

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**DIRECIONAMENTO DE PEPTÍDEOS TOLEROGÊNICOS DA PROTEÍNA DE  
CHOQUE TÉRMICO 60 PARA CÉLULAS DENDRÍTICAS UTILIZANDO  
ANTICORPOS ANTI-DEC-205**

**Graziele Zenaro Manin**

Monografia apresentada ao Instituto de  
Biociências, Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU – SP**

**2011**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**DIRECIONAMENTO DE PEPTÍDEOS TOLEROGÊNICOS DA PROTEÍNA DE  
CHOQUE TÉRMICO 60 PARA CÉLULAS DENDRÍTICAS UTILIZANDO  
ANTICORPOS ANTI-DEC-205**

**Graziele Zenaro Manin**

Orientador: Dr. Hernandez Moura Silva

Coorientadora: Dra. Ana Cláudia Pelizon

Monografia apresentada ao Instituto de  
Biociências, Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU - SP**

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Manin, Graziele Zenaro.

Direcionamento de peptídeos tolerogênicos da proteína de choque térmico 60 para células dendríticas utilizando anticorpos anti-DEC-205 / Graziele Zenaro Manin. – Botucatu : [s. n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Hernandez Moura Silva

Co-orientador: Ana Cláudia Pelizon

Capes: 21102007

1. Anticorpos-antígenos complexos. 2. Tolerância imunológica.

Palavras-chave: DEC-205; Direcionamento de antígenos; HSP60; Produção de anticorpos; Tolerância imunológica.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
que não mediram esforços para que eu realizasse esse sonho.

“E aqueles que foram vistos dançando  
foram julgados insanos por aqueles que  
não podiam escutar a música.”

Friedrich Nietzsche

## **Agradecimentos**

Com mais esta etapa concluída, tenho hoje que agradecer todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante esses 4 anos de graduação.

Primeiramente, gostaria de agradecer minha família que não mediu esforços para me apoiar em cada novo desafio que eu resolvia encarar. Agradeço minha mãe por não hesitar em acender uma velinha toda vez que uma decisão importante precisava ser tomada, meu pai por sempre acreditar em mim e por me incentivar a seguir em frente e minha irmã pelas roupas e sapatos emprestados.

Agradeço meus amigos do Encontro Nacional de Biomedicina (ENBM), com os quais aprendi muito e vivi momentos inesquecíveis (é inexplicável a felicidade de fazer parte dessa grande família que é a C.O. do ENBM); meus amigos da XLIV, companheiros nessa jornada, e meus amigos de Bariri, que me acolhiam quando eu precisava fugir um pouquinho da loucura que é a faculdade.

Agradeço também minhas grandes amigas Mariana Fernandes e Nathália Suiti Laszkiewicz por me emprestarem suas famílias durante este período aqui em São Paulo. Meninas, saibam que sem a ajuda de vocês a realização deste trabalho seria impossível e não seria tão prazerosa minha estadia nesta cidade. Obrigada também pelos momentos de descontração aqui. Sei que, infelizmente, não foram muitos, mas eu voltarei para passearmos mais.

Em especial, gostaria de agradecer os pais da Nathália que acompanharam de perto todas as novidades que aconteceram em minha vida durante este ano. Desculpem-me pelo trabalho!

Também tenho que dizer muito obrigada para todas as pessoas que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto. Desta forma, agradeço todos os responsáveis pelo Laboratório de Imunologia do InCor (Dr. Kalil, Dra. Verônica, Dr. Edécio e Dra. Luiza) pela infraestrutura disponibilizada, especialmente, a Dra. Verônica por me acolher em seu grupo de pesquisa e me estimular a pensar ciência, além de me apresentar um projeto tão

encantador, o “Imunologia nas Escolas”, e permitir que eu fizesse parte dele. Agradeço minha coorientadora, Ana Cláudia, por me aceitar como aluna, por disponibilizar tudo que eu precisava para realizar os experimentos e pelos super conselhos e lições de vida que me deu. Aliás, tenho que agradecer todas as minhas conselheiras Ana Paula, Jana, Taccy, Rose, Pri, Cris, Karine (com uns conselhos meio malucos, mas tudo bem), Alessandra e Dani. Vocês são demais.

Agradeço meu orientador, Hernandez, por todos os puxões de orelha que, querendo ou não, me fizeram crescer muito durante minha Iniciação Científica; por estar sempre disposto a me ensinar coisas novas e por ser um grande amigo. Já dizia um tal de Grayson, “como as pessoas melhoram depois que passamos a gostar delas!”. Não tem chocolate que pague tudo o que você fez por mim!

Não posso me esquecer dos amigos do laboratório (Simoninha, Samar, Raquel, Alexandra, Lili, Déia, Carlo, Maris, Priscila, Carla, Carol, Malu, Selma, Lu, Luis, Edil, Washington, Yolanda, Karen, Stefani, Amanda, Carolzinha, Sônia, Silvano, Jonas, Rai, Elaine, Carlos,... são muitos, acredite!) que me ensinaram muito, que sempre estavam dispostos a me ajudar e que compartilharam comigo tantos momentos de descontração. Sandra Maria, eu não sou louca de não colocar o seu nome aqui! Obrigada por todas as dicas sobre o FACS e também pela sua amizade! Tenho certeza que toda vez que alguém fizer algo errado no laboratório você vai morrer de saudade de colocar a culpa em mim!

Obrigada, Deus, pela força e por essa vida emocionante!

## Sumário

1.	Resumo .....	2
2.	Introdução .....	3
3.	Objetivos .....	14
4.	Materiais e Métodos .....	15
4.1.	Desenho Experimental.....	15
4.2.	Materiais .....	16
4.3.	Métodos .....	24
5.	Resultados.....	39
5.1.	Preparação plasmidial para transfecção de células eucariotas .....	39
5.2.	Produção de anticorpos .....	41
5.3.	Purificação dos anticorpos anti-DEC-205 N3.....	44
5.4.	Ligação dos anticorpos anti-DEC-205 N7 às células dendríticas.....	48
6.	Discussão .....	50
7.	Referências Bibliográficas .....	54



## 1. Resumo

A indução de tolerância imunológica em situações altamente desejadas como no transplante e em doenças autoimunes permanece um grande desafio para pesquisa científica de tradução. Nesse contexto, o estudo das proteínas do choque térmico (HSPs) e seus peptídeos vêm trazendo informações relevantes sobre o controle da resposta imune. Dados da literatura mostram que alguns de seus peptídeos apresentam propriedades imunorreguladoras, como os peptídeos N3 e N7 da HSP60. Além disso, tem se mostrado que a apresentação de antígenos em contextos específicos por células dendríticas (DCs) pode favorecer o estabelecimento da tolerância imunológica. Dessa forma, o direcionamento dos peptídeos tolerogênicos da HSP60, N3 e N7, *in vivo*, para DCs, com o intuito de essas células apresentarem esses peptídeos em um contexto imunorregulador, pode induzir um estado de tolerância. Assim, nesse trabalho, tivemos como objetivo a produção de anticorpos (Acs) contra o receptor DEC-205 de DCs conjugados com os peptídeos N3 e N7 da HSP60. Esses Acs, ao se ligarem ao DEC-205 nas DCs, podem ser fagocitados, processados e por fim apresentados a células T em um contexto imunorregulador. Para tal, foram realizadas transfecções de células HEK-293T e CHO com plasmídeos codificando as cadeias leve e pesada dos respectivos Acs a fim de se obter essas proteínas recombinantes. Podemos observar que as células HEK apresentaram uma produção mais eficiente dos Acs quando comparadas com as células CHO (120 vs 30 ng/ml, respectivamente), apesar disso a produção dos Acs ficou abaixo do esperado impossibilitando a realização ensaios *in vivo*. Além disso, realizamos um ensaio de ligação do Ac anti-DEC-N7 a superfície de DCs e observamos que os Acs produzidos apresentam capacidade de se ligarem a superfície dessas células. Concluímos que os anticorpos recombinantes anti-DEC-205 são capazes de se ligar à superfície de células dendríticas, podendo ser importantes ferramentas no direcionamento dos peptídeos tolerogênicos da HSP60 para indução da tolerância imunológica em situações tão almejadas como o transplante e a autoimunidade patológica.

## 2. Introdução

O sistema imune é formado por componentes celulares e humorais que desempenham a função de proteger os indivíduos contra agentes agressores e manter a homeostase do organismo. A resposta imunológica dirigida contra um patógeno pode resultar na eliminação deste por meio de mecanismos imediatos mediados pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Janeway e Medzhitov, 2002), o que denominamos resposta imune inata ou por mecanismos um pouco mais tardios que são específicos ao patógeno, denominados resposta imune adaptativa. Esta resposta específica tem como característica o desenvolvimento de uma memória imunológica que possibilita ao organismo responder de forma mais rápida e eficaz a uma segunda infecção pelo mesmo agente.

Para que o sistema imune possa responder a agentes agressores externos sem causar danos aos tecidos próprios do organismo, é necessário que ele seja capaz de distinguir elementos próprios de elementos não próprios. Deste modo, existem diversos mecanismos de geração de tolerância ao próprio que são aplicados pelo sistema imune para que ele não inicie uma resposta inflamatória exacerbada frente a antígenos pertencentes ao organismo hospedeiro. Tais mecanismos podem eliminar células B, T e NKT autorreativas e podem ocorrer tanto em órgãos linfóides centrais (medula óssea e timo), o que caracteriza a tolerância central (Hill *et al*, 2011), quanto em órgãos ou tecidos linfóides periféricos (como linfonodos, baço, tonsilas e placas de Peyer), o que caracteriza a tolerância periférica (Kyewski e Klein, 2006). Embora os mecanismos de geração de tolerância ainda não estejam totalmente esclarecidos, existem dados na literatura que permitem inferi-los.

A tolerância central é estabelecida durante a ontogenia dos linfócitos. Acredita-se que a tolerância central por células B seja obtida por meio da deleção (Norvell *et al*, 1995) ou anergia (inatividade clonal) (Nossal e Pike, 1980) dos linfócitos B que reagiram com alta afinidade aos antígenos próprios ou ainda pela edição dos receptores desses linfócitos (Gay *et al*, 1993). Neste último caso, os receptores de células B (BCR, do inglês, *B Cell Receptor*)

autorreativos seriam internalizados e a célula B passaria por um período de rearranjo dos genes que codificam a cadeia leve do BCR, alterando, assim, a especificidade dos receptores de superfície celular, o que proporcionaria a essas células o escape da deleção ou da anergia (Gay *et al*, 1993). Esses mecanismos de geração de tolerância de linfócitos B ocorrem na medula óssea, órgão no qual as células B realizam seu processo de diferenciação.

Diferentemente das células B, as células T não completam a sua diferenciação na medula óssea, órgão no qual são geradas, mas migram, ainda em estágio precoce do desenvolvimento (células pró-T), para o timo (Miller e Osoba, 1967). É amplamente aceito que as células T que adentram o timo são duplo-negativas ( $CD4^-CD8^-$ ) e se localizam inicialmente nas porções mais externas do córtex, tornando-se duplo positivas ( $CD4^+CD8^+$ ) conforme migram para porções mais internas do córtex e *single* positivas quando alcançam a medula do órgão (Norment e Bevan, 2000). As células duplo-negativas no timo passam a rearranjar a cadeia  $\beta$  do TCR (Receptor de Célula T, do inglês, *T Cell Receptor*), sendo que as células que tiverem uma cadeia  $\beta$  do TCR funcional (chamada de pré-TCR) poderão receber sinais que iniciam a transcrição e o rearranjo dos genes da cadeia  $\alpha$  do TCR (Kruisbeek *et al*, 2000). Há indícios de que sinais via TCR  $\alpha\beta$  estimulam a expressão de CD4 e CD8 na superfície celular tornando as células duplo-positivas (Fehling *et al*, 1995).

Ainda no córtex do timo, as células T duplo-positivas com o TCR maduro entram em contato com as células epiteliais tímicas corticais (cTEC, do inglês, *Cortical Thymic Epithelial Cells*) e passam por um processo denominado seleção positiva, no qual as células que interagirem com moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) continuam seu processo de maturação tornando-se positivas apenas para um marcador de superfície: CD8 se a interação for com a molécula do MHC de classe I ou CD4 se a interação for com a molécula do MHC de classe II (Onoe *et al*, 2003). Neste estágio, há a migração dessas células que expressam ou CD8 ou CD4 para a medula do timo devido ao gradiente de quimiocinas CCL19 e CCL21 no ambiente tímico e à expressão do receptor para essas citocinas, denominado CCR7 (Kwan e Killeen, 2004).

Na medula do timo, os timócitos (células T que estão no timo) podem passar pelo processo de seleção negativa, no qual as células que não

reconhecem os complexos peptídeo próprio-molécula de MHC apresentados pelas mTECs (células epiteliais tímicas medulares, do inglês, *Medullary Thymic Epithelial Cells*) e por DCs (células dendríticas, do inglês, *Dendritic Cells*). Os timócitos que têm baixa avidéz por esses complexos morrem por negligência; as que têm alta avidéz são selecionados negativamente (morte por apoptose) e as que têm avidéz intermediária são selecionadas positivamente, podendo fazer parte do repertório de linfócitos T periféricos (Klein *et al*, 2009). Desta forma, há a eliminação dos clones de linfócitos que não são funcionais e dos clones autorreativos, prevenindo doenças autoimunes.

Atualmente, sabe-se que alguns linfócitos reagem com média a alta avidéz aos complexos peptídeo próprio-molécula de MHC apresentados no timo e não são eliminados. Dados da literatura sugerem que esses linfócitos dão origem às células T reguladoras naturais (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), cuja função é vital para a supressão de processos autoimunes patológicos (Kim *et al*, 2007).

O desenvolvimento das células Treg (células T reguladoras) depende da expressão do fator de transcrição Foxp3 (do inglês, *Forkhead box P3*), visto que camundongos da linhagem *scurfy*, devido à sua incapacidade de expressar moléculas funcionais de Foxp3, desenvolvem espontaneamente uma doença fatal linfo-proliferativa e o fenótipo auto-imune da doença pode ser revertido após a introdução, por meio de um transgene, de moléculas funcionais de Foxp3 (Brunkow *et al*, 2001). Em humanos, a ausência de expressão de moléculas funcionais de Foxp3 causa a síndrome IPEX (síndrome da desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia, ligada ao cromossomo X, do inglês, Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome) que é caracterizada clinicamente por múltiplas doenças autoimunes, mostrando a importância desse fator de transcrição no desenvolvimento de células Treg (Bennett *et al*, 2001). A expressão ectópica do Foxp3 também é suficiente para ativar a função supressora em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Fontenot *et al*, 2003).

A tolerância periférica constitui uma seleção secundária envolvendo linfócitos maduros que, em órgãos periféricos (linfoides ou não linfoides), sofrem anergia, deleção (Kyewski e Klein, 2006) ou supressão por células reguladoras (Sakaguchi *et al*, 2001). Esse mecanismo tem como objetivo

regular a atividade efetora dos linfócitos. A anergia é um estado não proliferativo induzido pela estimulação dos linfócitos na ausência de sinais coestimulatórios (Knoechel *et al*, 2006) e a deleção é a eliminação das células por apoptose, que pode ser desencadeada a partir de estímulos externos à célula, como a ligação do FasL ao seu receptor presente na membrana dos linfócitos (Wells *et al*, 2001).

Desta forma, percebe-se que as células T reguladoras estão envolvidas tanto na tolerância central quanto na tolerância periférica, podendo ser classificadas como naturais, quando originadas no timo, ou induzidas, quando originadas na periferia. Acredita-se que as células T reguladoras naturais são células que escapam da seleção negativa no timo, como já descrito anteriormente e elas têm como característica a expressão das moléculas de superfície CD4 e CD25 e do fator de transcrição Foxp3 (Thompson e Powrie, 2004). Diferentemente das células Treg naturais, as células Treg induzidas podem ser originadas a partir de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> maduras e têm a capacidade de reconhecer tanto antígenos próprios quanto antígenos estranhos, visto que a diferenciação dessas células é estimulada pela exposição a diversos tipos de antígenos (Lohr *et al*, 2006). O TGF-β (fator transformador do crescimento, do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*) revelou-se como uma importante citocina envolvida na diferenciação de células Treg induzidas em experimento realizado com camundongos, no qual as células T periféricas CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> foram convertidas em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> na presença de TGF-β e de estimulação do TCR, porém o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pré-existentes não foi expandido nessas condições (Chen *et al*, 2003). Após a apresentação de um antígeno específico para as células T através de células dendríticas, células Treg antígeno-específicas foram induzidas na periferia, revelando a possibilidade de indução de Tregs por células dendríticas (Yamazaki *et al*, 2008).

