

GILBERTO MOREIRA PIASSA FILHO

**Avaliação da proliferação de linfócitos T CD8⁺ por células dendríticas
desafiadas com pró-oxidantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2010

GILBERTO MOREIRA PIASSA FILHO

**Avaliação da proliferação de linfócitos T CD8⁺ por células dendríticas
desafiadas com pró-oxidantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra Marilene Demasi

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Piassa Filho, Gilberto Moreira.

Avaliação da proliferação de linfócitos T CD8⁺ por células dendríticas desafiadas com pró-oxidantes / Gilberto Moreira Piassa Filho. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Marilene Demasi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioquímica e imunologia

Versão do título para o inglês: Assessment of T CD8⁺ lymphocytes proliferation by dendritic cells challenged with pro-oxidants.

Descritores: 1. Biotecnologia 2. Bioquímica 3. Imunologia I. Demasi, Marilene II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0129/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Gilberto Moreira Piassa Filho.

Título da Dissertação: Avaliação da proliferação de linfócitos T CD8⁺ por células dendríticas desafiadas com pró-oxidantes.

Orientador(a): Marilene Demasi.

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



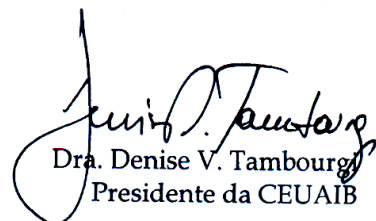
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

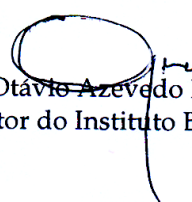
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº **362/06**, sobre o projeto intitulado "Efeito de estímulo oxidativo e do estado redox do imunoproteassomo na geração de peptídeos para apresentação por complexos de histocompatibilidade do tipo I em células dendríticas: implicações da modulação redox do imunoproteassomo", sob a responsabilidade de Marilene Demasi e Gilberto Piassa Filho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **13/03/2007**.

São Paulo, 16 de março de 2007.


Dra. Denise V. Tambourgs
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

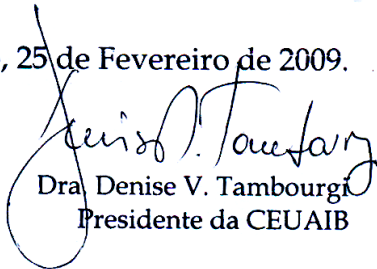
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 362/06, sobre o projeto intitulado "Efeito de estímulo oxidativo e do estado redox do imunoproteassomo na geração de peptídeos para apresentação por complexos de histocompatibilidade do tipo I em células dendríticas: implicações da modulação redox do imunoproteassomo", sob a responsabilidade de Marilene Demasi e Gilberto Piassa Filho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/03/2007 .

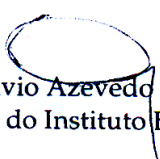
A vigência do projeto foi alterada, atendendo a solicitação da pesquisadora responsável, em 02/2009.

Vigência do Projeto: 03/2007 – 12/2009	Nº de animais/espécie
Laboratório de Bioquímica	90 / camundongos/C57Bl/6

São Paulo, 25 de Fevereiro de 2009.


Dra Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Dedico este trabalho aos meus pais, Gilberto e Nisabel, que estiveram comigo nesta nova etapa da minha vida, apoiando-me e dando forças nas horas boas e ruins. Vocês são a fonte de inspiração da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Marilene pela oportunidade de realizar um trabalho interessante e pela contribuição no meu aprendizado científico.

Aos meus amigos Gustavo, Angelino, Beatriz, Francisco, Adrian, Patrícia, Daniele e Vanessa pela ajuda em diversos experimentos, discussões relacionadas ao trabalho e também pelo companheirismo ao longo dos anos. Fizeram-me companhia em festas, jogos de futebol, baladas, restaurantes e em outras atividades “extra-laboratoriais”. Pessoas que tornam o dia a dia da bancada mais feliz e fazem com que a palavra “zagueirão” seja motivo de risada sempre.

À Fernanda, que principalmente na reta final e decisiva do trabalho, me apoiou, ajudou e me ensinou muita coisa na vida. Obrigado pelo companheirismo e atenção.

Ao prof. Dr. Emer Suavinho Ferro por me acolher em seu laboratório. Aos novos amigos: Lilian, Denise e ao Leandro, que com muita paciência me apresentou ao mundo da cultura celular. Eu dei muitas risadas com vocês.

À Sayami e Vilma que fizeram algumas doações de camundongos.

Ao profs. Dr. Rui Curi, Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho e Dr. Jorge Mario da Costa Ferreira Junior pela ajuda com alguns experimentos de FACS.

À Dra Ana Carolina Ramos Moreno que me ajudou com alguns experimentos de FACS.

Ao prof. Dr. Célio Lopes Silva que me recebeu em seu laboratório.

À Dra Patrícia Rodrigues Marques de Souza que me ajudou com os experimentos de co-cultura de células.

Aos amigos Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria e Cléber pela ajuda nos experimentos de FACS.

Ao prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto e ao pessoal do seu laboratório: Bruno, Rodrigo, Isabella e Lilian pela ajuda com alguns experimentos de FACS.

A todo o pessoal do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

À minha família em São Paulo: Geraldo, Mary, e aos meus queridos irmãozinhos Renan, Ivan e Bibi.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“A melhor forma de prever o futuro é inventá-lo”

Alan Kay

RESUMO

PIASSA-FILHO, G. M. **Avaliação da proliferação de linfócitos T CD8⁺ por células dendríticas desafiadas com pró-oxidantes.** 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As células dendríticas são as apresentadoras de antígenos mais eficazes para iniciar resposta primária de linfócitos T. Quando internalizado, o antígeno é processado gerando peptídeos que serão apresentados por complexos de histocompatibilidade do tipo I e II. Na via dos complexos de histocompatibilidade do tipo I em células dendríticas, os antígenos protéicos no citoplasma são processados pelo imunoproteassomo. Uma vez que células dendríticas estão nativamente expostas a uma série de agentes estressores incluindo os pró-oxidantes, nosso objetivo neste trabalho foi examinar o efeito de pró-oxidantes em células dendríticas para posterior avaliação da proliferação de linfócitos T CD8⁺. É importante salientar que nosso foco de interesse foi o sistema ubiquitina-proteassomo, responsável pela geração de peptídeos para a apresentação antigênica por moléculas de MHC do tipo I. Os resultados mostram que o sistema xantina/xantina oxidase, que gera o íon radical superóxido, promoveu um aumento significativo da proliferação de linfócitos após a co-cultura de células dendríticas tratadas com esse sistema e linfócitos T CD8⁺ isolados de camundongos previamente imunizados com DNA-HSP65. Além disso, o sistema xantina/xantina oxidase foi mais eficiente em promover a maturação de células dendríticas quando comparado ao lipopolissacarídeo bacteriano, LPS. Por outro lado, a incubação de DCs com o sistema xantina/xantina oxidase promoveu uma queda da atividade catalítica do imunoproteassomo em relação às células dendríticas incubadas com LPS, sugerindo que o aumento da proliferação de linfócitos não está diretamente relacionado à atividade catalítica do imunoproteassomo. Adicionalmente, a incubação de células dendríticas com o sistema xantina/xantina oxidase não alterou a expressão protéica da subunidade catalítica 20S, da unidade regulatória 19S ou de umas das subunidades do imunoproteassomo denominada β5i. Em relação a modulações positivas, foi observado um aumento na expressão da unidade regulatória 11S assim como um aumento no conteúdo de proteínas poli-ubiquitinadas. Nossa hipótese é de que a unidade 11S se acoplaria ao PT20S deslocando a unidade 19S, promovendo o acúmulo de proteínas poli-ubiquitinadas, acarretando, ainda, o direcionamento de mais fragmentos para a apresentação antigênica, através de uma ligação direta com o transportador associado ao processamento de antígenos (TAP). Esta ligação direta entre unidade 11S e TAP transferiria os peptídeos gerados pelo

proteassomo diretamente para o transportador protegendo-os da degradação por peptidases citosólicas, aumentando então a eficiência de apresentação de oligopeptídeos antigênicos nos complexos de histocompatibilidade.

Palavras-chave: Sistema xantina/xantina oxidase. Imunoproteassomo. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estresse oxidativo. Proliferação de linfócitos.

ABSTRACT

PIASSA-FILHO, G. M. **Assessment of T CD8⁺ lymphocytes proliferation by dendritic cells challenged with pro-oxidants**. 2010. 90 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Dendritic cells are the most effective antigen presenting cells in starting primary response of T lymphocytes. Once internalized, the antigen is processed generating peptides that are presented on the cell surface by the major histocompatibility complex type I and II. In order to be presented by the major histocompatibility complex type I, the cytosolic protein antigens must be processed by the immunoproteasome. Since dendritic cells are natively exposed to a variety of stress agents including pro-oxidants, our goal in this study was to examine the effect of pro-oxidants in dendritic cell-induced T CD8⁺ lymphocyte proliferation. It is worth mentioning that our focus of interest is the ubiquitin-proteasome system since it generates the antigenic peptides presented by MHC type I. We found that the co-culture of dendritic cells previously incubated with xanthine/xanthine oxidase system, a source of superoxide ion, with T CD8⁺ lymphocytes isolated from mice immunized with DNA-HSP65 promoted a pronounced CD8⁺ lymphocyte proliferation. Moreover, xanthine/xanthine oxidase incubation was more efficient in promoting the maturation of dendritic cells compared to the bacterial lipopolysaccharide, LPS. In addition, incubation of DCs with xanthine/xanthine oxidase induced a decrease of immunoproteasome catalytic activity in relation to LPS incubation, suggesting that the increase in lymphocyte proliferation is not directly related to the catalytic activity of immunoproteasome. Xanthine/xanthine oxidase incubation did not alter the protein expression of 20S catalytic subunit, 19S regulatory unit or one of the immunoproteasome subunits: the $\beta 5i$ subunit. As for positive modulation, results show that xanthine/xanthine oxidase incubation increased 11S regulatory unit content as well as the content of poly-ubiquitinated proteins. Together, these results suggest that the incubation of dendritic cells with xanthine/xanthine oxidase promoted increased 11S unit content thus favoring its coupling to 20S catalytic core in detriment of 19S unit, which in turn would increase poly-ubiquitinated protein levels. This increased 20S-11S coupling would direct peptide fragments for antigen presentation, through a putative direct connection between 11S unit and the transporter associated with antigen processing (TAP). In fact, this direct connection would deliver proteasome-generated antigen peptides directly to TAP, protecting them from further

degradation by cytosolic peptidases, consequently increasing the efficiency of histocompatibility complex molecules loading with antigen peptides.

Key words: Xanthine/xanthine oxidase system. Immunoproteasome. Reactive oxygen and nitrogen species. Oxidative stress. Lymphocyte proliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	O ciclo de vida das DCs.....	24
Figura 2.	Formação do complexo MHC I-peptídeo na superfície de DCs.....	27
Figura 3.	Estrutura do PT20S de mamífero.....	28
Figura 4.	Quantidade citosólica relativa de proteassomos híbridos em células HeLa.....	29
Figura 5.	Os três estágios de oxidação protéica.....	32
Figura 6.	Células dendríticas diferenciadas com o fator GM-CSF e células pluripotentes cultivadas na ausência do fator GM-CSF.....	49
Figura 7.	Representação de um experimento de FACS para avaliação da presença do marcador CD11c.....	50
Figura 8.	Expressão de CD11c.....	51
Figura 9.	Espectros de FACS representativos de um experimento com os marcadores de superfície CD11c e CD86.....	52
Figura 10.	Expressão dos marcadores de superfície CD11c e CD86.....	52
Figura 11.	Espectros de FACS representativos de um experimento de viabilidade celular.....	54
Figura 12.	Viabilidade celular após eletroporação e incubação com LPS.....	54
Figura 13.	Espectros de FACS representativos de um experimento de proliferação de linfócitos T CD8 ⁺ em co-cultura com DCs desafiadas com pró-oxidantes e eletroporadas com Hsp65 nativa e oxidada	57
Figura 14.	Proliferação de linfócitos T CD8 ⁺ em co-cultura com DCs desafiadas com pró-oxidantes e eletroporadas com Hsp65 nativa e oxidada.....	58
Figura 15.	Espectros de FACS representativos de um experimento de proliferação de linfócitos T CD8 ⁺ em co-cultura com DCs imaturas.....	59
Figura 16.	Proliferação de linfócitos T CD8 ⁺ em co-cultura com DCs imaturas.....	60
Figura 17.	Espectros de FACS representativos de um experimento relacionado ao efeito do sistema XaXO na maturação de DCs.....	61

Figura 18.	Efeito do sistema XaXO na maturação de DCs	62
Figura 19.	Espectros de FACS representativos da marcação de DCs com o anticorpo anti-MHC II-FITC	63
Figura 20.	Expressão de MHC II em DCs	63
Figura 21.	Viabilidade celular de DCs incubadas com LPS ou XaXO	64
Figura 22.	Viabilidade celular após eletroporação e incubação com LPS ou XaXO.....	65
Figura 23.	Quantificação das atividades peptidásicas do tipo tripsina e quimiotripsina do IP em extrato de DCs	66
Figura 24.	Imunomarcção com o anticorpo anti-ubiquitina no conteúdo de proteínas totais do extrato celular	67
Figura 25.	Ensaio de imunomarcção com os anticorpos anti-20S, anti-19S, anti- β 5i e anti-11S em extrato de DCs	68
Figura 26.	Ensaio de imunomarcção com os anticorpos anti-GSH e anti-nitrotirosina em extrato de DCs	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Plaqueamento inicial de monócitos e cultivo de DCs.....	48
Tabela 2 -	Determinação de densidade óptica (DO).....	69

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Geração do pró-oxidante peroxinitrito	70
------------	---------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	células apresentadoras de antígenos
ATP	trifosfato de adenosina
BSA	albumina do soro bovino
ChT-L	atividade do tipo-quimiotripsina
CON-A	concanavalina A
CSFE	<i>5,6-carboxy-succinimidyl-fluorescein-ester</i>
DCs	células dendríticas
DO	densidade óptica
EDTA	ácido etilendiamino tetra-acético
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	fator estimulante de colônias de macrófago-granulócito
GSH	glutathiona reduzida
Hsp65	<i>heat shock protein 65</i>
IFN	<i>interferon</i>
IP	imunoproteassomo
LPS	lipopolissacarídeo

MF	macrófagos
MHC I	complexos de histocompatibilidade do tipo I
MHC II	complexos de histocompatibilidade do tipo II
NK	células <i>natural killer</i>
NO [•]	óxido nítrico
O ₂	oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	íon radical superóxido
ONOO ⁻	peroxinitrito
OH [•]	radical hidroxila
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PE	ficoeritrina
PrOxI	<i>Protein Oxidation and Immunoproteasome Hypothesis</i>
PT	proteassomo
PT20S	unidade catalítica do proteassomo denominada 20S
PT26S	unidade 20S acoplada a duas unidades 19S
RE	retículo endoplasmático
RNS	espécies reativas de nitrogênio
ROS	espécies reativas de oxigênio

SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida, com o agente denaturante dodecil sulfato de sódio
TAP	transportador associado ao processamento de antígenos
TB	tuberculose
TFA	ácido trifluoroacético
T-L	atividade do tipo-tripsina
XaXO	sistema xantina/xantina oxidase
11S	complexo regulatório 11S
19S	complexo regulatório 19S

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Células dendríticas	23
<i>1.1.1</i>	<i>Obtenção de células dendríticas</i>	25
1.2	MHC	25
<i>1.2.1</i>	<i>MHC I</i>	26
1.3	Proteassomo	27
<i>1.3.1</i>	<i>Atividade do PT</i>	29
<i>1.3.2</i>	<i>Localização subcelular do PT</i>	30
<i>1.3.3</i>	<i>Produção de peptídeos para apresentação antigênica</i>	30
1.4	Metabolismo oxidativo	31
1.5	Oxidação protéica	31
<i>1.5.1</i>	<i>Degradação de proteínas oxidadas pelo PT20S</i>	33
<i>1.5.2</i>	<i>Localização intracelular do PT20S e degradação de proteínas oxidadas</i>	34
1.6	Hsp65 (Heat-Shock Proteins)	34
2	OBJETIVOS	36
2.1	Modelos para alteração do estado redox intracelular	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Animais	38
3.2	Extração da medula óssea	38
3.3	Células secretoras de GM-CSF	38

3.3.1	<i>Crescimento das células NIH/3T3</i>	39
3.4	Diferenciação da cultura celular com GM-CSF	39
3.5	Eletroporação das DCs	40
3.6	Citometria de Fluxo (FACS)	40
3.7	Obtenção do extrato celular	41
3.8	Oxidação da Hsp65	41
3.9	Ensaio de imunomarcação	42
3.10	Determinação da atividade hidrolítica dos PTs 20S e 26S em extrato de DCs	42
3.11	Modelos para a alteração do estado redox de DCs	43
3.12	Co-cultura	43
3.12.1	<i>Imunização dos animais com DNA-HSP65</i>	43
3.12.2	<i>Obtenção dos linfócitos T</i>	44
3.12.3	<i>Purificação dos linfócitos T CD8⁺</i>	44
3.12.4	<i>Marcação dos linfócitos T CD8⁺ com CFSE (5,6-Carboxy-Succinimidyl-Fluorescein-Ester)</i>	45
3.12.5	<i>Desafio oxidativo</i>	45
3.12.6	<i>Co-cultura de DCs com linfócitos T CD8⁺</i>	45
3.12.7	<i>Co-cultura de DCs imaturas com linfócitos T CD8⁺</i>	46
3.13	Viabilidade celular	46
3.14	Análise estatística	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Obtenção de células dendríticas	47

4.2	Avaliação da diferenciação de DCs a partir do marcador de superfície CD11c	50
4.3	Avaliação do estado de maturação das DCs a partir do anticorpo anti-CD86.....	51
4.4	Eletroporação das células dendríticas e avaliação da viabilidade celular.....	53
4.5	Proliferação de linfócitos T CD8 ⁺ após co-cultura com DCs desafiadas com pró-oxidantes.....	55
4.6	Maturação de DCs pelo sistema xantina/xantina oxidase.....	60
4.7	Atividade catalítica do proteassomo em células dendríticas submetidas à maturação com LPS e com o sistema XaXO.....	65
4.8	Determinação do conteúdo de proteínas poli-ubiquitinadas e do conteúdo intracelular de proteassomo (20S e IP) e unidades regulatórias (19S e 11S).....	67
4.8.1	<i>Modificações protéicas pós-traducionais dependentes do estado redox intracelular.....</i>	70
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células dendríticas

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos mais eficientes quando comparadas a linfócitos B e macrófagos, sendo capazes de apresentar peptídeos ligados às moléculas dos complexos de histocompatibilidade do tipo I (MHC I) e complexos de histocompatibilidade do tipo II (MHC II), iniciando assim a resposta primária de linfócitos T. Estas células foram descobertas por Steinman e Cohn em 1973 (STEINMAN, 2007) que as identificaram em órgãos linfóides de camundongos, descrevendo-as como células que apresentavam um tamanho acima do habitual e com capacidade de aderência e extensões únicas de dendritos. Por isso foram chamadas de dendríticas.

As DCs se originam na medula óssea a partir da célula-tronco hematopoiética pluripotente que, por diferenciação sucessiva, dá origem ao monócito. Este, por sua vez, se diferencia em célula dendrítica imatura no tecido epitelial e, após o processo de maturação, migra para os linfonodos. As DCs em seu estado imaturo estão localizadas em tecidos periféricos, particularmente em locais de interface com o meio externo, tais como pele e mucosa, onde formam um sistema de vigilância que tem como objetivo detectar e capturar antígenos externos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; CELLA; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1997; COCHAND et al., 1999; HOLT; SCHON-HEGRAD; MCMENARMIM, 1989). As DCs imaturas expressam receptores de membrana que se ligam aos antígenos: receptores de manose que atuam na ligação e ingestão de microorganismos e receptores *Toll* que atuam na ativação de fagócitos e resposta a diferentes tipos e componentes celulares.

Componentes bacterianos e virais assim como citocinas inflamatórias induzem a maturação das DCs, que passam a expressar moléculas co-estimulatórias (CD11 e CD86) tornando-se eficientes apresentadoras antigênicas e ativadoras de linfócitos T (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; CELLA; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1997). As DCs então migram até os linfonodos para iniciar uma resposta imune onde se concentram em áreas ricas em linfócitos T (DIEU et al., 1998). A maturação das DCs faz com que elas percam sua adesividade para epitélios e comecem a expressar o receptor de quimiocinas CCR7, específico para quimiocinas produzidas nas zonas de linfócitos T dos linfonodos. Os linfócitos T não expostos a antígenos também expressam CCR7 e por isso migram para a

mesma região das DCs nos linfonodos (BANCHEREAU et al., 2000). O esquema completo, desde a captura de antígenos até a resposta dos linfócitos, está demonstrado na figura 1 (BANCHEREAU et al., 2000).

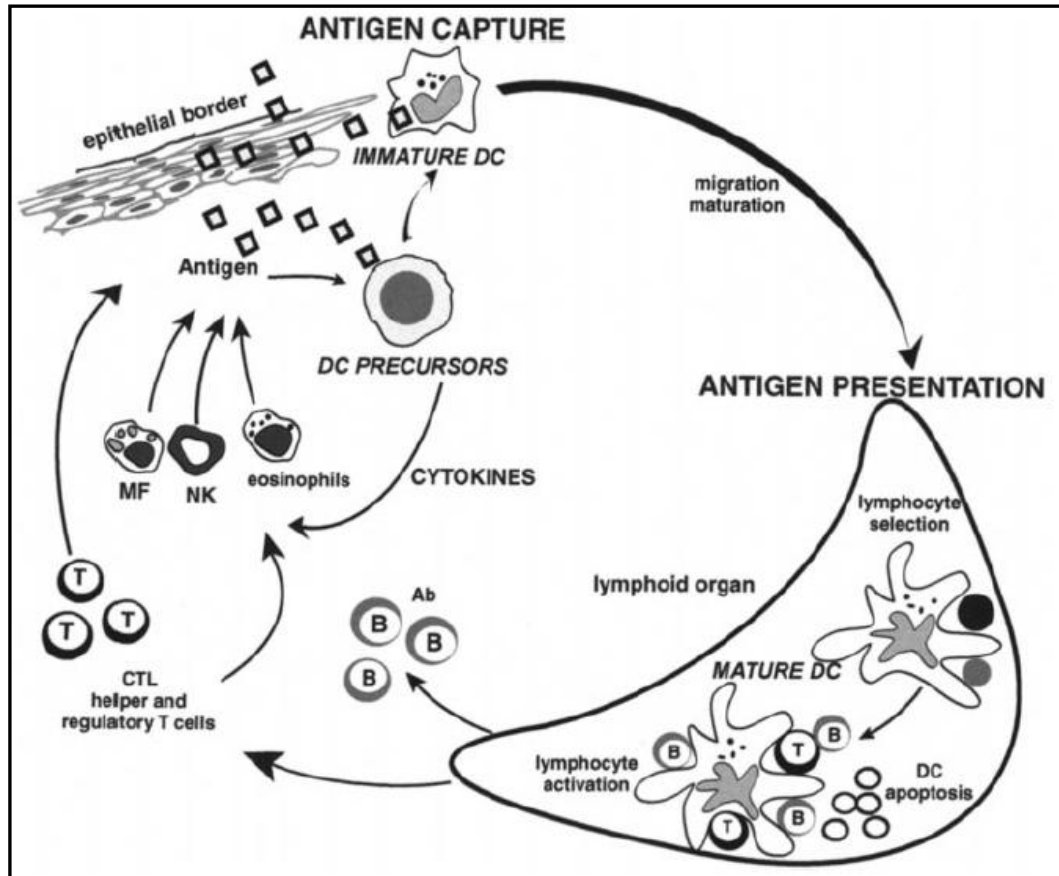


Figura 1. O ciclo de vida das DCs. DCs imaturas precursoras entram nos tecidos. Elas podem então, encontrar patógenos (p.ex. vírus) que induzem a secreção de citocinas (p. ex. $IFN\alpha$), as quais podem ativar eosinófilos, macrófagos (MF) e células *natural killer* (NK). Após a captura do antígeno, as DCs imaturas migram até os órgãos linfóides onde, após maturação, elas apresentam peptídeos ligados a complexos MHC, os quais permitem a seleção de linfócitos específicos aos antígenos. As células T auxiliares secretam citocinas, as quais permitem a ativação de macrófagos, células NK e eosinófilos. As células T citotóxicas lisam as células infectadas. Após entrarem em contato com as células T e DCs, as células B são ativadas e migram em diversas áreas do organismo onde elas se maturam e se transformam em plasmócitos, os quais produzem anticorpos que neutralizam o patógeno inicial. Acredita-se que, após a interação com linfócitos, as DCs são eliminadas por apoptose.

