANG, F. P.; PLATT, N.; WYKES, M.; MAJOR, J. R.; POWELL, T. J.; JENKINS, C. D.; MACPHERSON, G. G. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 435–444, 2000.

HUGUES S. Dynamics of dendritic cell-T cell interactions: a role in T cell outcome. **Semin. Immunopathol.**, v. 32, n. 3, p. 227-238, 2010.

HUTCHINS, A. S.; MULLEN, A. C.; LEE, H. W.; SYKES, K. J.; HIGH, F. A.; HENDRICH, B. D.; BIRD, A. P.; REINER, S. L. Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. **Mol. Cell.**, v. 10, p. 81–91, 2002.

INABA, K.; INABA, M.; NAITO, M.; STEINMAN, R. M. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including baccillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 479–488, 1993.

INABA, K.; INABA, M.; ROMANI, N.; AYA, H.; DEGUCHI, M.; IKEHARA, S.; MURAMATSU, S.; STEINMAN, R. M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.**, v. 176, n. 6, p. 1693-1702, 1992.

INTLEKOFER, A. M.; TAKEMOTO, N.; WHERRY, E. J.; LONGWORTH, S. A.; NORTHRUP, J. T.; PALANIVEL, V. R.; MULLEN, A. C.; GASINK, C. R.; KAECH, S. M.; MILLER, J. D.; GAPIN, L.; RYAN, K.; RUSS, A. P.; LINDSTEN, T.; ORANGE, J. S.; GOLDRATH, A. W.; AHMED, R.; REINER, S. L. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 1236–1244, 2005.

ISSEKUTZ, T.; CHU, E.; GEHA, R. S. Antigen presentation by human B cells: T cell proliferation induced by Epstein Barr Virus B lymphoblastoid cells. **J. Immunol.**, v. 129, p. 1446–1450, 1982.

ITO, T.; AMAKAWA, R.; INABA, M.; IKEHARA, S.; INABA, K.; FUKUHARA, S. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. **J. Immunol.**, v. 1, n. 5, p. 2961-2969, 2001.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J. J.; CUA, D. J.; LITTMAN, D. R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17(+) T helper cells. **Cell**, v. 126, p. 1121–1133, 2006

JUEDES, A. E.; RODRIGO, E.; TOGHER, L.; GLIMCHER, L. H.; VON HERRATH, M. G. T-bet controls autoaggressive CD8 lymphocyte responses in type 1 diabetes. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 1153–1162, 2004.

KALINSKI, P.; HILKENS, C. M.; SNIJDERS, A.; SNIJDEWINT, F. G.; KAPSENBERG, M. L. Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE₂, promote Th₂ responses. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 417, p. 63–367, 1997.

KALINSKI, P.; VIEIRA, P. L.; SCHUITEMAKER, J. H.; DE JONG, E. C.; KAPSENBERG, M. L. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. **Blood**, v. 97, p. 3466–3469, 2001.

KRAAIJ, M. D.; SAVAGE, N. D.; VAN DER KOOIJ, S. W.; KOEKKOEK, K.; WANG, J.; VAN DEN BERG, J. M.; OTTENHOFF, T. H.; KUIJPERS, T. W.; HOLMDAHL, R.; VAN KOOTEN, C.; GELDERMAN, K. A. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 107, n. 41, p. 17686-17691, 2010.

KRONENBERG M, RUDENSKY A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 598-604, 2005.

LANDMANN, S.; MÜHLETHALER-MOTTET, E.; BERNASCONI, L.; SUTER, T.; WALDBURGER, J. M.; MASTERNAK, K.; ARRIGHI, J. F.; HAUSER, C.; FONTANA, A.; REITH, W. Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 4, p. 379–391, 2001.

LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHIEIN, W. M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J. D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 233–240, 2005.

LANZAVECCHIA, A. Antigen-specific interaction between T and B cells. **Nature**, v. 314, p. 537-539, 1985b.

LANZAVECCHIA, A.; BOVE, S. Specific B lymphocytes efficiently pick up, process and present antigen to T cells. **Behring Inst. Mitt.**, v. 77, p. 82–87, 1985a.

LARSEN, C. P.; RITCHIE, S. C.; HENDRIX, R.; LINSLEY, P. S.; HATHCOCK, K. S.; HODES, R. J.; LOWRY, R. P.; PEARSON, T. C. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 152, p. 5208–5219, 1994.

LEE, D. U.; RAO, A. Molecular analysis of a locus control region in the T helper 2 cytokine gene cluster: A target for STAT6 but not GATA3. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 101, p. 16010–16015, 2004.