Quando os mecanismos de indução de tolerância falham, os componentes do sistema imune podem passar a gerar respostas exacerbadas contra antígenos próprios, causando doenças autoimunes. Nesses casos, o interesse da clínica é regular negativamente a resposta inflamatória patológica para que os tecidos próprios não sejam lesados pelo sistema imune.

No contexto dos alotransplantes (transplantes entre indivíduos de uma mesma espécie, porém com cargas genéticas diferentes), a indução de mecanismos imunorreguladores para o controle da alorresposta inflamatória é altamente desejada. A regulação do sistema imune do receptor propicia o controle da rejeição dirigida ao enxerto, que, na maioria das vezes, não é totalmente compatível com o receptor, e também evita que as células do sistema imune do doador, presentes no enxerto, desenvolvam uma resposta inflamatória dirigida às células do receptor (doença do enxerto contra o hospedeiro ou GVHD, do inglês, *graft-versus-host-disease*) (Luna *et al*, 2007, Song *et al*, 2006).

Atualmente, a terapia de escolha em casos de doenças autoimunes e no período pós-transplante é a utilização de potentes imunossuppressores. Entretanto, a sua utilização leva ao desenvolvimento de diversos efeitos colaterais, como angio e nefrotoxicidade (Lamoureux *et al*, 2011), além de aumentar a susceptibilidade dos pacientes a infecções e ao desenvolvimento de neoplasias (Molina *et al*, 2010). Dessa forma, o desenvolvimento de novas abordagens que levem a um aumento da sobrevida do transplante alogeneico e a inibição de processos autoimunes patológicos é altamente desejado na clínica.

Neste contexto, as HSPs (proteínas do choque térmico, do inglês, *heat shock protein*) surgem como grandes alvos de pesquisas, porque são importantes estimuladoras de diferentes tipos de respostas imune e têm sido descritas como proteínas importantes na modulação do sistema imune (Pockley *et al*, 2008). As HSPs são proteínas conservadas evolutivamente e expressas em todos os organismos, constitutivamente ou em condições de estresse (Lindquist e Craig, 1988). Elas são divididas em famílias segundo seu peso molecular monomérico (cerca de seis famílias existentes: HSP10, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100) (Van Eden *et al*, 2005). Essas proteínas possuem função de chaperonas, ou seja, elas auxiliam as cadeias de aminoácidos recém-sintetizadas na célula a obterem uma conformação proteica terciária correta e conduzem a proteína à destruição se a conformação desta não for adequada (Hartl e Hayer-Hartl, 2002).

Dentre as HSPs, a HSP60 se destaca por possuir a capacidade de induzir respostas inflamatórias (Chen *et al*, 1999) ou processos

imunorreguladores (Kilmartin e Reen, 2004). Foi observado que a HSP60 humana possui a capacidade de induzir a maturação de células dendríticas e a secreção, por essas células, de citocinas pró-inflamatórias; como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12; o que despertou o interesse na utilização dessa molécula como adjuvante na prevenção contra o câncer e contra doenças infecciosas (Flohe *et al*, 2003). A atividade inflamatória da HSP60 também foi observada em experimentos realizados com modelos experimentais, nos quais a proteína foi capaz de se ligar a adipócitos e estimular a liberação de mediadores pró-inflamatórios por essas células, independente do estágio de diferenciação delas (Gulden *et al*, 2009).

Por outro lado, a administração do peptídeo p277 da HSP60 encapsulado no adjuvante PLGM (do inglês, *polylactide-co-glycolide acid microspheres*) via intranasal aumentou a sobrevivência de enxertos de pele em camundongos com disparidade de antígenos secundários, indicando regulação da alorresposta dirigida ao enxerto (Luna *et al*, 2007). Além disso, foi observado que o pré-tratamento de células T reguladoras com a HSP60 induz um aumento na capacidade imunorreguladora dessas células, resultando em uma inibição mais eficiente da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e a proliferação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup> (Zanin-Zhorov *et al*, 2006).

Além de participar da regulação do sistema imune e de atuar como chaperona, a HSP60 e também seus peptídeos podem ser utilizados como biomarcadores por este sistema, sinalizando às células imunes o estado das células do organismo, principalmente se há uma perturbação da homeostase, indicando que há um processo de estresse físico ou molecular (Quintana e Cohen, 2008). A partir da informação fornecida pela HSP60 e por seus peptídeos, o sistema imune pode optar por iniciar o processo inflamatório, com o intuito de restabelecer a homeostase, mantê-lo ou finalizá-lo. Isso acontece, porque a HSP60 e seus peptídeos podem ser reconhecidos por células T e células B como antígenos ou podem se ligar a receptores Toll-like, ativando a imunidade inata (Zanin-Zhorov *et al*, 2006).

A partir da observação da função dual da HSP60, o grupo de transplantes e imunorregulação do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor-SP) vem estudando as características reguladoras ou

inflamatórias determinadas pelas diferentes regiões ou peptídeos da proteína. Em trabalho realizado por este grupo, foi observado que os peptídeos da região N-terminal da HSP60 possuem, predominantemente, perfil molecular imunorregulador com correspondência funcional, enquanto que os peptídeos da região C-terminal possuem perfil molecular inflamatório (Martello, 2009). Dentre os peptídeos da região N-Terminal, os peptídeos N3 e N7 da HSP60 se destacaram por apresentarem uma alta capacidade de induzir ou aumentar a expressão de moléculas imunorreguladoras, como IL-10 e TGF- $\beta$ , e inibir a resposta proliferativa induzida por estímulo com o anticorpo anti-CD3 *in vitro*, confirmando o potencial imunoregulador desses peptídeos (Martello, 2009).

Também foi observado que a interação de peptídeos da HSP60 com células dendríticas induziu a modificação do padrão de expressão de moléculas coestimulatórias na superfície dessas células e modificou também sua produção de citocinas, sendo que peptídeos como o N7 e o p277 induziram a secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF $\beta$ ) e peptídeos como o I8 e o I2 induziram a secreção de citocinas inflamatórias (TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e IL-12) no modelo murinho (Volsi, 2008). Em outro experimento, os peptídeos N7 e N3 se destacaram por apresentar capacidade de aumentar a expressão de genes imunorreguladores e diminuir a expressão de genes pró-inflamatórios em esplenócitos murinos (Guembes, 2010).

Sabe-se que a presença da HSP60 pode ser reconhecida por células T capazes de regular a atividade de outras células T ativadas, o que torna essa proteína uma importante sinalizadora do estado de ativação das células T (Lohse *et al*, 1989). Deste modo, as células T com capacidade reguladora, após reconhecerem peptídeos da HSP60 em um contexto de MHC de classe II, podem regular a resposta imune mediada por células T efetoras, controlando o rumo tomado pela resposta imune (Cohen, 2007). Segundo esses dados, o reconhecimento da HSP60 e de seus peptídeos por células T reguladoras da resposta imune seria dependente de APCs (células apresentadoras de antígenos, do inglês, *Antigen-Presenting Cells*), células que apresentam antígenos a células T associados com moléculas do MHC. Isso desperta o interesse em utilizar APCs como intermediárias na indução de respostas inflamatórias ou reguladoras por células T antígeno-específicas.



As APCs profissionais apresentam antígenos para os linfócitos T em moléculas MHC de classe II e expressam os sinais coestimulatórios necessários para desencadear a ativação de células T. Dentre as células apresentadoras de antígenos, as células dendríticas se destacam por apresentarem alta expressão de MHC e de moléculas coestimulatórias, sendo, desta forma, consideradas mais eficazes do que outras APCs para ativar a resposta efetora específica de células T (Nussenzweig *et al*, 1980).

As células dendríticas fagocitam antígenos na periferia, migram pelos vasos linfáticos enquanto processam os antígenos fagocitados e, por fim, apresentam estes antígenos ligados a moléculas do MHC para linfócitos T presentes nos linfonodos drenantes. Durante a migração, ocorrem mudanças fenotípicas nas células dendríticas relacionadas ao aumento da capacidade de processar antígenos e de ativar células T (Steinman *et al*, 2003).

As células dendríticas também são capazes de polarizar a resposta imune tanto para o tipo Th1 quanto para o tipo Th2 e de potencializar a memória por células T (Steinman *et al*, 2003). Existem três modelos descritos através dos quais as células dendríticas podem controlar a polarização por células T: através das diferentes subclasses de células dendríticas, através da natureza do estímulo que ativa a célula dendrítica ou através da cinética de ativação das células dendríticas (Maldonado-Lopez *et al*, 2001). Por essas propriedades, algumas terapias baseadas na injeção de células dendríticas têm demonstrado sucesso tanto para aumentar a resposta inflamatória quanto para diminuí-la em humanos (Baek *et al*, 2011, Hsieh *et al*, 2011).

Células dendríticas esplênicas (CD11c<sup>+</sup>) e células dendríticas derivadas da medula óssea (BM-DCs, do inglês, *bone marrow-derived dendritic cells*) de camundongos, ambas maduras (CD86<sup>high</sup>), foram capazes de expandir de duas a cinco vezes o número de células Treg naive em uma Reação Mista de Linfócitos (MLR, do inglês, *Mixed Lymphocyte Reaction*), na presença de IL-2, o que potencializou a supressão das células T efetoras presentes na reação (Yamazaki *et al*, 2006).

Em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* com células esplênicas de murinos, as células dendríticas CD8<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup> (DEC-205<sup>+</sup>) foram capazes de diferenciar células Treg Foxp3<sup>+</sup> a partir de precursores Foxp3<sup>-</sup> utilizando TGF- $\beta$  endógeno e o direcionamento de peptídeos através do anticorpo anti-DEC-205

às células dendríticas CD8<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup> tornou-as capaz de diferenciar células T reg Foxp3<sup>+</sup> específicas para o peptídeo em questão (Yamazaki *et al*, 2008).

Assim, o direcionamento dos peptídeos tolerogênicos N3 e N7 da HSP60 para as células dendríticas podem possibilitar a apresentação desses antígenos para linfócitos T, o que poderia potencializar a capacidade indutora de imunorregulação desses peptídeos pela indução Tregs responsivas a esses peptídeos. Isso poderia ser benéfico em situações onde a resposta imune é exacerbada ou em situações nas quais ela não é desejada.

O direcionamento dos peptídeos para células dendríticas pode ser feito através do receptor DEC-205 (CD205), que é uma proteína de superfície celular expressa, principalmente, na subpopulação de células dendríticas que expressa as moléculas CD11c e CD8 $\alpha$  e não expressa CD11b e CD4 e em células epiteliais tímicas (Kraal *et al*, 1986). Esta proteína, assim como os receptores de manose de macrófagos (MMR), pertence à família das proteínas transmembranas tipo I, cujos membros possuem pequenos domínios citoplasmáticos e domínios multi-lecitina extracelulares que podem ser utilizados por células dendríticas e células epiteliais tímicas para capturar antígenos e direcioná-los a compartimentos de processamento e apresentação de antígeno (Jiang *et al*, 1995). Diferentemente de outros receptores de endocitose como os MMR, a cauda citoplasmática do DEC-205, que contém cerca de 31 aminoácidos, pode capturar antígenos em endossomos ou lisossomos localizados na porção mais profunda do citoplasma e, em seguida, os receptores podem ser reciclados e expressos, novamente, na membrana celular (Mahnke *et al*, 2000). Após a captura, os antígenos podem seguir pela via endocítica de apresentação de antígenos e serem apresentados na membrana das células dendríticas em moléculas do MHC.

Diante da capacidade do receptor DEC-205, presente nas células dendríticas, de internalizar antígenos que podem ser apresentados pelas células a linfócitos T, alguns grupos de pesquisa vêm trabalhando na tentativa de manipular a apresentação de antígenos pelas células dendríticas utilizando técnicas que proporcionam o direcionamento *in vivo* de antígenos através de anticorpos monoclonais dirigidos a receptores celulares de endocitose. O anticorpo monoclonal anti-DEC-205 é um dos anticorpos utilizados nesse tipo de pesquisa, porque se liga, eficientemente, a células dendríticas *in vivo*

(Hawiger *et al*, 2001). Para confirmar esta hipótese, células T CD4 foram transferidas para um camundongo que não possuía células de origem linfóide e, posteriormente, administrou-se, subcutaneamente, 0,2 µg do anticorpo anti-DEC-205 acoplado a um peptídeo da HEL (lisozima do ovo de galinha, do inglês, *hen egg lysozyme*) ao animal ou 100µg de peptídeo da HEL juntamente com adjuvante de Freund. Concluiu-se que menos de 1 µg de anti-DEC-205/HEL acarretou a apresentação de antígenos pelas células dendríticas equivalente à apresentação visualizada após a administração de 100ug de peptídeo em adjuvante de Freund, indicando um aumento na eficiência de apresentação de antígenos de 100 a 1000 vezes quando utiliza-se o anti-DEC-205 (Hawiger *et al*, 2001).

A estimulação de células dendríticas com antígenos direcionados pelo anti-DEC-205 resultou na indução de uma polarização Th diferente da que é observada nos casos em que o estímulo não é direcionado por um anticorpo monoclonal, e a reestimulação acarretou a anergia ou deleção das células T expostas aos antígenos (Hawiger *et al*, 2001). Foi descrito que células dendríticas CD8<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup> do baço têm habilidade para diferenciar células Treg Foxp3<sup>+</sup> a partir de precursores periféricos que não expressam Foxp3, porque elas produzem seletivamente TGF-β, que é essencial para a diferenciação de células Treg (Yamazaki *et al*, 2008). As células dendríticas CD8<sup>+</sup> também expressam altos níveis de FasL, que ao se ligar ao Fas na membrana dos linfócitos T CD4, induzem a morte celular por apoptose nessas células, indicando que este subgrupo de células dendríticas tem papel importante na regulação da resposta primária de células T e na indução de tolerância periférica (Suss e Shortman, 1996). Esses dados apontam um potencial efeito regulador induzido pelas células dendríticas, especialmente pelas células dendríticas que expressam CD8 e o receptor de endocitose DEC-205.

Tendo em vista que a capacidade imunorreguladora dos peptídeos N3 e N7 da HSP60 associada à possibilidade de direcionamento de antígenos a células dendríticas pode contribuir para um aumento do potencial imunorregulador mediado pelos peptídeos, propomos realizar a produção de anticorpos anti-DEC-205 murino acoplados com o peptídeo N3 ou com o peptídeo N7, purificá-los e analisar sua ligação às células dendríticas. Esta

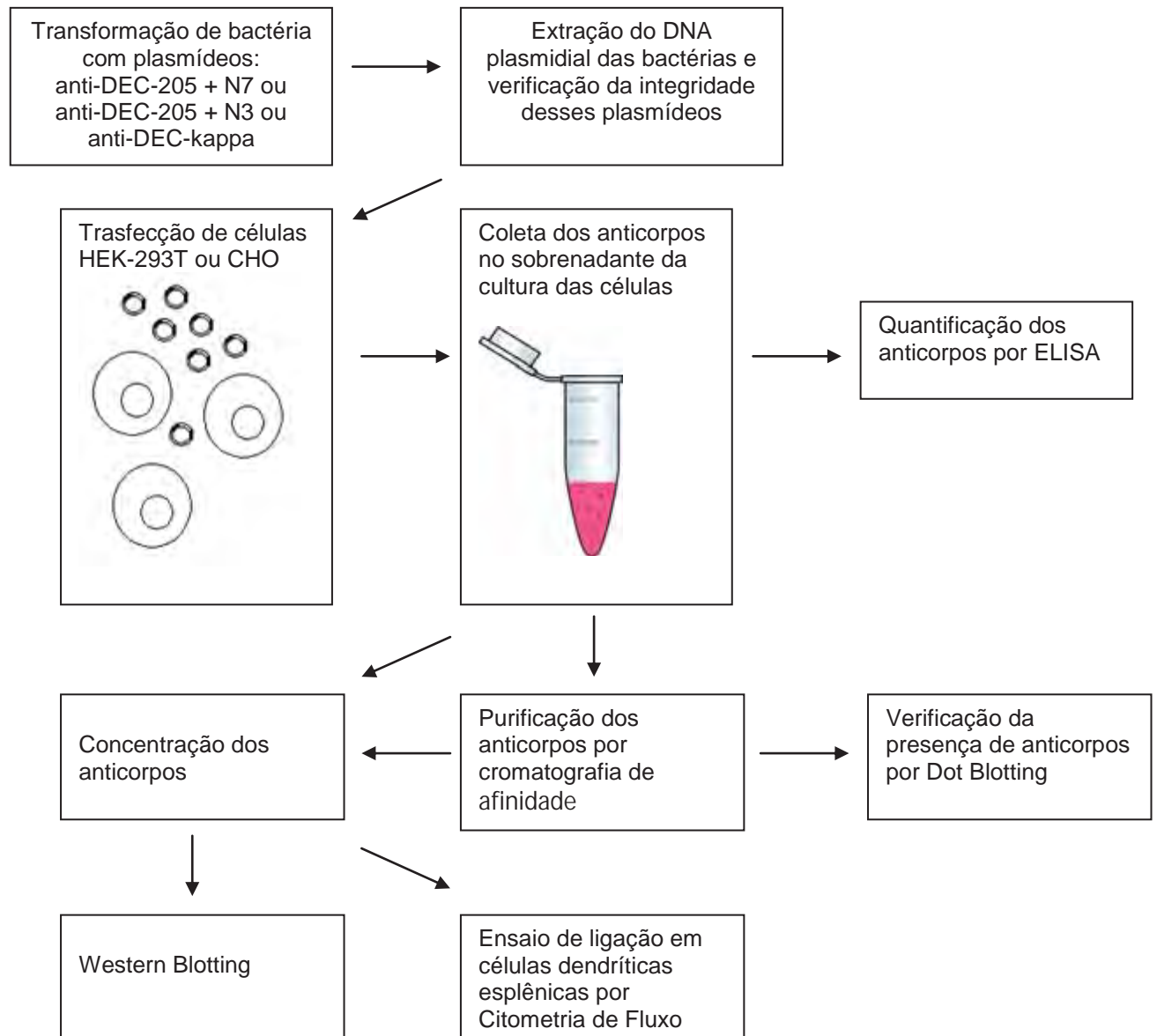
ferramenta possibilitará futuros ensaios experimentais de indução de tolerância em áreas tão desejadas como o de alotransplantes e de doenças autoimunes.