Fonte: Banchereau et al. et al. (2000).

1.1.1 Obtenção de células dendríticas

As DCs imaturas podem ser diferenciadas e cultivadas *in vitro* a partir de monócitos com a utilização do fator estimulante de colônias de macrófago-granulócito (GM-CSF) como descrito na literatura (INABA et al., 1992a; LUTZ et al., 1999; OHL et al., 2004; SCHEICHER et al., 1992; SCHÜLER; BLANKSTEIN, 2002). As DCs imaturas podem ser maturadas com a utilização de produtos bacterianos como os lipopolissacarídeos (LPS) ou citocinas, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α ; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994).

A maturação das DCs é uma etapa essencial no estudo destas células uma vez que apenas as DCs maduras são capazes de apresentar antígenos eficientemente (SALLUSTO et al., 1995). Num organismo vivo, as DCs apresentam-se em muito baixa concentração para serem isoladas, por isso sua geração é feita *in vitro*, permitindo a obtenção de maiores quantidades de célula, necessárias para o estudo de sua morfologia e função (LUTZ et al., 1999), além de possibilitar sua utilização em imunoterapia (SILVA et al., 1999).

A partir do sangue total de um camundongo, com a utilização do fator GM-CSF, podem ser geradas 1×10^6 DCs (INABA et al., 1992a). Entretanto, precursores de medula óssea tratados com GM-CSF, após 6-8 dias podem gerar 5×10^6 DCs por camundongo (INABA et al., 1992b; INABA et al., 1993; SCHEICHER et al., 1992; YAMAGUCHI et al., 1997). Lutz et al. (1999) descrevem uma metodologia para a obtenção de DCs de camundongos a partir de precursores hematopoiéticos, amplamente utilizada por diversos grupos de pesquisa. Segundo este método é possível obter $1-3 \times 10^8$ DCs por camundongo (a partir da medula de dois fêmeas) após 10-12 dias, um aumento de 50x em comparação aos métodos tradicionais descritos anteriormente.

1.2 MHC

Os complexos MHC (*Major Histocompatibility Complex*) têm a função de apresentar antígenos produzidos por células apresentadoras de antígenos (APCs) para serem reconhecidos pelos linfócitos T. O MHC I apresenta peptídeos aos linfócitos T CD8⁺ e o MHC II aos CD4⁺.

O MHC foi descoberto no ano de 1940, por Snell e colaboradores (BENACERRAF, 1978; DAUSSET, 1973; SNELL, 1957) utilizando técnicas genéticas para analisar processos

de rejeição tumoral e de órgãos transplantados entre linhagens distintas de camundongos. Vinte anos após a descoberta do MHC, sua única função documentada era aquela relativa ao processo de rejeição observado em transplantes cirúrgicos. Posteriormente, se verificou que os genes MHC eram fundamentais para todas as respostas imunológicas a antígenos protéicos.

O complexo MHC é constituído por duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente que formam uma fenda extracelular onde se ligam os peptídeos processados, além de um par de domínios semelhantes a imunoglobulinas. O complexo MHC-peptídeo ancora-se na membrana celular por meio de domínios transmembrânicos.

Os receptores de antígenos CD8 e CD4 de células T interagem com os peptídeos apresentados e com as α -hélices das moléculas do complexo MHC. Estes receptores, também conhecidos como co-receptores, são expressos por populações distintas de linfócitos T maduros. O receptor CD8 liga-se seletivamente às moléculas MHC I e o CD4 às MHC II.

1.2.1 MHC I

Na via do MHC I, os antígenos protéicos no citoplasma são processados pelo proteassomo (PT) gerando peptídeos com 7-9 resíduos de aminoácidos. Estes peptídeos são então transportados para o retículo endoplasmático (RE) pelo Transportador associado ao Processamento de Antígenos (TAP) onde são ligados às moléculas de MHC I. As moléculas de MHC I-peptídeo se movimentam através do complexo de Golgi e são transportadas por vesículas para a superfície das células, onde ocorre o reconhecimento pelos linfócitos T CD8⁺. Esse processo é exclusivo de proteínas intracelulares e virais, mas exceções também são descritas quanto a alguns protozoários e algumas bactérias, p. ex. *Micobacterium leprae* e *tuberculosis* (BANCHEREAU et al., 2000 – Figura 2).

O complexo MHC I é expresso em praticamente todas as células nucleadas (citocinas como os interferons; IFN- α , IFN- β e IFN- γ aumentam a expressão do complexo MHC-I).

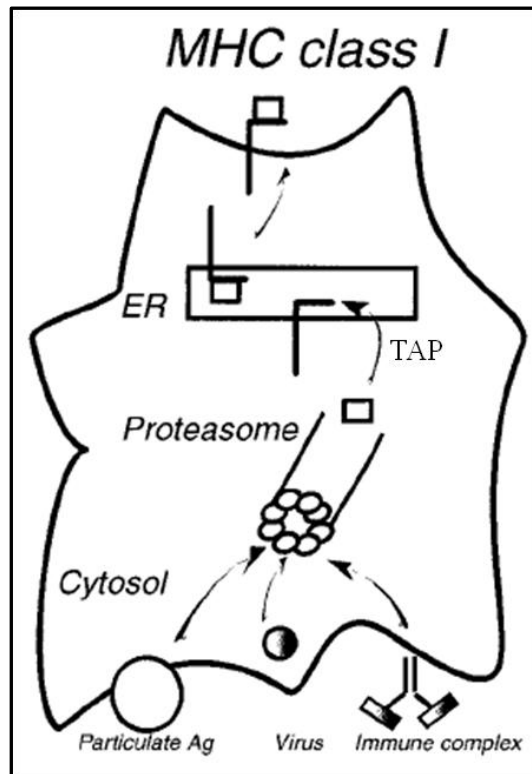


Figura 2. Formação do complexo MHC I-peptídeo na superfície de DCs. Além da via endógena clássica que gera peptídeos a partir de proteínas e antígenos intracelulares, as DCs também podem gerar antígenos para serem apresentados pelos complexos MHC I através de vias exógenas com peptídeos originados através de antígenos particulados ou complexos imunes fagocitados. Os peptídeos são gerados pelo PT, transferidos até o RE pela TAP, e ligados as moléculas do MHC I. Em seguida o complexo MHC I-peptídeo é transportado até a superfície celular.

Fonte: Banchereau et al. (2000).

1.3 Proteassomo

O PT é um sistema proteolítico essencial em células eucarióticas sendo responsável por 80% da degradação de proteínas intracelulares. Este complexo catalítico ocupa papel central na regulação celular, processamento antigênico e é também essencial para a eliminação de proteínas que tiveram erro de transcrição/tradução (BOCHTLER et al., 1999; COUX; TANAKA; GOLDBERG, 1996; VOGES; ZWICKL; BAUMEISTER, 1999) e aquelas modificadas oxidativamente (GRUNE et al., 2003). O PT consiste de uma unidade catalítica central denominada de 20S (700 kDa) constituída de sete subunidades α e sete β , constituindo ao todo 14 subunidades, diferentes entre si, dispostas espacialmente em estrutura heptagonal. O centro da unidade 20S é ocupado por 2 heptâmeros idênticos formados por subunidades β e constitui a porção catalítica, sendo que 2 heptâmeros, também idênticos,

formados por subunidades α , flanqueiam o centro catalítico. Este conjunto de cadeias polipeptídicas é denominado de unidade catalítica 20S (JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009 – Figura 3).

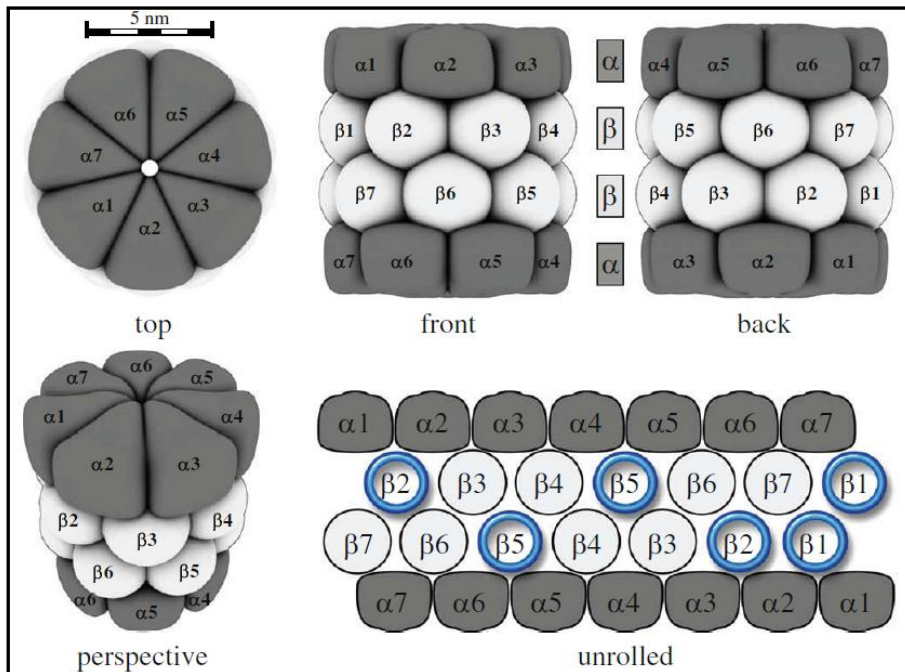


Figura 3. Estrutura do PT20S de mamífero. As imagens da fileira superior (*top*, *front* e *back*) mostram diferentes perspectivas de um modelo estrutural simplificado do arranjo das subunidades do PT20S. As subunidades α estão demonstradas na cor preta e as subunidades β na cor cinza claro. A fileira inferior mostra o mesmo modelo em perspectiva (*perspective*) e a imagem denominada “*unrolled*” mostra uma apresentação das subunidades na forma desdobrada. As 3 subunidades β de cada metade do PT20S ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$) apresentam atividade proteolítica e estão representadas por círculos azuis.

Fonte: Jung, Bader e Grune (2007).

Complexos regulatórios (PA28 ou 11S; PA700 ou 19S) estão acoplados aos terminais da porção central (20S) em orientações opostas (TANAKA, 1998). A porção regulatória 19S tem múltiplos papéis na regulação da atividade catalítica do PT: seleção do substrato (reconhecimento da cadeia de poli-ubiquitina na proteína alvo) assim como a preparação para degradação (desubiquitinação, desdobraimento e translocação para a câmara catalítica (PICKART; VANDEMARK, 2000; WILKINSON et al., 1998). O complexo que inclui a unidade catalítica 20S e unidades regulatórias 19S é denominado de PT 26S (2500 kDa). Vale ressaltar que em células de mamíferos a concentração molar do PT 20S, destituído das unidades regulatórias, supera de duas a três vezes o complexo PT 26S (TANAHASHI et al., 2000 – Figura 4).

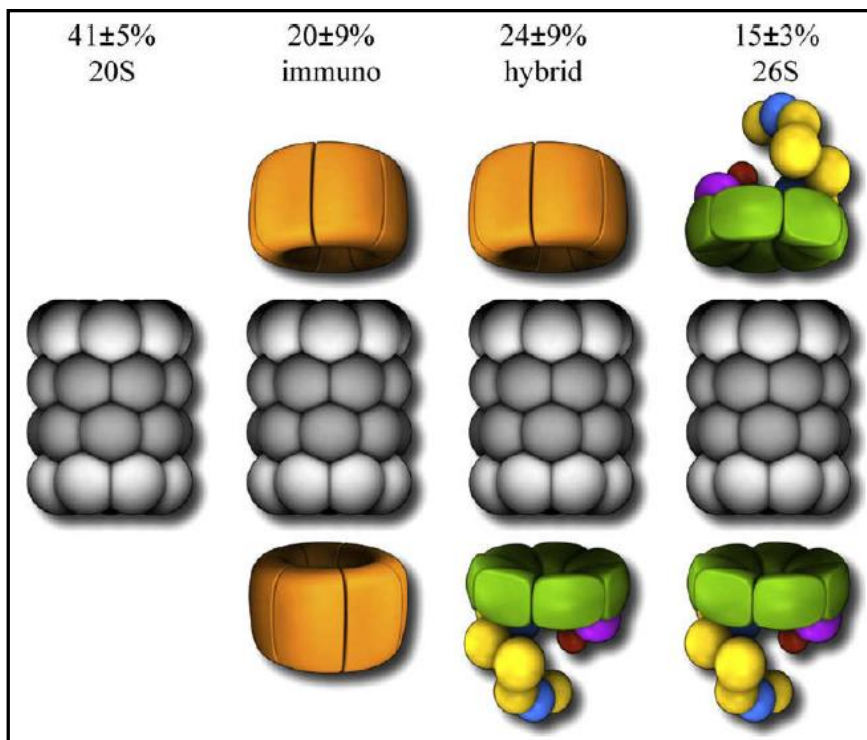


Figura 4. Quantidade citosólica relativa de proteassomos híbridos em células HeLa. A imagem mostra a distribuição relativa do PT20S (da direita para a esquerda) e as diferentes combinações das subunidades regulatórias ligadas ao PT20S. “*Immuno*” indica o IP com suas duas subunidades regulatórias 11S, “*hybrid*” o PT com ambas subunidades (11S e 19S) e “26S” o PT com as duas subunidades regulatórias 19S.
 Fonte: Tanahashi et al. (2000)

1.3.1 Atividade do PT

A atividade catalítica do PT é atribuída a um resíduo terminal de treonina altamente conservado em subunidades β da unidade 20S de células eucarióticas. O PT cliva os substratos em peptídeos que variam em comprimento de 3-23 resíduos de aminoácidos. Esses produtos não se acumulam na célula sendo imediatamente processados por peptidases ou utilizados para a apresentação antigênica. Os peptídeos destinados à apresentação antigênica apresentam de 7-9 resíduos aminoácidos, uma vez que o complexo MHC I acomoda exclusivamente peptídeos com esta variação de tamanho.

1.3.2 Localização subcelular do proteassomo

O PT é abundante no núcleo e citoplasma celular. Estudos de microscopia por imunofluorescência (HIRSCH; PLOEGH, 2000) permitiram a detecção de PT co-localizado com filamentos intermediários no RE. Outros estudos ainda mostraram que o PT também está associado ao centríolo (BADANO; TESLOVICH; KATSANIS, 2005; WIGLEY et al., 1999).

1.3.3 Produção de peptídeos para apresentação antigênica

O PT é o principal responsável em mamíferos pela geração de peptídeos utilizados pelos complexos de MHC I para a apresentação antigênica. O IFN- γ induz a expressão de subunidades β modificadas do PT e de complexos regulatórios. Ocorre assim a substituição das subunidades nativas do PT $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ por LMP2, LMP5 e MECL1 respectivamente, formando a unidade catalítica do imunoproteassomo (IP). Ao IP podem se ligar os complexos regulatórios 19S ou complexos regulatórios 11S. Os complexos 11S têm sua expressão induzida também por IFN- γ , indicando uma ligação com o processo imune (REALINI et al., 1994). A substituição das subunidades β provoca aumento da atividade proteolítica. O IP é constitutivo em DCs diferentemente da grande maioria das células nucleadas onde ele é expresso mediante estímulo por IFN- γ . A diferença entre o IP e o PT reside na eficiência cinética de geração de peptídeos pela clivagem proteica gerando uma maior abundância e diversidade de peptídeos capazes de se associar aos complexos MHC do tipo I (DE VERTEUIL et al., 2010).

A degradação de proteínas oxidadas pelo PT, processo este não-dependente de ubiquitina (SHRINGAPURE et al., 2003), já foi exaustivamente demonstrado por diversos grupos de pesquisa (DAVIES, 2001; PACIFICI; DAVIES, 1990; VARSHAVSKY, 2005). Vale ressaltar que, uma das hipóteses sobre o processo pelo qual proteínas são selecionadas para gerarem peptídeos que serão utilizados na apresentação antigênica envolve oxidação proteica: PrOxI (*Protein Oxidation and Immunoproteasome Hypothesis*; TEOH; DAVIES, 2004), porém nunca foi feita nenhuma demonstração experimental sobre essa possibilidade.

1.4 Metabolismo oxidativo

À medida que a concentração de oxigênio molecular (O_2) aumentou na crosta terrestre, surgiram os organismos aeróbicos. A explosão desses organismos ao longo da evolução ocorreu, muito provavelmente, devido às vantagens de ganho energético em consequência da utilização metabólica do O_2 . Vale lembrar que a quantidade de energia obtida a partir da oxidação de 180g de glicose no metabolismo aeróbico é de 18 ATP *versus* 2 ATP no metabolismo anaeróbico (AUGUSTO, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). No entanto, uma das mais importantes consequências dessa ‘conquista’ evolutiva foi a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), p.ex. o íon radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) gerado durante a respiração mitocondrial. Em organismos superiores, outros sistemas enzimáticos intracelulares também constituem fontes geradoras de ROS (xantina/xantina oxidase; sistema do citocromo P_{450} , NADPH oxidase, resposta imune, dentre outros). Em condições normais do metabolismo celular, essas espécies são geradas em baixas concentrações (JUNG; BADER; GRUNE, 2007). As ROS podem ser tanto espécies radicalares (contendo um elétron desemparelhado), por exemplo, $O_2^{\cdot-}$, radical hidroxila e o óxido nítrico (NO^{\cdot}), como pró-oxidantes, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou peroxinitrito, este derivado da reação de NO^{\cdot} com o $O_2^{\cdot-}$. Dependendo de sua reatividade, as ROS são capazes de reagir e causar dano em componentes celulares, sendo as proteínas um de seus alvos. Como a formação ROS nos sistemas celulares é ininterrupta, mecanismos de defesa antioxidante surgiram durante a evolução com o intuito de proteger as biomoléculas. Esses mecanismos incluem tanto a interação química direta e detoxificação do oxidante por substâncias de baixo peso molecular como ácido ascórbico, vitamina E e glutatona (GSH), assim como processos catalisados por uma variedade de sistemas enzimáticos como as superóxido dismutases, catalases, glutatona peroxidases, tiolperoxidases, dentre muitas outras enzimas.

1.5 Oxidação protéica

Inúmeros resíduos de aminoácido são modificados oxidativamente por distintos processos químicos (DEAN et al., 1997; NASKALSKI; BARTOSZ, 2000; STADTMAN, 1993). A maioria das modificações oxidativas pode acarretar perda de função protéica ou agregação. Isso se deve ao fato de que podem ocorrer modificações em domínios essenciais responsáveis pela função da proteína ou haver perda importante de estruturas secundárias

aumentando a hidrofobicidade superficial protéica o que facilita a agregação (JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009 – Figura 5).

Diferente de outras macro-moléculas, não foi descrito até o momento sistemas de reparo enzimático aos danos oxidativos protéicos, exceção da metionina sulfóxido redutase que repara resíduos oxidados de metionina (ZHANG; WEISSBACH, 2008).

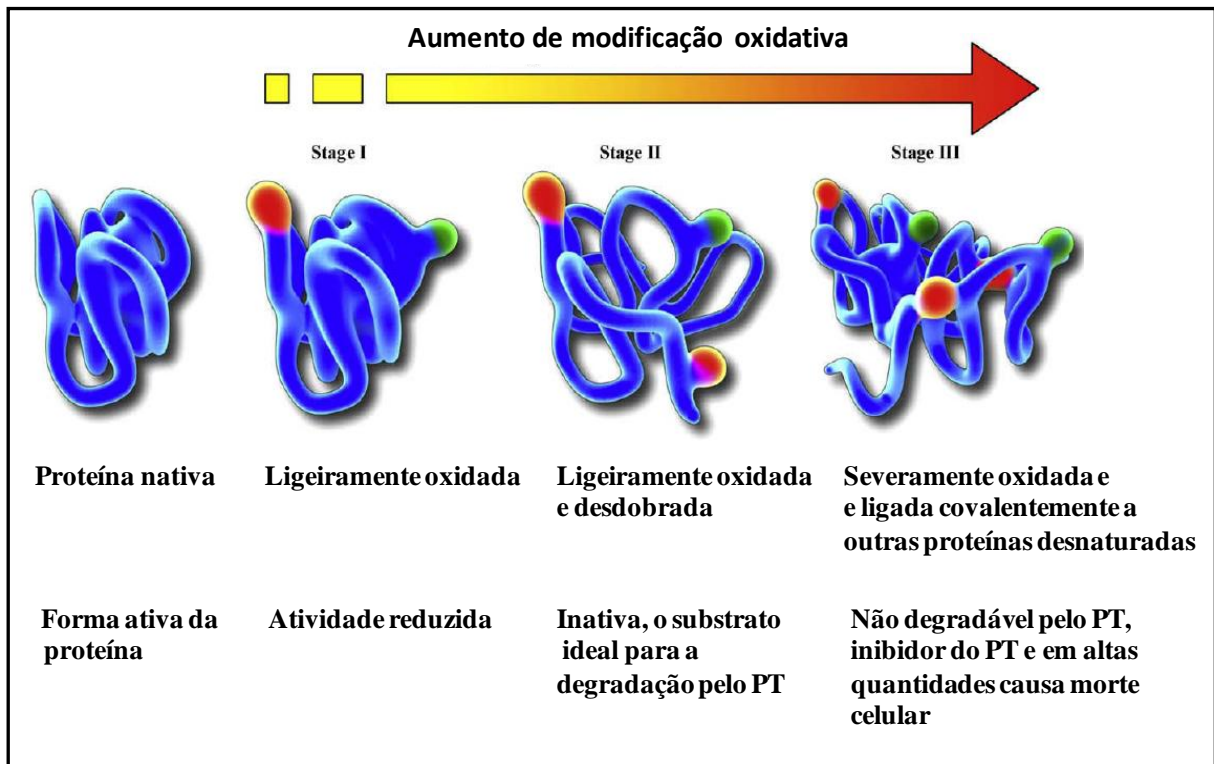


Figura 5. Os três estágios de oxidação proteica. A imagem da esquerda mostra a forma nativa de uma proteína globular completamente funcional. A segunda imagem (a partir da esquerda) a forma ligeiramente oxidada, mostrando que a proteína teve sua atividade reduzida; a modificação oxidativa está indicada pelas bolhas coloridas, representando diferentes modificações, resultado de vias oxidativas distintas (*Stage I*). A próxima imagem mostra a proteína mais oxidada em relação ao estágio anterior e completamente desdobrada (*Stage II*). Neste estágio de oxidação a proteína está inativa e se torna um substrato ideal para a degradação pelo PT. Provavelmente, o sinal para a degradação, se encontra nos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, que em proteínas no seu estado nativo estão dentro da estrutura, mas quando expostos na superfície da proteína são capazes de se ligar as subunidades α do PT. Se neste estágio de oxidação a proteína não for degradada, ela pode ainda ser mais oxidada e se ligar covalentemente a outras proteínas com estágios similares de modificação (*Stage III*).

Fonte: Jung, Catalgol e Grune (2009).

