



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

Pollyana Guimarães de Oliveira

Avaliação da capacidade da nova linhagem de células dendríticas AP284 responder a diferentes agonistas de TLRs e de induzir uma resposta Th17

**Goiânia
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

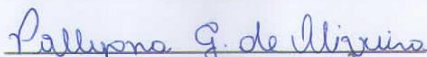
Nome completo do autor: Pollyana Guimarães de Oliveira

Título do trabalho: Avaliação da capacidade da nova linhagem de células dendríticas AP284 responder a diferentes agonistas de TLRs e de induzir uma resposta Th17

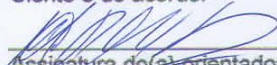
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 04 / 10 / 19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

Pollyana Guimarães de Oliveira

Avaliação da capacidade da nova linhagem de células dendríticas AP284 responder a diferentes agonistas de TLRs e de induzir uma resposta Th17

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Prof Dr Milton A. Pelli de Oliveira

**Goiânia
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira, Pollyana Guimarães de
Avaliação da capacidade da nova linhagem de células dendríticas AP284 responder a diferentes agonistas de TLRs e de induzir uma resposta Th17 [manuscrito] / Pollyana Guimarães de Oliveira. - 2018. xvi, 104 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Células dendríticas. 2. AP284. 3. IL-12p40. 4. IL-23. I. Oliveira, Milton Adriano Pelli de, orient. II. Título.

CDU 612.017

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Pollyana Guimarães de Oliveira

Orientador (a): Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Membros:

1. Prof Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira (UFG-GO)

2. Prof^ª. Dr^ª. Simone Fonseca (UFG-GO)

3. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer (PUC-GO)

4. Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos (UFG-GO)

5. Prof^ª.Dr^ª. Elisângela Silveira Lacerda (ICB-UFG)

Data: 14/11/2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n - Setor Universitário - Goiânia/GO - CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 - Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgmtsp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE POLLYANA GUIMARÃES DE OLIVEIRA - Aos catorze dias do mês de novembro do ano de 2018 (14/11/2018), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA, SIMONE GONÇALVES DA FONSECA, IRMTRAUT ARACI HOFFMANN PFRIMER, HELIOSWILTON SALES DE CAMPOS e ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA NOVA LINHAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS AP284 RESPONDER A DIFERENTES AGONISTAS DE TLRs E DE INDUZIR UMA RESPOSTA Th17"** em nível de DOUTORADO, área de concentração em IMUNOLOGIA, de autoria de **POLLYANA GUIMARÃES DE OLIVEIRA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador Prof. Dr. MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da tese que, em 30 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1304/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada ou Reprovada:**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira
Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca
Profa. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer
Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos
Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Aprovado / Reprovado

APROVADO
APROVADO
APROVADO
APROVADA
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata HABILITADA (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTORA EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **IMUNOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 19h09 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, **JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO**, secretário da Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira (IPTSP/UFG) _____

Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca (IPTSP/UFG) _____

Profa. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer (PUC/GO) _____

Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos (IPTSP/UFG) _____

Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda (ICB/UFG) _____

Secretário da Pós-Graduação: _____

Dedico este trabalho a minha família, em especial ao meu esposo, pelo seu amor e compreensão. Dedico ao meu orientador, pelo suporte e auxílio durante toda essa caminhada.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

Á Deus primeiramente, pois Nele eu encontro o descanso que preciso e a paz que busco nos momentos de aflições.

Ao meu esposo, que comigo esteve desde o início até agora. Agradeço pelo companheirismo, pelo amor e pela dedicação a mim.

Ao meu orientador, que me deu a oportunidade de conhecer o mundo científico e que me auxiliou em todos os momentos em que precisei. Agradeço pela paciência, agradeço pelo suporte que me forneceu. Agradeço por todo ensinamento que me proporcionou.