### **3. Objetivos**

Neste trabalho, propomos a produção de anticorpos contra o receptor DEC-205 de células dendríticas conjugados com os peptídeos tolerogênicos N3 e N7 da HSP60.

## 4. Materiais e Métodos

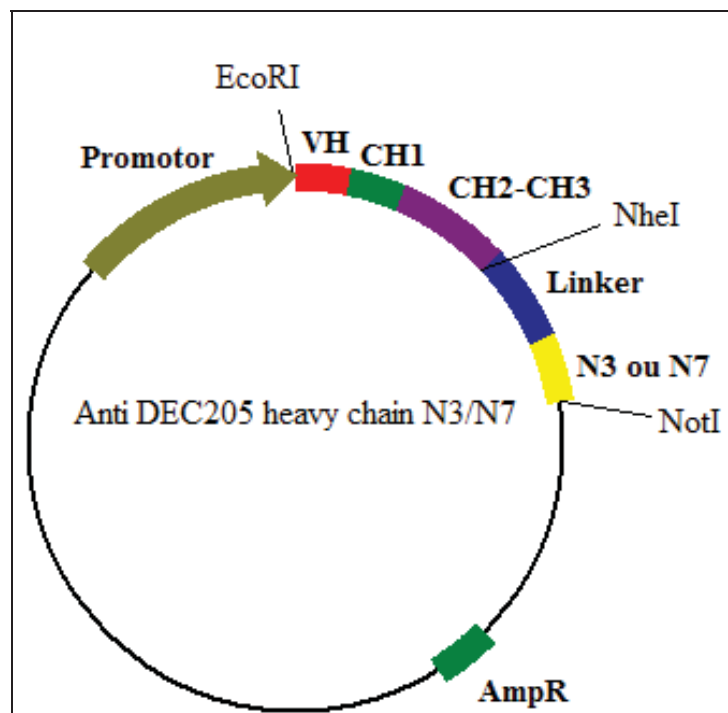
### 4.1. Desenho Experimental



## 4.2. Materiais

### 4.2.1. Plasmídeos

Neste trabalho, foram utilizados três tipos de plasmídeos com sequências codificadoras diferentes. Um contendo a cadeia leve  $\kappa$  das imunoglobulinas (Ig) de ratos específica para o receptor DEC-205, outro contendo a cadeia variável pesada da IgG2 de ratos com Fc (fragmento cristalizável, do inglês, *Fragment crystallizable*) de IgG1 de camundongos e o peptídeo N3 da HSP60 e o terceiro contendo a cadeia variável pesada da IgG2 de ratos com Fc de IgG1 de camundongos e o peptídeo N7 da HSP60 (Figura 1). As regiões Fc das cadeias pesadas das Igs eram Fcs de camundongos e possuíam algumas mutações para garantir que não interagissem com receptores dessas regiões presentes na superfície de outras células (Hawiger *et al*, 2001). Os dois primeiros plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo grupo do Dr. Michel C. Nussenzweig da Rockefeller University, New York. O terceiro foi obtido em nosso laboratório a partir do segundo, excisando-se a região que codifica o peptídeo N3 da HSP60 e incluindo no plasmídeo a sequência de DNA que codifica o peptídeo N7 da HSP60. Os plasmídeos são objetos de patente e, por isso não temos acesso a sua sequência completa.



**Figura 1.** Desenho esquemático do plasmídeo apresentando a região codificadora da cadeia pesada do anticorpo anti-DEC-205. **EcoRI**: sítio de ligação da enzima de restrição EcoRI; **VH**: sequência que codifica a região variável da cadeia pesada do anticorpo; **CH**: sequências que codificam a região constante da cadeia pesada do anticorpo; **NheI**: sítio de ligação da enzima de restrição NheI; **N3 ou N7**: sequência que codifica um dos peptídeos da HSP60 (N3 ou N7); **NotI**: sítio de ligação da enzima de restrição NotI e **AmpR**: gene de resistência ao antibiótico ampicilina.

#### 4.2.2. Células HEK-293T e CHO

As células HEK e CHO foram gentilmente cedidas pelo grupo da professora Dra. Sílvia Boscardin do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), São Paulo, Brasil.

#### 4.2.3. Células esplênicas de camundongos

As células esplênicas utilizadas no ensaio de ligação (descrito no item 5.3.19.) foram obtidas a partir da homogeneização de baços de camundongos C57/BL6 mantidos em condições livres de patógenos no Biotério do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IMT-FMUSP), São Paulo, Brasil.



#### **4.2.4. Meio Luria-Bertani (LB) líquido**

1 g Triptona

0,5 g Extrato de levedura

1 g Cloreto de Sódio (NaCl)

Adicionar 90 mL de água milli-Q e agitar até dissolver. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5N. Ajustar o volume da solução para 100 mL e autoclavar para o uso.

#### **4.2.5. Tampão TE**

10 mM Tris-HCl pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0

#### **4.2.6. TEA (Triethanolamine) 1x**

4 mM Trietanolamina

0,02 mM MgSO<sub>4</sub>

0,02 mM EDTA

0,0002% Azida

#### **4.2.7. Meio DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)**

DMEM (Gibco, Grand Island, NY, EUA)

10% soro fetal bovino ou Nutridoma SP (Roche, Mannheim, Germany)

2 mM L-Glutamina

10 mM Hepes

0,1 ng/mL de Perflacin (Rhodia, SP, Brasil)

1 mM Piruvato de sódio (Gibco, Grand Island, NY, EUA)

#### **4.2.8. Meio de congelamento**

90% de soro fetal bovino

10% DMSO (Dimetilsolfóxido)

#### **4.2.9. PBS (Phosphate Buffered Saline) 1x**

8 g cloreto de sódio (NaCl)

0,2 g cloreto de potássio (KCl)

1,15 g fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0,2 g hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

800 ml de água Milli-Q

Ajustar o pH para 7,4. Adicionar a quantidade de água Milli-Q necessária para completar 1 litro. Esterilizar em autoclave.

Quando utilizado em procedimentos associados à cultura de células, deve ser filtrado em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.10. Tampão de lavagem**

PBS 1x

0,1% Tween 20

#### **4.2.11. Tampão de bloqueio**

PBS 1x

5% de leite em pó desnatado

#### **4.2.12. Tampão citrato 0,1M**

3,15g Ácido cítrico anidro ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )

Água Milli-Q q.s.p. 150 mL

#### **4.2.13. Tampão fosfato 0,2M**

4,26g Fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

Água Milli-Q q.s.p. 150 mL

#### **4.2.14. Tampão citrato-fosfato (pH 5)**

150 mL Tampão citrato 0,1M

150mL Tampão fosfato 0,2M

Ajustar o pH do tampão fosfato 0,2M para 5, adicionando, vagarosamente, o tampão citrato 0,1M.

#### **4.2.15. Solução de OPD (o-Phenylenediamina)**

4 mg OPD (Sigma-Aldrich)

10 mL Tampão citrato-fosfato pH, 5,0

4 µL Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A solução deve ser preparada em tubo escuro.

#### **4.2.16. Tampão de ligação (pH 8,5)**

3M Cloreto de sódio (NaCl)

1,5M Glicina

Água mili-Q

Filtrado em membrana com poros de 0,45µL.

#### **4.2.17. Tampão de ligação – fosfato de sódio 20mM (pH 7,0)**

20mM Fosfato de sódio

Água mili-Q

Filtrado em membrana com poros de 0,45µL.

#### **4.2.18. Tampão de eluição – ácido cítrico 0,1M (pH 4,5 ou 2)**

0,1M Ácido cítrico anidro (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)

Água mili-Q

Filtrado em membrana com poros de 0,45µL.

#### **4.2.19. Tampão de neutralização – Tris-HCl 1M (pH 9,0)**

1M Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)

Ácido clorídrico para acertar o pH

Água mili-Q

Filtrado em membrana com poros de 0,45µL.

#### **4.2.20. PMSF (Phenilmethylsulfonyl Fluoride) 0,1M**

0,1M PMSF

Isopropanol

Estocado a temperatura ambiente por até 1 ano. Adicionar a uma concentração final de 1mM.

#### **4.2.21. EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético) 0,5M (pH 8-9)**

0,5M EDTA

Água mili-Q

O EDTA é apenas dissolvido em pH básico ( entre 8 e 9), por isso acertar o pH com NaOH para haver dissolução. Estocado a 4°C por até 6 meses. Adicionar a uma concentração final de 5mM.

#### **4.2.22. Reagentes de detecção Amersham ECL Plus**

2 mL solução A

50 µL da solução B

Os reagentes de detecção devem ser retirados previamente da geladeira para estarem à temperatura ambiente no momento do uso.

#### **4.2.23. Tampão de eletroforese com SDS**

(Tris-HCl 25mM; pH 8,3; Glicina 192mM; SDS 0,1%)

30,3g Tris-Base (P.M. 121,1)

144g Glicina (P.M. 75,07)

10g SDS (P.M. 288,4)

Água Milli-Q q.s.p. 10L

Acondicionar em temperatura ambiente

Homogeneizar a solução com agitador magnético, ajustar o pH com HCl para 8,3 e completar volume 1250 mL. Manter em temperatura ambiente. Após a diluição (1:4), no momento do uso, a concentração final da solução dos constituintes é: Tris- HCl 25mM, pH 8,3; EDTA 1,95 M; Glicina 192mM; SDS 0,075%.

#### **4.2.24. Solução estoque de acris/bis**

(Acrilamida 30%; N,N-Metilenebisacrilamida 0,8%)

60g Acrilamida (P.M. 71,08)

1,6g N,N-Metilenebisacrilamida

Água Milli-Q q.s.p. 200mL

Homogeneizar a solução com agitador magnético e, em seguida, passa-la através de um filtro de 0,45µL. Acondicionar a 4°C.

**4.2.25. Solução de SDS 10%**

5g SDS (P.M. 288,4)

Água Milli-Q q.s.p. 50mL

Dissolver gentilmente por agitação.

**4.2.26. Solução de persulfato de amônia 10%**

0,1g Persulfato de amônia (P.M. 228,2)

Água Milli-Q q.s.p. 1mL

Preparar a solução no instante do uso.

**4.2.27. Tampão de amostra 5x**

(Tris-base 312,5mM, pH 6,8; Glicerol 50%; SDS 10%;  $\beta$ -mercaptoetanol 25%;

Azul de bromofenol 0,005%)

0,375g Tris-Base (P.M. 121,1)

1g SDS (P.M. 288,4)

5mL Glicerol 87%

0,05g Azul de bromofenol

2,5mL B-mercaptoetanol

Água Milli-Q q.s.p. 2,5mL

Colocar o  $\beta$ -mercaptoetanol por último. O tampão é acondicionado a -20°C em alíquotas de 500-1000 $\mu$ L.

**4.2.28. Gel de resolução (ou de separação) (10mL)**

Concentração Final	Estoque	10%
Acris/Bis	Acris/Bis (30/0,8)	3,3 mL
Tris-HCl 0,375M, pH 8,8	Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	2,5 mL
SDS 0,1%	SDS 10%	100 $\mu$ L
Água Milli-Q	Água Milli-Q	4,0 mL
APS 0,125%	APS 10%	50 $\mu$ L
TEMED 0,125%	TEMED	3,3 $\mu$ L

**4.2.29. Gel de empilhamento (ou separador) (5mL)**

Concentração Final	Estoque	5%
Acris/Bis	Acris/Bis (30/0,8)	0,85 mL
Tris-HCl 0,375M, pH 6,8	Tris-HCl 2M, pH 6,8	0,132 mL
SDS 0,1%	SDS 10%	100 µL
Água Milli-Q	Água Milli-Q	3,75 mL
APS 0,125%	APS 10%	25 µL
TEMED 0,125%	TEMED	5 µL

**4.2.30. Solução corante**

Metanol 50%

Ácido acético 10%

Coomassie Blue R 250 0,1%

**4.2.31. Tampão FACS**

162,4 g Cloreto de sódio (NaCl)

5,6 g Cloreto de potássio (KCl)

5,2 g Hidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

47 g Fosfato de sódio dibásico anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

8,6 g Cloreto de Lítio (LiCl)

7,2 g Ácido etileno diamino tetracético sódico (EDTA-Na)

4 g (0,02%) Azida

H<sub>2</sub>O q.s.p. 20 litros

Acertar o pH para 7,2 – 7,4

**4.2.32. Tampão de lavagem FACS**

500 mL PBS-1x

2,0% Soro fetal bovino

0,02% Azida

## 4.3. Métodos

### 4.3.1. Transformação de bactéria

Incubou-se 50  $\mu$ L de células competentes (*E. coli*, DH5 $\alpha$ ) com 100 ng dos plasmídeos de interesse em banho de água/gelo por 30 minutos. A seguir, procedeu-se o choque térmico por incubação do sistema de transformação a 42°C por 3 minutos. Adicionou-se 1 mL de meio LB e incubou-se em estufa a 37°C por 1 hora. O sistema foi semeado em placas contendo meio LB-ágar adicionado de 50  $\mu$ g/mL de ampicilina e foi mantido em estufa a 37°C por 16 horas. Depois deste período, uma colônia foi retirada da placa e semeada em meio LB, permanecendo a 37°C e sob agitação por 8 horas.

### 4.3.2. Extração de DNA plasmidial de bactéria

Após a multiplicação do DNA plasmidial através da transformação de bactérias, os plasmídeos precisam ser extraídos para uso posterior. Para isso, as bactérias são lisadas e o DNA plasmidial é separado do DNA bacteriano. Para a realização deste experimento, foi utilizado o kit comercial Quiagen Maxiprep (Quiagen, Alemanha).

1 mL das bactérias obtidas no item 4.3.1 foi adicionado a 200 mL de meio LB acrescido de 50 mg/mL de ampicilina. A mistura foi submetida a incubação sob agitação constante à 37°C *overnight*. No dia seguinte, as garrafas de bactérias foram centrifugadas por 15 minutos a 4200 g. O botão celular foi, primeiramente, ressuscitado em 10 mL de Tampão P1 (Quiagen, Alemanha) acrescido de RNase e, depois, acrescido de 10 mL de Tampão P2 (Quiagen, Alemanha), homogeneizado cuidadosamente e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 10 mL de Tampão P3 (Quiagen, Alemanha) gelado, homogeneizou-se imediatamente por inversão das garrafas e incubaram-se as garrafas em gelo por 20 minutos. A seguir, a mistura foi centrifugada por 30 minutos a 24200 g à 4°C e as colunas Quiagen-tip 500 foram lavadas com 10 mL de Tampão QBT (Quiagen, Alemanha). Adicionou-se o sobrenadante obtido após a centrifugação às colunas e, posteriormente, as colunas foram lavadas duas vezes com 30 mL de Tampão QC (Quiagen, Alemanha). O DNA foi eluído com Tampão QF (Quiagen, Alemanha) (2 vezes

de 5 mL) e foi precipitado com 7 mL de isopropanol à temperatura ambiente seguido de centrifugação por 30 minutos a 24200 g à 4°C. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado ao botão de DNA 5 mL de etanol 70% e a mistura foi centrifugada duas vezes por 5 minutos a 24200 g à 4°C, com intervalo para descarte do sobrenadante.