1.5.1 Degradação de proteínas oxidadas pelo PT20S

A degradação protéica é determinante para a manutenção da homeostase celular. O sistema ubiquitina-PT é responsável pela degradação de proteínas de meia-vida ultra-curta, curta e média, que representam aproximadamente 80% do conteúdo protéico intracelular. Somente o PT26S (19S-20S-19S ou formas híbridas 19S-20S-11S) é capaz de degradar proteínas ubiquitinadas. Proteínas com erro de dobramento, desnaturadas ou danificadas, de maneira geral, são degradadas pelo PT tanto por processo dependente quanto independente de ubiquitinação (este último, degradação pelo PT20S destituído de unidades regulatórias 19S). A degradação seletiva pelo PT20S de proteínas oxidadas tem sido intensamente investigada (DAVIES, 2001; PACIFICI; DAVIES, 1990; VARSHAVSKY, 2005) e proposta como defesa anti-oxidante celular. A oxidação protéica é um fenômeno abrangente, intensificado durante o processo de envelhecimento e subjacente à patogênese de diversas doenças degenerativas, p. ex. neurodegeneração (STADTMAN, 2006; BUTTERFIELD et al., 2006). Os mecanismos químicos das modificações protéicas oxidativas são relativamente bem conhecidos, principalmente a oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos arginina, histidina, lisina e prolina, catalisada por metais de transição que resulta na formação de derivados carbonílicos (REQUENA et al., 2001; STADTMAN; LEVINE, 2003). Uma vez que até o momento não está descrito nenhum reparo enzimático de aminoácidos modificados oxidativamente (exceção do sulfóxido de metionina, como citado acima), o processo proteolítico tem sido proposto como defesa fisiológica contra danos protéicos oxidativos, do contrário as proteínas facilmente agregariam. Tudo indica que proteínas oxidadas não dependem de poli-ubiquitinação para serem reconhecidas e degradadas pelo PT (BAUGH; VIKTOROVA; PILIPENKO, 2009; INAI; NISHIKIMI, 2002; SHRINGAPURE et al., 2003). Por essa razão, os estudos sobre a degradação de proteínas intracelulares oxidadas estão principalmente centrados no PT20S. O mecanismo pelo qual proteínas oxidadas interagem com o PT20S não é conhecido. O aumento de hidrofobicidade superficial dessas proteínas parece ser uma característica importante para permitir a interação proteína-PT20S e conseqüente degradação (PACIFICI; KONO; DAVIES, 1993).

1.5.2 Localização intracelular do PT20S e degradação de proteínas oxidadas

Comparando a distribuição intracelular de proteínas oxidadas após estresse oxidativo com a distribuição proteassomal, verifica-se que a célula é capaz de manter o conteúdo de proteínas nucleares livres de dano oxidativo, ao passo que proteínas citosólicas acumulam marcadores oxidativos (JUNG; BADER; GRUNE, 2007). Se isso é devido a uma baixa taxa de oxidação protéica no núcleo, uma degradação eficiente de proteínas nucleares que foram submetidas a dano oxidativo, fato esse devido à grande quantidade de PT presente no núcleo, ou se existem sistemas envolvidos no transporte de proteínas oxidadas do núcleo para o citoplasma, ainda permanece desconhecido. A maior razão entre proteínas oxidadas e PT é encontrada perto da membrana celular (JUNG; BADER; GRUNE, 2007). Portanto, pode-se concluir que a maior parte da degradação de proteínas oxidadas está concentrada na parte citosólica da célula (JUNG et al., 2006).

1.6 Hsp65 (Heat-Shock Proteins)

Em 1962, a resposta de choque térmico (*Heat Shock Response*) foi descoberta por Ritossa em células de *Drosophila* e constitui o mecanismo de defesa primordial das células frente a situações de estresse (RITOSSA, 1962). Posteriormente, as HSPs foram descritas como efetores principais da resposta de choque térmico (SCHLESINGER, 1990).

As HSPs estão entre as proteínas mais conservadas e imunogênicas distribuídas entre os seres vivos. Em condições fisiológicas, a distribuição das HSPs tem como objetivo manter a integridade e a função de outras proteínas intracelulares quando as células são expostas a situações de estresse como o térmico, desbalanço redox, dentre outros (RAJAIHAH; MOUDGIL, 2009).

Trabalhos da literatura descrevem um papel protetor de uma HSP de *Mycobacterium leprae* (Hsp65), que estimula o mamífero hospedeiro a combater a infecção por *M. tuberculosis*, outro organismo dentro deste gênero bacteriano (SILVA; LOWRIE, 2000). Essa proteção é atribuída ao estabelecimento de uma resposta imune celular desencadeada por linfócitos T específicos para o antígeno, que produzem IFN γ e são citotóxicos contra as células infectadas (LIMA et al., 2003a ; SILVA; LOWRIE, 2000). Em camundongos severamente infectados, a vacina de DNA que codifica a Hsp65 altera a resposta imunológica natural que só envolve estase bacteriana, fazendo com que ocorra uma resposta eficiente do

hospedeiro induzindo atividade bactericida. Assim, a vacina de DNA-*HSP65*, que inicialmente foi desenhada para evitar a infecção por *M. tuberculosis*, também poderia ter ação terapêutica (LOWRIE et al., 1999).

Todo ano a tuberculose (TB) mata no mundo de 2-3 milhões de pessoas apesar da existência de uma vacina (bacilo de Calmette-Guérin: BCG), aplicada a 85% dos recém-nascidos e, de esforços da comunidade global de saúde em fornecer medicamentos adequados para essa doença pulmonar (KOCHI, 1991). O consenso entre a comunidade médica e os pesquisadores que estudam a TB, é que a epidemia atual não pode ser interrompida sem uma nova vacina, mais eficaz, que teria como objetivo reduzir o número de pessoas infectadas (KOCHI, 1991).

Nos últimos anos a comunidade científica vem explorando técnicas de DNA recombinante com o objetivo de identificar novos antígenos e novas abordagens para a vacinação contra a TB. Diversos antígenos e estratégias de imunização demonstraram proteção contra a TB em modelos animais. (KAUFMANN, 2001; KAUFMANN; HESS, 2000). Um dos antígenos mais utilizados em vetores de DNA é a Hsp65 (LIMA et al., 2003b; LOWRIE et al., 1999; SILVA et al., 1996; SILVA et al., 1999; TASCÓN et al., 1996).

Um trabalho envolvendo DNA-*HSP65* e DCs demonstrou que as DCs apresentam uma grande capacidade de absorção desta vacina, e que durante a infecção por *M. tuberculosis* as DCs estão principalmente envolvidas na indução de resposta imune anti-micobacteriana em células T (FRANCO et al., 2008). A interação entre DNA-*HSP65* e DCs se mostrou importante para a concepção de novas vacinas baseadas em imunoterapia e, conseqüentemente, na modulação da resposta imune na TB. (FRANCO et al., 2008).

Neste trabalho adotamos a proteína recombinante Hsp65 como antígeno padrão dos estudos realizados.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal investigar as conseqüências do desafio oxidativo em DCs sobre a proliferação de linfócitos T CD8⁺. Ressaltamos que nosso interesse foi focado na atividade do IP, e por isso investigamos apenas a proliferação de linfócitos T CD8⁺. Os dados de literatura que motivaram o estudo estão abaixo discutidos.

Circunstância que consideramos relevante é o fato de que APCs operam frequentemente sob condições de estresse, destacando-se o oxidativo induzido pelo dano tecidual, inflamatório e presença de antígenos. O mesmo é válido para as DCs que se localizam no epitélio e mucosas gastro-intestinal e respiratória, regiões altamente susceptíveis a alterações redox. Relatos da literatura mostram que o estresse oxidativo altera o processamento antigênico (PREYNAT-SEAUVRE et al., 2003) e que a inibição parcial do IP em DCs aumenta a apresentação de determinados peptídeos imunogênicos (BASLER et al., 2004; CHROMIK et al., 2006). Este dado está alinhado a evidências mostrando que o IP, devido a sua maior atividade catalítica, pode destruir alguns peptídeos gerados para apresentação ao invés de favorecer a produção desses peptídeos (CHAPIRO et al., 2006). Já está bem estabelecido na literatura de que os peptídeos gerados a partir da fragmentação de uma dada proteína devem possuir entre 7-9 resíduos de aminoácidos para serem processados pelos complexos MHC I e alterações deste padrão comprometem a apresentação antigênica (CHAPIRO et al., 2006). Uma vez que nos estudos propostos haveria a produção de estresse oxidativo nessas células, partimos da premissa que a atividade do PT20S padrão ou do IP seriam alteradas o que poderia modificar a produção de peptídeos para apresentação antigênica no sentido de favorecê-la ou não.

Outro dado relevante é o fato já bastante documentado de que proteínas moderadamente oxidadas são facilmente degradadas pelo PT20S por processo independente de ubiquitinação, o que aceleraria o processamento antigênico uma vez que as etapas de ubiquitinação são desnecessárias. No entanto, o aumento da taxa de degradação protéica, no caso, não comprometeria o processamento seqüencial dos peptídeos gerados. Com esse objetivo, em nosso modelo procedemos à oxidação do antígeno além do desafio oxidativo celular que aumenta o conteúdo de proteínas oxidadas intracelulares.

2.1 Modelos para alteração do estado redox intracelular

Os modelos adotados visando promover desafio oxidativo nas DCs foram os seguintes:

1. Inibição do transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Esta abordagem é de uso corrente (BARROS et al., 2004; CADENAS; DAVIES, 2000) e tem por objetivo aumentar a geração de ROS provocando desta maneira alteração redox intracelular favorecendo processos oxidativos. Utilizamos a antimicina A, inibidor do transporte de elétrons que atua no complexo III da cadeia fosforilativa;
2. Incubação das células com o sistema xantina/xantina oxidase (XaXO) gerador de $O_2^{\cdot -}$ e com o peróxido inorgânico H_2O_2 . Neste procedimento, as células foram incubadas na presença do H_2O_2 ou do sistema XaXO gerador de $O_2^{\cdot -}$.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a extração dos fêmures foram utilizados camundongos C57BL/6 (fêmeas) e para os experimentos de co-cultura camundongos BALB/c, todos crescidos em nosso biotério sob condições de esterilidade, com idade de 2-3 meses e peso compreendido entre 18-22 gramas.

3.2 Extração da medula óssea

Esta metodologia foi realizada com modificações segundo protocolo descrito em Feili-Hariri, Falkner, e Morel (2005) e Lutz et al. (1999). Os fêmures, após remoção passaram por uma etapa de desinfecção. Para a desinfecção os ossos intactos foram mergulhados em etanol 70% por 5 minutos e posteriormente lavados com 10mL de PBS. Na próxima etapa, os fêmures foram cortados em suas extremidades distais e perfundidos com 500µL de PBS para a obtenção do cordão medular. Para a perfusão foi utilizada uma seringa de 0.45mm de diâmetro (Becton Dickinson). O cordão medular assim obtido foi homogeneizado por repetidas ressuspensões com a seringa. Após a homogeneização, as células foram lavadas com 2 mL de PBS e posteriormente coradas com solução de *Turk* e contadas em câmara de *Neubauer* na diluição de 1:20. Procedendo-se à metodologia acima descrita, o número de monócitos por fêmur foi sempre de aproximadamente $9-10 \times 10^6$. Os monócitos são comumente utilizados como padrão de contagem dessas preparações (FEILI-HARIRI; FALKNER; MOREL, 2005).

3.3 Células secretoras de GM-CSF

A linhagem celular NIH/3T3 (fibroblasto de camundongo) transformada com o plasmídeo contendo o gene murino codificante do fator GM-CSF foi gentilmente cedida pelo Dr. Thomas Blankenstein do Instituto de Imunologia da Universidade Livre de Berlin, Alemanha. Informações sobre a construção do plasmídeo e transformação celular estão em Ohl et al. (2004), Qin et al. (1997) e Schüler e Blankstein (2002).

3.3.1 Crescimento das células NIH/3T3

As células NIH/3T3 foram crescidas em meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com penicilina (100 U/mL, GIBCO), estreptomicina (100 µg/ mL, GIBCO) e 10% de soro fetal bovino inativado e filtrado (filtros de 0,22 µM, Millipore). As células NIH/3T3 foram inicialmente plaqueadas na concentração de $0,375 \times 10^6$ células e crescidas por uma semana. No primeiro dia da cultura foram adicionados 8mL de meio completo. No 4º dia o meio de cultura foi removido, centrifugado e posteriormente devolvido para a placa juntamente com 8mL adicionais de meio de cultura fresco. Após uma semana as células foram suspendidas por tratamento com tripsina, centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido e posteriormente congelado a -20 °C. Foram testadas algumas condições de plaqueamento inicial das células NIH/3T3, desde $0,1 \times 10^6$ céls até $1,5 \times 10^6$ céls e o número de dias de cultura (2 a 10) com o objetivo de estabelecer a condição ideal para a obtenção do fator GM-CSF no melhor rendimento para a diferenciação das DCs. Os parâmetros que foram considerados ideais se baseiam na resposta de diferenciação de DCs obtidas posteriormente e foram de **0,375 x 10⁶ céls após 7 dias** de plaqueamento. Com estas condições padronizadas, foi possível prosseguir com a etapa seguinte do projeto (obtenção e diferenciação de DCs).

3.4 Diferenciação da cultura celular com GM-CSF

O método aqui adotado para a geração de DCs a partir de células pluripotentes com o fator GM-CSF obtido como descrito acima, foi adaptado de publicações anteriores (FEILHARIRI; FALKNER; MOREL, 2005). As modificações estão descritas em (LUTZ et al., 1999). As células foram crescidas em placas de Petri com 120 mm de diâmetro (Becton Dickinson). Foi utilizado meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com penicilina (100 U/mL, GIBCO), estreptomicina (100 µg/ mL, GIBCO), L-glutamina (2mM, GIBCO), piruvato de sódio (1mM, GIBCO), aminoácidos não-essenciais (1mM, GIBCO), β₂-mercaptoetanol (50µM, GIBCO) e 10% de soro bovino fetal inativado e filtrado. No primeiro dia foram plaqueadas $0,2 \times 10^6$ células por disco em 10mL de meio completo de cultura, contendo 300µL do sobrenadante obtido do crescimento de células NIH-3T3 (secretoras do fator GM-CSF). No terceiro dia foram acrescidos 10mL de meio completo contendo 300µL do sobrenadante com GM-CSF. No sexto e no oitavo dia de cultura celular foram coletados 10mL de meio de cada placa, centrifugados a $800 \times g$ por 5 minutos em temperatura ambiente

e, em seguida o sobrenadante foi descartado. O precipitado celular foi ressuscitado em 10mL de meio suplementado, que posteriormente foi devolvido para a placa junto com 100 μ L do sobrenadante com GM-CSF. No décimo dia todo o meio das placas, (contendo células não aderentes) foi removido e posteriormente centrifugado a $800 \times g$ por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o precipitado celular (DCs imaturas), foi ressuscitado em 10mL de meio suplementado e devolvido para uma nova placa de Petri, junto com 100 μ L do sobrenadante com GM-CSF. Uma parte das células permaneceu em cultura até realização dos experimentos. A outra parte foi lavada $2 \times$ com 10mL de PBS, em seguida procedeu-se à contagem das células. A maturação dessas células foi feita pela adição de LPS no 10^o dia de cultivo. Quando os experimentos exigiram eletroporação para a introdução do antígeno, o LPS foi adicionado imediatamente após a eletroporação.

3.5 Eletroporação das DCs

O protocolo de eletroporação foi adaptado de trabalhos da literatura (GIL-TORREGROSA et al., 2004; KIM et al., 2003; LI et al., 1994). No 10^o dia de cultura, as DCs foram removidas da placa, conforme descrito acima. As DCs foram lavadas 2x com meio RPMI não suplementado. Após a lavagem foram transferidas para as cubetas de eletroporação com espessura de 4 mm (Bio-Rad) na concentração de $0,2 \times 10^6$ células / 500 μ L de meio RPMI não suplementado. Após a transferência, as DCs foram incubadas a 4°C por 10 minutos. Em seguida foram adicionadas 40 μ g de Hsp65 em suas formas nativa e oxidada na cubeta (volume final de 500 μ L) e em seguida as DCs foram eletroporadas com o aparelho *Gene Pulser Electroporation System* (Bio-Rad). A eletroporação foi conduzida com 2 pulsos na potência de 300V (750 V / cm), capacitância de 25 μ F por 2ms. Logo após a eletroporação, as DCs foram incubadas a 4°C por 10 minutos e em seguida lavadas $3 \times$ com PBS. Após a incubação, as DCs foram devolvidas para a placa. Foi adicionado meio completo acrescido de 1 μ g de LPS. As DCs permaneceram incubadas por 48 h com LPS ou com os demais tratamentos.

3.6 Citometria de Fluxo (FACS)

A análise de FACS foi realizada com DCs tratadas conforme as condições descritas abaixo. O aparelho utilizado para as análises foi o *Guava EasyCyte Plus System* (Guava

Technologies). Os dados obtidos foram analisados pelo programa *CytoSoft* 4.1 (Guava Technologies). Para a citometria, as DCs foram removidas, transferidas para o tubo de leitura de FACS e lavadas 1x com tampão de FACS (PBS + 0,5% BSA). Em seguida, foram adicionados 25µL de tampão de FACS e 2,5µL (1,25µg) do anticorpo anti-MHC II, 25µL de tampão de FACS e 2,5µL (1,25µg) do anticorpo anti-CD86 ou 25µL de tampão de FACS e 2,5µL (1,25µg) do anticorpo anti-CD11c. As amostras foram incubadas protegidas da luz a 4°C durante 20 minutos. Após a incubação, foram acrescentados 100µL de tampão de FACS e as DCs foram centrifugadas a $800 \times g$ por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. Então as células foram lavadas 3x com 200µL de tampão de FACS e centrifugadas a $800 \times g$ por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a última lavagem foram adicionados, em cada tubo, 400µL de formaldeído 2%. Os tubos permaneceram protegidos da luz a 4°C até a leitura do FACS que foi realizada em no máximo até 4 dias após a marcação com os anticorpos anti-MHC II, anti-CD86 e anti-CD11c.

3.7 Obtenção do extrato celular

Este protocolo foi adotado em todos os procedimentos onde o extrato total celular foi utilizado. Primeiramente foram adicionados 300µL de tampão de lise (50mM HEPES pH 7.5, contendo 5mM de EDTA, 150mM NaCl e 1% Triton) no precipitado celular (10^7 células / tratamento) seguido de incubação por 10 minutos a 4°C. Em seguida as células foram ressuspendidas $10 \times$ com uma agulha de 0.45mm de diâmetro adaptada a uma seringa e incubadas 20 minutos a 4°C. O extrato celular foi centrifugado a $15.000 \times g$ por 40 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e a concentração protéica foi determinada no sobrenadante pelo método de *Bradford* (BRADFORD, 1976).

3.8 Oxidação da Hsp65

Para a oxidação foram utilizados 5mg de Hsp65 recombinante em 500µL de H₂O MilliQ, seguida da adição de 5mM de H₂O₂. Após a adição do H₂O₂ a proteína foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente e em seguida filtrada em *Microcon* YM-10 (Millipore). O filtro foi lavado 2x com 200µL de água MilliQ e a proteína recuperada em 100µL de água. Em seguida foi feita a dosagem protéica pelo método de *Bradford*. Todas as preparações de

Hsp65_{ox} utilizadas foram avaliadas quanto ao grau de oxidação pela derivatização com dinitrofenilhidrazina (SHACTER et al, 1994).

3.9 Ensaios de imunomarcação

As amostras utilizadas nos ensaios de imunomarcação foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8,5-12,5% (SDS-PAGE) e submetidas à eletroforese. Em seguida as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45µm, que foram coradas com solução de Ponceau 1% para a avaliação da eficiência de transferência. A membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente com 10% do agente bloqueador (leite em pó desnatado da marca Glória ou albumina do soro bovino; BSA) diluído em TBS-T (150 mM NaCl, 0,1% de Tween-20 em 100 mM Tris-HCl pH7,5). A membrana foi incubada por 16 h à 4° C com os anticorpos primários diluídos em TBS-T e, posteriormente com o anticorpo secundário. Os anticorpos secundários e as soluções de revelação são partes do kit ECL™ *Western Blotting Systems* (GE Biosciences). Como descrito no manual do fabricante, após a membrana ser incubada com solução de revelação o sinal luminescente é captado em filme radiológico. Nos ensaios, as diluições dos anticorpos primários foram como segue: anti-β5i (subunidade β do imunoproteassomo; Calbiochem) 1:10000, anti-PT20S (unidade catalítica do PT; Calbiochem) 1:1000, anti-PT11S (subunidade regulatória do imunoproteassomo; Calbiochem) 1:1000, anti-PT19S (subunidade regulatória do PT; Calbiochem) 1: 1000 . O anticorpo secundário utilizado foi o anti-coelho na diluição de 1:1000. O anticorpo anti-nitrotirosina (Oxis) foi diluído na concentração de 1:3000 e de 1:5000 do secundário anti-ovelha ; o anticorpo anti-ubiquitina (Calbiochem) foi diluído na concentração de 1:200 e de 1:1000 do secundário anti-camundongo; anti-GSH (Calbiochem) foi diluído na concentração de 1:1000 e de 1:1000 do secundário anti-camundongo; anti-actina (Calbiochem) foi diluído na concentração de 1:5000 e de 1:1000 do secundário anti-camundongo e anti DNP (Calbiochem) foi diluído na concentração de 1:10000 e de 1:1000 do secundário anti-camundongo, todos diluídos em TBS-T.

3.10 Determinação da atividade hidrolítica dos PTs 20S e 26S em extrato de DCs

Os peptídeos *suc*-LLVY-MCA (Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amide-4-methylcoumarin; Calbiochem) e *z*-ARR-MCA (carbобензоxi-Ala-Ala-Arg-7-amide-4-

methylcoumarin; Calbiochem) foram os substratos utilizados para a quantificação das atividades do tipo-quimiotripsina (ChT-L) e tripsina (T-L) dos PT20S e 26S. Alíquotas de extrato celular (25 µg de proteína total) foram incubadas com 125-500 µM de substrato peptídico em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 (tampão padrão) por 45 minutos a 37° C. Emissão da fluorescência foi capturada a 440 nm (excitação a 365 nm). No caso da medida da atividade do PT26S, o extrato celular foi preparado na presença de 2 mM de ATP que foi mantido nas preparações durante todo o procedimento para obtenção do extrato assim como durante avaliação da atividade catalítica. A atividade catalítica avaliada foi atribuída ao PT20S uma vez que foi feita a medida de atividade em paralelo a amostras pré-incubadas com o inibidor catalítico lactacistina na concentração de 20 µM. Nesta condição nenhuma atividade foi medida, o que demonstra a seletividade dos substratos utilizados.

3.11 Modelos para alteração do estado redox de DCs.

A alteração do estado redox em DCs foi realizada por três modelos diferentes: H₂O₂ em concentrações crescentes no meio extracelular (250µM - 750µM), Antimicina A que é um inibidor do complexo III da cadeia respiratória mitocondrial e pelo sistema xantina (3mM) xantina oxidase que libera o íon O₂^{•-} no meio extracelular. Os tratamentos com H₂O₂ e XaXO promoveriam o aumento das ROS no meio extracelular. O tratamento com Antimicina A promoveria aumento de ROS intracelular. O protocolo completo de utilização dos modelos encontra-se detalhado abaixo (Co-cultura de DCs e linfócitos T CD8⁺).

3.12 Co-cultura

3.12.1 Imunização dos animais com DNA-HSP65

Para a imunização com DNA-*HSP65* foram utilizados camundongos C57BL/6 (fêmeas). Os camundongos foram imunizados pela administração de 3 doses intra-muscular de DNA-*HSP65* (intervalo de 15 dias entre as doses) e com uma dose intravenosa de Hsp65 (proteína recombinante) 15 dias após a imunização com a última dose intra-muscular do DNA-*HSP65*. Foram utilizados 100µg de DNA-*HSP65* ou Hsp65 em cada etapa do processo de imunização dos animais. Três dias após a imunização intravenosa, os animais foram

sacrificados para a obtenção de linfócitos T CD8⁺ que foram utilizados nos experimentos de co-cultura com DCs.

3.12.2 *Obtenção dos linfócitos T*

Após o processo de imunização descrito acima, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida o baço foi removido de maneira asséptica dentro do fluxo laminar e coletado em placas de cultura celular contendo 2mL de meio RPMI. Com o auxílio de um êmbolo de seringa, o baço foi macerado contra a placa de cultura e o sobrenadante foi transferido para um tubo *Falcon* de 15mL. As hemácias foram lisadas com a adição de 1mL de tampão de lise ACK (0.15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA) seguida pela centrifugação a 800 x g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e a suspensão celular foi lavada com 10mL de PBS e centrifugada a 800 x g por 5 minutos a 4° C. O precipitado celular, que contém linfócitos totais, foi ressuscitado em 1mL de RPMI e foi retirada uma alíquota da suspensão para a contagem total de células em câmara de *Neubauer*.