Agradeço a todos os colegas e amigos que tive a portude de fazer durante essa caminhada, amigos que levarei por toda a vida. Agradeço pelo o apoio que sempre me deram. Vocês fizeram com que essa jornada se tornasse mais leve.

A todos do IPTSP que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Agradeço a todos os professores pelos ensinamentos. Agradeço aos técnicos pelo suporte e auxílio.

As agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEG que fez com que fosse possível o desenvolvimento deste projeto.

Enfim, eu agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho. Obridada a todos!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	x
TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	xi
Avaliação da produção de TNF- α por células AP284 após estímulos com LPS e IFN- γ	45 xi
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Características, funções e diversidade das células dendríticas.....	1
1.2. Receptores semelhantes à Toll (TLRs) e expressão em DCs.....	6
1.3. Produção de citocinas por DCs e sua influência na indução dos diferentes perfis de linfócitos TC4+ auxiliares (Th).....	10
1.4. A família IL-12.....	12
1.5. Agonistas de TLRs e produção de IL-12 e IL-23.....	15
1.6. Geração de DCs <i>in vitro</i>	17
1.7. Linhagens de DCs imortalizadas e células AP284.....	18
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. ARTIGOS	22
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS	77

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1:	Família IL-12.....	14
Figura 2:	Avaliação de marcadores celulares presentes em macrófagos, BMDCs e AP284.....	32
Figura 3:	Avaliação da expressão de diferentes TLRs por células AP284.....	33
Figura 4:	Aspecto morfológico de células AP284 em cultura após estímulo com zymosam ou LPS	34
Figura 5:	Avaliação da produção de IL-12p40 por células AP284 e BMDCs após estímulos com diferentes agonistas de TLRs.....	35
Fugua 6:	Avaliação da produção De IL-p70 por células AP284 e BMDCs após estímulo com diferentes agonistas de TLR.....	37
Figura 7:	Avaliação da produção De IL-23 por células AP284 e BMDCs após estímulo com diferentes agonistas deTLRs.....	39
Fugua 8:	Avaliação da produção IL-12p40, IL-12p70 e IL-23 por células AP284 e BMDCs após estímulo com IFN- γ	41
Fugua 9:	Avaliações da viabilidade de células AP284 após estímulo com IFN- γ	42
Figura 10:	Avaliação da produção de NO por células AP284 e BMDCs.....	43
Fugua 11:	Avaliação da produção de TNF- α por células AP284 após estímulos com LPS e IFN- γ	45
Fugua 12:	Avaliação da capacidade de células AP284 fagocitar leishmânia.	46
Fugua 13:	Avaliação da produção de IL-12p40 por células AP284 infectadas por <i>L. major</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> ou estimuladas com BCG.....	47
Figura 14	Avaliação da participação de células AP284 na indução do perfil de resposta imune Th1 ou Th17 <i>in vivo</i>	48
Figura 15	Avaliação da participação de células AP284 na indução dos perfis	

Th1, Th2, Th17 e Treg após imunização <i>in vivo</i> com Adjuvante de Freund.....	50
---	----

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

- APCs:** células apresentadoras de antígenos
- BMDCs:** células dendríticas derivadas de medula óssea
- cDCs:** células dendríticas convencionais
- CFA:** adjuvante completo de Freund
- CLP :** progenitores linfoides comum
- CMP:** progenitor mieloide comum
- ConA:** concanavalina A
- DCs:** células dendríticas
- ER:** retículo endoplasmático
- ELISA:** ensaio imoenzimático
- FACS:** separação de células ativadas por fluorescência
- GM-CSF:** fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
- GMPs:** precursor de granulócitos macrófagos
- imDcs:** células dendríticas imaturas
- Inf-DC:** células dendríticas inflamatórias
- iNOS:** óxido nítrico sintase induzida
- IFN- γ :** interferon- gama
- IFN- tipo I:** interferon tipo um
- LBP:** proteína de ligação à LPS
- LC:** células de Langerhans
- LPS:** lipopolissacarídeo
- LTA:** ácido lipoteicóico
- LTc:** linfócitos T citotóxicos
- mDCs:** células dendríticas migratórias
- MBP:** proteína de ligação a maltose
- MDP:** precursor macrófago/DC
- MHC:** molécula principal de histocompatibilidade
- miRNA:** micro RNA
- MLR:** reação leucocitária mista
- MPL:** monophosphoril lipídio
- moDC:** células dendríticas derivadas de monócitos
- NK:** natural Killer