Deixou-se secar o botão de DNA e, em seguida, procedeu-se a ressuspensão do DNA em 500 µL de tampão TE.

### **4.3.3. Digestão de plasmídeos**

Os plasmídeos que carregam o DNA do anti-DEC-205-N3 ou do anti-DEC-205-N7 foram digeridos para posterior eletroforese, visando verificar se o perfil de tamanho do plasmídeo correspondia ao esperado para a construção.

Foram preparados 3 tubos de 1,5 mL de capacidade, um para cada plasmídeo a ser digerido (cadeia pesada do anti-DEC-205 + N3, cadeia pesada do anti-DEC-205 + N7 e cadeia leve kappa do anti-DEC-205). Em cada tubo foi adicionado 1 µg do respectivo DNA, 1 µL de tampão Eco R1 NE (New England Biolabs, UK), 1 µL da Enzima EcoR1 (New England Biolabs, UK) e 7 µL de água de injeção. Os tubos permaneceram em banho-maria, 37°C, por 3 horas, para que a reação ocorresse.

### **4.3.4. Eletroforese em gel de agarose de DNA**

A Eletroforese é uma técnica, na qual espécies carregadas eletricamente migram através de um gel, quando submetidas a uma corrente elétrica, sendo que moléculas maiores migram mais lentamente e moléculas menores migram mais agilmente. Como o DNA possui carga negativa, ele migra para o pólo positivo da cuba de eletroforese e a comparação da amostra com um marcador comercial permite inferir o tamanho destes fragmento de DNA.

Primeiramente, o gel para a eletroforese foi produzido misturando-se 0,8g de agarose em 100 mL de tampão TEA 1x em erlenmeyer e levando-se a mistura ao forno micro-ondas por 5 minutos na potência de 40%. Depois de decorridos os 5 minutos, a solução foi parcialmente esfriada e acrescentada de 2,5 µL de brometo de etídeo. Adicionou-se a mistura à cama de eletroforese



que já estava com os pentes que formam os poços do gel posicionados. A polimerização aconteceu à temperatura ambiente.

Enquanto o gel polimerizava, as amostras foram preparadas para a eletroforese. Como as amostras digeridas (cadeia pesada do anti-DEC-205 + N3, cadeia pesada do anti-DEC-205 + N7 e cadeia leve kappa do anti-DEC-205) já tinham um volume de 10 µL, apenas foi adicionado à elas 1 µL de Tampão de amostra Blue Juice 10x (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). Como controle comparativo da reação de digestão, amostras não digeridas (500ng de cada DNA) correspondentes a cada plasmídeo foram aplicadas ao gel e a elas foi adicionado 1 µL de Tampão Blue Juice 10x (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e 9 µL de água de injeção.

O gel foi posicionado dentro do aparelho de eletroforese e, depois, o aparelho foi completado com tampão TEA 1x. As amostras e o marcador 1Kb plus (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) foram colocados nos poços do gel e o aparelho de eletroforese foi ligado. Nos primeiros 10 minutos, a potência foi de 75V e nos 40 minutos restantes, de 100V. O padrão de migração das amostras foi então observado em transiluminador com luz UV (Alpha Innotech, San Leandro, EUA).

#### **4.3.5. Descongelamento de células HEK-293T ou CHO**

O meio de congelamento utilizado contém DMSO, que é tóxico para as células a temperatura ambiente. Por isso o descongelamento deve ser feito com cautela e as células devem ser colocadas em meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino antes de estarem totalmente descongeladas.

As células HEK-293T (Rim Embrionário Humano, do inglês, *Human Embryonic Kidney*) ou CHO (Ovário de Hamster Chinês, do inglês, *Chinese Hamster Ovary*) foram retiradas dos containers com nitrogênio líquido e foram conduzidas à sala de cultura de células em isopor contendo nitrogênio líquido.

O tubo que continha as células foi colocado em banho-maria (37°C) até que o descongelamento iniciasse. Em seguida, as células, parcialmente descongeladas, foram transferidas para um tubo contendo 10 mL de meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino. Após o descongelamento total das células, o tubo foi centrifugado a 500g por 8 minutos e o botão celular

obtido foi ressuspendido em 3 mL de meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino.

As células foram contadas e tiveram sua viabilidade determinada pela coloração com Azul de Tripán (MCB Manufacturing Chemists Inc., Cincinnati, OH, EUA) e observação em câmara de Neubauer. A viabilidade observada nos experimentos foi sempre acima de 85%. A partir deste momento, as HEK-293T ou CHO foram mantidas em garrafas de cultura (25, 75 ou 150 cm<sup>2</sup>) com meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino em estufa a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.3.6. Tripsinização de células HEK-293T ou CHO**

Quando a confluência das células nas garrafas de cultura atingia 90-100% a tripsinização e o replaqueamento de um número menor de células era feito para manter a proliferação celular, evitando a morte celular. A enzima tripsina digere as proteínas que facilitam a adesão das células à garrafa de cultura, deixando as células suspensas no meio de cultura.

O meio de cultura presente nas garrafas foi aspirado e foi adicionado PBS 1x para lavá-la. O PBS 1x foi aspirado e foi adicionada tripsina (Instituto Adolfo Lutz). As garrafas foram fechadas e levadas à estufa (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) por 3 minutos. As garrafas foram agitadas e observadas em microscópio óptico invertido. Se as células estivessem soltas, a tripsina era inativada com meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino. O meio em que as células estavam foi transferido para um tubo e centrifugado a 500g por 8 minutos. O botão celular obtido foi ressuspendido em 3 mL de meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e as células foram contadas e tiveram sua viabilidade determinada pela coloração com Azul de Tripán (MCB Manufacturing Chemists Inc.) e observação em câmara de Neubauer. Em seguida, fez-se o replaqueamento das células. Os volumes de PBS 1x, tripsina e meio de cultura para inativação da tripsina variavam conforme o tamanho das garrafas de cultura (Tabela 1).

**Tabela 1. Volumes utilizados na tripsinização de células.**

Tamanho da garrafa	PBS 1x	Tripsina	Meio com soro para inativar a tripsina
25 cm <sup>2</sup>	5 mL	1 mL	5 mL
75 cm <sup>2</sup>	10 mL	3 mL	10 mL
150 cm <sup>2</sup>	20mL	6 mL	20 mL

#### 4.3.7. Congelamento de células HEK-293T ou CHO

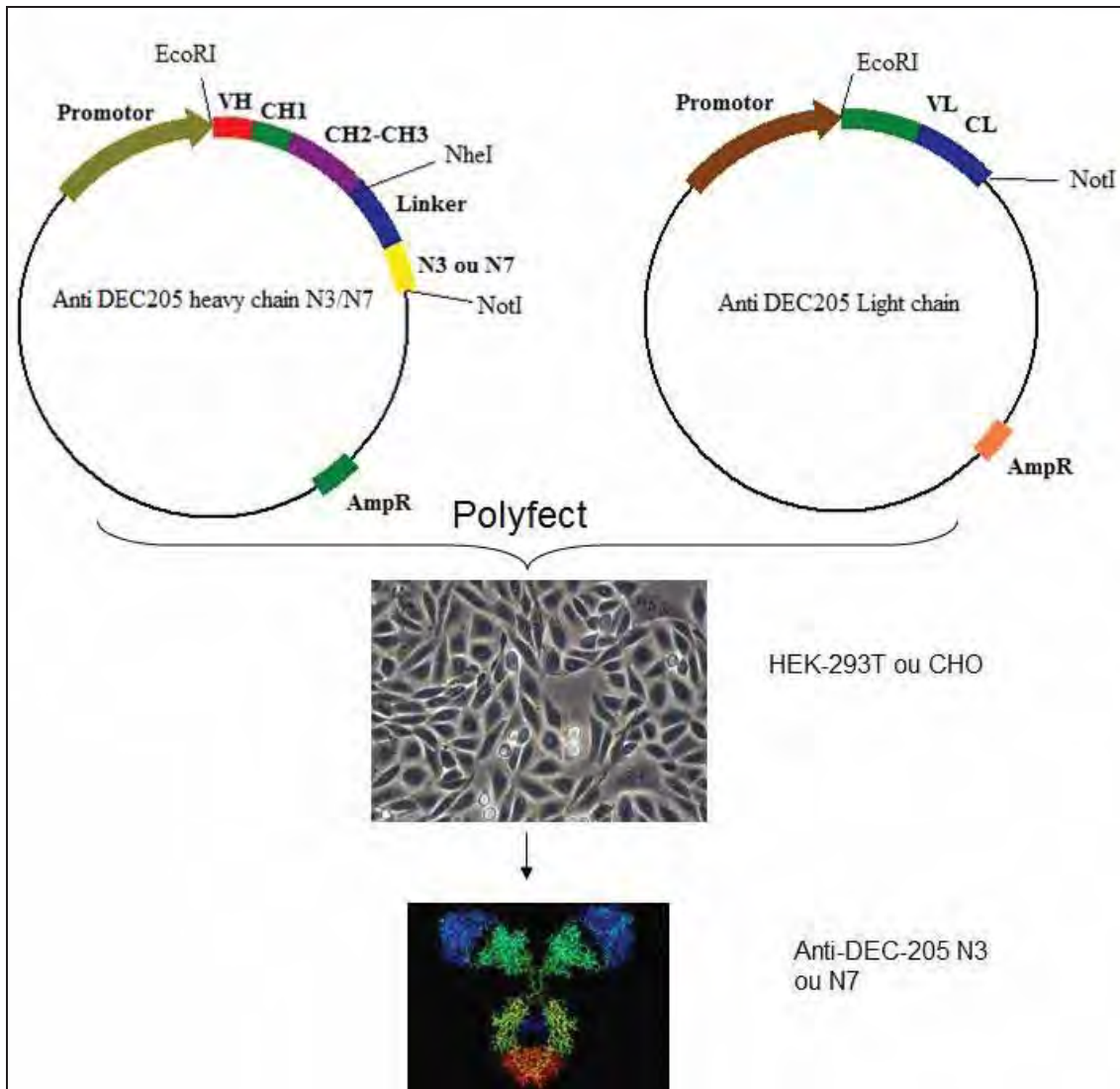
Quando havia uma grande quantidade de células em cultura, quantidade essa além da necessária para a realização dos experimentos foi procedido o congelamento de parte da população celular. Após tripsinização, as células em suspensão em meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino foram centrifugadas a 500g por 8 minutos. O botão celular foi ressuspensionado em meio de congelamento e cada tubo para congelamento criogênico recebeu 1 mL de meio de congelamento contendo  $10 \times 10^6$  células. Esses tubos foram armazenados em um recipiente com álcool isopropílico em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas e depois foram transferidos para containers de nitrogênio líquido.

#### 4.3.8. Transfecção de células HEK-293T ou CHO

As transfecções foram realizadas com a finalidade de inserir os plasmídeos nas células HEK-293T ou CHO, o que possibilitou a produção do anticorpo anti-DEC-205 acoplado com os peptídeos da HSP60 por essas células a partir da transcrição e tradução da respectiva sequência de DNA (Figura 2).

O reagente comercial utilizado consiste em dendrímeros com arquitetura esférica que possuem grupamentos amina carregados positivamente nas porções terminais de seus ramos. Esses grupamentos amina se ligam a grupamentos fosfato dos ácidos nucleicos que são carregados negativamente, transformando o DNA numa estrutura compacta capaz de se ligar a superfície

celular e adentrar a célula por endocitose inespecífica. O reagente também tampona o pH dos endossomos, o que acarreta a inibição de enzimas endossomais e garante a estabilidade do complexo reagente-DNA.



**Figura 2. Esquema representativo da transfecção celular e produção de anticorpos.** Células HEK-293T ou CHO foram transfectadas com os plasmídeos que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada do anti-DEC recombinante e passam a produzir o anticorpo. **EcoRI**: sítio de ligação da enzima de restrição EcoRI; **VH**: sequência que codifica a região variável da cadeia pesada do anticorpo; **CH**: sequências que codificam a região constante da cadeia pesada do anticorpo; **NheI**: sítio de ligação da enzima de restrição NheI; **N3 ou N7**: sequência que codifica um dos peptídeos da HSP60 (N3 ou N7); **NotI**: sítio de ligação da enzima de restrição NotI e **AmpR**: gene de resistência ao antibiótico ampicilina.

Preparou-se 2 placas de petri de 150 cm<sup>2</sup>, no dia anterior à transfecção, com 3,6 x 10<sup>6</sup> células cada uma e 12 mL de meio DMEM acrescido de 10% de

soro fetal bovino. Estas placas foram mantidas em estufa 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C para atingir a confluência ideal para a transfecção (40-80%).

No dia da transfecção, foram preparados 2 tubos, um para os plasmídeos que tinham a região codificadora do anti-DEC-205-N3 e outro para os que tinham a região codificadora do anti-DEC-205-N7. Em cada tubo foi colocado 12 µg de plasmídeo da cadeia pesada do anti-DEC-205 + peptídeo da HSP60, 12 µg de plasmídeo da cadeia leve kappa do anti-DEC-205 e meio DMEM sem soro e sem antibióticos até atingir um volume de 450 µL. Submeteu-se os tubos a agitação e a uma breve centrifugação e adicionou-se 120 µL de Polyfect Transfection Reagent (Qiagen, Alemanha) a cada tubo. Os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente para a formação dos complexos de transfecção.

Durante a incubação, o meio de cultura das placas previamente preparadas foi aspirado e adicionou-se 10,5 mL de meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino em cada placa.

Após o tempo de incubação, acrescentou-se 1,5 mL de meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino em cada tubo, misturando vagarosamente para não desfazer os complexos de transfecção. O conteúdo dos tubos foi aplicado na placa de petri correspondente por gotejamento e em forma de cruz, para garantir o melhor espalhamento dos complexos.

As placas foram levadas à estufa 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### **4.3.9. Coleta de sobrenadante de cultura de células HEK-293T ou CHO transfectadas**

O sobrenadante de cultura das células HEK-293T ou CHO transfectadas foi colhido a cada 2 dias para verificação da produção de anticorpos. Depois de retirado da placa, o sobrenadante era centrifugado a 500 g por 8 minutos para separação dos debrís celulares, que eram descartados. Em seguida, o sobrenadante era filtrado em filtro de 0,45 µm e adicionava-se a ele um inibidor de metaloproteases (EDTA 0,5M) e um inibidor de serinoproteases (PMSF 0,1M). Os sobrenadantes eram mantidos à 4°C e se o pH estivesse muito baixo ele era corrigido com NaOH 0,5M. As placas eram completadas com meio DMEM + Nutridoma – SP (Roche, Mannheim, Germany), porque as

imunoglobulinas bovinas presentes no soro podem interferir na posterior purificação dos anticorpos.

#### **4.3.10. Seleção de clone produtor de anticorpos**

Esta técnica foi empregada com finalidade de aumentar a produção de anticorpos por células CHO. A partir desta técnica, é possível identificar qual clone celular é o melhor produtor de anticorpos e expandi-lo para se obter uma maior eficiência na produção de anticorpos.

As células CHO transfectadas foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas em placas de 96 poços nas concentrações: 0,1; 1 ou 10 células por poço. O crescimento destas células foi monitorado por microscopia óptica e, quando o fundo do poço estava repleto de células, procedia-se um ELISA do sobrenadante de cultura para verificar a produção de anticorpos. Os clones que estavam produzindo anticorpos eram tripsinizados e replaqueados em placas maiores.

#### **4.3.11. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para quantificação de anticorpos**

ELISA é um método imunológico, no qual uma enzima conjugada a um anticorpo reage a um substrato específico e produz uma reação colorimétrica que pode ser visualizada por espectrofotometria. Esta técnica permitiu a quantificação dos anticorpos anti-DEC-205 presentes em sobrenadante de cultura de células transfectadas.