3.12.3 *Purificação dos linfócitos T CD8⁺*

Após a obtenção e posterior contagem dos linfócitos, passou-se à purificação dos linfócitos T CD8⁺. A suspensão celular foi centrifugada a 300 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado celular foi ressuscitado em 90µL de PBS/ 10⁷ linfócitos e foi adicionado 10µL de Magnetic *MicroBeads CD8a*/ 10⁷ linfócitos (Miltenyi Biotec). Os linfócitos TCD8⁺ ligam-se às *MicroBeads* que posteriormente são eluídos através de uma coluna de separação magnética. A amostra foi agitada e incubada por 30 minutos a 4° C. A suspensão celular foi lavada com 2mL de PBS/ 10⁷ linfócitos, centrifugada a 300 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram contadas e ressuscitadas na proporção de 10⁸ células/ 500 µL de PBS. A coluna de separação magnética LS (Miltenyi Biotec) previamente equilibrada com 3 mL de PBS foi introduzida na estante magnética e a suspensão celular foi então adicionada na coluna. Após 3 lavagens com 3mL de PBS, a coluna foi removida da estante magnética e os linfócitos T CD8⁺ ligados as *MicroBeads CD8a* foram recolhidos em um tubo *Falcon* de 15mL. Foram adicionados mais 5mL de PBS na coluna e imediatamente foi introduzido um êmbolo. A coluna foi lavada, possibilitando a remoção do

restante de linfócitos T CD8⁺ ligados as *MicroBeads CD8a*. As células foram coletadas em um tubo *Falcon*.

3.12.4 Marcação dos linfócitos T CD8⁺ com CSFE (5,6-Carboxy-Succinimidyl-Fluorescein-Ester)

Após a separação magnética, o tubo *Falcon* contendo os linfócitos T CD8⁺ foi centrifugado a 300 x g por 5 minutos. Logo em seguida as células foram contadas e ressuspensas em PBS na concentração de 5-10 x 10⁶ /mL. Foi adicionado o mesmo volume de uma solução de CSFE (Invitrogen) no tubo atingindo a concentração final de 1.25µM. A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos com agitação periódica. O processo de marcação foi interrompido com a adição de Soro Fetal Bovino Estéril 5%. O *Falcon* foi completado com PBS, centrifugado a 300 x por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram então lavadas com 10 mL de RPMI, contadas e ressuspensas em RPMI.

3.12.5 Desafio oxidativo

As DCs foram obtidas como descrito acima. No 10º dia de cultura, as DCs foram removidas da placa de cultura e eletroporadas na presença dos antígenos (Hsp65 e Hsp65 oxidada). Após uma hora as DCs foram submetidas aos tratamentos com os modelos de alteração do estado redox e posteriormente incubadas com LPS. As células foram incubadas com Antimicina A (1µg / mL), H₂O₂ (750 µM) ou XaXO (3mM xantina e 20µL de xantina oxidase 0.6 U / mL) na presença de LPS por 48 horas.

3.12.6 Co-cultura de DCs com linfócitos T CD8⁺

As DCs eletroporadas e submetidas aos tratamentos com os modelos de alteração redox (protocolos descritos acima), após 48h foram co-cultivadas em placas de 96 poços com linfócitos T CD8⁺ purificados. A proporção do ensaio de co-cultura foi de 1 DC/10 linfócitos T CD8⁺. As células foram incubadas por 5 dias a 37º C em atmosfera de 5% CO₂. Após 5 dias, as células foram retiradas das placas, e 1mL de PBS foi adicionado. A suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. As

células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS e em seguida foi realizado o ensaio de FACS. O aparelho utilizado para a análise foi o *FACSCalibur* (BD Biosciences) e os dados analisados pelo *software FlowJo* (Tree Star).

3.12.7 Co-cultura de DCs imaturas com linfócitos T CD8⁺

As DCs foram eletroporadas e submetidas aos tratamentos com modelos de alteração redox por 48h. Em seguida, as DCs foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido. O sobrenadante recolhido foi adicionado a uma cultura de DCs imaturas, que foram co-cultivadas em placas de 96 poços na presença de linfócitos T CD8⁺ purificados. O procedimento experimental restante foi idêntico ao item anterior (3.12.6).

3.13 Viabilidade celular

As DCs foram eletroporadas e submetidas aos tratamentos de alteração redox por 48h. Em seguida, as células foram transferidas para os tubos de análise e foi adicionado iodeto de propídeo. Em seguida foi feita a análise por FACS. O aparelho utilizado para a análise foi o *FACSCalibur* (BD Biosciences) e os dados analisados pelo *software WinMDI* (Joseph Trotter).

3.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm SD. A significância estatística foi determinada pelo teste t de *Student*. As diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de células dendríticas

As DCs são células apresentadoras de antígenos mais eficientes quando comparadas a linfócitos B e macrófagos, sendo capazes de apresentar peptídeos ligados às moléculas dos complexos de MHC I e complexos MHC II, iniciando assim a resposta primária de linfócitos T (STEINMAN, 2007). Diversos grupos utilizam metodologias distintas para a obtenção e cultivo de DCs (INABA et al., 1992a; LUTZ et al., 1999; OHL et al., 2004; SCHEICHER et al., 1992; SCHÜLER; BLANKSTEIN, 2002). A obtenção destas células em nosso laboratório se baseou em alguns desses trabalhos. O primeiro passo foi estabelecer o número de camundongos necessários para a preparação de células e quantificar o número de células pluripotentes de cada fêmur. O parâmetro adotado foi a contagem de monócitos do cordão medular (FEILI-HARIRI; FALKNER; MOREL, 2005). Foi encontrada uma média de $9-10 \times 10^6$ células por fêmur. Com um fêmur obtivemos células para a diferenciação de DCs em 20 placas de 56.5 cm^2 , obtendo-se no final de 10 dias de cultivo o correspondente a 5×10^6 células diferenciadas por placa. A conclusão final foi de que a condição ideal de plaqueamento seria de $0,2 \times 10^6$ células da medula por placa que no final de 10 dias de cultivo geram 5×10^6 DCs diferenciadas por placa (Tabela 1). Por último, o volume de meio contendo GM-CSF (obtenção descrita em Materiais e Métodos) utilizado nos experimentos ficou estabelecido em $300\mu\text{L}$. A quantidade de $300\mu\text{L}$ de GM-CSF corresponde a cada adição do fator nos dias 1, 3, 6 e 8 da cultura celular (Tabela 1).

Tabela 1- Plaqueamento inicial de monócitos e cultivo de DCs.

PLAQUEAMENTO MONÓCITOS	GM-CSF (µL)	QUANTIDADE DE DCs
0,05 x 10 ⁶ céls	50µL	0,5 x 10 ⁶ céls
0,05 x 10 ⁶ céls	300µL	0,76 x 10 ⁶ céls
0,05 x 10 ⁶ céls	900µL	0,4 x 10 ⁶ céls
0,2 x 10 ⁶ céls	50µL	1,0 x 10 ⁶ céls
0,2 x 10⁶ céls	300µL	5,0 x 10⁶ céls
0,2 x 10 ⁶ céls	900µL	2,1 x 10 ⁶ céls
0,5 x 10 ⁶ céls	50µL	1,5 x 10 ⁶ céls
0,5 x 10 ⁶ céls	300µL	3,1 x 10 ⁶ céls
0,5 x 10 ⁶ céls	900µL	3,2 x 10 ⁶ céls
1,0 x 10 ⁶ céls	50µL	2,1 x 10 ⁶ céls
1,0 x 10 ⁶ céls	300µL	2,2 x 10 ⁶ céls
1,0 x 10 ⁶ céls	900µL	2,3 x 10 ⁶ céls
2,0 x 10 ⁶ céls	50µL	0,5 x 10 ⁶ céls
2,0 x 10 ⁶ céls	300µL	1,0 x 10 ⁶ céls
2,0 x 10 ⁶ céls	900µL	0,8 x 10 ⁶ céls

A partir da contagem total de monócitos obtida por fêmur, procedeu-se ao plaqueamento serial dessas células em concentrações crescentes de GM-CSF no meio de cultura de células NIH/3T3. O objetivo foi estabelecer a condição ideal de cultivo e diferenciação em células dendríticas. A condição ideal após 10 dias de plaqueamento e volume correspondente de meio de cultura contendo o fator GM-CSF está assinalada em negrito.

Os dados apresentados na tabela 1 mostram que a condição ideal para a obtenção das DCs foi alcançada quando os monócitos foram plaqueados inicialmente na concentração de 0,2 x 10⁶ células com a adição de 300µL de GM-CSF (nos dias 1, 3, 6 e 8 da cultura celular). No final de 10 dias de cultivo foram encontradas o correspondente a 5 x 10⁶ células diferenciadas por placa.

Para confirmarmos que realmente estávamos trabalhando com DCs foi testada uma condição de cultivo das células pluripotentes sem adição do fator GM-CSF para demonstrar que as células pluripotentes permanecem indiferenciadas no final de 10 dias. Com esse experimento demonstramos que morfologicamente as células cultivadas na ausência de GM-CSF permaneceram indiferenciadas. Estes resultados estão mostrados na figura 6, junto com os resultados das células cultivadas na presença do fator GM-CSF.

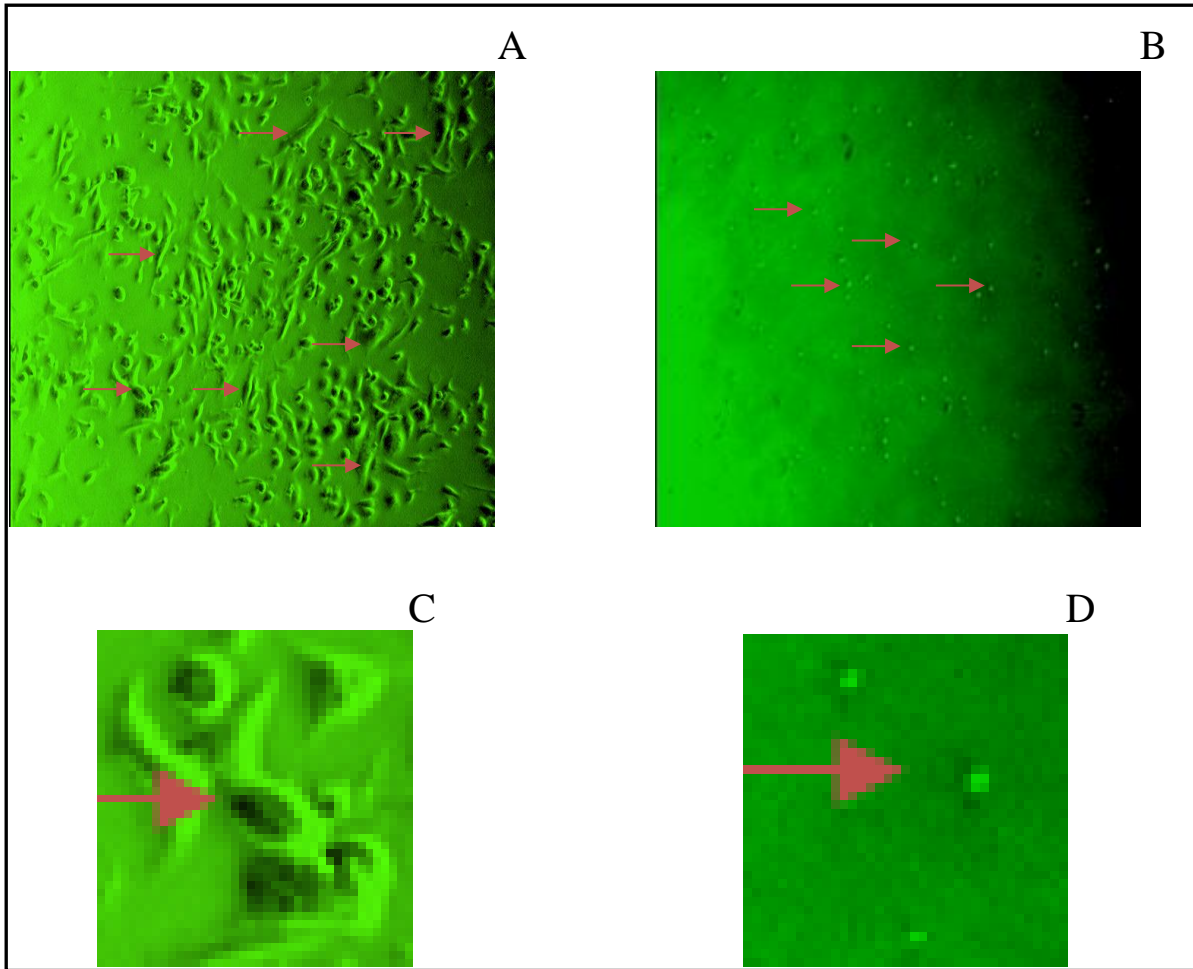


Figura 6. Células dendríticas diferenciadas com o fator GM-CSF e células pluripotentes cultivadas na ausência do fator GM-CSF. (A) Cultura de DCs no 10º dia após plaqueamento na concentração inicial de 0.2×10^6 células pluripotentes (avaliada pela contagem de monócitos como descrito em “Materiais e Métodos”) e com adição de $300 \mu\text{L}$ de fator GM-CSF nos dias 1, 3, 6 e 8 de cultura. As setas indicam células diferenciadas em DCs. (B) Células pluripotentes no 10º dia após plaqueamento, obtidas a partir da mesma preparação do fêmur mostrada em A. No meio de cultura não foi adicionado o fator GM-CSF em nenhuma das etapas da cultura. As setas indicam células pluripotentes indiferenciadas: morfologicamente arredondadas. (C) e (D) Visão aproximada das DCs diferenciadas e das células pluripotentes indiferenciadas, respectivamente. As fotos foram obtidas a partir de microscópio invertido (*Axiocvert 135; Zeiss*) com câmera analógica acoplada e as imagens captadas através do software *Scion Image 1.60C*.

A figura 6 ilustra a diferença entre células pluripotentes incubadas na presença e ausência GM-CSF. É possível observar as diferenças morfológicas de DCs na figura 6 (A e C) quando comparadas as células pluripotentes indiferenciadas: morfologicamente arredondadas (B e D).

Conforme mostram os resultados obtidos, todas as condições necessárias para a obtenção de DCs, desde o plaqueamento inicial até a quantidade de GM-CSF utilizada na diferenciação foram padronizadas. Com isso estabelecido foi possível prosseguir com a etapa seguinte do projeto, que foi avaliar a diferenciação das DCs a partir do marcador de superfície CD11c.

4.2 Avaliação da diferenciação de DCs a partir do marcador de superfície CD11c

As DCs apresentam diversos marcadores de superfície (STEINMAN, 2007) cujos anticorpos são largamente utilizados como controle de diferenciação. Após o crescimento e adição do fator GM-CSF às células pluripotentes, foi feita a análise do marcador de superfície CD11c. As células pluripotentes extraídas da medula de camundongos C57BL/6 (“Materiais e Métodos”) foram crescidas na ausência e na presença do fator GM-CSF durante 10 dias. Em seguida, foram marcadas com o anticorpo anti-CD11c-FITC e analisadas por FACS (figuras 7 e 8).

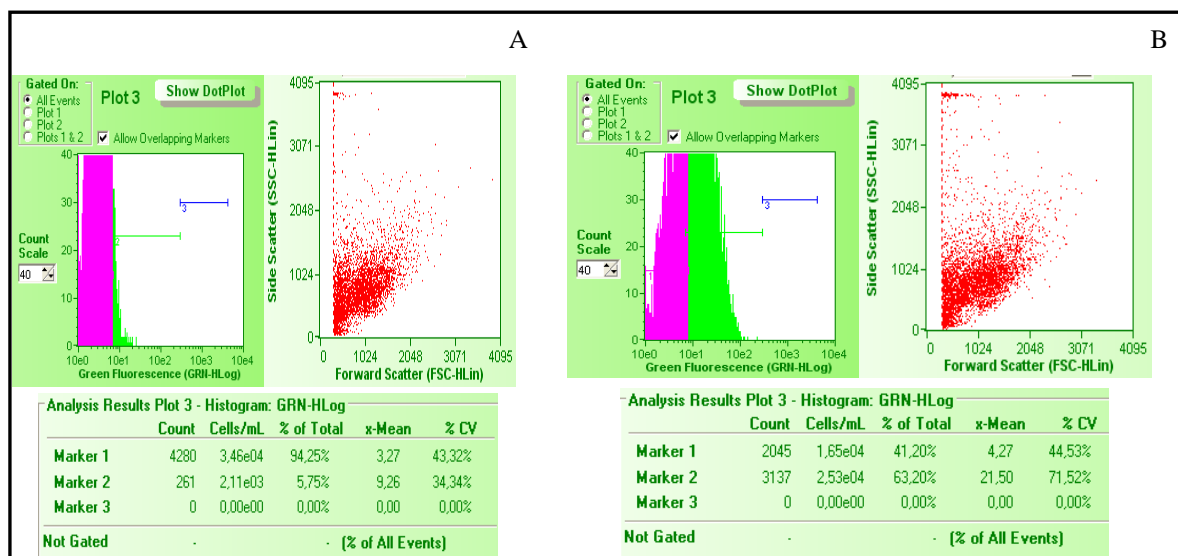


Figura 7. Representação de um experimento de FACS para avaliação da presença do marcador CD11c. (A) Cultura de células pluripotentes extraídas de fêmur de camundongo C57BL/6, crescidas na ausência do fator GM-CSF e marcadas com o anticorpo anti-CD11c-FITC. A percentagem (%) de células marcadas com anti-CD11c-FITC está representada como *Marker 2*. (B) Cultura de células pluripotentes extraídas de fêmur de camundongo C57BL/6, crescidas na presença do fator GM-CSF e marcadas com o anticorpo anti-CD11c-FITC. A percentagem (%) de células marcadas com anti-CD11c-FITC está representada como *Marker 2*. O aparelho utilizado para a análise foi o *Guava EasyCyte Plus System* (Guava Technologies) e os dados analisados pelo *software CytoSoft 4.1* (Guava Technologies). Os dados obtidos foram colocados no gráfico mostrado na Figura 8.

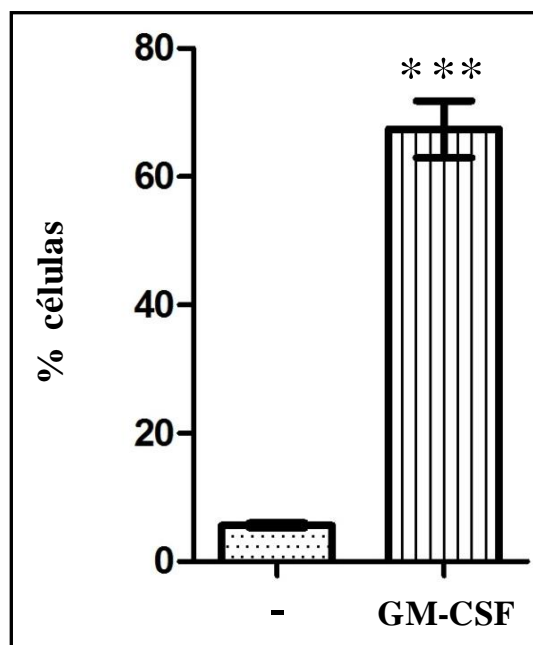


Figura 8. Expressão de CD11c. Dados extraídos dos FACS representativos mostrados na Figura 7. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=3) da percentagem de células marcadas. ***p < 0.0001.

Os resultados obtidos mostraram que na presença do fator GM-CSF foram obtidas porcentagens de células marcadas com CD11c superiores a 70%, indicando êxito no cultivo de DCs. Com mais esse parâmetro alcançado, prosseguimos com os experimentos de avaliação de maturação das DCs a partir da quantificação do marcador de superfície CD86.

4.3 Avaliação do estado de maturação das DCs a partir do anticorpo anti-CD86

As DCs maduras exibem uma variedade de marcadores específicos de superfície (Reis e col., 2008). Vários grupos de pesquisa utilizam o marcador específico CD86 para a quantificação do grau de maturação de DCs (GAYMALOV et al., 2009; MATHEU et al., 2008; REIS et al., 2008). Para promover a maturação das DCs foi utilizado LPS na concentração de 1 μ g/mL por 48h. O objetivo foi obter uma preparação com alto grau de DCs maduras, condição ideal para os experimentos posteriores. As amostras foram marcadas com os anticorpos anti-CD86-PE e anti-CD11c-FITC. O objetivo da marcação anti-CD86 era avaliar o grau de maturação das DCs e a marcação anti-CD11c avaliar o grau de pureza da preparação de DCs. Os resultados estão mostrados na figuras 9 e 10.

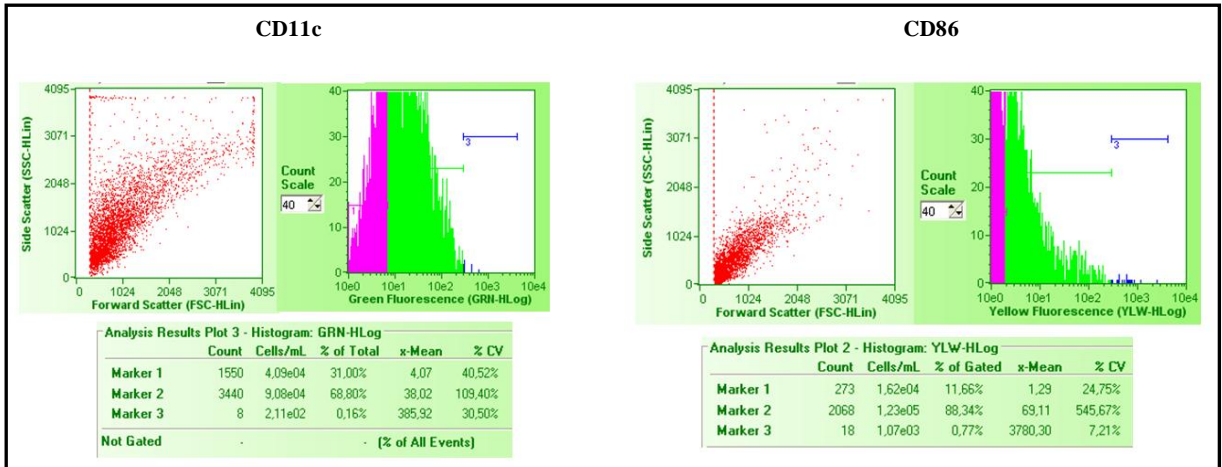


Figura 9. Espectros de FACS representativos de um experimento com os marcadores de superfície CD11c e CD86. Cultura de DCs eletroporadas, incubadas com LPS por 48h, marcadas com os anticorpos anti-CD11c-FITC e anti-CD86-PE e analisadas por FACS. O aparelho utilizado para a análise de porcentagem de células marcadas foi o *Guava EasyCyte Plus System* (Guava Technologies) e os dados analisados pelo *software CytoSoft 4.1* (Guava Technologies). Os dados obtidos foram colocados no gráfico mostrado na figura 10.

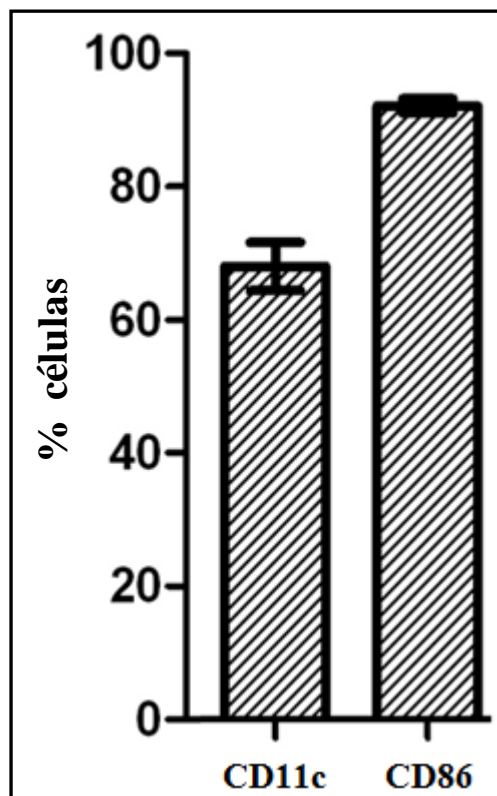


Figura 10. Expressão dos marcadores de superfície CD11c e CD86. Dados extraídos dos FACS representativos mostrados na figura 9. Os resultados foram expressos como média \pm SD. Anti-CD11c n=3 e anti-CD86 n=6.