LEE, G. R.; FIELDS, P. E.; GRIFFIN, T. J.; FLAVELL, R. A. Regulation of the Th2 cytokine locus by a locus control region. **Immunity**, v. 19, p. 145–153, 2003.

LEE, S. J.; EVERS, S.; ROEDER, D.; PARLOW, A. F.; RISTELI, J.; RISTELI, L.; LEE, Y. C.; FEIZI, T.; LANGEN, H.; NUSSENZWEIG, M. C. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1898–1901, 2002.

LI, L.; LI, S-P.; MIN, J.; ZHENG, L. Hepatoma cells inhibit the differentiation and maturation of dendritic cells and increase the production of regulatory T cells. **Immunol. Letters**, v. 114, p. 38–45, 2007.

LIN, H.; RATHMELL, J. C.; GRAY, G. S.; THOMPSON, C. B.; LEIDEN, J. M.; ALEGRE, M. L. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 1, p. 199–204, 1998.

LINSLEY, P. S.; GREENE, J. L.; BRADY, W.; BAJORATH, J.; LEDBETTER, J. A.; PEACH, R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. **Immunity**, v. 1, p. 793-801, 1994.

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

MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.; O'QUINN, D. B.; HELMS, W. S.; BULLARD, D. C.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WAHL, S. M.; SCHOEB, T. R.; WEAVER, C. T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**, v. 441, p. 231–234, 2006.

MASTELLER, E. L.; CHUANG, E.; MULLEN, A. C.; REINER, S. L.; THOMPSON, C. B. Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. **J. Immunol.**, v. 164, n. 10, p. 5319–5327, 2000.

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

MULLEN, A. C.; HIGH, F. A.; HUTCHINS, A. S.; LEE, H. W.; VILLARINO, A. V.; LIVINGSTON, D. M.; KUNG, A. L.; CEREB, N.; YAO, T. P.; YANG, S. Y.; REINER, S. L. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. **Science**, v. 292, p. 1907–1910, 2001.

MULLEN, A. C.; HUTCHINS, A. S.; HIGH, F. A.; LEE, H. W.; SYKES, K. J.; CHODOSH, L. A.; REINER, S. L. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 652–658, 2002.

MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 933-944, 2002.

NAIK, S. H. Demystifying The development of dendritic cell subtypes, a little. **Immunol. Cell Biol.**, v. 86, n. 5, p. 439-452, 2008.

NAPOLITANI, G.; RINALDI, A.; BERTONI, F.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 769–776, 2005.

PAI, S. Y.; TRUITT, M. L.; HO, I. C. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 101, p. 1993–1998, 2004.

PEARCE, E. L.; MULLEN, A. C.; MARTINS, G. A.; KRAWCZYK, C. M.; HUTCHINS, A. S.; ZEDIAK, V. P.; BANICA, M.; DICIOCCIO, C. B.; GROSS, D. A.; MAO, C. A.; SHEN, H.; CEREB, N.; YANG, S. Y.; LINDSTEN, T.; ROSSANT, J.; HUNTER, C. A.; REINER, S. L. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. **Science**, v. 302, p. 1041–1043, 2003.

PERKINS, D.; WANG, Z.; DONOVAN, C.; HE, H.; MARK, D.; GUAN, G.; WANG, Y.; WALUNAS, T.; BLUESTONE, J.; LISTMAN, J.; FINN, P. W. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. **J. Immunol.**, v. 156, n. 11, p. 4154-4159, 1996.

PORCHERAY, F.; VIAUD, S.; RIMANIOL, A. C.; LÉONE, C.; SAMAH, B.; DEREUDDRE-BOSQUET, N.; DORMONT, D.; GRAS, G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 142, n. 3, p. 481–489, 2005.

PROBST, H. C., MCCOY, K., OKAZAKI, T., HONJO, T., VAN DER STROBL, H. Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 280-286, 2005.

PULENDRAN, B.; BANCHEREAU, J.; BURKEHOLDER, S.; KRAUS, E.; GUINET, E.; CHALOUNI, C.; CARON, D.; MALISZEWSKI, C.; DAVOUST, J.; FAY, J.; PALUCKA, K. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. **J. Immunol.**, v. 165, n. 1, p. 566-572, 2000.

RANDOLPH, G. J.; JAKUBZICK, C.; QU, C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 20, n. 1, p. 52-60, 2008.

RAVENEY, B. J. E.; MORGAN, D. J. Dynamic control of self-specific CD8⁺ T cell responses via a combination of signals mediated by dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 179, p. 2870–2879, 2007.

REDMOND, W. L.; MARINCEK, B. C.; SHERMAN, L. A. Distinct requirements for deletion versus Anergy during CD8 T cell peripheral tolerance in vivo. **J. Immunol.**, v. 174, p. 2046–2053, 2005.