Placas de 96 poços de alta ligação (Costar<sup>®</sup>, Corning, NY) foram sensibilizadas com 150 µL por poço de anticorpo anti-IgG de camundongo não marcado Fc específico (Sigma-Aldrich, Israel) diluído em PBS 1x na concentração 1:1000. As placas permaneceram a 4°C durante toda a noite para que ocorresse a ligação do anticorpo primário nelas.

Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes pela adição de 200 µL de tampão de lavagem por poço, agitação e descarte do tampão. Em seguida as placas foram incubadas com 200µL de tampão de bloqueio por poço durante 1 hora à temperatura ambiente para que os sítios reativos das placas, que não

foram ocupados com o anticorpo primário, fossem ocupados pelas proteínas presentes no tampão de bloqueio.

Em seguida, foram, novamente, lavadas por 3 vezes 200  $\mu$ L de tampão de lavagem por poço e foram incubadas, durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente e 30 minutos a 37°C, com o sobrenadante de cultura das células HEK-293T transfectadas com plasmídeos contendo a sequência de DNA que codifica o anti-DEC-205-N3 ou o anti-DEC-205-N7. A curva de comparação foi feita por meio da incubação de 8 poços em duplicata com IgG de camundongo (Sigma-Aldrich, EUA) em concentrações decrescentes com fator 0,5.

Após a incubação as placas foram lavadas segundo o procedimento já descrito anteriormente e foi incubada com 150  $\mu$ L por poço de anticorpo anti-IgG de camundongo Fc específico conjugado com Peroxidase (Sigma-Aldrich, Israel) na concentração de 1: 10000 por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente e 30min a 37°C.

Após nova lavagem, foram adicionados 100  $\mu$ L por poço de solução de OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich, EUA) que é substrato para a enzima peroxidase conjugada ao anticorpo secundário. A reação acontece à temperatura ambiente e no escuro por 30 minutos e é interrompida com 50  $\mu$ L por poço de ácido sulfúrico 2N.

A leitura da placa é feita em espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 490 nm (Bio-Rad, Japan).

#### **4.3.12. Purificação dos anticorpos anti-DEC-205 acoplados com peptídeos da HSP60 por cromatografia de afinidade**

A cromatografia por afinidade é uma técnica utilizada para separar proteínas que se baseia na ligação reversível destas proteínas a ligantes específicos fixados a uma matriz cromatográfica. Neste experimento, as colunas utilizadas continham como ligante a proteína A, que é uma proteína bacteriana derivada de *Staphylococcus aureus*. A região Fc da IgG1 de camundongo pode se ligar a proteína A ou se desligar dela de acordo com o pH e a composição dos tampões utilizados no experimento.

Foram preparados 13 tubos de 1,5 mL contendo 200  $\mu$ L de 1M Tris-HCl, pH 9,0, um para cada mL a ser coletado durante a eluição das proteínas. Em seguida, a bomba peristáltica (GE Healthcare, Suécia) foi regulada para um fluxo de 1 mL por minuto e ela foi conectada à coluna HiTrap Protein A HP 1mL (GE Healthcare, Suécia) em funcionamento, para que não entrasse ar na coluna. O lacre da extremidade inferior da coluna foi, então, rompido e a coluna foi lavada cinco vezes com tampão de ligação fosfato de sódio (pH 7,0) e, depois, dez vezes com tampão de ligação (pH 8,9). A amostra (sobrenadantes de cultura contendo os anticorpos de interesse) com pH acertado para 8,9 foi inserida no sistema. Os recipientes que continham as amostras permaneceram no gelo durante todo o procedimento.

Ao esgotar a amostra, a coluna foi lavada dez vezes com tampão de ligação (pH 8,9) e iniciou-se a eluição dos anticorpos com tampão de eluição (pH 4,5). Foram coletados 10 mL do tampão de eluição (pH 4,5) que passou pela membrana, um em cada tubo preparado anteriormente com 1M Tris-HCl e posteriormente, foram coletados 3mL de tampão de eluição (pH 2,0), também um mL em cada tubo preparado com 1M Tris-HCl.

A coluna foi lavada com tampão de ligação fosfato de sódio (pH 7,0) e em seguida foi preenchida com etanol 20% e armazenada à 4°C.

Em seguida, as amostras obtidas eram analisadas por *Dot Blotting* para detecção de amostras que continham as proteínas de interesse.

#### **4.3.13. Análise de proteínas por *Dot Blotting***

Este experimento se baseia na ligação das proteínas presentes na amostra a uma membrana de nitrocelulose e na posterior detecção dessas proteínas por anticorpos conjugados com peroxidase.

1  $\mu$ L de cada amostra, 1  $\mu$ L de PBS 1x (controle negativo), 1  $\mu$ L de anticorpo IgG de camundongo (controle positivo) e 1 $\mu$ L do flow through do experimento foram colocados em uma membrana de nitrocelulose Amersham Bioscience Hybond-ECL (Amersham Bioscience, Alemanha) e após a ligação da proteínas, com a membrana seca, procedeu-se o bloqueio com solução de bloqueio overnight à 4°C, sob agitação constante.



No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem e foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação constante com anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1:5000. Depois da incubação, a membrana foi lavada novamente por 3 vezes e a revelação foi feita com os reagentes de detecção Amersham ECL Plus (GE Healthcare, Alemanha).

Os filmes foram expostos à membrana por 1 minuto e 30 segundos e, em seguida, foram revelados por impregnação de prata.

#### **4.3.14. Concentração e dessalinização de amostras contendo anticorpos anti-DEC-205**

A concentração e dessalinização foram feitas por meio de filtros de centrífuga CENTRIPEP UltraCel 50k (Millipore, County Cork, Irlanda). Esses filtros apresentam uma membrana com capacidade de reter moléculas com tamanho molecular maior que 50kDa, Dessa forma, foi possibilitada a concentração da amostra por sedimentação e a retirada dos sais presentes no tampão em que as amostras estavam em suspensão.

Inicialmente, os filtros foram lavados com 15 mL de PBS 1x por meio de centrifugação a 3000g à 4°C para remoção dos traços de glicina presentes na membrana de filtração. As amostras selecionadas com base no *Dot Blotting* por possuírem anticorpos (depois da purificação dos anticorpos por cromatografia) ou o meio de cultura contendo os anticorpos (sem serem purificados) foram colocados nos filtros de centrífuga e o volume foi completado para 15 mL. Procedeu-se centrifugação à 3000g, 4°C até que a amostra estivesse concentrada a 600 µL aproximadamente. Novamente, o volume da amostra foi completado para 15 mL e a centrifugação permaneceu até a concentração da amostra a 600 µL.

#### **4.3.15. Análise de proteínas em gel de SDS-Page**

Previamente, as placas do sistema SE 260 (Hoefer/ GE Healthcare) foram limpas com etanol 70% e foram posicionadas na vertical com espaçadores de teflon de espessura 1 mm e 1cm de largura entre ambas, ao

longo das bordas laterais. As placas foram niveladas e imobilizadas num suporte de acrílico (gel caster).

Todos os componentes do gel foram misturados, sendo que o APS 10% e o TEMED foram os últimos a serem adicionados, porque são os responsáveis pela polimerização da solução. A solução foi aplicada, cuidadosamente, entre as duas placas até uma altura de 1 cm abaixo do pente. Em seguida, sobre o gel, aplicou-se uma solução de butanol saturado em água para evitar o contato com o ar atmosférico a fim de se acelerar o processo de polimerização nivelá-lo e obter uma superfície homogênea. A polimerização foi efetuada entre 30 e 60 minutos, a temperatura ambiente. A solução de butanol foi retirada, o gel foi lavado com água Milli-Q e o excesso de água foi retirado com auxílio de um papel de filtro.

As soluções do gel de empilhamento foram misturadas e colocadas sobre o gel de resolução. Imediatamente após, inseriu-se o pente entre as duas placas. Aguardou-se a polimerização e retirou-se o pente. Os poços foram lavados com água Milli-Q para a retirada da acrilamida não polimerizada.

As amostras de interesse foram diluídas em tampão de amostra (1:5) e fervidas por 3 minutos, para redução e desnaturação das proteínas. Após este procedimento, as amostras foram aplicadas nos poços do gel.

A eletroforese foi efetuada com amperagem inicial de 60 v e, após penetração da amostra no gel de separação, a intensidade de corrente foi aumentada para 120 v até que o azul de bromofenol, presente no tampão de amostra, atingisse a extremidade inferior do gel.

Após a corrida, as placas de eletroforese foram removidas da cuba e retirou-se os espaçadores laterais. As placas de vidro foram separadas com uma espátula (alavanca) e o gel de empilhamento foi desprezado. As proteínas contidas no gel foram coradas e descoradas ou transferidas para membranas de nitrocelulose.

#### **4.3.16. Coloração do gel de SDS-Page com Coomassie Brilliant Blue R-250**

Normalmente, o corante Coomassie e os reagentes de ensaio de proteínas são muito ácidos. Em condições ácidas, o corante Coomassie se liga

a proteínas, inespecificamente, através de aminoácidos básicos (como arginina, lisina e histidina) e o número de ligações é proporcional ao número de cargas positivas encontradas na proteína. Essas ligações coram a proteína de azul.

Após a eletroforese, o gel foi colocado em solução de Coomassie R-250 e deixado por 3 dias. A descoloração foi feita com água e, em seguida, o gel foi digitalizado em digitalizador ImageScanner (Amersham Bioscience, Alemanha).

#### **4.3.17. Transferência semi-seca das proteínas para membrana de nitrocelulose**

Após a corrida, o gel de poliacrilamida é colocado face-a-face com uma membrana de nitrocelulose e uma corrente elétrica é aplicada em ambos por meio de duas placas posicionadas uma do lado do gel e outra do lado da membrana. Assim, as proteínas são transferidas do gel para a membrana.

#### **4.3.18. Western blotting**

Diferentemente da coloração com Coomassie que cora de uma forma geral todas as proteínas presentes no gel, o *western blotting* permite a visualização de proteínas específicas presentes no gel que foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose.

A membrana de nitrocelulose com as proteínas aderidas foi bloqueada overnight com tampão de bloqueio, à 4°C sob agitação constante. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com tampão de lavagem e foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação constante com anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1:5000. Depois da incubação, a membrana foi lavada novamente por 3 vezes, como descrito anteriormente, e a revelação foi feita com os reagentes de detecção Amersham ECL Plus (GE Healthcare).

Os filmes foram expostos à membrana por 1 minuto e 30 segundos e, em seguida, foram revelados.

#### 4.3.19. Ensaio de ligação de anticorpos por meio de citometria de fluxo

O ensaio de ligação foi realizado para sabermos se os anticorpos produzidos se ligam funcionalmente às células dendríticas que possuem o receptor DEC-205 em sua superfície, cujo fenótipo é CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup>IaIe<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup>.

Células esplênicas de camundongos C57/BL6 foram obtidas após a maceração do baço desses camundongos. Essas células foram lavadas com tampão de lavagem FACS e foram contadas.  $5 \times 10^5$  células foram colocadas em tubos para citometria de fluxo com fundo em U. Esses tubos foram centrifugados por 5 minutos a 400g à 8°C, o sobrenadante foi descartado, as células foram homogeneizadas em agitador de tubos e foram incubadas com seus respectivos anticorpos marcados com fluorescência. O painel de incubações está representado na tabela abaixo. As incubações foram feitas no gelo e no escuro com duração de 30 minutos e foram sucedidas por 2 lavagens com 1 mL de tampão de lavagem FACS, centrifugando à 400g, 8°C por 5 minutos.

**Tabela 2. Painel de ensaio de ligação de anticorpos recombinantes em células dendríticas por citometria de fluxo.**

	<b>Primeira incubação</b>	<b>Segunda incubação</b>	<b>Terceira incubação</b>
<b>Controle negativo (só células)</b>	200 µL tampão de lavagem FACS + 20 µL de soro de camundongo	50 µL de tampão de lavagem FACS	50 µL de tampão de lavagem FACS
<b>Tubo 1</b>	200 µL tampão de lavagem FACS + 20 µL de soro de camundongo	Anti-IgG de camundongo FITC (1:75)	50 µL de tampão de lavagem FACS
<b>Tubo 2</b>	200 µL tampão de lavagem FACS + 20 µL de soro de camundongo	Anti-IgG de camundongo FITC (1:75)	IaIe PE (1:50) + CD11c APC (1:50) + CD4 APC Cy7 (1:50) + CD8a

			PercP (1:50)
	200 µL de anti-		lale PE (1:50) +
	DEC-205 N7	Anti-IgG de	CD11c APC (1:50)
<b>Tubo 3</b>	recombinante + 20	camundongo FITC	+ CD4 APC Cy7
	µL de soro de	(1:75)	(1:50) + CD8a
	camundongo		PercP (1:50)
			lale PE (1:50) +
	200 µL tampão de		CD11c APC (1:50)
<b>Tubo 4</b>	lavagem FACS +	50 µL de tampão	+ CD4 APC Cy7
	20 µL de soro de	de lavagem FACS	(1:50) + CD8a
	camundongo		PercP (1:50) + anti-
			DEC FITC (1:75)
			lale PE (1:50) +
	200 µL tampão de		CD11c APC (1:50)
<b>Tubo 5</b>	lavagem FACS +	50 µL de tampão	+ CD4 APC Cy7
	20 µL de soro de	de lavagem FACS	(1:50) + CD8a
	camundongo		PercP (1:50)

Os tubos foram lavados duas vezes com 1 mL de tampão de lavagem FACS, centrifugando sob refrigeração a 400g por 5 minutos à 8°C. As células foram homogeneizadas em agitador de tubos e ressuspensas em 400 µL de tampão de lavagem FACS. Procedeu-se a aquisição em aparelho FACS Cantoll (BD Biosciences, San Jose, CS, EUA).

A compensação do experimento foi realizada com BD CompBeads Anti-Rat e Anti-Hamster. Segundo instruções do fabricante, foram preparados um tubo para cada fluorescência utilizada no experimento e um controle negativo. O tubo do controle negativo recebeu uma gota da bead negativa e 400 µL de tampão de lavagem FACS e os demais tubos receberam uma gota da bead negativa, uma gota da bead positiva, o anticorpo que possuía a fluorescência daquele tubo segundo sua titulação e 400 µL de tampão de lavagem FACS. O tampão de lavagem só era adicionado no momento da aquisição dos tubos no FACS Cantoll (BD Biosciences, San Jose, CS, EUA).

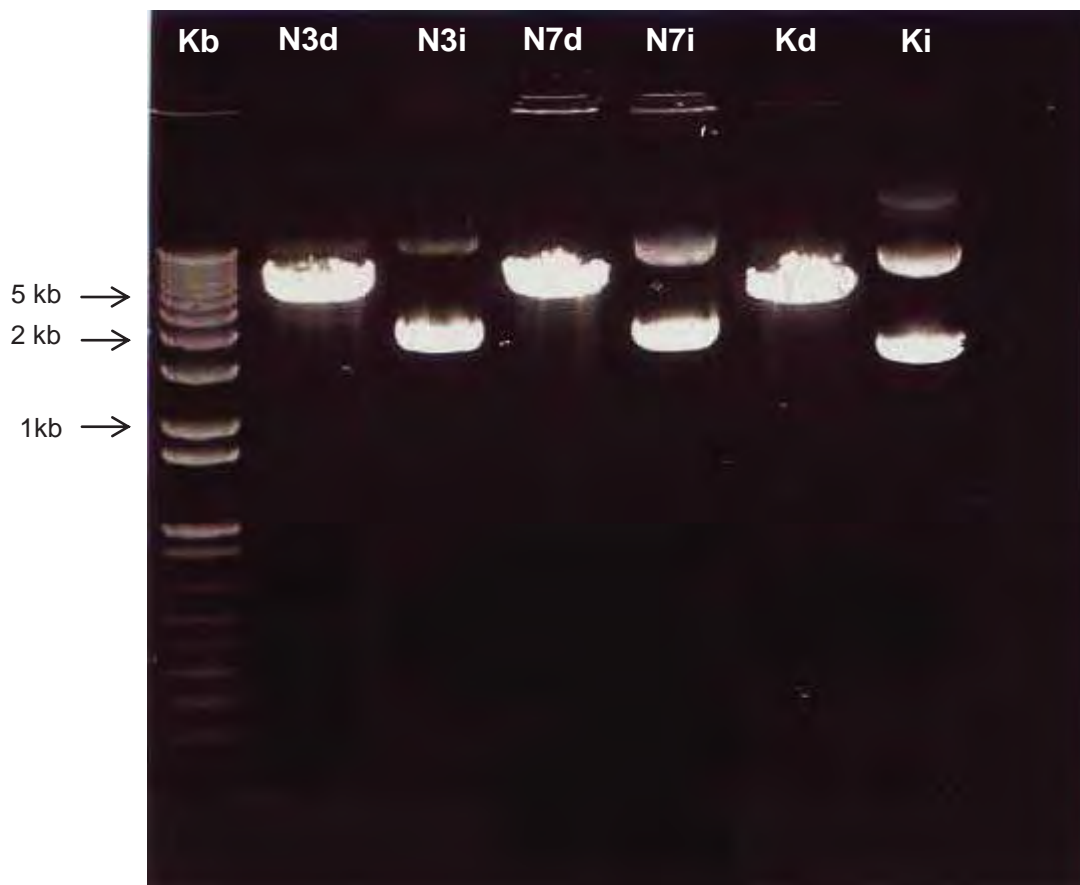
## 5. Resultados

### 5.1. Preparação plasmidial para transfecção de células eucariotas

Objetivando obter uma quantidade de plasmídeos suficientes para realizar a transfecção das células e produzir os anticorpos recombinantes, transformamos bactérias *E. coli* não patogênicas da linhagem DH5 $\alpha$  e fornecemos condições para que essas bactérias proliferassem. Foi possível selecionar as bactérias que realmente foram transformadas adicionando ampicilina no meio de cultura, porque, naturalmente, as bactérias utilizadas são sensíveis à ampicilina e os plasmídeos utilizados na transformação carregam genes de resistência à ampicilina, assim a transformação da bactéria fornece a ela resistência ao antibiótico. Desta forma, as bactérias que receberam os plasmídeos, ao se multiplicarem, multiplicaram também o plasmídeo que estava em seu interior. Neste momento, lisamos as bactérias e separamos os plasmídeos do DNA próprio delas.