NO: óxido nítrico

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PBS: solução salina tamponada com fosfato

pDCs: células dendríticas plasmocitóides

PIC: ácido polinosínico-policitidílico

RPMI: roswell Park Memorial Institute

PRRs: receptores de reconhecimento de padrões

RNA: ácido ribonucleico

SBF: soro fetal bovino

SD: desvio padrão

SDS: dodecil sulfato de sódio

TGF β : fator de crescimento transformador beta

Th: T auxiliares

Th1: linfócitos T auxiliares do tipo 1

Th2: linfócitos T auxiliares do tipo 2

Th17: linfócitos T auxiliares do tipo 17

TLRs: receptores semelhantes ao toll

TMB: tetramethylbenzidine

TNF: fator de necrose tumoral

Treg: células T reguladoras

RESUMO

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos (APCs) que fazem parte de um grupo diversificado de células. DCs são as principais células que apresentam antígenos e ativam linfócitos T virgens e são capazes de produzir diferentes tipos de citocinas que influenciam a geração dos diferentes perfis destes linfócitos. A produção de IL-12p70 favorece a diferenciação para o perfil Th1 e a produção de IL-6 e IL-23 é importante para geração, estabilização e manutenção do perfil Th17. O objetivo deste trabalho foi caracterizar melhor a linhagem celular AP284 como uma DC, a partir de seus marcadores de superfície, expressão de TLRs e a resposta a seus agonistas, produção de IL-12p40, IL-12p70, IL-6 e IL-23 e a capacidade de induzir o perfil Th1 ou Th17. Neste trabalho também foram pesquisadas as principais DCs murinas imortalizadas descritas até o momento comparando as suas principais características. Células AP284 expressam moléculas características de DCs, como MHC classe II, CD11c e 33D1 em sua superfície. Após estímulos com os diferentes agonistas de TLRs, células AP284 produzem uma surpreendente quantidade de IL-12p40 além de IL-6 e IL-23, porém, não produzem IL-12p70. A adição de IFN- γ não foi capaz de induzir a produção de IL-12p70, porém, inibiu a produção de IL-12p40 e IL-23. A linhagem AP284 está relacionada com a geração do perfil Th17 em células de linfonodos de camundongos imunizados com Adjuvante Completo de Freund (CFA). Assim, células AP284 podem ser de grande importância para o estudo dos mecanismos de indução e de regulação da produção da IL-12p40 e IL-23 e uma possível ferramenta para o estudo da geração e manutenção de um perfil de resposta Th17. Além do mais, células AP284 possuem algumas características semelhantes entre as demais DCs murinas imortalizadas, porém a linhagem AP284 produz uma quantidade de IL-12p40 bem mais elevada do que todas as células descritas.