Os resultados obtidos referentes à expressão dos marcadores de superfície CD86 e CD11c mostram que realmente, nós estávamos trabalhando com DCs com uma porcentagem de maturação elevada (aproximadamente 100% das células diferenciadas e 70% células totais segundo marcação com CD11c; Figura 10). Esta porcentagem de maturação foi importante devido ao fato que só DCs maduras apresentam antígenos de uma forma eficiente. (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; CELLA; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1997). Após estes resultados prosseguimos então com experimentos de eletroporação das DCs e avaliação da viabilidade celular.

4.4 Eletroporação das células dendríticas e avaliação da viabilidade celular

O passo seguinte do projeto foi estabelecer uma condição ideal de eletroporação das DCs que permitisse a sobrevivência das células para podermos introduzir os antígenos (Hsp65 e Hsp65ox) diretamente no citoplasma. Como as DCs apresentam peptídeos tanto pelas vias MHC I e MHC II e o PT20S gera peptídeos apenas para o complexo MHC I (DELAMARRE; HOLCOMBE; MELLMAN, 2003) que é nosso interesse avaliar, os antígenos foram internalizados por eletroporação. Com esse procedimento evita-se que o antígeno seja direcionado ao lisossomo que gera peptídeos para apresentação por complexos MHC II. Nesse caso, a internalização do antígeno proteico é feita por fagocitose, processo no qual há formação de vesículas lipídicas que são, após internalização, direcionadas para o lisossomo ao invés de permanecer no citoplasma para processamento da proteína pelo PT (BANCHEREAU et al., 2000).

Após a obtenção das DCs, elas foram eletroporadas na ausência e na presença de antígeno (Hsp65). Nas condições adotadas (descritas em Materiais e Métodos), a sobrevivência foi de mais de 90% das células após eletroporação segundo avaliação de viabilidade realizada com iodeto de propídeo (Figuras 11 e 12).

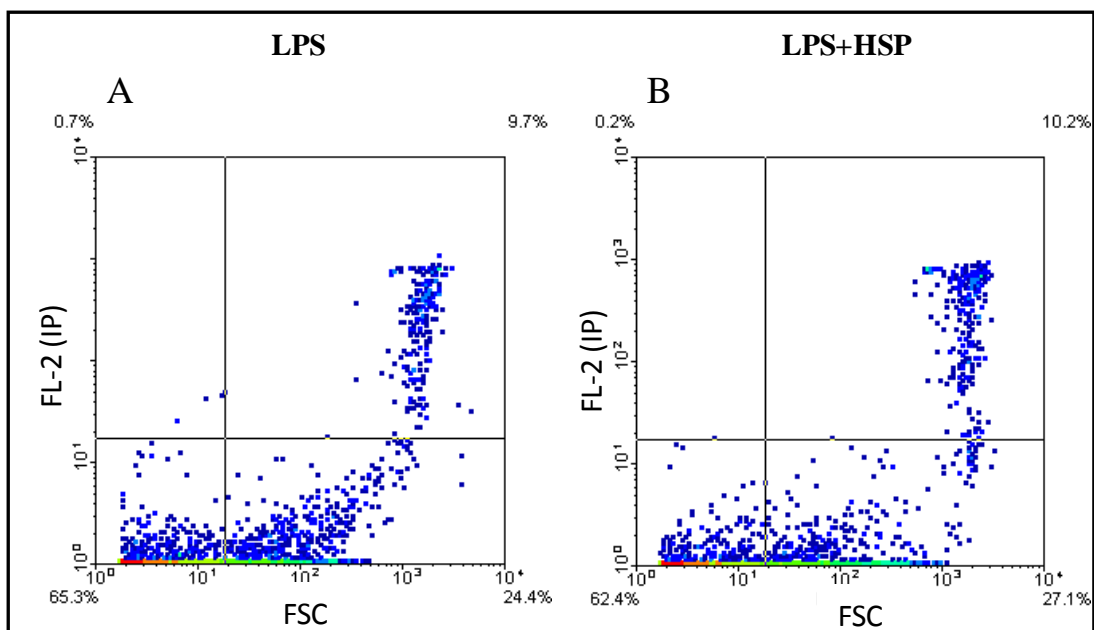


Figura 11. Espectros de FACS representativos de um experimento de viabilidade celular. Cultura de DCs eletroporadas na ausência (A) ou na presença de antígeno (B) e em seguida incubadas com LPS por 48h (A; B). Após o tratamento as células foram ressuspensas e incubadas com iodeto de propídeo. O aparelho utilizado para a análise de viabilidade celular foi o *FACSCalibur* (BD Biosciences) e os dados analisados pelo *software WinMDI* (Joseph Trotter).

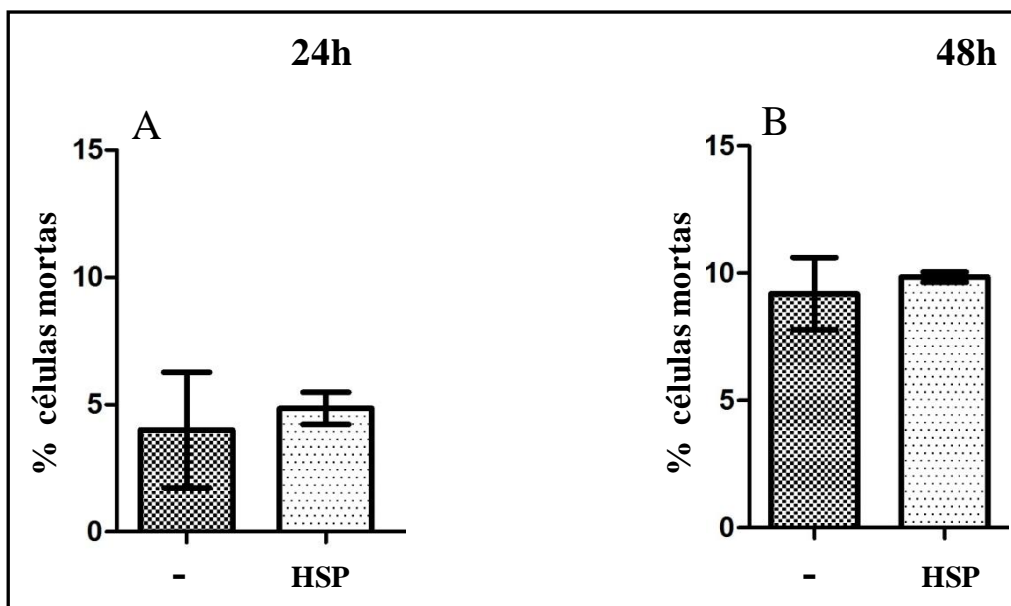


Figura 12. Viabilidade celular após eletroporação e incubação com LPS. Os dados mostrados foram obtidos a partir dos experimentos de FACS de acordo com o descrito na Figura 11. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=4).

Nossa conclusão foi de que em todas as condições experimentais utilizadas: eletroporação; incubação com LPS na presença do antígeno nativo, não houve perda significativa da viabilidade celular: no máximo 10% das células totais plaqueadas apresentaram perda de viabilidade celular, de acordo com o ensaio adotado para a avaliação, o que inclui DCs assim como as demais células presentes.

4.5 Proliferação de linfócitos T CD8⁺ após co-cultura com DCs desafiadas com pró-oxidantes

Após a padronização dos protocolos descritos acima, iniciamos os experimentos propriamente ditos. Nosso interesse foi em verificar se DCs eletroporadas com proteína oxidada, no caso a Hsp65, aumentaria a proliferação de linfócitos T CD8⁺ uma vez que possivelmente as DCs gerariam maior taxa de apresentação antigênica da classe MHC I. Nosso interesse em verificar se DCs eletroporadas com antígeno oxidado e submetidas a modelos de alteração redox geraria um aumento na proliferação de linfócitos T CD8⁺ é porque uma das hipóteses sobre a seleção de proteínas que geram peptídeos processados pelos complexos MHC I se refere a proteínas oxidadas (TEOH; DAVIES, 2004).

É aceito na literatura que proteínas oxidadas são preferencialmente degradadas pelo PT20S (DAVIES, 2001) por processo não dependente de ubiquitina e, portanto, independente das unidades regulatórias do PT26S (INAI; NISHIKIMI, 2002; SHRINGAPURE et al., 2003). No entanto, até o momento não existem dados demonstrando que fragmentos dessas proteínas, produtos de hidrólise pelo PT20S, seriam utilizados na apresentação antigênica.

Recentemente surgiu uma teoria relacionada a unidade regulatória 11S do PT (“*Molecular Coupling Hypothesis*”). Esta teoria sugere que poderia haver uma ligação da subunidade regulatória 11S do PT com a TAP (JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009) favorecendo assim um aumento dos fragmentos protéicos para apresentação antigênica, uma vez que, a subunidade regulatória 11S, transferiria os oligopeptídeos antigênicos diretamente para o TAP, protegendo os fragmentos da degradação por proteases citosólicas. No entanto, até o momento não existem dados demonstrando essa teoria.

Tomando por base os dados acima, uma hipótese seria o fato de que o antígeno uma vez oxidado não seria substrato do PT26S, mas sim do 20S (padrão ou IP). Considerando-se que a unidade catalítica 20S livre pode associar-se à unidade regulatória 11S, acreditamos na

possibilidade de favorecimento da produção de peptídeos antigênicos, via antígeno oxidado hidrolisado pelo complexo 20S-11S ou mesmo híbridos 19S-20S-11S. O experimento descrito abaixo foi desenhado tomando por base essas premissas.

Neste experimento de proliferação de linfócitos, escolhemos a proteína Hsp65 porque foi de nosso interesse utilizar um antígeno de possível aplicação clínica. Utilizamos a Hsp65 em sua forma nativa e oxidada, pois já é aceito na literatura um papel protetor desta Hsp de *M. leprae* (Hsp65) em mamíferos, uma vez que ela estimula o hospedeiro a combater a infecção por *M. tuberculosis*, outro organismo dentro deste gênero bacteriano (SILVA; LOWRIE, 2000)

Além da utilização do antígeno Hsp65 em sua forma nativa e oxidada para a sensibilização de linfócitos T CD8⁺, também foram utilizados modelos de alteração do estado redox nestas células (descritos em Materiais e Métodos). Adotamos neste experimento o sistema gerador de íons O₂^{•-} (sistema XaXO) e H₂O₂ no meio extracelular, além de antimicina A, inibidor de cadeia respiratória o que contribui para o aumento de ROS intracelular.

Nesses experimentos os camundongos C57BL/6 foram imunizados com DNA-*HSP65* durante 3 meses. Em seguida, após a obtenção das DCs a partir de camundongos C57BL/6, as células foram eletroporadas na ausência e na presença dos antígenos (Hsp65 e Hsp65_{ox}), submetidas aos modelos de alteração redox (H₂O₂, Antimicina A e o sistema XaXO) e posteriormente incubadas com LPS por 48h. O procedimento completo está descrito em Materiais e Métodos. Paralelamente, foi realizada a obtenção dos linfócitos a partir de camundongos C57BL/6 imunizados com DNA-*HSP65*. Após a obtenção dos linfócitos totais do baço, os linfócitos T CD8⁺ foram purificados (descrito em Materiais e Métodos) e marcados com CFSE. Em seguida os Linfócitos T CD8⁺ foram co-cultivados com as DCs tratadas durante 5 dias como está descrito em Materiais e Métodos. No 5º dia, a porcentagem de proliferação de linfócitos T CD8⁺ foi analisada por FACS. A concanavalina A (CON-A) foi utilizada como controle positivo da proliferação de linfócitos. As figuras 13 e 14 mostram os resultados referentes a co-cultura de DCs e linfócitos T CD8⁺.

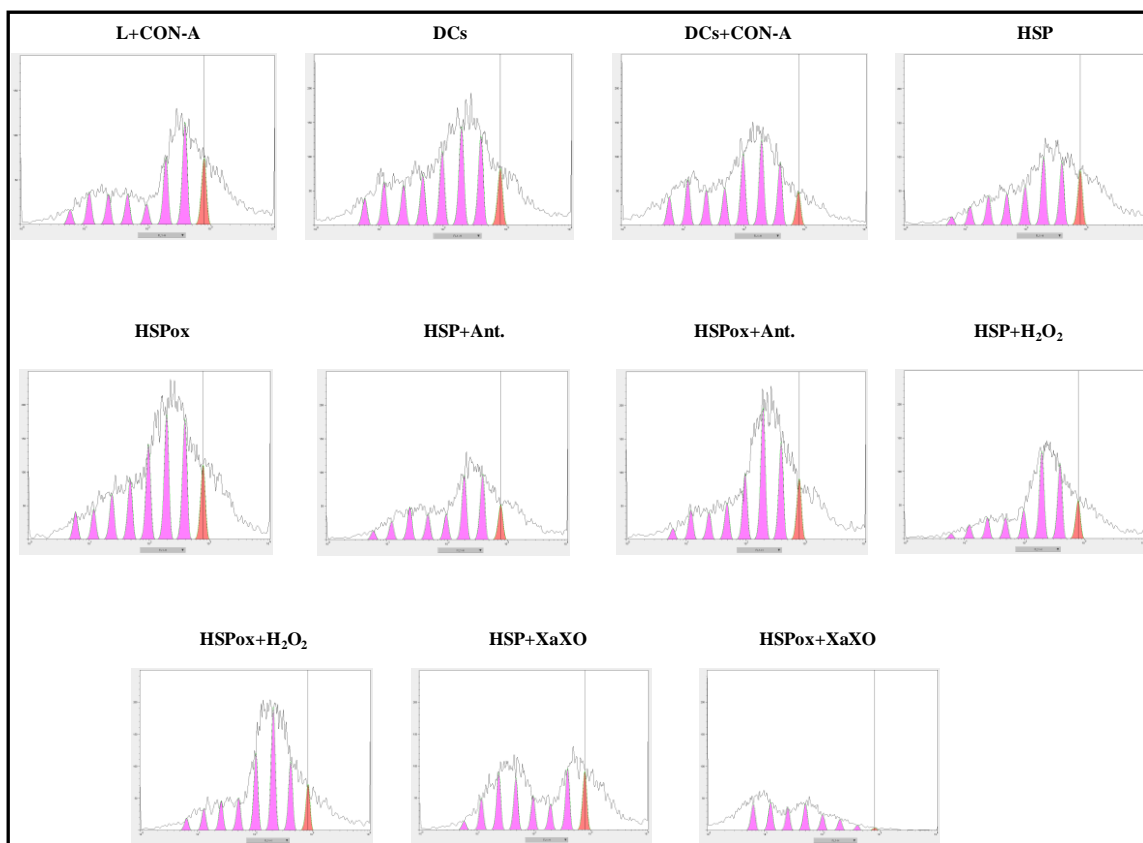


Figura 13. Espectros de FACS representativos da proliferação de linfócitos T CD8⁺ em co-cultura com DCs desafiadas com pró-oxidantes e eletroporadas com Hsp65 nativa e oxidada. As DCs foram eletroporadas com antígeno em suas formas nativa (Hsp) e oxidada (Hsp_{ox}), incubadas com LPS e com modelos de alteração redox: 1µg/mL de antimicina A (Ant.); 750µM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂); sistema XaXO na concentração de 3mM xantina e 20 µL de xantina oxidase 0,6 U/mL (XaXO), por 48h e em seguida, colocadas em co-cultura com linfócitos T CD8⁺ (5 dias) previamente marcados com CFSE. O aparelho utilizado para a análise de proliferação celular foi o *FACSCalibur* (BD Biosciences) e os dados analisados pelo *software FlowJo* (Tree Star). Os dados obtidos foram colocados no gráfico mostrado na figura 14.

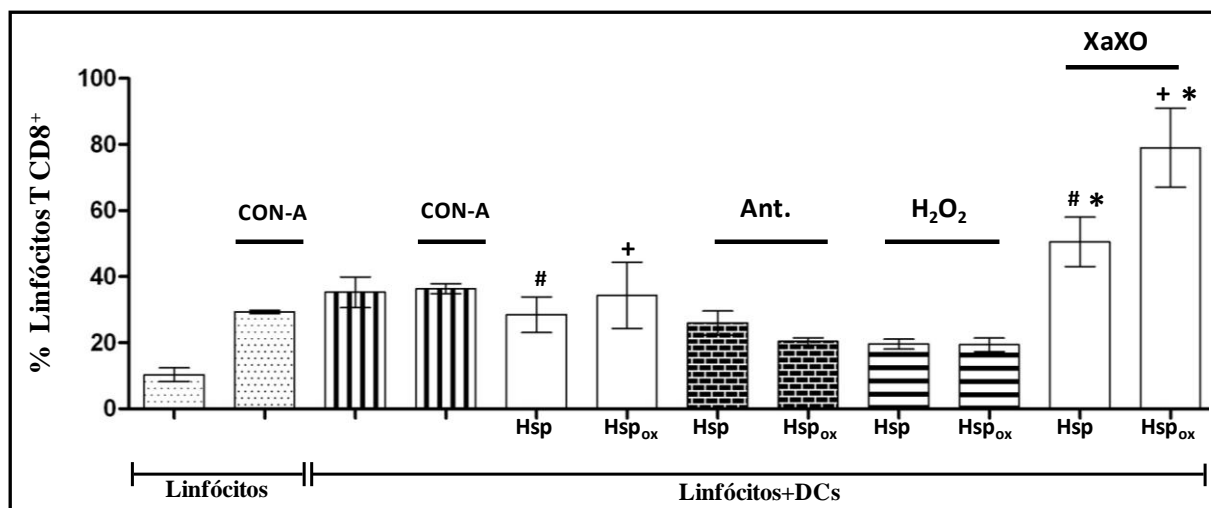


Figura 14. Proliferação de linfócitos T CD8⁺ em co-cultura com DCs desafiadas com pró-oxidantes e eletroporadas com Hsp65 nativa e oxidada. Os dados mostrados se referem aos experimentos mostrados na figura 13. CON-A, concanavalina A. A concanavalina A foi utilizada como controle positivo de proliferação de linfócitos. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=3). #p < 0.0146; +p < 0.0078; *p < 0.0252.

Os dados da figura 14 sugerem que as DCs incubadas com o sistema XaXO induziram um aumento significativo na proliferação de linfócitos, principalmente quando eletroporadas com o antígeno na forma oxidada (Hsp65_{ox}). Também se pode observar que a incubação das DCs com Antimicina A ou H₂O₂ não foi capaz de modular a proliferação de linfócitos (figuras 13 e 14). Estes dados sugerem que o sistema XaXO modulou o metabolismo de DCs positivamente, possivelmente por promover alterações redox nestas células, pois o sistema XaXO é gerador de ROS (O₂⁻, H₂O₂) (ULLRICH; KISSNER, 2006).

A partir dos dados acima passamos a explorar o sistema XaXO. Para tanto, enquanto controle dos experimentos acima, procedemos a um ensaio no qual a co-cultura de linfócitos T CD8⁺ com DCs foi feita na presença dos sobrenadantes de DCs desafiadas com o sistema XaXO. Este ensaio teve como objetivo descartar a possibilidade de que o efeito anteriormente observado (proliferação de linfócitos por DCs desafiadas com XaXO) pudesse ser devido à secreção de citocinas pelas DCs no meio de cultura durante o período de 5 dias da co-cultura com os linfócitos T CD8⁺.

Neste próximo experimento de proliferação de linfócitos T CD8⁺, após a obtenção das DCs, as células foram eletroporadas e incubadas com LPS, XaXO ou LPS+XaXO por 48h. Paralelamente foi crescida outra cultura de DCs sem tratamentos (DCs imaturas). Em seguida, as DCs tratadas foram descartadas e o sobrenadante foi separado para adição na co-cultura de DCs imaturas e linfócitos T CD8⁺ previamente marcados com CFSE por 5 dias. O sobrenadante das células tratadas foi adicionado neste momento. No 5º dia, a porcentagem de

proliferação de linfócitos T $CD8^+$ foi analisada por FACS. As figuras 15 e 16 mostram os resultados referentes a co-cultura de DCs imaturas e linfócitos T $CD8^+$.

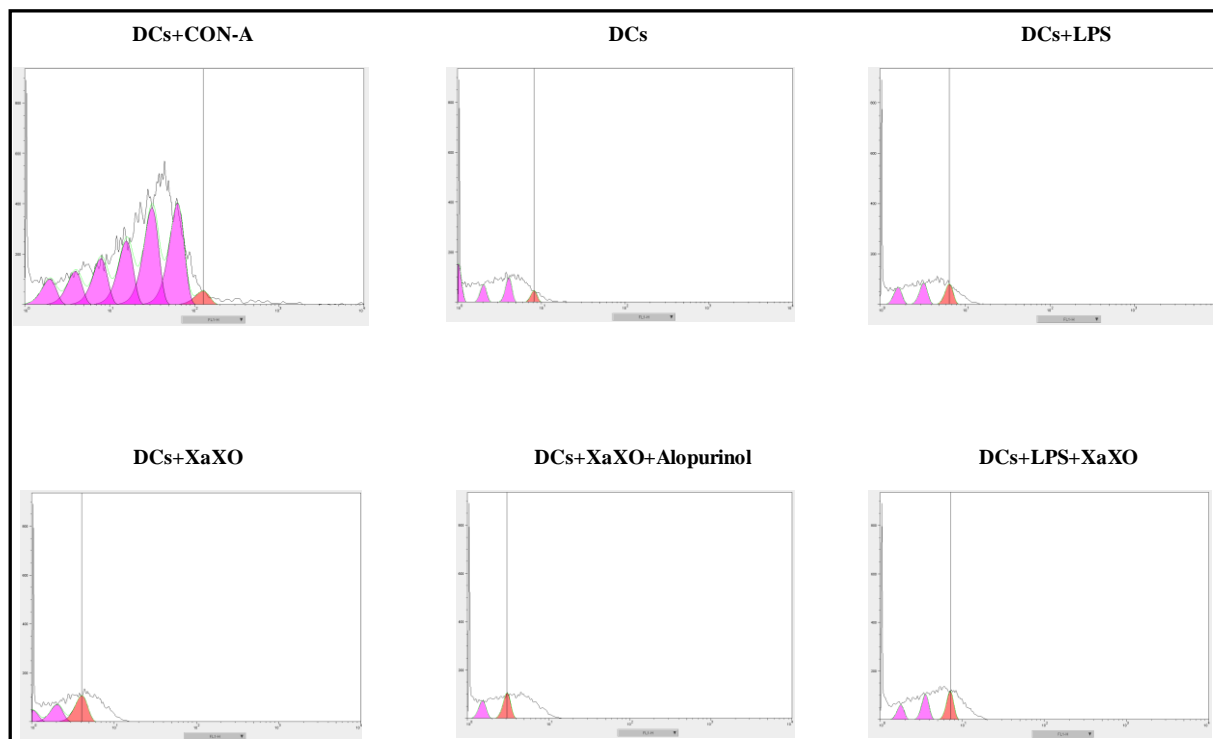


Figura 15. Espectros de FACS representativos de um experimento de proliferação de linfócitos T $CD8^+$ em co-cultura com DCs imaturas. As DCs foram eletroporadas, incubadas com LPS ou XaXO por 48h. Em seguida, as DCs tratadas foram descartadas e o sobrenadante obtido foi adicionado na co-cultura de DCs imaturas-linfócitos T $CD8^+$ previamente marcados com CFSE por 5 dias. O aparelho utilizado para a análise de proliferação celular foi o *FACSCalibur* (BD Biosciences) e os dados analisados pelo *software FlowJo* (Tree Star). Os dados obtidos foram colocados no gráfico mostrado na figura 15.