Em seguida, foi necessária a verificação da integridade dos plasmídeos para nos certificarmos de que os plasmídeos estavam em condições de serem utilizados para os ensaios de transfecção de células eucariotas. Para isso, realizamos a digestão dos plasmídeos com a enzima de restrição EcoR1, o que abriria o DNA circular em um ponto, visto que nossos plasmídeos possuem apenas um sitio de ligação para essa enzima (Figura 1). Utilizamos os plasmídeos sem digestão e os plasmídeos digeridos em uma eletroforese em gel de agarose. As sequências de DNA dos plasmídeos digeridos (anti-DEC-205kappa, anti-DEC-205 N3 e anti-DEC-205 N7) mostraram-se íntegras, podendo ser visualizada apenas uma banda de cerca de 5700 pares de bases no gel para os plasmídeos que continham a cadeia pesada do anti-DEC-205 associada a um peptídeo da HSP60 e cerca de 5000 pares de bases no gel para os plasmídeos que continham a cadeia leve kappa do anti-DEC-205 (Figura 3). Nos poços em que foram colocados os plasmídeos sem digestão, observaram-se duas bandas no gel (Figura 3). A inferior corresponde ao plasmídeo em sua conformação normal e a superior corresponde ao plasmídeo

em sua conformação torcida, que, por causa de sua estrutura tridimensional alterada, tem sua velocidade de corrida reduzida.



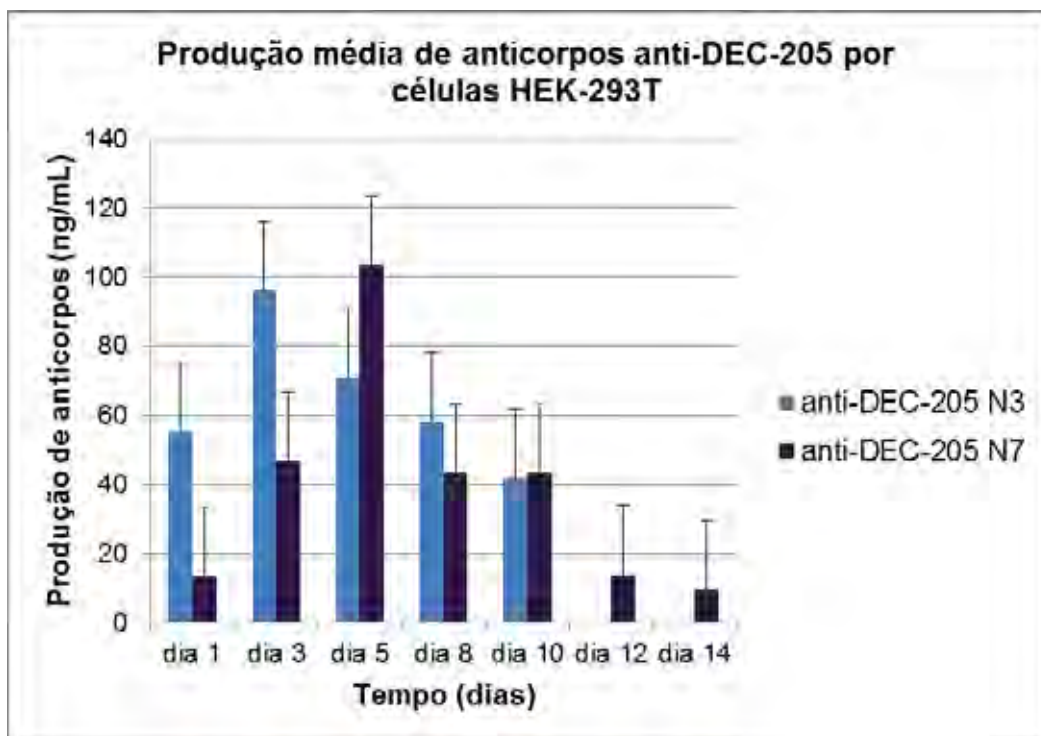
**Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos íntegros e digeridos. N3d:** plasmídeo que codifica o anti-DEC-205 N3 digerido com EcoRI; **N3i:** plasmídeos que codifica o anti-DEC-205 N3 sem digestão; **N7d:** plasmídeo que codifica o anti-DEC-205 N7 digerido com EcoRI; **N7i:** plasmídeo que codifica o anti-DEC-205 N7 sem digestão; **Kd:** plasmídeo que codifica o anti-DEC-205 kappa digerido com EcoRI; **Ki:** plasmídeo que codifica o anti-DEC-205 kappa sem digestão e **Kb:** marcador de pares de bases 1 Kb Plus (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA).

A constatação da integridade dos plasmídeos permitiu dar continuidade aos experimentos e realizar a transfecção das células HEK-293T e CHO visando a produção de anticorpos.

## 5.2. Produção de anticorpos

Após a transfecção das células HEK-293T com os plasmídeos que codificam o anticorpo anti-DEC-205, o anticorpo era produzido e secretado pelas células, permanecendo no sobrenadante de cultura de células.

A cada dois dias, o sobrenadante era colhido e procedia-se a quantificação dos anticorpos por ELISA. A figura 4 mostra a média de produção de anticorpos segundo o tempo. Observamos que o pico de produção de anticorpos anti-DEC-205 N7 pelas células transfectadas ocorria no quinto dia após a transfecção, enquanto que as células transfectadas com os anticorpos anti-DEC-205 N3 atingiam o máximo de produção no terceiro dia, em ambos os casos a produção máxima atingia cerca de 100 ng/mL.

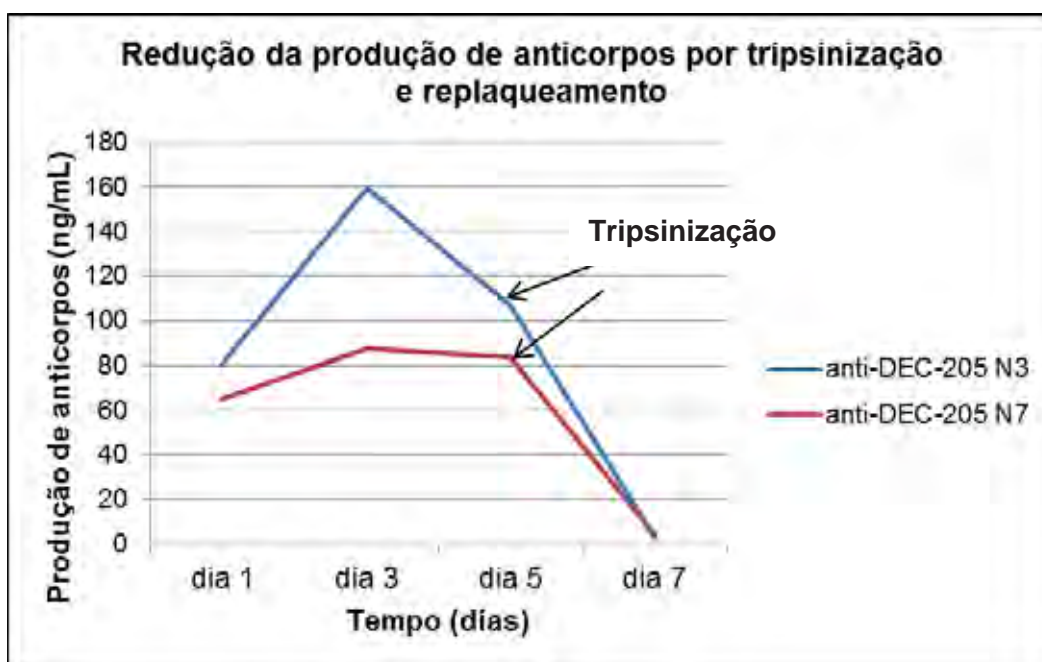


**Figura 4. Produção média de anticorpos anti-DEC-205 por células HEK-293T.** Células HEK-293T foram transfectadas com plasmídeos contendo a cadeia leve e a cadeia pesada do anti-DEC-205 recombinante e o sobrenadante da cultura de células foi colhido a cada dois dias para dosagem da concentração de anticorpos por ELISA. O gráfico mostra a produção média dessas células segundo o tempo. As barras representam o erro padrão das dosagens.

Inicialmente, as transfecções eram feitas em placas de 6 poços e, quando estas placas estavam com confluência de 90%, as células eram



tripsinizadas e transferidas para placas maiores, porém, percebemos que, após a tripsinização, a produção de anticorpos diminuía significativamente e cessava em poucos dias. O gráfico da figura 5 mostra que a produção de anti-DEC-205 N3 de uma cultura de células HEK-293T transfectadas caiu de 106,7 ng/ mL para 3 ng/mL e a produção de anti-DEC-205 N7 também por uma cultura de células HEK-293T transfectadas caiu de 83,44 ng/mL para 3,9 ng/mL, ambas as tripsinizações ocorreram no quinto dia após a transfecção. Por esse motivo, decidimos extinguir a tripsinização de nosso protocolo e, visando à obtenção das maiores quantidades possíveis de anticorpos, adotamos a estratégia de transfectar as células em placas de petri de 150 mm de diâmetro e coletar o sobrenadante com os anticorpos até que as células parassem, naturalmente, de produzi-los.

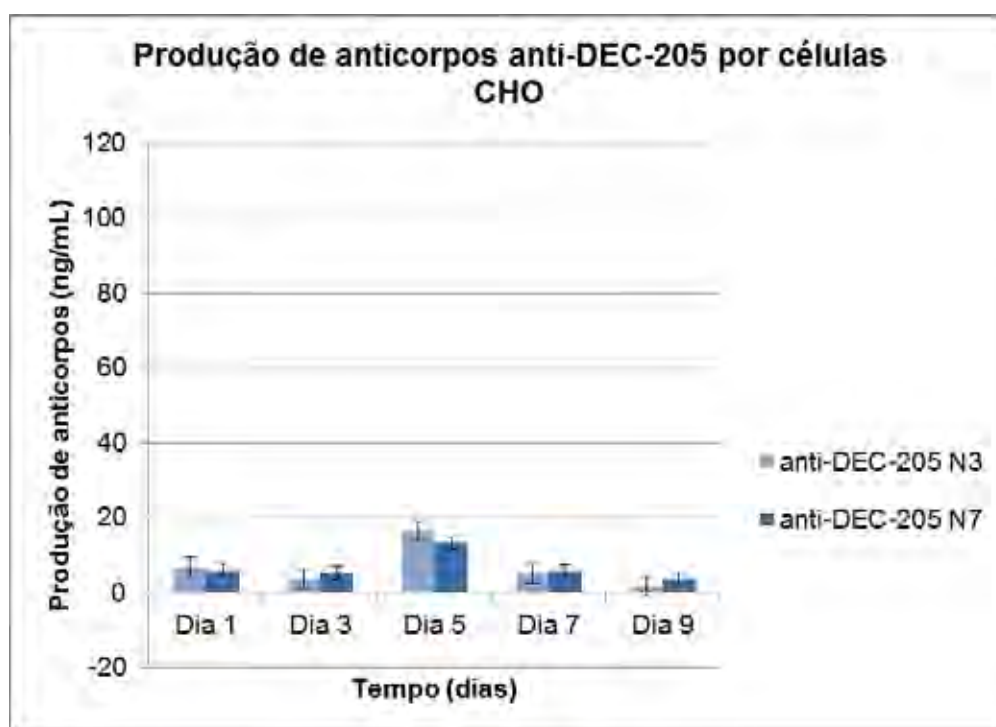


**Figura 5. Redução da produção de anticorpos por tripsinização e replaqueamento.** A tripsinização de células transfectadas em cultura, cuja confluência ultrapassava 90%, reduziu a produção de anticorpos por essas células para níveis quase nulos.

O rendimento por mL de sobrenadante de cultura da produção de anticorpos recombinantes em placas de petri de 150 mm de diâmetro não diferiu do rendimento apresentado pela produção em placas de 6 poços (Figura

4), porém foi possível coletar anticorpos da cultura por um período maior, visto que a ausência de tripsinização da placa no quinto dia possibilitou a produção prolongada de anticorpos.

Com o intuito de tentarmos otimizar a produção de anticorpos, realizamos a transfecção células CHO devido a sua maior estabilidade de produção de proteínas heterólogas (Boado *et al*, 2011). Ao analisarmos o rendimento da produção de anticorpos por essas células observamos que as células CHO não se mostraram mais eficientes em produzir anticorpos que as células HEK-293T. Enquanto o pico de produção de anticorpos pelas células HEK-293T alcançava 100 ng/mL (Figura 4), o pico de produção de anticorpos pelas células CHO não ultrapassava o limite de 30 ng/mL (Figura 6).



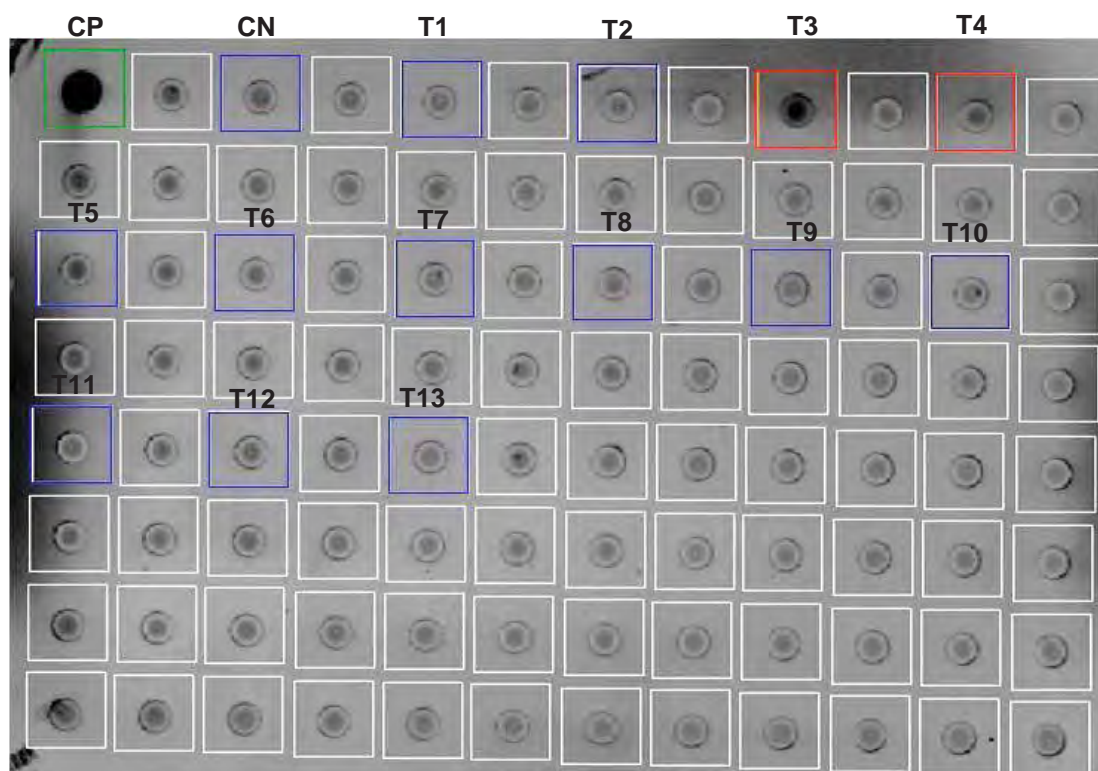
**Figura 6. Produção de anticorpos anti-DEC-205 por células CHO.** Células CHO foram transfectadas com plasmídeos que codificam o anti-DEC-205 recombinante e o sobrenadante de cultura dessas células foi coletado a cada dois dias para verificação da produção de anticorpos por ELISA.