Palavras-chave: Células dendríticas, AP284, IL-12p40, IL-23

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are a diverse group of antigen presenting cells (APCs) able to present antigens to and activate virgin T lymphocytes. Additionally they are able to produce different types of cytokines that favor different profiles of T lymphocyte. The production of IL-12p70 favors the differentiation of Th1 profile and the production of IL-6 and IL-23 is important for generation, stabilization and maintenance of the Th17 profile. The objective of this work was to better characterize the AP284 cell line as a DC, based on their surface markers, TLRs expression and response, production of IL-12p40, IL-12p70, IL-6 and IL-23 and the ability to induce the Th1 or Th17 profile. In this work we also investigated the main immortalized murine DCs described, comparing their main characteristics. AP284 cells express classical DCs molecules such as MHC class II, CD11c and 33D1 on their surface. After stimuli with the different TLR agonists, AP284 cells produce a surprising amount of IL-12p40 in addition to IL-6 and IL-23, but do not produce IL-12p70. Addition of IFN- γ was not able to induce IL-12p70 production, however, it inhibited the production of IL-12p40 and IL-23. The AP284 cell line is related to generation of the Th17 profile in lymph node cells from mice immunized with Freund's Complete Adjuvant (CFA). Thus, AP284 cells may be important to study mechanisms of induction and regulation of IL-12p40 and IL-23 production and a possible tool for the study the generation and maintenance of a Th17 profile. In addition, AP284 cells have some similar characteristics among the other immortalized murine DCs and produces higher amount of IL-12p40 than all other DC described.

Key words: *Dendritic cells, AP284, IL-12p40 and IL-23.*

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Características, funções e diversidade das células dendríticas

As células dendríticas (DCs) foram descobertas em 1973, como uma nova linhagem celular do sistema imune. DCs são células apresentadoras de antígenos (APCs), formada por populações altamente heterogêneas. Possuem características específicas que as diferenciam de monócitos ou macrófagos, como por exemplo, ser células aderentes, possuírem longos prolongamentos em suas membranas, além de maior capacidade fagocítica e estão localizadas em locais estratégicos para melhor capturar micro-organismos (Steinman e Cohn, 1973; Randolph *et al.*, 1999).

Uma das principais funções do sistema imune é de manter o equilíbrio e homeostase dos organismos, sendo que a incapacidade de manter uma resposta imune equilibrada pode contribuir para o desenvolvimento de uma variedade de doenças (Huehn *et al.*, 2009). O sistema imune é filogeneticamente dividido em sistema imune inato e adquirido e DCs evoluíram ao longo do tempo, desempenhando um papel essencial na ligação entre estes dois tipos de imunidade, para que trabalhem juntas e de forma sinérgica (Austyn, 2016).

Importantes funções das DCs vêm sendo gradualmente identificadas, como a sua habilidade na apresentação de antígenos a linfócitos T *naïve* (Zhou e Wu, 2017). Assim, DCs possuem a capacidade de capturar antígenos, migrar para órgãos linfóides periféricos onde estão localizados estes linfócitos T e ativá-los (Heuze *et al.*, 2013).

Esta capacidade de interação de DCs com linfócitos T foi inicialmente demonstrada em um estudo em que DCs isoladas do baço de camundongos foram capazes de induzir uma grande proliferação de linfócitos em uma reação leucocitária mista (MLR), sendo que DCs poderiam ser até 100 vezes mais eficientes para estimular linfócitos T do que outras populações de leucócitos (Steinman e Witmer, 1978).

Observou-se ainda que esta capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T por DCs dependia da interação de moléculas presentes em sua superfície, principalmente da molécula principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) (Steinman *et al.*, 1979). Assim, receptores de antígenos de células TCD4+ (TCR) são capazes de reconhecer peptídeos associados à MHC II presentes em APCs e as principais células responsáveis pela ativação inicial de linfócitos TCD4+ são DCs (Germain, 1981).

As características das DCs foram cada vez mais esclarecidas, sendo denominadas células sentinelas por alguns autores, as quais estão distribuídas em locais estratégicos para melhor capturar antígenos e iniciar a resposta imune adquirida, sendo este processo induzido por agentes infecciosos e produtos inflamatórios (Banchereau e Steinman, 1998).

As primeiras observações morfológicas das DCs mostraram que elas são diferentes de qualquer outra célula sanguínea, pois exibem muitos prolongamentos longos e finos em suas membranas que se espalham em várias direções semelhantes a dendritos de células nervosas (Banchereau e Steinman, 1998). Estudos iniciais sobre a geração de DCs e seus progenitores mostraram que células hematopoiéticas CD34+ dão origem a todas as células sanguíneas incluindo DCs (Maraskovsky *et al.*, 1996).