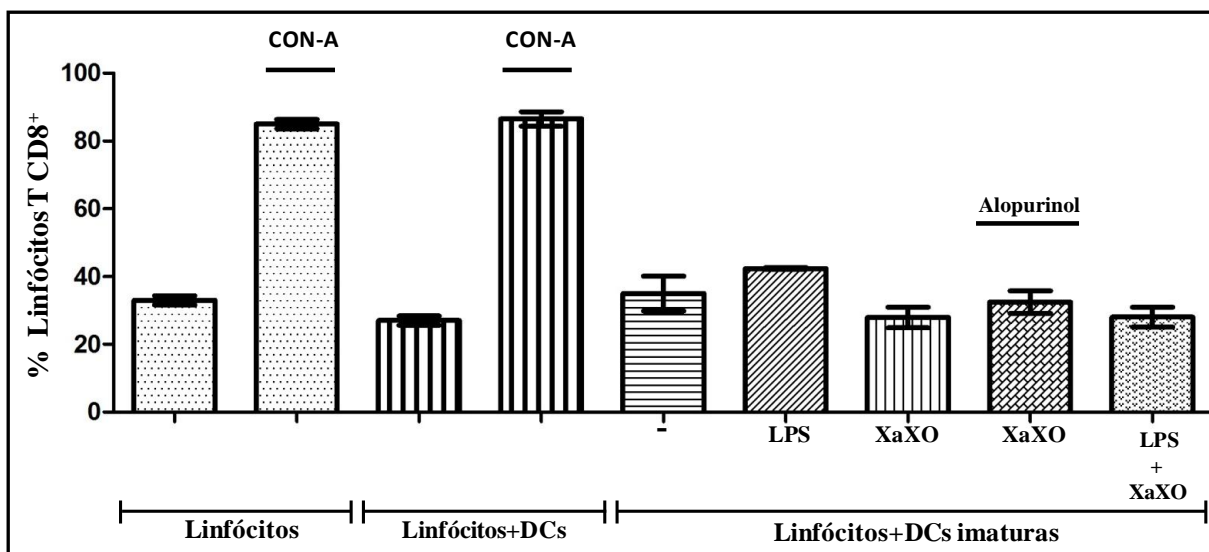


Figura 16. Proliferação de linfócitos T CD8⁺ em co-cultura com DCs imaturas. Os dados mostrados se referem aos experimentos mostrados na Figura 15. CON-A, concanavalina A. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=3).

Conforme está demonstrado nas figuras 15 e 16, a incubação das DCs imaturas com o sobrenadante de DCs previamente tratadas não gerou proliferação dos linfócitos T CD8⁺. Nem o LPS, o sistema XaXO ou a combinação dos dois compostos foi capaz de promover a proliferação dos linfócitos. Mesmo considerando que no meio de cultura, utilizado para a co-incubação, haveria xantina oxidase e talvez xantina, tudo indica que a atividade do sistema, remanescente no meio, não foi suficiente para maturar as DCs presente na co-cultura. A proliferação somente foi observada quando o mesmo meio de cultura foi utilizado na co-cultura de linfócitos CD8⁺ com DCs previamente maturadas com LPS (dados não mostrados).

4.6 Maturação de DCs pelo sistema xantina/xantina oxidase

O processo de maturação de DCs é importante para a ativação destas células, pois só DCs maduras apresentam antígenos de uma forma eficiente (SALLUSTO et al., 1995). As DCs interagem com micróbios através de receptores denominados TLRs (*Toll-like receptors*) e isto desencadeia uma cascata de ativação de genes da resposta imune. (ZANONI; GRANUCCI, 2010).

Uma das cascatas conhecidas de ativação gênica é desencadeada pelo fator de transcrição NF-kB através da interação dos TLRs com LPS (ZANONI; GRANUCCI, 2010). Estes receptores estão centrados no topo da resposta imune e é difícil catalogar os efeitos finais de suas respostas. Alguns de seus efeitos podem incluir o recrutamento de leucócitos,

ativação da atividade microbicida (produção de ROS e RNS, aumento de peptídeos antimicrobianos), relaxamento dos vasos sanguíneos pelo aumento da produção de NO^{*} e início das respostas imune-adaptativas (BEUTLER et al., 2003). Sabendo da importância desses receptores e de sua ativação por LPS, e ainda, da importância de DCs maduras no processo de apresentação antigênica e proliferação de linfócitos foi feito um experimento, baseado na maturação de DCs por LPS.

Neste experimento as DCs foram tratadas com XaXO na presença ou ausência de alopurinol, inibidor de xantina oxidase e foi avaliada a expressão do marcador CD86. Nosso objetivo foi comparar a maturação dessas células pelo sistema XaXO com LPS. Os dados obtidos estão mostrados na Figuras 17 e 18.

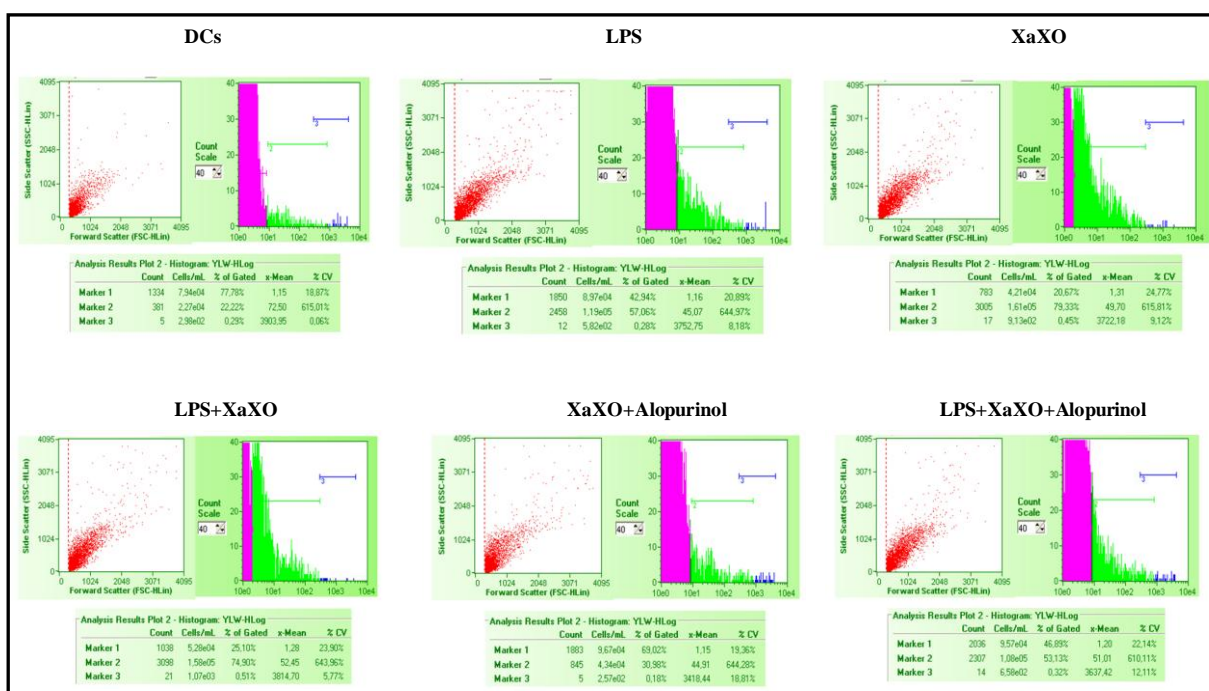


Figura 17. Espectros de FACS representativos do efeito do sistema XaXO na maturação de DCs. Cultura de DCs incubadas com LPS, XaXO, LPS+XaXO, XaXO+Alopurinol ou LPS+XaXO+Alopurinol por 48h, marcadas com o anticorpo anti-CD86-PE e analisadas por FACS. O aparelho utilizado foi o *Guava EasyCyte Plus System* (Guava Technologies) e os dados analisados pelo *software CytoSoft 4.1* (Guava Technologies). Os dados obtidos foram colocados no gráfico mostrado na figura 19.

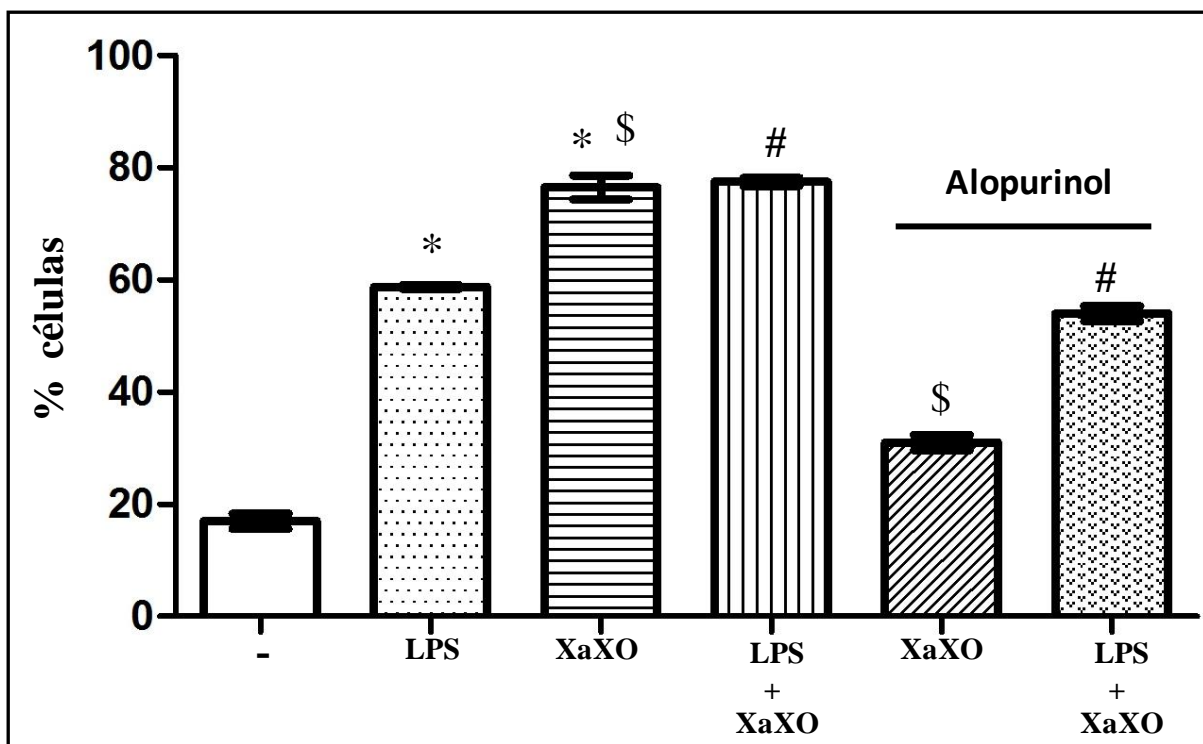


Figura 18. Efeito do sistema XaXO na maturação de DCs segundo marcação com CD86-PE. Cultura de DCs incubadas de acordo com o descrito na Figura 17. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=3). *p < 0.0073; \$p < 0.0016; #p < 0.0023.

Os dados da figura 18 mostram que o sistema XaXO foi mais eficiente na maturação de DCs do que o LPS. Somente a incubação de LPS+XaXO foi tão eficiente quanto a incubação de XaXO na maturação de DCs. Além disso, é possível constatar que a maturação de DCs foi inibida quando as células foram incubadas com XaXO na presença de alopurinol (inibidor de xantina oxidase), demonstrando a importância da geração do $O_2^{\cdot-}$. Também se pode observar que a maturação das DCs incubadas com LPS+XaXO e alopurinol foi idêntica às das DCs incubadas somente com LPS. Dado semelhante já foi descrito na literatura (KANTENGWA et al., 2003).

Os dados obtidos só reforçam a idéia de que o sistema XaXO, ou seja, a geração do $O_2^{\cdot-}$, teria papel crucial no metabolismo de maturação de DCs. Estes dados, juntamente com os dados de proliferação de linfócitos, sugerem que a via de maturação e ativação de DCs é distinta daquela induzida por LPS.

Também realizamos a marcação de DCs maturadas com XaXO com o anticorpo anti-MHC II-FITC (Figuras 19 e 20) onde verificamos que a porcentagem de células marcadas com anti-MHC II foi superior a 90%, confirmando a diferenciação destas células.

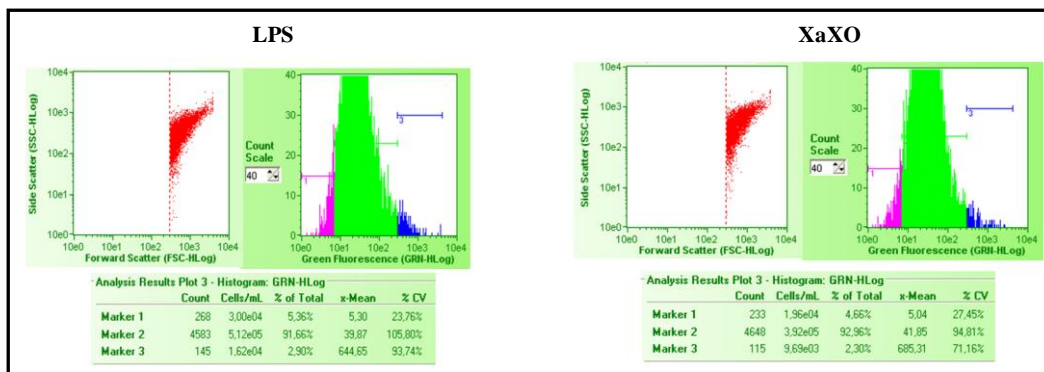


Figura 19. Espectros de FACS representativos da marcação de DCs com o anticorpo anti-MHC II-FITC. Células pluripotentes crescidas na presença do fator GM-CSF, incubadas com LPS ou com o sistema XaXO e marcadas com o anticorpo anti-MHC II-FITC. O aparelho utilizado para a análise foi o *Guava EasyCyte Plus System* (Guava Technologies) e os dados analisados pelo *software CytoSoft 4.1* (Guava Technologies). Os dados obtidos foram colocados no gráfico mostrado na figura 20.

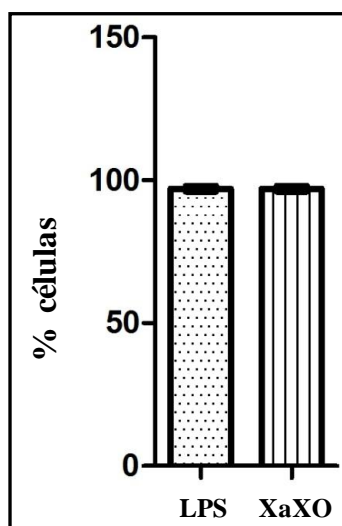


Figura 20. Expressão de MHC II em DCs. Os dados mostrados são referentes aos experimentos descritos na Figura 19. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=3) da percentagem de células marcadas.

Verificamos que a porcentagem de células marcadas com anti-MHC II-FITC foi superior a 90%, como demonstrado por outros grupos de pesquisa e dentro do esperado no caso de diferenciação com LPS (BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002). Nesta série de experimentos concluímos que o sistema XaXO além de promover a proliferação de linfócitos T CD8⁺ quando em co-cultura com DCs pré-incubadas com esse sistema, também promove a maturação das DCs tendo efeito similar ao LPS.

Realizamos também um ensaio de viabilidade celular após maturação de DCs com o sistema XaXO, comparativamente à maturação com LPS. As células foram mantidas por 48h com esses agentes. Em seguida foram incubadas com iodeto de propídeo e analisadas por FACS (figuras 21 e 22). Como pode ser observado, a incubação com o sistema XaXO não alterou a viabilidade celular quando comparado com a incubação com LPS: a viabilidade foi superior a 90% nas duas condições testadas.

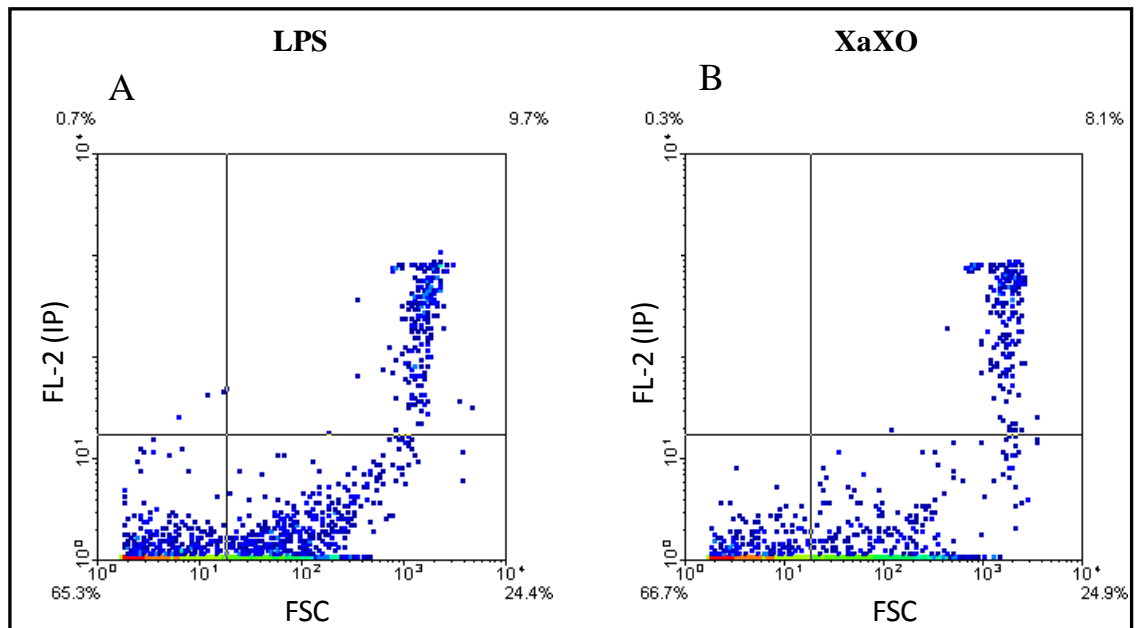


Figura 21. Viabilidade celular de DCs incubadas com LPS ou XaXO. Cultura de DCs eletroporadas e em seguida incubadas com LPS (A) ou XaXO (B) por 48h. Após o tratamento as células foram ressuspensas e incubadas com iodeto de propídeo. O aparelho utilizado para a análise foi o *FACSCalibur* (BD Biosciences) e os dados analisados pelo *software WinMDI* (Joseph Trotter).

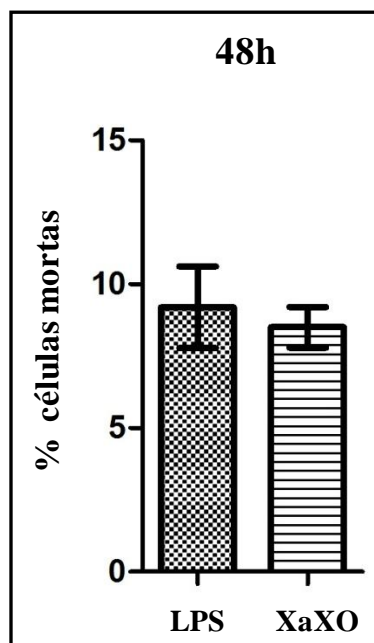


Figura 22. Viabilidade celular após eletroporação e incubação com LPS ou XaXO. Os dados mostrados foram obtidos a partir dos experimentos de FACS de acordo com o descrito na Figura 21. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=4).

Na próxima etapa do trabalho tentamos compreender o mecanismo pelo qual a geração de $O_2^{\cdot-}$ tem efeito sobre a maturação de DCs além de contribuírem para o aumento da proliferação de linfócitos T $CD8^+$ dependente do processamento do antígeno utilizado (Hsp65). Para tanto, procedemos a algumas determinações relativas ao conteúdo de PT (20S padrão, IP, unidades regulatórias 19S e 11S) e avaliamos a atividade do PT dependente e não-dependente de ATP (26S e 20S, respectivamente). Os resultados obtidos estão mostrados abaixo.

4.7 Atividade catalítica do proteassomo em células dendríticas submetidas à maturação com LPS e com o sistema XaXO

Nos experimentos de avaliação da atividade do PT, após a obtenção das DCs, as células foram tratadas com LPS ou XaXO por 48 horas. Em seguida, as células foram recolhidas das placas e o precipitado celular foi lisado para a obtenção do extrato. Após a quantificação protéica nestes extratos, as atividades peptidásicas do tipo quimiotripsina e tripsina do PT foram avaliadas com os respectivos peptídeos fluorogênicos (s-LLVY-MCA e z-ARR-MCA) na presença e ausência de ATP. A atividade dependente de ATP se refere à atividade do PT26S, ou seja, acoplado a unidades regulatórias 19S. Já, na ausência de ATP onde ocorre o desacoplamento das unidades 19S e 20S, é possível avaliar a atividade

hidrolítica somente da unidade 20S desacoplada. O protocolo completo está descrito em Materiais e Métodos. A figura 23 apresenta os resultados referentes à atividade do PT.

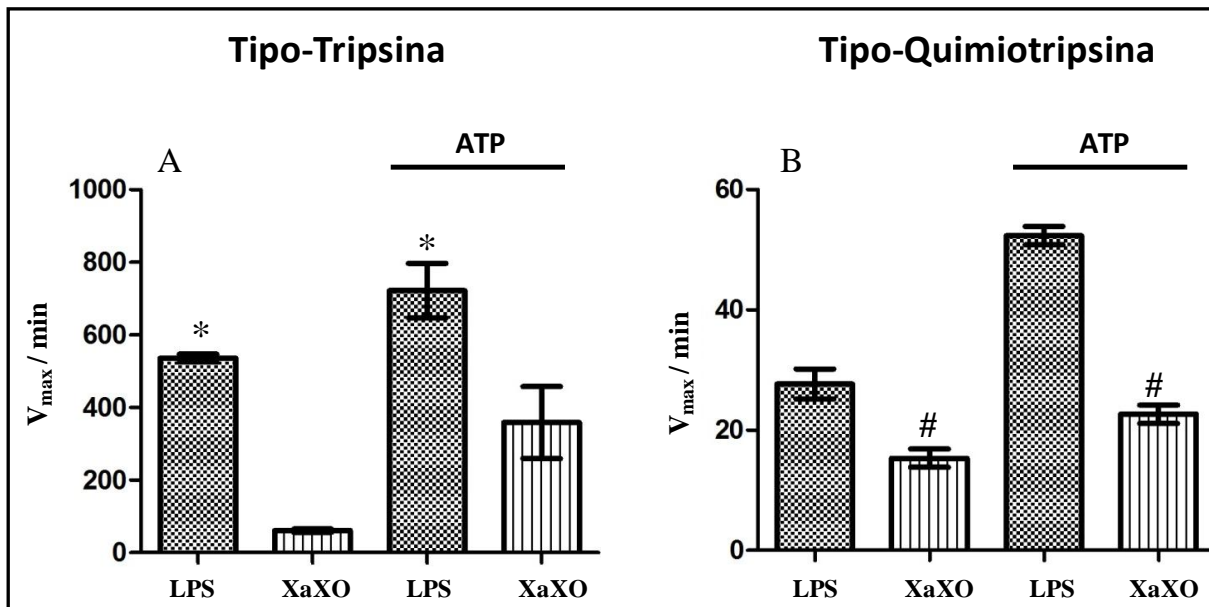


Figura 23. Quantificação das atividades peptidásicas do tipo tripsina e quimiotripsina do IP em extrato de DCs obtido a partir de DCs incubadas com LPS ou XaXO por 48h. (A) Quantificação da atividade tipo tripsina (B) Quantificação da atividade tipo quimiotripsina de. O ATP foi adicionado nas etapas de lise celular e quantificação da atividade. Os resultados foram expressos como média \pm SD (n=6). *p < 0.0133; #p < 0.0042.

Os dados apresentados na figura 24 mostram que a atividade do PT, tanto aquela dependente quanto a não-dependente de ATP, está diminuída em DCs maturadas com o sistema XaXO. As atividades peptidásicas não-dependentes de ATP do tipo tripsina e quimiotripsina sofreram uma diminuição de aproximadamente 5 X e 50%, respectivamente. Por outro lado, aquela dependente de ATP foi reduzida em 50% em ambos os sítios catalíticos. Também se pode observar que a diferença das atividades tipo tripsina e quimiotripsina é de cerca de 14 vezes.