Também tentamos selecionar um clone de células CHO produtor de anticorpos, plaqueando 0,1 e 1 célula transfectada por poço de uma placa de 96 poços e fornecendo condições para que as células presentes nesses poços

se multiplicassem. Esta seleção poderia proporcionar uma maior eficiência na produção de anticorpos, pois a seleção de um clone altamente produtor e a sua expansão garantiria que todas as células presentes na cultura, ou pelo menos a maioria delas, estariam produzindo anticorpos. Porém a dosagem de anticorpos no sobrenadante de cultura dos clones celulares foi negativa, revelando que nenhum dos clones colocados em cultura em placa de 96 poços apresentava a capacidade de produzir anticorpos.

### **5.3. Purificação dos anticorpos anti-DEC-205 N3**

Os anticorpos anti-DEC-205 N3 presentes nos sobrenadantes de cultura foram, então, purificados por cromatografia de afinidade, através de uma coluna de proteína A. A eluição dos anticorpos que se ligaram à coluna foi feita em séries, separando-se 1 mL de tampão de eluição em cada tubo de 1,5 mL de capacidade. Ao final, tínhamos 13 mL de tampão de eluição, sendo 1 mL por tubo receptor. Para saber em qual dos tubos continham os anticorpos desejados, procedeu-se a realização de um *Dot Blotting*. Observamos que os tubos de número 3 e 4 eram positivos para os anticorpos anti-DEC-205 N3 (Figura 7), por isso utilizamos na concentração as amostras presentes nos tubos 3, 4 e 5, visando a incorporação na amostra de possíveis concentrações que estariam no tubo 5 e que não teriam sido detectadas no *Dot Blotting*.

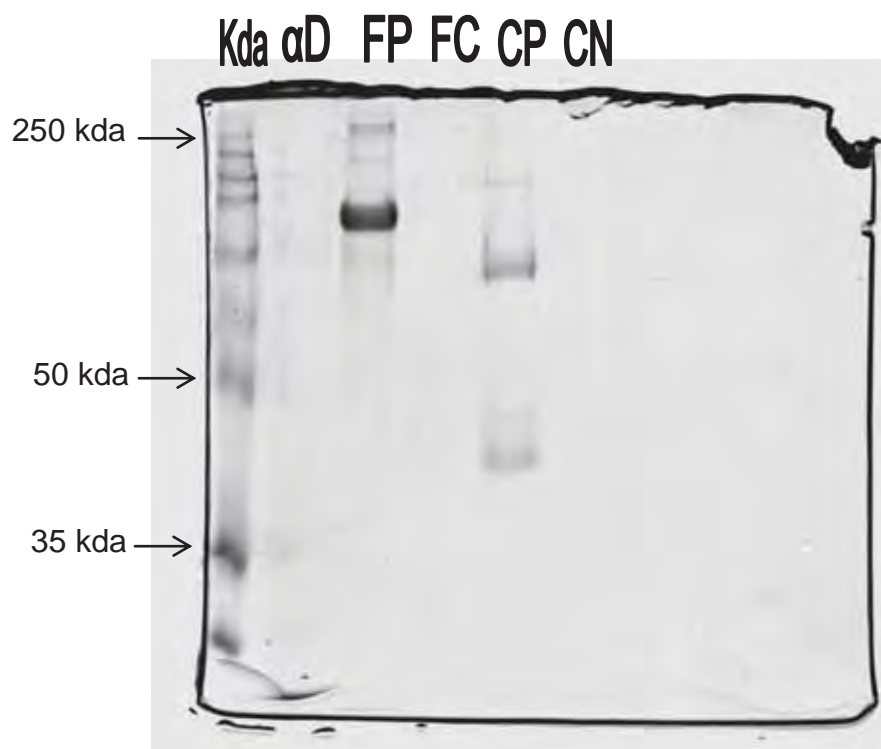


**Figura 7. Dot Blotting de anticorpos anti-DEC-205 recombinantes purificados.** Dot Blotting das amostras obtidas após a purificação dos anticorpos. Em verde está o controle positivo; em vermelho, amostras positivas para o anti-DEC-205 recombinante e em azul o controle negativo e as demais amostras em ordem numérica crescente. **CP**: controle positivo; **CN**: controle negativo e **T**: amostras.

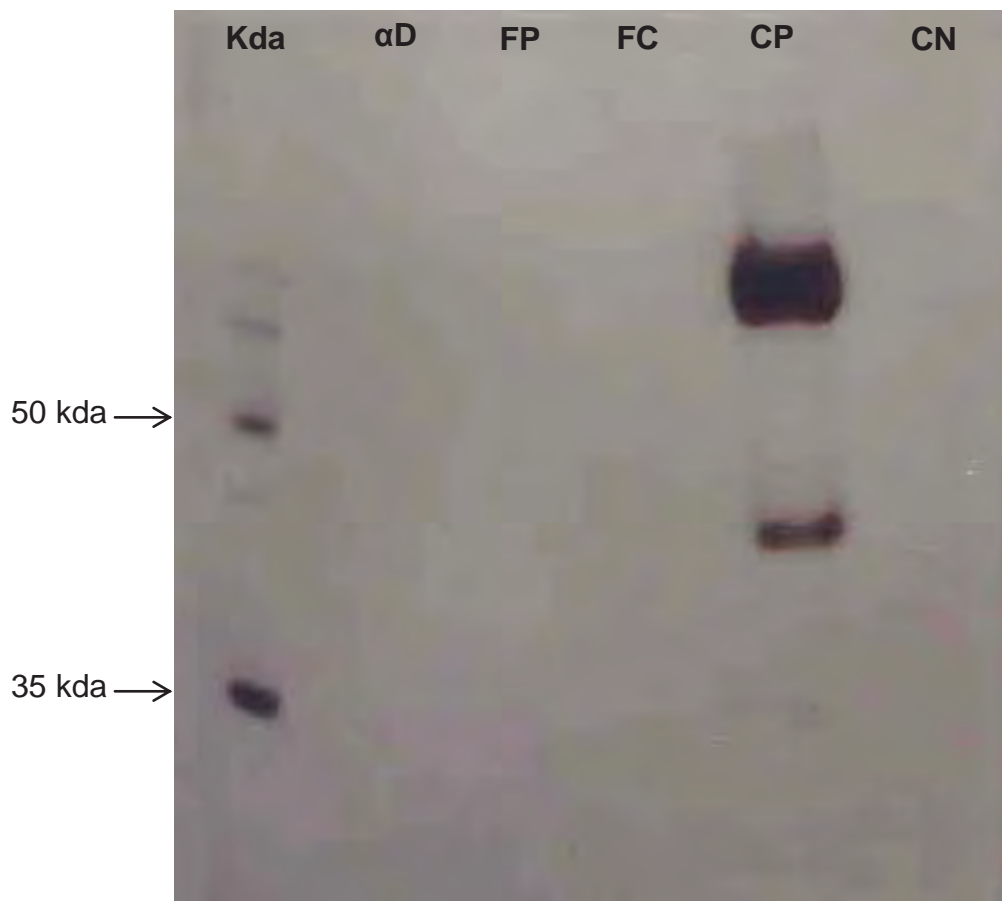
Após o *Dot Blotting* procedeu-se a concentração e a dessalinização das amostras de anti-DEC-205 N3 purificadas em filtros que não permitem a passagem de moléculas com tamanho maior que 50 kda. Após a concentração, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida. Um dos géis foi corado com Coomassie para visualização das proteínas totais presentes nele e o outro teve suas proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose para verificação da presença de proteínas específicas, no caso, anticorpos anti-DEC-205, por *western blotting*.

A partir desta etapa, os anticorpos anti-DEC-205 não foram mais detectados nas amostras. O gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 mostra a presença de proteínas no flow through da purificação de anticorpos, o que é normal por se tratar de meio de cultura, e no controle positivo. Não aparecem proteínas coradas no flow through da concentração de anticorpos, na amostra e no controle negativo (Figura 8). No *Western Blotting* apenas foram detectadas duas bandas no controle positivo (Figura 9). Este

experimento revela que as proteínas presentes no flow through da purificação de anticorpos, detectadas pela coloração com Coomassie, não são os anticorpos anti-DEC-205, porque elas não foram detectadas nesta técnica que foi específica para detectar os anticorpos em questão.



**Figura 8. Eletroforese do anti-DEC recombinante purificado e concentrado.** A figura mostra um gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. Visualizamos bandas no gel nos espaços correspondentes ao flow through da purificação de anticorpos (**FP**) e no controle positivo (**CP**). Nas amostras com o anti-DEC-205 (**αD**), no flow through da concentração de anticorpos (**FC**) e no controle negativo (**CN**) não foram detectadas proteínas. Kda: marcador de peso molecular Amersham Full-Range Rainbow (GE Healthcare, Piscataway, N.J)



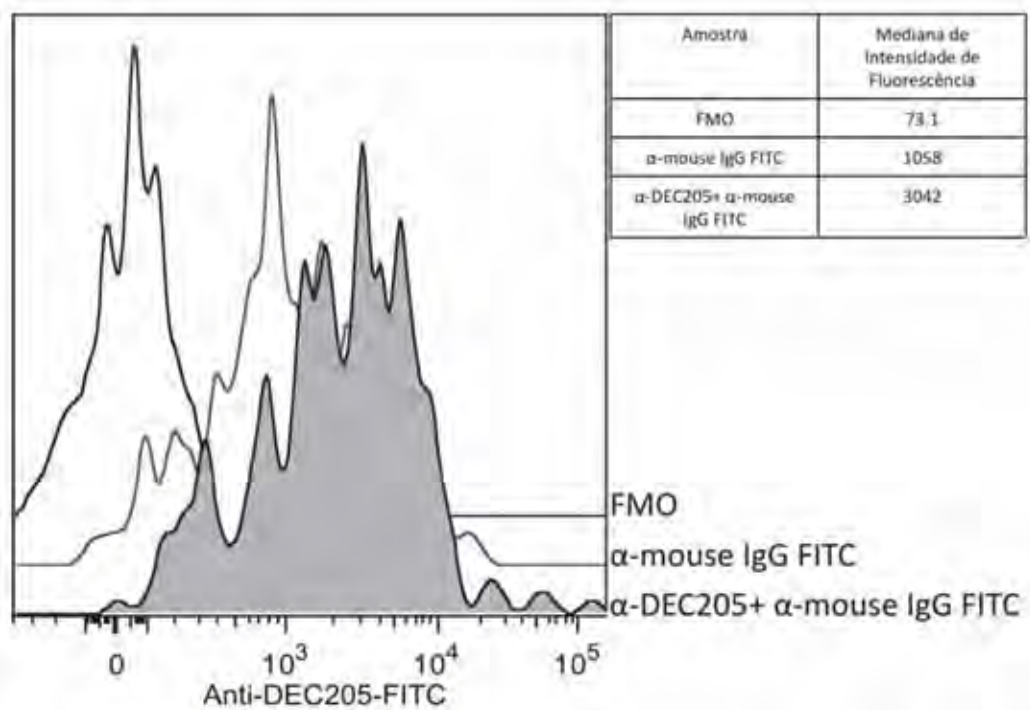
**Figura 9. Western Blotting do anti-DEC recombinante purificado e concentrado.** Visualizamos bandas no filme nos espaços correspondentes ao controle positivo (**CP**) e ao marcador de peso molecular Amersham Full-Range Rainbow (GE Healthcare, Piscataway, N.J)(**Kda**). Na amostra com o anti-DEC-205 (**αD**), no flow through da purificação de anticorpos (**FP**), no flow through da concentração de anticorpos (**FC**) e no controle negativo (**CN**) não foram detectadas proteínas. Ca

Para os anticorpos anti-DEC-205 N7, decidiu-se realizar a concentração a partir dos sobrenadantes de cultura, a fim de evitar manipulações e contato com soluções que poderiam causar uma possível degradação das proteínas. Foram concentrados 300 ng dos anticorpos anti-DEC-205 N7, quantificados por ELISA, obtidos no 4º dia após a transfecção. Esses anticorpos concentrados foram submetidos à um ensaio de ligação por citometria de fluxo.

#### 5.4. Ligação dos anticorpos anti-DEC-205 N7 às células dendríticas

Para verificar a ligação dos anticorpos anti-DEC-205 N7 concentrados às células dendríticas esplênicas murinas  $CD11c^+CD8^+I\alpha e^+CD4^-CD205^+$ , estes foram submetidos a um ensaio de ligação e depois análise por citometria de fluxo. Inicialmente, as células esplênicas foram incubadas com soro de camundongo para que fossem bloqueados os sítios de ligação dos fragmentos Fc das Igs nas células esplênicas, permitindo que as ligações dos anticorpos durante as incubações fossem feitas apenas pelas regiões variáveis dos mesmos. Em seguida, houve a incubação das células com os anticorpos recombinantes produzidos, os quais deveriam se ligar nos receptores DEC-205 das células dendríticas. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos anti-IgG de camundongo marcados com FITC, os quais deveriam se ligar aos anticorpos IgG de camundongo previamente ligados nas células dendríticas pelo receptores DEC-205. Por último, foram adicionados anticorpos anti-I $\alpha$ e (MHC de classe II) marcados com PE, anti-CD11c (marcador de células dendríticas) marcados com APC, anti-CD8 $\alpha$  marcados com PerCP e anti-CD4 marcados com APC Cy7.

Os anticorpos anti-DEC-205 N7 mostraram-se capazes de se ligar a células dendríticas  $CD11c^+CD8\alpha^+I\alpha e^+CD4^-CD205^+$ . Na figura 10 é possível visualizar três condições: FMO FITC (todas as fluorescências exceto uma, do inglês, *Fluorescence Minus One*) onde são adicionados todos os anticorpos menos o anticorpo com a fluorescência FITC, anticorpos anti-IgG marcados com FITC (sendo o *background* da reação) e anticorpos anti-DEC-205 N7 + anticorpos anti-IgG marcados com FITC. Embora o anticorpo anti-IgG marcado com FITC tenha demonstrado inespecificidade, visto que a MFI (mediana de intensidade de fluorescência, do inglês, *Median Fluorescence Intensity*) da condição em que eles estavam sozinhos com as células foi superior a MFI da condição sem a fluorescência FITC, a ligação dos anticorpos recombinantes produzidos fica evidenciada, porque esta condição apresentou MFI cerca de três vezes maior que a MFI controle.



**Figura 10.** O anticorpo anti-DEC-205 N7 apresenta capacidade de ligação a células dendríticas murinas esplênicas  $CD11c^+CD8a^+$ . As células esplênicas foram incubadas com os anticorpos recombinantes e, em seguida, com anticorpos anti-IgG de camundongo FITC. A figura mostra a mediana da intensidade de fluorescência das células ligadas ao anticorpo recombinante ( $\alpha$ -DEC205+  $\alpha$ -mouse IgG FITC) e de seus controles (FMO e  $\alpha$ -mouse IgG FITC).