Com a descoberta das DCs, muitos estudos surgiram com o objetivo de melhor caracterizar esta linhagem celular. A investigação da expressão de marcadores específicos destas células foi intensa e logo foi demonstrado diferenças na expressão desses marcadores nos diferentes estágios de sua maturação, evidenciando que DCs imaturas não expressam alguns marcadores que podem estar presentes em DCs maduras (Steinman, 2012). Assim, DCs podem desempenhar diferentes funções dependendo do seu estado de maturação (Kim *et al.*, 2015). Nos tecidos periféricos elas estão em um estado de repouso e atuam como sentinelas, sendo DCs imaturas (imDC). Diante de uma infecção, elas são capazes de reconhecer e fagocitar micro-organismos. Após a fagocitose, elas migram principalmente para os linfonodos mais próximos e passam a expressar moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86 e produzem diferentes tipos de citocinas, se caracterizando como células maduras (Shortman e Liu, 2002; Shortman e Naik, 2007).

A migração das DCs é dependente da expressão do receptor de quimiocina CCR7, o qual é fundamental para que DCs possam alcançar os vasos linfáticos e consequentemente os órgãos linfóides (Dupasquier *et al.*, 2004; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos apontam que imDCs podem estar relacionadas com a modulação da tolerância imunológica enquanto DCs maduras estão mais relacionadas com ativação de processos inflamatórios (Carreno *et al.*, 2011). Assim DCs maduras tem maior capacidade de produzir importantes citocinas pro-inflamatórias como interleucina 12 (IL-12), IL-6 e IL-1 β (Steinman e Idoyaga, 2010).

Monócitos, DCs e macrófagos têm sido historicamente classificados como pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear com base em suas características

funcionais e fenotípicas, no entanto, como estas células possuem várias diferenças e funções uma classificação definitiva vem sendo um desafio (Guilliams *et al.*, 2014). Diferentes subpopulações de DCs vêm sendo caracterizadas nos últimos anos e são separadas com base em vários critérios, como os seus diferentes marcadores de superfícies, funções e localização (Chopin *et al.*, 2012). Diferentes subpopulações de DCs também podem necessitar de diferentes citocinas e fatores de transcrições para se desenvolverem (Ginhoux e Merad, 2010; Merad *et al.*, 2013)

Monócitos sanguíneos, macrófagos e a maioria das DCs, possuem origem em progenitores derivados de células hematopoiéticas conhecidos como progenitores mielóides comum (CMPs), precursores de granulócitos-macrófagos (GMPs) e progenitores de macrófagos e DCs (MDPs). Na medula óssea, MDPs se diferenciam em monócitos e em precursores comum de DCs (CDPs) (Geissmann *et al.*, 2010)

Até o momento, pelo menos cinco linhagens de DCs têm sido identificadas em camundongos, compreendendo duas populações de DCs clássicas ou convencionais (cDCs), células dendríticas plasmocitóides (pDCs), células de Langerhans na pele (LC), células dendríticas derivadas de monócitos (moDC) e células dendríticas inflamatórias (inf-DC) (Guilliams *et al.*, 2010; Austyn, 2016). As cDCs ainda podem ser classificadas como mielóides ou linfóides, dependendo das células progenitoras das quais se originam.