Estes dados, até o momento, sugerem que o aumento da proliferação de linfócitos T CD8⁺ e, provavelmente da apresentação antigênica do tipo MHC I, não estaria relacionado a um possível aumento da atividade do PT de DCs incubadas com o sistema XaXO.

4.8 Determinação do conteúdo de proteínas poli-ubiquitinadas e do conteúdo intracelular de proteassomo (20S e IP) e unidades regulatórias (19S e 11S)

Uma vez observada diferença tão significativa nas atividades catalíticas do PT, na sequência de nossa investigação determinamos o conteúdo intracelular da unidade catalítica 20S e da subunidade do IP $\beta 5i$, além da concentração das unidades regulatórias 11S e 19S para tentarmos compreender a razão da diferença observada dentre os dois tratamentos (LPS e XaXO) (Figura 25). Ainda, fizemos a confirmação da diferença de atividade catalítica examinando o conteúdo intracelular de proteínas poli-ubiquitinadas (Figura 24).

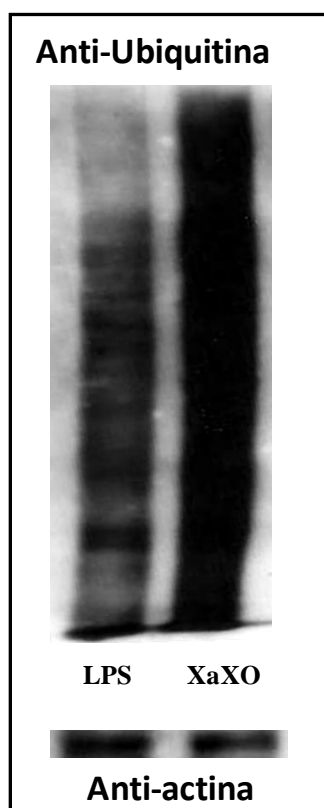


Figura 24. Imunomarcação com o anticorpo anti-ubiquitina no cont eudo de proteínas totais do extrato celular. Nos ensaios de imunomarcação, o extrato celular foi obtido a partir de DCs incubadas com LPS ou XaXO por 48h. O procedimento completo que descreve a imunomarcação do extrato está demonstrado em Materiais e Métodos. A marcação com o anticorpo anti-actina foi realizada nas mesmas amostras utilizadas no ensaio mostrado.

A imunomarcação mostrada na figura 24 revelou que de fato as DCs incubadas com o sistema XaXO apresentaram uma acúmulo de proteínas poli-ubiquitinadas o que concorda com a importante diminuição da atividade hidrolítica observada (figura 23).

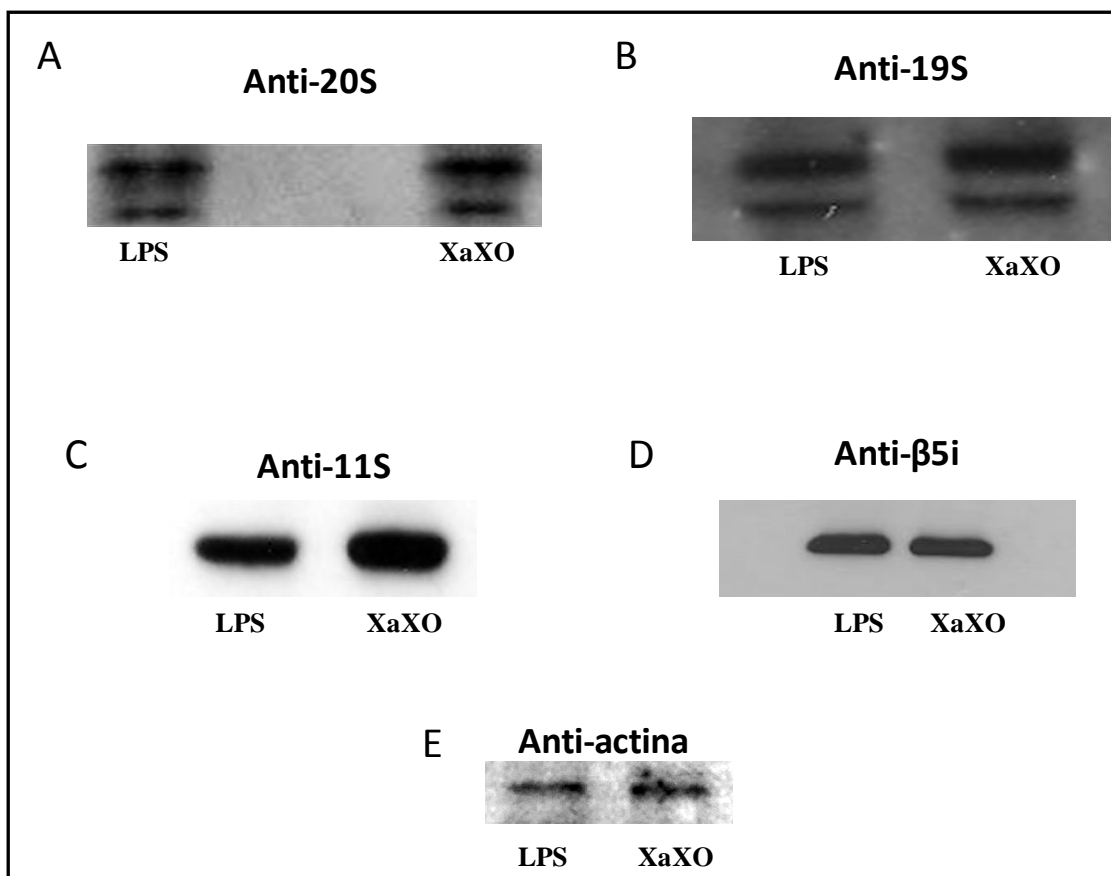


Figura 25. Ensaio de imunomarcção com os anticorpos anti-20S, anti-19S, anti-β5i e anti-11S em extrato de DCs. O extrato celular foi obtido a partir de DCs submetidas ao mesmo tratamento descrito na Figura 24. Os resultados mostrados são representativos de três experimentos independentes. A marcação com anti-actina foi feita nas mesmas amostras utilizadas para os demais ensaios. A quantificação da densidade óptica tomando a de anti-actina como controle de aplicação está mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Determinação de densidade óptica (DO).

	LPS	XaXO
PT20S	100 ± 5	110 ± 4
Unidade 19S	100 ± 10	111 ± 5
Subunidade 20S	100 ± 4	99 ± 1
Unidade 11S	100 ± 5	203 ± 15*
Proteínas poli-ubiquitinadas	100 ± 14	168 ± 15 *

A DO foi calculada pela ferramenta *Histogram* do programa *Adobe PhotoShop* versão 6.1. Os valores de DO calculados foram normalizados pelo valor médio da DO anti-actina. Atribuiu-se em todos os experimentos o valor de 100 % para as amostras de LPS. A porcentagem média dos valores de DO das amostras de extratos obtidos de células tratadas com o sistema XaXO foram calculadas tomando-se o valor da porcentagem da DO de anti-actina das amostras de XaXO relativas às amostras de LPS (100%). Os resultados da tabela se referem aos experimentos das figuras 24 e 25. * $p \leq 0,000037$.

O conjunto de dados obtidos mostra que não houve alteração significativa das concentrações intracelulares das unidades 20S e 19S assim como da subunidade do IP nas células tratadas com XaXO. A única alteração importante foi da unidade 11S: aumento de duas vezes em DCs tratadas com o sistema XaXO (Tabela 2).

Os dados obtidos sugerem que o aumento observado no conteúdo de proteínas poli-ubiquitinadas possa ser devido a um efeito de desacoplamento da unidade 19S do PT20S uma vez que essas proteínas somente podem ser degradadas após reconhecimento pela unidade regulatória 19S. Os dados ainda sugerem que esse desacoplamento seria devido ao importante aumento da unidade 11S que possivelmente compete com a unidade 19S no acoplamento à partícula 20S.

Como observado, a diferença no conteúdo da unidade regulatória 11S é bastante significativa: duas vezes maior nas DCs tratadas com XaXO. O papel dessa unidade regulatória ainda não é bem compreendido. A teoria “*Molecular Coupling Hypothesis*” sugere que poderia haver uma ligação da subunidade regulatória 11S do PT com a TAP (CASCIO et al., 2002; JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009) favorecendo assim a estabilização dos fragmentos protéicos para a complexação com o MHC I, uma vez que, a subunidade regulatória 11S, transferiria os oligopeptídeos antigênicos diretamente para o TAP, protegendo os fragmentos da degradação por proteases citosólicas, mas até o momento não

existem dados demonstrando essa teoria. Ainda, relatos da literatura propõem que a unidade 11S desempenharia um papel no aumento de degradação de peptídeos com cadeias maiores que 9 aminoácidos (não processáveis para apresentação) e na degradação de proteínas oxidadas (JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009).

4.8.1 Modificações protéicas pós-traducionais dependentes do estado redox intracelular

Numa outra série de experimentos avaliamos o conteúdo de proteínas modificadas oxidativamente. Optamos por verificar modificações oxidativas que possam alterar a atividade protéica, tais como a nitração de resíduos de tirosina e a glutatiolação de resíduos de cisteína protéicos. Esta abordagem foi adotada por que acreditamos que a geração de íons $O_2^{\cdot-}$ poderia gerar o pró-oxidante peroxinitrito ($ONOO^-$) em decorrência da interação do $O_2^{\cdot-}$ com o NO^{\cdot} , segundo o esquema abaixo (Esquema 1).



Esquema 1. Geração do pró-oxidante peroxinitrito. No processo de maturação de DCs há aumento de NO^{\cdot} sendo que o sistema XaXO gera o radical $O_2^{\cdot-}$. A reação destas espécies produz $ONOO^-$ que dentre uma série de propriedades, promove a nitração de resíduos protéicos de tirosina.

O $O_2^{\cdot-}$, gerado no meio extracelular pelo sistema XaXO, pode atravessar a membrana plasmática, apesar de sua menor difusibilidade quando comparado com o O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). DCs têm a síntese de NO^{\cdot} elevada quando comparadas a outras células em condições inflamatórias (YAMAMOTO et al., 1998). Portanto, seria factível a produção de $ONOO^-$ nas condições ensaiadas. Uma das conseqüências do aumento da produção de $ONOO^-$ seria a nitração de resíduos de tirosina de proteínas específicas.

Dados obtidos pelo grupo nos últimos anos mostram que o PT20S sofre modulação catalítica por modificação pós-traducional dependente do estado redox intracelular, denominada de S-glutatiolação (DEMASI; SHRINGARPURE; DAVIES, 2001; DEMASI; SILVA; NETTO, 2003; SILVA et al., 2008). Essa modificação diminui a atividade do tipo quimiotripsina, porém aumenta a degradação de proteínas oxidadas devido ao desacoplamento

entre unidades 20S e 19S, devido à abertura da câmara catalítica 20S (dados ainda não publicados; Tese de Doutorado do aluno Gustavo M. Silva).

Partindo das premissas acima, avaliamos o conteúdo total de proteínas nitradas e glutatioladas nas DCs submetidas ao sistema XaXO comparativamente às tratadas com LPS. Esta abordagem teve como principal objetivo tentar avaliar modificações protéicas que possam justificar a diferença na atividade do PT20S observada nas DCs incubadas com XaXO. Iniciamos pelo conteúdo total de proteínas para, caso diferenças fossem observadas, analisarmos as unidades 19S e 20S do PT em ensaios de imunoprecipitação. O resultado dos ensaios de imunomarcção com os anticorpos anti-nitrotirosina e anti-GSH estão mostrados na figura 26.

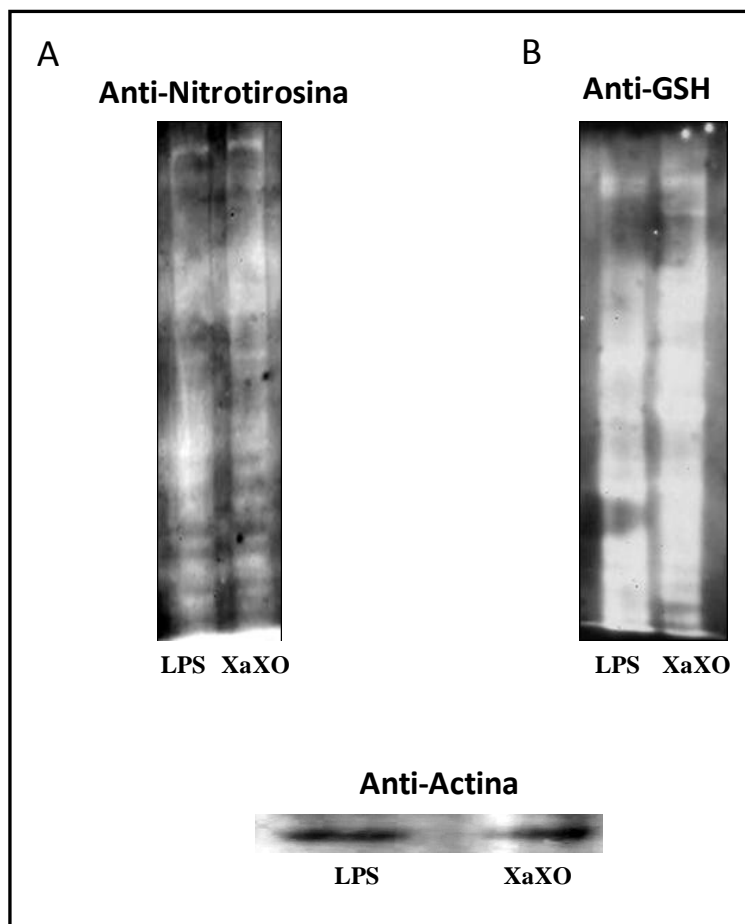


Figura 26. Ensaio de imunomarcção com os anticorpos anti-GSH e anti-nitrotirosina em extrato de DCs. Nos ensaios de imunomarcção, o extrato celular foi obtido a partir de DCs incubadas com LPS ou XaXO por 48h. Os resultados mostrados são representativos de dois experimentos independentes. Segundo os valores de DO obtidos, normalizados pelos valores da imunomarcção com anti-actina, o conteúdo de proteínas glutatioladas e nitradas nas DCs tratadas com XaXO foi 30% e 20% superior ao encontrado em DCs maturadas com LPS, respectivamente.

Segundo os dados obtidos, as diferenças observadas no conteúdo de proteínas glutatioladas e nitradas: 30% e 20% de aumento, respectivamente, nas amostras de DCs incubadas com XaXO, podem não ser significativas, diferentemente do que esperávamos obter baseados nas premissas acima discutidas. No entanto, observa-se na imunomarcção anti-nitrotirosina (Figura 26) que a população de proteínas marcadas difere dentre as amostras de DCs tratadas com LPS ou XaXO. Notam-se duas populações distintas com diferenças de intensidade de marcação. Uma hipótese é de que possivelmente proteínas específicas foram nitradas nas amostras de DCs tratadas com XaXO e por isso a diferença de 20% observada. O grupo está no momento investigando a possibilidade de nitração de subunidades do PT (19S e 20S) por ensaios de imunoprecipitação.

5 DISCUSSÃO

De acordo com os dados aqui apresentados, o sistema XaXO foi capaz de promover a maturação de DCs, segundo ensaios mostrando a significativa apresentação de moléculas CD86 (figura 18). Os dados sugerem que o efeito observado seria devido ao $O_2^{\cdot-}$. Entretanto, não podemos descartar ainda a possibilidade de que os efeitos observados tenham sido devidos ao metabólito gerado pelo sistema XaXO, ou seja, o ácido úrico. O ácido úrico em pH fisiológico é ionizado a urato (pK_a 5,4) que é pouco solúvel em meio aquoso, com grande tendência a cristalizar. O urato pode ser oxidado por algumas espécies radiculares, tais como radical hidroxila (OH^{\cdot}) e RO_2^{\cdot} formando um radical cujo elétron desemparelhado é estabilizado por ressonância devido ao anel purínico o que torna a reação com O_2 lenta (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; p. 156). O urato é ainda um competente seqüestrador de O_3 e NO_2^{\cdot} , portanto com propriedades antioxidantes. Ele protege proteínas de nitração uma vez que reage com o $ONOO^-$ cujos produtos se decompõem formando NO^{\cdot} (HOFSETH et al., 2003). Apesar da complexidade do sistema XaXO, acreditamos que a formação de urato no meio extracelular não tenha tido papel relevante nos efeitos aqui verificados se considerarmos sua baixa solubilidade. No entanto, desconhecemos a possibilidade de DCs endocitarem cristais de urato. Para sabermos se o urato teria ou não um papel relevante na maturação de DCs bastaria incubar as DCs com concentrações crescentes de ácido úrico, seguindo o mesmo protocolo mostrado na figura 18. Esses experimentos serão ainda realizados.

Vale ressaltar que a produção de $O_2^{\cdot-}$ no meio de cultura pelo sistema XaXO implica na geração de H_2O_2 pela dismutação espontânea do $O_2^{\cdot-}$. O H_2O_2 , um agente pró-oxidante, poderia gerar uma série de conseqüências oxidativas incluindo a produção do OH^{\cdot} , altamente reativo. Apesar de termos realizado experimentos incubando DCs com H_2O_2 no meio extracelular e, de acordo com os dados obtidos, nenhuma resposta foi observada na proliferação de linfócitos co-incubados com DCs pré-tratadas com o H_2O_2 (figura 14), não podemos descartar a possibilidade da internalização do $O_2^{\cdot-}$ e sua dismutação enzimática no interior das células gerando concentração intracelular de H_2O_2 compatível com a sinalização da cascata de ativação de NF- κ B (ver discussão abaixo), diferentemente da presença de H_2O_2 no meio extracelular que facilmente se decompõe na presença de soro fetal. Para confirmarmos o papel do $O_2^{\cdot-}$, outra fonte geradora desse radical deverá ser utilizada. Sem dúvida que esses experimentos estão programados pelo grupo.

Corroborando os dados aqui obtidos com o sistema XaXO, Surendran et al. (2010) mostraram em um estudo recente que DCs de camundongos super-expressando a enzima superóxido dismutase (SOD), que dismuta $O_2^{\cdot-}$, têm ativação e função diminuídas. Os autores discutem que isso possivelmente ocorre porque uma vez havendo o aumento da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ não haveria a formação de $ONOO^-$ (Esquema 1) que teria papel na maturação dessas células. Ainda não se conhece nada sobre a sinalização via $ONOO^-$ em DCs, porém alguns estudos com outras células como neutrófilos (JÓZSEF et al., 2006) e monócitos (MATATA; GALINANES, 2002) mostram que o $ONOO^-$ atua na produção de citocinas pela ativação do fator de transcrição NF- κ B por mecanismo ainda não estabelecido. Por outro lado, sabe-se que o processo de maturação de DCs pelo LPS implica na ativação de uma cascata de genes através do fator de transcrição NF- κ B (ZANONI; GRANUCCI, 2010).

Como os dados de literatura são escassos, fica difícil especular sobre mecanismos de maturação de DCs pelo sistema XaXO. No entanto, considerando-se que o efeito aqui descrito tenha sido devido à produção do $O_2^{\cdot-}$, não descartamos a possibilidade de que o processo de maturação observado seja bastante semelhante àquele produzido por LPS, uma vez que existe um conjunto de dados mostrando que a ativação de NF- κ B pelo LPS envolve uma série de eventos que levam ao aumento da produção de espécies pró-oxidantes incluindo a ativação de NADPH oxidases, geradoras de $O_2^{\cdot-}$ (PARK et al., 2004). O $O_2^{\cdot-}$, por dismutação enzimática gera o H_2O_2 que seria o sinalizador final da cascata de NF- κ B (GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006).

DCs estimuladas por LPS sofrem a indução do gene da NO sintase induzível (CORINTI et al., 2003). Assim sendo, outra possibilidade centrada no $O_2^{\cdot-}$, seria a produção de $ONOO^-$, segundo esquema mostrado acima (Esquema 1), uma vez que diversos dados de literatura sugerem que esta espécie reativa de nitrogênio ativa o NF- κ B (COOKE; DAVIDGE, 2002; HATTORI; KASAI; GROSS, 2004; JÓZSEF; FILEP, 2003). Entretanto existem controvérsias a respeito. Essa ativação parece depender da linhagem celular e de outros fatores (LEVRAND et al., 2005). Segundo ensaio mostrado na figura 26 A, encontramos 20% de aumento no conteúdo de proteínas nitradas no extrato de DCs submetidas ao tratamento com XaXO. Não podemos afirmar se esta diferença seja significativa sem analisarmos a nitração de proteínas específicas, que poderiam contribuir com a resposta observada.

Surpreendentemente, o tratamento das DCs com o sistema XaXO provocou uma importante alteração do sistema ubiquitina-proteassomo: inibição catalítica tanto da atividade

dependente quanto da não dependente de ATP, o aumento da unidade regulatória 11S e o aumento do conteúdo de proteínas poli-ubiquitinadas (figuras 23-25 e tabela 2). As diferenças catalíticas não foram acompanhadas de diferenças no conteúdo de PT20S, 26S ou IP20S (figura 25 A, B e D, respectivamente). Sabe-se que DCs maduras, quando comparadas às DCs imaturas, têm aumento na expressão da unidade regulatória 11S sem aumento expressivo das subunidades que compõem o IP (MACAGNO et al., 2001). O aumento significativo da expressão de IP se dá por ocasião da diferenciação celular (LI et al., 2001). Segundo os dados aqui obtidos, o sistema XaXO promoveu um aumento bastante significativo do conteúdo da unidade 11S em comparação ao LPS (figura 25B e tabela 2). De acordo com dados da literatura, a unidade 11S (também denominada de REG ou PA28) quando acoplada à unidade catalítica 20S aumenta a atividade dos três sítios catalíticos: tipos tripsina, quimiotripsina e pós-ácida (JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009). Essa atividade é ATP e ubiquitina independente. Existem três diferentes complexos PA28 denominados de α , β e γ . Somente os complexos α e β são capazes de aumentar a atividade dos três sítios catalíticos e modular a resposta imune. O anticorpo utilizado nos ensaios foi o anti-PA28 β . Diante da série de dados de literatura, o esperado seria observar aumento das atividades catalíticas aqui avaliadas: tipos tripsina e quimiotripsina (figura 23). No entanto, foi visto uma dramática queda, principalmente da atividade do tipo tripsina, a mais abundante em DCs. Considerando que não houve queda no conteúdo do IP20S ou do PT20S padrão, nossa hipótese é de que muito provavelmente tanto a unidade catalítica do PT(20S) quanto a regulatória 19S, que reflete a atividade dependente de ATP e a degradação de proteínas poli-ubiquitinadas, sofreram modificações pós-traducionais em DCs tratadas com o sistema XaXO, principalmente a unidade 20S, haja visto a diferença marcante de sua atividade quando comparada às DCs tratadas com LPS (figura 23A).

São várias as modificações pós-traducionais moduladoras da atividade do PT já descritas: acetilação, fosforilação, S-glutatiolação, modificação por hidroxinonal (produto de peroxidação lipídica), nitrosilação, oxidação de metionina e outros resíduos (ZONG et al, 2008). Já se sabe que algumas dessas modificações inibem a atividade catalítica do PT. A fosforilação, que é uma modificação sabidamente enzimática, ativa a catálise, portanto a inibição desse processo, por exemplo, através da inibição da quinase responsável pela fosforilação, também poderia levar à diminuição da atividade catalítica. Em conclusão, a modificação pós-traducional do PT no modelo estudado é factível e poderia explicar as

alterações aqui observadas. Essas possibilidades deverão ser investigadas para melhor compreensão dos dados obtidos.