REINHARDT, R. L.; KANG, S. J.; LIANG, H. E.; LOCKSLEY, R. M. T helper cell effector fates - who, how and where? **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, p. 271–277, 2006.

RHODES, J. Macrophage heterogeneity in receptor activity: the activation of macrophage Fc receptor function in vivo and in vitro. **J. immunol.**, v. 114, p. 976–981–1975.

ROAKE, J. A.; RAO, A. S.; MORRIS, P. J.; LARSEN, C. P.; HANKINS, D. F.; AUSTYN, J. M. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 2237–2247, 1995.

ROMANI, N.; REIDER, D.; HEUER, M.; EBNER, S.; KÄMPGEN, E.; EIBL, B.; NIEDERWIESER, D.; SCHULER, G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. **J Immunol. Methods**, v. 196, p. 137-151, 1996.

RONCAROLO, M. G.; GREGORI, S.; BATTAGLIA, M.; BACCHETTA, R.; FLEISCHHAUER, K.; LEVINGS, M. K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 28–50, 2006.

SAKAGUCHI, S.; MIYARA, M.; CONSTANTINO, C. M.; HAFNER, D. A. FOXP3+ Regulatory T cells in the human immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 7, p. 490-500, 2010.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 531–562, 2004.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; SAKIHAMA, T.; ITOH, M.; KUNIYASU, Y.; NOMURA, T.; TODA, M.; TAKAHASHI, T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 182, p. 18-32, 2001.

SALLUSTO, F.; CELLA, M.; DANIELI, C.; LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 389–400, 1995.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SAXON, A.; FELDHAUS, J.; ROBINS, R. A. Single step separation of human T and B cells using AET treated srbc rosettes. **J. Immunol. Methods**, v. 12, n. 3–4, p. 285–288, 1976.

SCHEINECKER, C., MCHUGH, R., SHEVACH, E. M., GERMAIN, R. N. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 1079–1090, 2002.

SCHEINECKER, C., MCHUGH, R., SHEVACH, E. M., GERMAIN, R. N. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 1079–1090, 2002.

SCHUBERT, L. A.; JEFFERY, E.; ZHANG, Y.; RAMSDELL, F.; ZIEGLER, S. F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 37672–37679, 2001.

SCHULZ, O.; EDWARDS, A. D.; SCHITO, M.; ALIBERTI, J.; MANICKASINGHAM, S.; SHER, A.; REIS E SOUSA, C. CD40 triggering of heterodimeric IL-12p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. **Immunity**, v. 13, p. 453–462, 2000.

SCHWARTZ, R. H. T cell anergy. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 305–334, 2003.
SERBINA NV, JIA T, HOHL TM, PAMER EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 421-452, 2008.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 2, p. 116–126, 2002.

SHEVACH, E. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 6, p. 389-400, 2002.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 636-645, 2009.

SMITH, W.; FELDMANN, M.; LONDEI, M. Human macrophages induced in vitro by macrophage colony-stimulating factor are deficient in IL-12 production. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 8, p. 2498-2507, 1998.

STEINBRINK, K.; WOLFT, M.; JONULEIT, H.; KNOP, J.; ENK, A. H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 159, p. 4772–4780, 1997.

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

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic Dendritic Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 685–711, 2003.

STEINMAN, R. M.; TURLEY, S.; MELLMAN, I.; INABA, K. The Induction of Tolerance by Dendritic Cells That Have Captured Apoptotic Cells. **J. Exp. Med.**, v. 191, n. 2, p. 411–416, 2000.

STEINMAN, R.M.; IDOYAGA, J. Features of the dendritic cell lineage. **Immunol. Rev.**, v. 234, n. 1, p. 5–17, 2010.

SULLIVAN, B. M.; JUEDES, A.; SZABO, S. J.; VON HERRATH, M.; GLIMCHER, L. H. Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 100, p. 15818–15823, 2003.

SZABO, S. J.; SULLIVAN, B. M.; PENG, S. L.; GLIMCHER, L. H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 713–758, 2003.

TATO, C. M.; O'SHEA, J. J. Immunology: what does it mean to be just 17? **Nature**, v. 441, p. 166–168, 2006.

THIELE, D. L.; LIPSKY, P. E. Apoptosis is induced in cells with cytolytic potential by L-leucyl-L-leucine methyl ester. **J. Immunol.**, v. 148, n. 12, p. 3950–3957, 1992.

THORNTON, A. M.; SHEVACH, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 287–296, 1998.