Dentre as DCs mielóides, encontra-se as DCs dermais, caracterizadas por expressarem MHC II, CD11b, CD11c e CD301 (Dupasquier *et al.*, 2004; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). DCs de origem linfóides comumente expressam MHC II, CD11c e CD11b (Edelson *et al.*, 2010; Chopin *et al.*, 2012) cDCs mielóides ainda podem ser dividida em cDCI e cDCII, podendo também ser classificadas como células migratórias (mDCs) mDCI ou mDCII. Ambas as populações são importantes para a indução da resposta primária de células T e contribuem de forma significativa na regulação da imunidade adaptativa (Jiao *et al.*, 2014).

cDCI necessita dos fatores de transcrições IRF8 e BATF3 para se desenvolver e cDCII necessita principalmente de IRF4. A utilização de técnicas como citometria intracelular utilizando marcadores fluorescentes, confirmam que os fatores de transcrições IRF8^{hi}IRF4^{lo} são característicos de cDCI, sendo elas XCR1^{hi}CD172a^{lo} e mostram que os fatores de transcrições IRF8^{lo}IRF4^{hi} são identificados em cDCII com expressão de XCR1^{lo}CD172a^{hi} (Guilliams *et al.*, 2016)

A Subpopulação de cDCI tem sido descrita como importante na apresentação de antígenos a linfócitos TCD8+, sendo caracterizadas por maior expressão de MHCI. Em

camundongos, cDCI expressam o marcador CD8 em órgãos linfóides secundários e CD103 ou CD207 em tecidos não linfóides (Smith e Kumar, 2008). Estas células também podem reconhecer padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Em humanos, DCI expressam CD36, um receptor para células apoptóticas e em camundongos elas expressam CD205 (DEC-205), um receptor de células apoptóticas e necróticas (Persson *et al.*, 2013).

Diferentemente, a subpopulação cDCII é especializada em apresentar antígenos para linfócios TCD4+. Em humanos e camundongos cDCII expressam CD11b em associação com CD18 e também expressam a molécula CD172 (Guilliams *et al.*, 2016).

De maneira geral, cDCs localizadas em tecidos não linfóides expressam baixos níveis de MHCII em relação a cDCs localizadas em órgãos linfóides secundários. cDCs em tecidos não linfóides podem endocitar ou fagocitar micro-organismos, processá-los e apresentá-los via MHCII, podendo ainda manter os epitópos destes antígenos processados por um tempo considerável mesmo após a eliminação do patógeno (Li *et al.*, 2012).

pDCs são subpopulações especializadas na imunidade contra vírus, pois possuem uma característica específica que é a capacidade de produzir interferon (IFN) do tipo I após estímulos com estes micro-organismo ou seus componentes, sendo estas as principais células produtoras desta citocina após infecção de camundongos com citomegalovírus (Grouard *et al.*, 1997; Asselin-Paturel *et al.*, 2001).

Diferente de cDCs, o desenvolvimento de pDCs requer o fator de transcrição E2-2 e também Flt3L (Swiecki e Colonna, 2015). Um pequeno número de pDCs podem estar presentes nas mucosas, na lâmina própria do intestino, nos pulmões e vias aéreas, porém, parecem estar ausentes em outros tecidos periféricos. Em contrapartida, durante processos patológicos, pDCs podem estar em grande quantidade na pele inflamada e também em melanomas e carcinomas ovarianos e mamários (Austyn, 2016).

Ao contrário de outras subpopulações de DCs, pDCs não expressam o marcador CD11b e podem ser identificadas por expressarem CD317, B220, CD11c, Ly6C (Guilliams *et al.*, 2016). Diferente de cDCs, que o seu precursor sai da medula óssea para se desenvolver na periferia, o desenvolvimento de pDCs é geralmente finalizado na medula óssea (D'amico e Wu, 2003).

cDCs e pDCs compartilham um progenitor comum denominado precursor de macrófago-DC (MDP) identificado pelos seus marcadores de superfícies Lin⁻cKit^{hi} CD115⁺ CX3CR1⁺ Flt3⁺ (Fogg *et al.*, 2006) e estudos mostram que algumas subpopulações de DCs incluindo CD11c⁺ CD8 α ⁻, CD11c⁺ CD8 α ⁺ e também pDCs

podem ter a origem de progenitores de medula óssea, tais como progenitores linfóides comum (CLP) ou progenitores mielóides comum (CMP) (Akashi *et al.*, 2000).

pDcs são importantes tanto para a imunidade inata quanto adquirida, sua capacidade de produzir IFN tipo I de forma rápida durante infecções virais induz um estado antiviral e apoptose de células infectadas. A produção de IFN tipo I, IL-12 e IL-18 por estas células, podem aumentar a ativação de células natural killer (NK) aumentando a produção de interferon gama (IFN- γ). As pDCs expressam MHC I e MHC II e as moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40, o que permite que pDCs possam apresentar antígenos de forma cruzada para linfócitos TCD4+ ou TCD8+ (Swiecki e Colonna, 2015).