## 6. Discussão

Embora as respostas organizadas pelo sistema imune possuam a função de manter a homeostase do organismo, em algumas situações estas respostas não são desejadas e acabam causando o desequilíbrio de diversos sistemas. Este é o caso, por exemplo, das doenças autoimunes e dos transplantes alogeneicos. Nas doenças autoimunes, há uma falha nos mecanismos de indução de tolerância ao próprio e as células do sistema imune passam a reconhecer elementos próprios como não próprios e a regulação das respostas imunes faz-se necessária para que não haja danos aos órgãos e tecidos do portador da doença. Nos transplantes alogeneicos, as células do sistema imune tendem a rejeitar o enxerto por se tratar de tecidos ou células estranhas e, neste caso, a indução de tolerância ao enxerto pode melhorar a sobrevida do transplante e garantir o sucesso da técnica. Atualmente, a terapia de escolha é a imunossupressora, porém ela causa sérios efeitos colaterais (Lamoureux *et al*, 2011) e deixa o indivíduo susceptível a infecções e ao desenvolvimentos de neoplasias (Molina *et al*, 2010). Neste trabalho, desenvolvemos uma nova ferramenta que pode contribuir com as pesquisas que buscam formas de induzir imunorregulação, os anticorpos que reconhecem os receptores de endocitose DEC-205 das células dendríticas acoplados com os peptídeos tolerogênicos N7 e N3 da HSP60. Mostramos que os anticorpos anti-DEC-205 N7 se ligam ao seu alvo na superfície de células dendríticas murinas. A ligação desses anticorpos às DCs poderá possibilitar a fagocitose dessas moléculas, o seu processamento e a apresentação dos peptídeos tolerogênicos da HSP60 pelas DCs em um contexto de MHC de classe II para linfócitos T. Nossa hipótese é que isso poderá induzir a diferenciação de células T com perfil imunorregulador.

As células utilizadas para a produção dos anticorpos foram células imortalizadas de mamíferos, porque elas têm a capacidade de promover o correto dobramento e processamento pós-traducional (Wurm, 2004).

A transfecção das células foi realizada com reagente comercial, segundo instruções do fabricante, porém o rendimento da produção de anticorpos foi baixo comparado a outros trabalhos com células HEK-293T transfectadas (Li *et al*, 2007). As transfecções foram realizadas quando o nível de confluência das

células se aproximava de 50%, o que permitiu o crescimento celular, não afetando, desta maneira, a eficiência da transfecção. As células HEK-293T não estavam em passagens avançadas e o tempo de incubação foi adequado, pois conservamos as células em cultura até que a produção de anticorpos finalizasse ou chegasse a níveis muito baixos. Percebemos que os complexos reagente comercial – plasmídeos são tóxicos para as células e, por isso, não podem ficar em contato com elas por 48 horas, que é o tempo máximo recomendado pelo fabricante, porque isso causava a morte da maioria das células em cultura (dados não mostrados). Como medida preventiva do dano e da morte celular, o tempo máximo de incubação dos complexos com as células era 24 horas.

Em eletroforese em gel de agarose, verificamos que os nossos plasmídeos possuem cerca de 5000 pares de bases e que eles estão íntegros (Figura 3), assim acreditamos que a baixa produção também não seja devido ao tamanho exacerbado da sequência de DNA, porque as concentrações recomendadas no protocolo de transfecção fornecido pelo fabricante são para plasmídeos com até 20000 pares de bases, e também acreditamos que não seja devido à qualidade prejudicada do DNA, devido à integridade comprovada.

As células CHO também foram utilizadas nas condições recomendadas, porém mostraram-se menos eficientes em produzir anticorpos do que células HEK-293T, o que já é amplamente mostrado na literatura (Bollin *et al*, 2011). Contudo, nossa intenção era selecionar um clone estável de células CHO para posterior expansão, porém os clones selecionados não foram capazes de produzir anticorpos.

Ambas as células por nós utilizadas eram células aderentes. Para aumentar a densidade destas células é necessário aumentar a superfície de aderência das mesmas, por isso células em suspensão, cuja densidade atinge níveis maiores que as células aderentes num mesmo volume, são mais eficientes em produzir anticorpos (Chu e Robinson, 2001). Substituir as células utilizadas na transfecção por células que vivem em suspensão talvez seja uma alternativa para garantir a produção de maiores concentrações de anticorpos.

Outro fator que está envolvido na baixa expressão de proteínas recombinantes em células de mamíferos é a construção dos vetores utilizados. Geralmente, os genes que codificam a proteína recombinante encontram-se

sob promotores considerados fortes como, por exemplo, o promotor de citomegalovírus (Gopalkrishnan *et al*, 1999). Atualmente, tem-se desenvolvido estratégias que aumentam a transcrição dos genes que codificam a proteína recombinante e a tradução dos mesmos. Exemplos dessas estratégias são o desenvolvimento de sequências flanqueadoras do gene de interesse, que aumentam a expressão do mesmo, (Kwaks *et al*, 2003) e a introdução no gene que codifica a proteína recombinante de sequências não codificadoras (íntrons), pois dados na literatura apontam para o fato de que o transporte do RNA mensageiro para o citoplasma e sua tradução de forma eficiente dependem do processo de *splicing* (Le Hir *et al*, 2003). Como o plasmídeo utilizado em nossos experimentos é objeto de patente, não conhecemos sua sequência genética e não podemos discutir as possíveis interferências de sua construção na produção dos anticorpos recombinantes. Porém não podemos descartar que este problema esteja presente e tenha influenciado este trabalho.

Ainda assim, reconhecemos que é necessário realizar transfecções adicionais com princípios e células diferentes na tentativa de se estabelecer uma técnica mais eficaz em produzir anticorpos.

Os anticorpos produzidos pelas células transfectadas foram purificados e sua presença nas amostras eluídas foi confirmada por *Dot Blotting* (Figura 7), porém, após a concentração e dessalinização destes anticorpos, a proteína não foi mais detectada. Uma de nossas hipóteses para essa ausência de detecção das proteínas é a degradação, visto que, após a purificação dos anticorpos, as amostras foram retiradas do meio de cultura com inibidores de proteases e novas concentrações destes inibidores não foram adicionadas a elas. O intervalo entre a purificação dos anticorpos e a sua concentração, dessalinização e dosagem de anticorpos foi de cinco dias, tempo este suficiente para a degradação total das proteínas.

Assim, adotamos a estratégia de concentrar os anticorpos recombinantes diretamente do sobrenadante de cultura das células, devido ao avançar do tempo e a necessidade de concluirmos o trabalho. Os anticorpos recombinantes concentrados foram submetidos a um ensaio de ligação a células dendríticas realizado por citometria de fluxo e mostraram-se capazes de se ligar a essas células. Como a concentração foi feita sem prévia purificação, a preparação com os anticorpos recombinantes apresentava outras proteínas

presentes no meio de cultura que também acabaram sendo concentradas pela técnica. É possível que estas proteínas contaminantes tenham atrapalhado a ligação dos anticorpos recombinantes a seus receptores, porém isso não nos impediu de visualizar as ligações desejadas. Experimentos posteriores, com anticorpos recombinantes devidamente purificados, poderão nos fornecer dados mais claros da eficácia de ligação destes anticorpos a seus receptores.

Além disso, os anticorpos conjugados (anti-mouse IgG FITC) utilizados para marcar os anticorpos recombinantes ligados às células dendríticas apresentaram inespecificidade de ligação, o que pode ser concluído a partir da observação de certa positividade na condição em que células dendríticas, sem incubação prévia com os anticorpos recombinantes anti-DEC205, foram incubadas com os conjugados. Os anticorpos conjugados disponíveis no laboratório não são mais comercializados e devido a isso, não temos acesso às informações técnicas do produto, por isso, não podemos afirmar, mas supomos que os anticorpos utilizados apresentam reatividade cruzada com outras proteínas. Novamente, a intercorrência não impediu a visualização do resultado deste experimento, porém novos experimentos com concentrações mais baixas do conjugado devem ser realizados para a obtenção de um resultado mais claro.

Como os anticorpos recombinantes anti-DEC-205 N7 produzidos neste trabalho se mostraram capazes de se ligar à superfície de células dendríticas, eles são considerados importantes ferramentas no direcionamento dos peptídeos N7 a estas células. Dessa forma, como perspectivas futuras almejamos otimizar a produção dos anticorpos recombinantes conjugados com os peptídeos N3 e N7 da HSP60 e purificá-los. Com essas etapas vencidas poderemos administrar estes anticorpos a modelos experimentais murinos e realizar ensaios de transplante de pele nestes camundongos com o intuito de verificar o potencial do direcionamento dos peptídeos da HSP60 a células dendríticas na indução de tolerância ao transplante alogeneico. Desta forma, podendo contribuir com o desenvolvimento de uma nova abordagem para a indução de imunorregulação em situações em que uma resposta inflamatória não é desejada.

## 7. Referências Bibliográficas

- Baek, S., Kim, C. S., Kim, S. B., Kim, Y. M., Kwon, S. W., Kim, Y., *et al.* Combination therapy of renal cell carcinoma or breast cancer patients with dendritic cell vaccine and IL-2: results from a phase I /II trial. *J Transl Med.* 2011 Oct 20;9(1):178.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):20-1.
- Boado, R. J., Hui, E. K., Lu, J. Z., Pardridge, W. M. CHO cell expression, long-term stability, and primate pharmacokinetics and brain uptake of an IgG-paroxonase-1 fusion protein. *Biotechnol Bioeng.* 2011 Jan;108(1):186-96.
- Bollin, F., Dechavanne, V., Chevalet, L. Design of Experiment in CHO and HEK transient transfection condition optimization. *Protein Expr Purif.* 2011 Jul;78(1):61-8.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):68-73.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198(12):1875-86.
- Chen, W., Syldath, U., Bellmann, K., Burkart, V., Kolb, H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol.* 1999 Mar 15;162(6):3212-9.
- Chu, L., Robinson, D. K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Apr;12(2):180-7.
- Cohen, I. R. Real and artificial immune systems: computing the state of the body. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jul;7(7):569-74.
- Fehling, H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C., Von Boehmer, H. Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature.* 1995 Jun 29;375(6534):795-8.

- Flohe, S. B., Bruggemann, J., Lendemans, S., Nikulina, M., Meierhoff, G., Flohe, S., *et al.* Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol.* 2003 Mar 1;170(5):2340-8.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S., Weigert, M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med.* 1993 Apr 1;177(4):999-1008.
- Gopalkrishnan, R. V., Christiansen, K. A., Goldstein, N. I., Depinho, R. A., Fisher, P. B. Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 1999 Dec 15;27(24):4775-82.
- Guembes, A. P. S. Mapeamento de peptídeos da proteína de choque térmico 60 potencialmente imurreguladores no modelo murino. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.
- Gulden, E., Marker, T., Kriebel, J., Kolb-Bachofen, V., Burkart, V., Habich, C. Heat shock protein 60: evidence for receptor-mediated induction of proinflammatory mediators during adipocyte differentiation. *FEBS Lett.* 2009 Sep 3;583(17):2877-81.
- Hartl, F. U., Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 2002 Mar 8;295(5561):1852-8.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):769-79.
- Hill, M., Thebault, P., Segovia, M., Louvet, C., Beriou, G., Tilly, G., *et al.* Cell Therapy With Autologous Tolerogenic Dendritic Cells Induces Allograft Tolerance Through IFN-gamma and EB13. *Am J Transplant.* 2011 Jul 27.
- Hsieh, C. H., Liao, H. F., Kuo, C. D., Huang, Y. C., Shueng, P. W., Hsu, Y. P., *et al.* Norcantharidin Modulates Development of Dendritic Cells and Prolongs Skin Allograft Survival. *Transplantation.* 2011 Oct 27;92(8):848-57.
- Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., *et al.* The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 1995 May 11;375(6527):151-5.

- Kilmartin, B., Reen, D. J. HSP60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli. *Eur J Immunol.* 2004 Jul;34(7):2041-51.
- Kim, J. M., Rasmussen, J. P., Rudensky, A. Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol.* 2007 Feb;8(2):191-7.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol.* 2009 Dec;9(12):833-44.
- Knoechel, B., Lohr, J., Zhu, S., Wong, L., Hu, D., Ausubel, L., *et al.* Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol.* 2006 Jun 1;176(11):6473-83.
- Kraal, G., Breel, M., Janse, M., Bruin, G. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med.* 1986 Apr 1;163(4):981-97.
- Kruisbeek, A. M., Haks, M. C., Carleton, M., Michie, A. M., Zuniga-Pflucker, J. C., Wiest, D. L. Branching out to gain control: how the pre-TCR is linked to multiple functions. *Immunol Today.* 2000 Dec;21(12):637-44.
- Kwaks, T. H., Barnett, P., Hemrika, W., Siersma, T., Sewalt, R. G., Satijn, D. P., *et al.* Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2003 May;21(5):553-8.
- Kwan, J., Killeen, N. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J Immunol.* 2004 Apr 1;172(7):3999-4007.
- Kyewski, B., Klein, L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:571-606.
- Lamoureux, F., Mestre, E., Essig, M., Sauvage, F. L., Marquet, P., Gastinel, L. N. Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus. *J Proteomics.* 2011 Sep 18.
- Le Hir, H., Nott, A., Moore, M. J. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci.* 2003 Apr;28(4):215-20.
- Li, J., Menzel, C., Meier, D., Zhang, C., Dubel, S., Jostock, T. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. *J Immunol Methods.* 2007 Jan 10;318(1-2):113-24.
- Lindquist, S., Craig, E. A. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77.
- Lohr, J., Knoechel, B., Abbas, A. K. Regulatory T cells in the periphery. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:149-62.

- Lohse, A. W., Mor, F., Karin, N., Cohen, I. R. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells responding to activated T cells. *Science*. 1989 May 19;244(4906):820-2.
- Luna, E., Postol, E., Caldas, C., Benvenuti, L. A., Rodrigues, J. M., Jr., Lima, K., *et al.* Treatment with encapsulated Hsp60 peptide (p277) prolongs skin graft survival in a murine model of minor antigen disparity. *Scand J Immunol*. 2007 Jul;66(1):62-70.
- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S. L., Nussenzweig, M., *et al.* The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol*. 2000 Oct 30;151(3):673-84.
- Maldonado-Lopez, R., Maliszewski, C., Urbain, J., Moser, M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J Immunol*. 2001 Oct 15;167(8):4345-50.
- Martello, F. G. HSP60 e imunorregulação: estratégias para identificação de peptídeos imunorreguladores. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
- Miller, J. F., Osoba, D. Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol Rev*. 1967 Jul;47(3):437-520.
- Molina, B. D., Leiro, M. G., Pulpon, L. A., Mirabet, S., Yanez, J. F., Bonet, L. A., *et al.* Incidence and risk factors for nonmelanoma skin cancer after heart transplantation. *Transplant Proc*. 2010 Oct;42(8):3001-5.
- Norment, A. M., Bevan, M. J. Role of chemokines in thymocyte development. *Semin Immunol*. 2000 Oct;12(5):445-55.
- Norvell, A., Mandik, L., Monroe, J. G. Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *J Immunol*. 1995 May 1;154(9):4404-13.
- Nossal, G. J., Pike, B. L. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Mar;77(3):1602-6.
- Nussenzweig, M. C., Steinman, R. M., Gutchinov, B., Cohn, Z. A. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1980 Oct 1;152(4):1070-84.
- Onoe, K., Gotohda, T., Nishihori, H., Aranami, T., Iwabuchi, C., Iclozan, C., *et al.* Positive and negative selection of T cell repertoires during differentiation in allogeneic bone marrow chimeras. *Transpl Immunol*. 2003 Oct-Nov;12(1):79-88.



- Pockley, A. G., Muthana, M., Calderwood, S. K. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem Sci.* 2008 Feb;33(2):71-9.
- Quintana, F. J., Cohen, I. R. Regulatory T cells and immune computation. *Eur J Immunol.* 2008 Apr;38(4):903-7.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:18-32.
- Song, J., Ito, T., Matsuda, C., Tanemura, M., Nishida, T., Nozawa, M., *et al.* Regulation of donor T cells in the tolerant rats to graft-versus-host disease by FTY720 following small bowel transplantation. *Transplant Proc.* 2006 Dec;38(10):3181-3.
- Steinman, R. M., Hawiger, D., Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685-711.
- Suss, G., Shortman, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1789-96.
- Thompson, C., Powrie, F. Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2004 Aug;4(4):408-14.
- Van Eden, W., Van Der Zee, R., Prakken, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2005 Apr;5(4):318-30.
- Volsi, E. C. F. R. Células dendríticas e a proteína de choque térmico 60 KDA (HSP60): estratégias para imunorregulação do sistema imune murino. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
- Wells, A. D., Li, X. C., Strom, T. B., Turka, L. A. The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 May 29;356(1409):617-23.
- Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2004 Nov;22(11):1393-8.
- Yamazaki, S., Dudziak, D., Heidkamp, G. F., Fiorese, C., Bonito, A. J., Inaba, K., *et al.* CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):6923-33.
- Yamazaki, S., Patel, M., Harper, A., Bonito, A., Fukuyama, H., Pack, M., *et al.* Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 21;103(8):2758-63.

Zanin-Zhorov, A., Cahalon, L., Tal, G., Margalit, R., Lider, O., Cohen, I. R. Heat shock protein 60 enhances CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):2022-32.