THORNTON, A. M.; SHEVACH, E. M. Suppressor effector function of CD4+CD25+immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. **J. Immunol.**, v.164, p.183–190, 2000.

THURNER B, RÖDER C, DIECKMANN D, HEUER M, KRUSE M, GLASER A, KEIKAVOUSSI P, KÄMPGEN E, BENDER A, SCHULER G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. **J. Immunol. Methods**, v. 223, n. 1, p. 1–15, 1999.

TIVOL, E. A.; BORRIELLO, F.; SCHWEITZER, A. N.; LYNCH, W. P.; BLUESTONE, J. A.; SHARPE, A. H. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. **Immunity**, v. 3, n. 5, p. 541–547, 1995.

TOMIYOSHI, M. Y.; SAKAI, M.; BALEEIRO, R. B.; STANKEVICIUS, D.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J.; BARBUTO, J. A. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain Behav. Immun.**, v. 23, n. 4, p. 558-567, 2009.

TORRES-AGUILAR, H.; AGUILAR-RUIZ, S.; GONZALEZ-PEREZ, G.; MUNGUÍA, R.; BAJAÑA, S.; MERAZ-RIOS, M. A.; SANCHEZ-TORRES, C. Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory CD4⁺ T Cells. **J. Immunol.**, v. 184, n. 4, p. 1765-1775, 2010.

VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 9, p. 697–709, 2003.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGF[β] in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, p. 179–189, 2006.

VERHASSELT, V., VOSTERS, O., BEUNEU, C., NICAISE, C., STORDEUR, P., GOLDMAN, M. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4^{pos} T cells by human mature autologous dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 762–772, 2004.

VERRECK, F.A.; DE BOER, T.; LANGENBERG, D. M.; HOEVE, M. A.; KRAMER, M.; VAISBERG, E.; KASTELEIN, R.; KOLK, A.; DE WAAL-MALEFYT, R.; OTTENHOFF, T. H. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 101, n. 13, p. 4560-4565, 2004.

VIEIRA, P. L.; DE JONG, E. C.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L.; KALINSKI, P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. **J. Immunol.**, v. 164, p. 4507–4512, 2000.

VILLADANGOS, J. A.; SCHNORRER, P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 7, p. 543-555, 2007.

VOEHRINGER, D.; REESE, T. A.; HUANG, X.; SHINKAI, K.; LOCKSLEY, R. M. Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 1435–1446, 2006.

WANG, K.; ZHOU, Q.; GUO, A. L.; XU, C. R.; AN, S. J.; WU, Y. L. An autologous therapeutic dendritic cell vaccine transfected with total lung carcinoma RNA stimulates cytotoxic T lymphocyte responses against non-small cell lung cancer. **Immunol. Invest.**, v. 38, n. 7, p. 665-80, 2009.

WATERHOUSE, P.; PENNINGER, J. M.; TIMMS, E.; WAKEHAM, A.; SHAHINIAN, A.; LEE, K. P.; THOMPSON, C. B.; GRIESSER, H.; MAK, T. W. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. **Science**, v. 270, n. 5238, p. 985–988, 1995.

WILSON, N. S.; EL-SUKKARI, D.; VILLADANGOS, J. A. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. **Blood**, v. 103, p. 2187–2195, 2004.

XU, W.; SCHLAGWEIN, N.; ROOS, A.; VAN DEN BERG, T. K.; DAHA, M. R.; VAN KOOTEN, C. Human peritoneal macrophages show functional characteristics of M-CSF-driven anti-inflammatory type 2 macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 6, p. 1594-1599, 2007.

YANAGIHARA, S.; KOMURA, E.; NAGAFUNE, J.; WATARAI, H.; YAMAGUSHI, Y. EB11/ CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3096–3102, 1998.

YOUNG, J. W.; KOULOVA, L.; SOERGEL, S. A.; CLARK, E. A.; STEINMAN, R. M.; DUPONT, B. The B7/ BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 90, p. 229–237, 1992.

ZHENG, W.; FLAVELL, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. **Cell**, v. 89, p. 587–596, 1997.

ZHOU L. J.; TEDDER, T. F. Human blood dendritic cells selectively Express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. **J. Immunol.**, v. 154, n. 8, p. 3821–3835, 1995.

ZHU, J.; MIN, B.; HU-LI, J.; WATSON, C. J.; GRINBERG, A.; WANG, Q.; KILLEEN, N.; URBAN, J. F. JR.; GUO. L.; PAUL, W. E. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in TH1-TH2 responses. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 1157–1165, 2004.

ZOUALI, M. B lymphocytes – chief players and therapeutic targets in autoimmune diseases. **Front Biosci.**, v. 13, p. 4852–4861, 2008.

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](#)