O aumento tão significativo observado no conteúdo da unidade 11S em células incubadas com o sistema XaXO poderia explicar o aumento da proliferação de linfócitos T CD8⁺, dependente da apresentação do tipo MHC I e, portanto, do PT, segundo a teoria anteriormente citada (“*Molecular Coupling Hypothesis*”; JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009). Segundo essa hipótese, a ligação da unidade regulatória 11S ao PT20S ou formas híbridas (20S-19S), interagiria com a TAP favorecendo o aumento do processamento de fragmentos protéicos para apresentação antigênica, uma vez que, a subunidade regulatória 11S, transferiria os oligopeptídeos antigênicos diretamente para a TAP, protegendo-os da degradação por peptidases citosólicas. Portanto, o aumento da apresentação antigênica não estaria relacionado à atividade do IP e sim a uma potencialização da eficiência na entrega de peptídeos para os complexos MHC I visto que com a expressão aumentada de 11S este processo estaria favorecido.

Nossa avaliação sobre os dados mostrados na figura 14 sobre o aumento da proliferação de linfócitos T CD8⁺ após a co-cultura entre linfócitos retirados de animais previamente imunizados com o DNA-*HSP65* e DCs previamente tratadas com o sistema XaXO e desafiadas com Hsp65 recombinante, na sua forma nativa e oxidada, é de que muito provavelmente os dados de fato refletem um aumento na apresentação de epítomos imunodominantes processados por complexos MHC I. Os experimentos mostrados na figura 16 descartam a possibilidade de artefato ou de resposta mediada por citocinas liberadas no meio de cultura por DCs maturadas com XaXO.

O grupo de pesquisa do Dr. Célio Lopes Silva desenvolveu a vacina de DNA-*HSP65*, a partir da proteína Hsp65 produzida por *M. leprae*. Esta vacina estimula o sistema imune do hospedeiro a combater a infecção por *M. tuberculosis*. O DNA que codifica a proteína Hsp65 é inserido em um retrovírus. Macrófagos e DCs infectados com esse retrovírus expressam a Hsp65 que é processada, sendo os antígenos apresentados principalmente por complexos MHC I e também por complexos MHC II (BONATO et al., 2004). Linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ são estimulados e conferem proteção contra a infecção por *M. tuberculosis*. Assim, a proteção da vacina é atribuída ao estabelecimento de uma resposta imune celular dominada por linfócitos T e antígenos específicos que produzem interferon γ , que são citotóxicos contra as células infectadas (LIMA et al., 2003b; SILVA; LOWRIE, 2000).

Vacinas de DNA mimetizam os efeitos de vacinas atenuadas devido à habilidade de induzir a apresentação antigênica MHC I e consequente proliferação de linfócitos T CD8⁺, além de possuírem sequências CpG não metiladas que desempenham importante papel na imunogenicidade (TASCON et al., 2000; ULMER et al., 1993).

Em relação à utilização da vacina DNA-*HSP65* para o tratamento da TB em humanos, estudos pré-clínicos estão em fase final e o grupo do Dr. Célio Lopes Silva se prepara para a realização de estudos clínicos de fase I.

O elo entre os dados aqui obtidos com os estudos já desenvolvidos sobre o potencial da vacina DNA-*HSP65* são muito pouco relevantes, pois não sabemos da possibilidade da utilização da imunoterapia celular com DCs em TB. Esse na verdade não é o escopo do presente trabalho. Utilizamos a Hsp65 enquanto antígeno padrão neste estudo, tendo-se em vista a relevância deste antígeno, com o objetivo de explorar o potencial da utilização de pró-oxidantes para estimular DCs na proliferação de linfócitos T CD8⁺. Concluímos que o sistema XaXO teria esse potencial.

6 CONCLUSÕES

Nossa principal conclusão foi de que o sistema XaXO apresentou o mesmo potencial que LPS para a maturação de DCs e, principalmente, DCs maturadas com esse sistema foram capazes de induzir a proliferação de linfócitos T CD8⁺ de maneira mais eficiente do que aquelas maturadas com LPS. Os dados aqui obtidos levantam questões cruciais sobre a modulação do PT em DCs, independentes do sistema XaXO, pois segundo os dados mostrados a inibição catalítica acompanhada do aumento significativo do conteúdo da unidade 11S do IP, foram eventos capazes de induzir a proliferação de linfócitos T CD8⁺, aqui traduzida como aumento da eficiência de DCs na apresentação de antígenos via complexos MHC do tipo I.

Enquanto perspectivas futuras, o trabalho suscitou uma série de questões a serem investigadas, sendo as de nosso interesse aquelas relativas à modulação do PT no modelo aqui investigado.

REFERÊNCIAS*

AUGUSTO, O. **Radicais Livres: Bons, Maus e Naturais**. São Paulo: Ed. Oficina de Textos, 2006.

BADANO, J. L.; TESLOVICH, T. M.; KATSANIS, N. The centrosome in human genetic disease. **Nat. Rev. Genet.**, v. 6, n. 3, p. 194-205, 2005.

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

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

BARROS, M. H.; BANDY, B.; TAHARA, E. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol. Chem.**, v. 279, n. 48, p. 49883-49888, 2004.

BASLER, M.; YOUHNOVSKI, N.; VAN DEN BROEK, M.; PRZYBYLSKI, M.; GROETTRUP, M. Immunoproteasomes down-regulate presentation of a subdominant T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. **J Immunol.**, v. 173, n. 6, p. 3925-3934, 2004.

BAUGH, J. M.; VIKTOROVA, E. G.; PILIPENKO, E. V. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. **J. Mol. Biol.**, v. 386, n. 3, p. 814-827, 2009.

BENACERRAF, B. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region-specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. **J Immunol.**, v. 120, n. 6, p. 1809-1812, 1978.

BEUTLER, B.; HOEBE, K.; DU, X.; ULEVITCH, R. J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, n. 4, p. 479-485, 2003.

***De acordo com:**

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

BOCHTLER, M.; DITZEL, L.; GROLL, M.; HATMANN, C.; HUBER, R. The proteasome. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, n. 28, p. 295-317, 1999.

BONATO, V. L.; GONÇALVES, E. D.; SOARES, E. G.; SANTOS JÚNIOR, R. R.; SARTORI, A.; COELHO-CASTELO, A. A.; SILVA, C. L. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8⁺ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. **Immunology**, v. 113, n. 1, p. 130-138, 2004.

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

BUTTERFIELD, D. A.; ABDUL, H. M.; NEWMAN, S.; REED, T. Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. **NeuroRx**, v. 3, n. 3, p. 344-357, 2006.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, n. 3-4, p. 222-230, 2000.

CASCIO, P.; CALL, M.; PETRE, B. M.; WALZ, T.; GOLDBERG, A. L. Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. **EMBO J.**, v. 21, n. 11, p. 2636-2645, 2002.

CELLA, M.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 9, n. 1, p. 10-16, 1997.

CHAPIRO, J.; CLAVEROL, S.; PIETTE, F.; MA, W.; STROOBANT, V.; GUILLAUME, B.; GAIRIN, J. E.; MOREL, S.; BURLET-SCHILTZ, O.; MONSARRAT, B.; BOON, T.; VAN DEN EYNDE, B. J. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. **J. Immunol.**, v. 176, n. 2, p. 1053-1061, 2006.

CHROMIK, J.; SCHNURER, E.; GEORG-MEYER, R.; WHELER, T.; TUTING, T.; WOLFEL, T.; HUBER, C.; HERR, W. Proteasome-inhibited dendritic cells demonstrate improved presentation of exogenous synthetic and natural HLA-class I peptide epitopes. **J Immunol. Methods**, v. 308, n. 1-2, p. 77-89, 2006.

COCHAND, L.; ISLER, P.; SONGEON, F.; NICOD, L. P. Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 21, n. 5, p. 547-554, 1999.

COOKE, C. L.; DAVIDGE, S. T. Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 282, n. 2, p. C395-402, 2002.

CORINTI, S; PASTORE, S; MASCIA, F; GIROLOMONI, G. Regulatory role of nitric oxide on monocyte derived dendritic cell functions. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 23, n.8, p. 423-431, 2003.

COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A. F. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annu. Rev. Biochem.**, n. 65, p. 801-847, 1996.

DAUSSET, J. Some remarks about the preceding paper by Prof. J. J. van Rood with regard to the interpretation of the results of kidney and skin allograft studies in man. **Transplant Proc.**, v. 5, n. 4, p. 1751-1753, 1973.

DAVIES, K. J. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. **Biochimie**, v. 83, n. 3-4, p. 301-310, 2001.

DE VERTEUIL, D; MURATORE-SCHROEDER, T. L; GRANADOS, D. P; FORTIER, M. H; HARDY, M. P; BRAMOULLÉ, A; CARON, E; VINCENT, K; MADER, S; LEMIEUX, S; THIBAUT, P; PERREAULT, C. Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. **Mol. Cell Proteomics**, 2010. In press.

DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem. J.**, v. 324, n. 1, p. 1-18, 1997.

DELAMARRE, L.; HOLCOMBE, H.; MELLMAN, I. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 1, p. 111–122, 2003.

DEMASI, M.; SHRINGARPURE, R.; DAVIES, K. J. Glutathiolation of the proteasome is enhanced by proteolytic inhibitors. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 389, n. 2, p. 254-263, 2001.

DEMASI, M.; SILVA, G. M.; NETTO, L. E. 20S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 1, p. 679-685, 2003.

DIEU, M. C.; VANBERVLIET, B.; VICARI, A.; BRIDON, J. M.; OLDHAM, E.; AÏT-YAHIA, S.; BRIÈRE, F.; ZLOTNIK, A.; LEBEQUE, S.; CAUX, C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 2, p. 373–386, 1998.

FEILI-HARIRI, M.; FALKNER, D. H.; MOREL, P. A. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. **J. Leukoc. Biol.**, v. 78, n. 3, p. 656-664, 2005.

FRANCO, L. H.; WOWK, P. F.; SILVA, C. L.; TROMBONE, A. P.; COELHO-CASTELO, A. A.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C.; MORETTO, E. L.; BONATO, V. L. A DNA vaccine against tuberculosis based on the 65 kDa heat-shock protein differentially activates human macrophages and dendritic cells. **Genet. Vaccines Ther.**, n. 6, p. 3, 2008.

GAYMALOV, Z. Z.; YANG, Z.; PISAREV, V. M.; ALAKHOV, V. Y.; KABANOV, A. V. The effect of the nonionic block copolymer pluronic P85 on gene expression in mouse muscle and antigen-presenting cells. **Biomaterials**, v. 30, n. 6, p. 1232-1245, 2009.

GIL-TORREGROSA, B. C.; LENNON-DUMÉNIL, A. M.; KESSLER, B.; GUERMONPREZ, P.; PLOEGH, H. L.; FRUCI, D.; ENDERT, P. V.; MIGORENA, S. Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, n. 2, p. 398–407, 2004.

GLOIRE, G; LEGRAND-POELS, S; PIETTE, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, n. 11, p. 1493-1505, 2006.

GRUNE, T.; MERKER, K.; SANDIG, G.; DAVIES, K. J. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 305, n. 3, p.709-718, 2003.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. Ed. Oxford: Oxford University Press, 2006.

HATTORI, Y; KASAI, K; GROSS, S. S. NO suppresses while peroxynitrite sustains NF-kappaB: a paradigm to rationalize cytoprotective and cytotoxic actions attributed to NO. **Cardiovasc. Res.**, v. 63, n. 1, p. 31-40, 2004.

HIRSCH, C.; PLOEGH, H. D. Intracellular targeting of the proteasome. **Trends Cell Biol.**, v. 10, n.7, p. 268-272, 2000.

HOFSETH, L. J; SAITO, S; HUSSAIN, S. P; ESPEY, M. G; MIRANDA, K. M; ARAKI, Y; JHAPPAN, C; HIGASHIMOTO, Y; HE, P; LINKE, S. P; QUEZADO, M. M; ZURER, I; ROTTER, V; WINK, D. A; APPELLA, E; HARRIS, C. C. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n. 1, p. 143-148, 2003.

HOLT, P. G.; SCHON-HEGRAD, M. A.; MCMENARMIN, P. G. Ia-positive dendritic cells form a tightly meshed network within the human airway epithelium. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 19, n. 6, p. 597–601, 1989.

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, 1693-1702, 1992a.

INABA, K.; STEINMAN, R. M.; PACK, M. W.; AYA, H.; INABA, M.; SUDO, T.; WOLPE, S.; SCHULER, G. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. **J. Exp. Med.**, v. 175, p. 1157-1167, 1992b.

INABA, K.; INABA, M.; DEGUCHI, M.; HAGI, K.; YASUMIZU, R.; IKEHARA, S.; MURAMATSU, S.; STEINMAN, R. M. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, p. 3038-3042, 1993.

INAI, Y.; NISHIKIMI, M. Increased degradation of oxidized proteins in yeast defective in 26S proteasome assembly. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 404, p. 279-284, 2002.

JIN, P; HAN, T. H; REN, J; SAUNDERS, S; WANG, E; MARINCOLA, F. M; STRONCEK, D. F. Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. **J. Transl. Med.**, v. 8, p. 4, 2010.

JÓZSEF, L.; FILEP, J. G. Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF-kappaB and AP-1 activation and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 35, p. 1018-1027, 2003.

JÓZSEF, L.; KHREISS, T.; KEBIR, D.; FILEP, J. G. Activation of TLR-9 Induces IL-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils. **J. Immunol.**, v. 176, p. 1195-1202, 2006.

JUNG, T.; ENGELS, M.; KAISER, B.; POPPEK, D.; GRUNE, T. Intracellular distribution of oxidized proteins and proteasome in HT22 cells during oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, p. 1303-1312, 2006.

JUNG, T.; BADER, N.; GRUNE, T. Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 462, p. 231-237, 2007.

JUNG, T.; CATALGOL, B.; GRUNE, T. The proteasomal system. **Mol. Aspects Med.**, v. 30, p. 191-296, 2009.

KANTENGWA, S.; JORNOT, L.; DEVENOGES, C.; NICOD, L. P. Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 167, p. 431-437, 2003.

KAUFMANN, S. H.; HESS, J. Immune response against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for vaccine development. **J. Biotechnol.**, v. 83, p. 13-17, 2000.

KAUFMANN, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, p. 20-30, 2001.

KIM, S.; PABON, A.; SWANSON, T. A.; GLUCKSMAN, M. J. Regulation of cell-surface major histocompatibility complex class I expression by the endopeptidase EC3.4.24.15 (thimet oligopeptidase). **Biochem. J.**, v. 375, p. 111-120, 2003.

KOCHI, A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. **Tubercle**, v. 72, p. 1-6, 1991.

LEE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Trends Cell. Biol.**, v. 8, p. 397-403, 1998.

LEVRAND, S.; PESSE, B.; FEIHL, F.; WAEBER, B.; PACHER, P.; ROLLI, J.; SCHALLER, M. D.; LIAUDET, L. Peroxynitrite is a potent inhibitor of NF- κ B activation triggered by inflammatory stimuli in cardiac and endothelial cell lines. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 34878-34887, 2005.

LI, J.; SCHULER-THURNER, B.; SCHULER, G.; HUBER, C.; SELIGER, B. Bipartite regulation of different components of the MHC class I antigen-processing machinery during dendritic cell maturation. **Int. Immunol.**, v. 13, p. 1515-1523, 2001.

LI, Y.; KE, Y.; GOTTLIEB, P. D.; KAPP, J. A. Delivery of exogenous antigen into the major histocompatibility complex class I and class II pathways by electroporation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 56, p. 616-624, 1994.

LIMA, K. M.; SANTOS, S. A.; LIMA, V. M.; COELHO-CASTELO, A. A.; RODRIGUES, J. M. JR.; SILVA, C. L. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene Ther.**, v. 10, p. 678-685, 2003.

LIMA, K. M.; DOS SANTOS, S. A.; SANTOS, R. R.; BRANDÃO, I. T.; RODRIGUES, J. M. JR.; SILVA, C. L. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. **Vaccine**, v. 22, p. 49-56, 2003b.

LOWRIE, D. B.; TASCAN, R. E.; BONATO, V. L.; LIMA, V. M.; FACCIOLI, L. H.; STAVROPOULOS, E.; COLSTON, M. J.; HEWINSON, R. G.; MOELLING, K.; SILVA, C. L. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature**, v. 400, p. 269-271, 1999.

LUTZ, M. B.; KUKUTSCH, N.; OGILVIE, A. L.; ROSSNER, S.; KOCH, F.; ROMANI, N.; SCHULER, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **J. Immunol. Methods.**, v. 223, p. 77-92, 1999.

MACAGNO, A.; KUEHN, L.; DE GIULI, R.; GROETTRUP, M. Pronounced up-regulation of the PA28 α / β proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 3271-3280, 2001.

MATATA, B. M.; GALINANES, M. Peroxynitrite Is an Essential Component of Cytokines Production Mechanism in Human Monocytes through Modulation of Nuclear Factor- κ B DNA Binding Activity. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 2330-2335, 2002.

MATHEU, M.; SEN, D.; CAHALAN, M. D.; PARKER, I. Generation of bone marrow derived murine dendritic cells for use in 2-photon imaging. **J. Vis. Exp.**, v. 9, p. 773, 2008.

NASKALSKI, J. W.; BARTOSZ, G. Oxidative modifications of protein structures. **Adv. Clin. Chem.**, v. 35, p. 161-253, 2000.

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

PACIFICI, R. E.; DAVIES K. J. A. Protein degradation as an index of oxidative stress. **Methods. Enzymol.**, v. 186, p. 485–502, 1990.

PACIFICI, R. E.; KONO, Y.; DAVIES, K. J. Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex proteasome. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 15405-15411, 1993.

PARK, H. S; JUNG, H. Y; PARK, E. Y; KIM, J; LEE, W. J; BAE, Y. S. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. **J. Immunol.**, v. 173, p. 3589-3593, 2004.

PICKART, C. M.; VANDEMARK, A. P. Opening doors into the proteasome. **Nat. Struct. Biol.**, v. 7, p. 999-1001, 2000.

PREYNAT-SEAUVE, O.; COUDURIER, S.; FAVIER, A.; MARCHE, P. N.; VILLIERS, C. Oxidative stress impairs intracellular events involved in antigen processing and presentation to T cells. **Cell Stress Chaperones.**, v. 8, p. 162-171, 2003.

QIN, Z.; NOFFZ, G.; MOHAUPT, M.; BLANKENSTEIN, T. Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. **J. Immunol.**, v. 159, p. 770-776, 1997.

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

REALINI, C.; DUBIEL, W.; PRATT, G.; FERRELL, K.; RECHSTEINER, M. Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 20727-20732, 1994.

REIS, E. S.; BARBUTO, J. A.; KÖHL, J.; ISAAC, L. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. **Mol. Immunol.**, v. 45, p. 1952-1962, 2008.

REQUENA, J. R.; CHAO, C. C.; LEVINE, R. L.; STADTMAN, E. R. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 98, p. 69-74, 2001.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced and temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.

ROCK, K. L.; GRAMM, C.; ROTHSTEIN, L.; CLARK, K.; STEIN, R.; DICK, L.; HWANG, D.; GOLDBERG, A. L. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. **Cell**, v. 78, p. 761-771, 1994.

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

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.

SCHEICHER, C.; MEHLIG, M.; ZECHER, R.; RESKE, K. Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **J. Immunol. Methods**, v. 154, p. 253-264, 1992.

SCHLESINGER, M. J. Heat shock proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 12111-12114, 1990.

SCHÜLER, T.; BLANKENSTEIN, T. Naive CD8⁺ but not CD4⁺ T cells induce maturation of dendritic cells. **J. Mol. Med.**, v. 80, p. 533-541, 2002.

SHACTER, E., WILLIAMS, J. A., LIM, M., LEVINE, R. L. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: Examination by western blot immunoassay. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 429-437, 1994.

SHRINGARPURE, R.; GRUNE, T.; MEHLHASE, J.; DAVIES, K. J. A. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 311-318, 2003.

SILVA, C. L.; SILVA, M. F.; PIETRO, R. C.; LOWRIE, D. B. Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2400-2407, 1996.

SILVA, C. L.; BONATO, V. L.; LIMA, V. M.; FACCIOLI, L. H.; LEÃO, S. C. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin or DNA vaccination. **Immunology**, v. 97, p.573-581, 1999.

SILVA, C. L.; LOWRIE, D. B. Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3269-3274, 2000.

SILVA, G. M.; NETTO, L. E.; DISCOLA, K. F.; PIASSA-FILHO, G. M.; PIMENTA, D. C.; BÁRCENA, J. A.; DEMASI, M. Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome. **FEBS J.**, v. 275, p. 2942-2955, 2008.

SNELL, G. The genetics of transplantation. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 69, p. 555-560, 1957.

STADTMAN, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 62, p. 797-821, 1993.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. **Free Radic. Res.**, v. 40, p. 1250-1258, 2006.

STEINMAN, R. M. Dendritic cells: understanding immunogenicity. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 53-60, 2007.

SURENDRAN, N.; HILTBOLD, E. M.; HEID, B.; SRIRANGANATHAN, N.; BOYLE, S. M.; ZIMMERMAN, K. L.; MAKRIS, M. R.; WITONSKY, S. G. Live *Brucella abortus* rough vaccine strain RB51 stimulates enhanced innate immune response in vitro compared to rough vaccine strain RB51SOD and virulent smooth strain 2308 in murine bone marrow-derived dendritic cells. **Vet. Microbiol.**, 2010. In press.

TANAHASHI, N.; MURAKAMI, Y.; MINAMI, Y.; SHIMBARA, N.; HENDIL, K. B.; TANAKA, K. Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 14336-14345, 2000.

TANAKA, K. Molecular biology of the proteasome. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 247, p. 537-541, 1998.

TASCON, R. E.; COLSTON, M. J.; RAGNO, S.; STAVROPOULOS, E.; GREGORY, D.; LOWRIE, D. B. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. **Nat. Med.**, v.2, p. 888-892, 1996.

TASCON, R. E; SOARES, C. S; RAGNO, S; STAVROPOULOS, E; HIRST, E. M; COLSTON, M. J. Mycobacterium tuberculosis-activated dendritic cells induce protective immunity in mice. **Immunology**, v. 99, p. 473–480, 2000.

TEOH, C. Y; DAVIES, K. J. Potential roles of protein oxidation and the immunoproteasome in MHC class I antigen presentation: the 'PrOxI' hypothesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 423, p. 88-96, 2004.

ULLRICH, V.; REINHARD KISSNER, R. Redox signaling: Bioinorganic chemistry at its best. **J. Inorg. Biochem.**, v. 100, p. 2079–2086, 2006.

ULMER, J. B; DONNELLY, J. J; PARKER, S. E; RHODES, G. H; FELGNER, P. L; DWARKI, V. J; GROMKOWSKI, S. H; DECK, R. R; DEWITT, C. M; FRIDMAN, A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**, v. 259, p. 1745-1749, 1993.

VARSHAVSKY, A. Regulated protein degradation. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 283-286, 2005.

VOGES, D.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 1015-1068, 1999.

WIGLEY, W. C.; FABUNMI, R. P.; LEE, M. G.; MARINO, C. R.; MUALLEM, S.; DEMARTINO, G. N.; THOMAS, P. J. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. **J. Cell Biol.**, v. 145, p. 481-490, 1999.

WILKINSON, C. R.; WALLACE, M.; MORPHEW, M.; PERRY, P.; ALLSHIRE, R.; JAVERZAT, J. P.; MCINTOSH, J. R.; GORDON, C. Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. **EMBO J.**, v. 17, p. 6465-6476, 1998.

YAMAGUCHI, Y.; TSUMURA, H.; MITSURU, M.; INABA, K. Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. **Stem Cells**, v. 15, p. 144-153, 1997.

YAMAMOTO, K.; AKBAR, M. D. F.; MASUMOTO, T.; ONJI, M. Increased nitric oxide (NO) production by antigen-presenting dendritic cells is responsible for low allogeneic mixed leucocyte reaction (MLR) in primary biliary cirrhosis (PBC). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 114, p. 94-101, 1998.

ZANONI, I.; GRANUCCI, F. Differences in lipopolysaccharide-induced signaling between conventional dendritic cells and macrophages. **Immunobiology**, 2010, In press.

ZHANG, X. H; WEISSBACH, H. Origin and evolution of the protein-repairing enzymes methionine sulphoxide reductases. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v. 83, p. 249-57, 2008.

ZONG, C; YOUNG, G. W; WANG, Y; LU, H; DENG, N; DREWS, O; PING, P. Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes. **Proteomics**, v. 8, p. 5025-5037, 2008.