LCs foram identificadas pela primeira vez em 1968 e estão localizadas na epiderme, em posição suprabasal e expressam MHC II e CD11c. LCs epidérmicas e células cDCI dérmicas também expressam CD207 (Langerina). LCs requerem os fatores de transcrições ID2 e RUNX3 para se desenvolverem e também dependem do fator de transcrição de crescimento β (TGF- β) (Strobl *et al.*, 1997).

LCs podem desempenhar importantes funções no sistema imune, são capazes, por exemplo, de produzirem IL-22 que induz a proliferação de queratinócitos e auxilia no reparo tecidual. LCs ainda possuem a capacidade de estender suas membranas e capturar antígenos entre queratinócitos (Kubo *et al.*, 2009), exercendo funções clássicas de DCs, como a capacidade de migrar para órgãos linfóides periféricos para apresentação de antígenos (Wilson e Villadangos, 2004; Kissenpfennig *et al.*, 2005).

Outra importante subpopulação de DCs são as moDCs. Estudos iniciais sobre esta população demonstram sua presença em áreas de células T nos linfonodos, onde são caracterizadas por expressarem MHC II, DC86 e MIDC-8, com pouca ou nenhuma expressão de CD11c e podendo ou não expressar DEC-205. Estas moDCs demonstram maior capacidade fagocítica que as demais DCs de tecidos periféricos (Randolph *et al.*, 1999).

moDCs podem ser particularmente importantes para mediarem repostas efectoras de linfócitos T, especialmente linfócitos TCD4+ (Jakubzick *et al.*, 2013). Monócitos também podem migrar do sangue para os tecidos durante uma infecção e podem se diferenciar em infDCs (Serbina *et al.*, 2008) que expressam MHC II, CD11b, CD11c, DC-SIGN, CD107b (MAC-3) e Ly6C^{low} (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010; Belz e Nutt, 2012).

Atualmente há um grande impasse entre pesquisadores sobre ser possível definir DCs de forma isolada de macrófagos, ou se elas apenas são macrófagos com algumas especializações e se podem ser ou não incluídas de forma separada no sistema fagocítico mononuclear. Todas as DCs parecem ser essenciais tanto para imunidade inata e adaptativa, mas nenhuma de forma isolada parece ser totalmente suficiente (Austyn, 2016).

Além da complexidade e heterogeneidade das DCs, há grandes desafios técnicos para o avanço das pesquisas com esta linhagem. Como, por exemplo, a escassez de DCs naturais para estudos *in vivo*, o que limita o estudo destas células. No entanto, em modelos murinos, DCs derivadas de medula óssea (BMDC) ainda têm sido amplamente utilizadas para estudar os seus papéis, onde estas células são diferenciadas pelo tratamento com fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). (Inaba *et al.* 2009).

Muitas dificuldades ainda são encontradas para uma classificação clara das DCs, porém os estudos sobre estas células vêm aumentando ao longo dos anos, devido ao seu papel fundamental na ativação da imunidade adquirida. Portanto, um melhor entendimento sobre a ação destas células poderá auxiliar na compreensão de mecanismos de vacinas, geração de tolerância a transplantes ou de doenças autoimunes. Além disso, novas técnicas baseadas na manipulação das DCs tem sido uma poderosa ferramenta para induzir uma resposta imune protetora também contra tumores (Morel e Turner, 2010; Palucka e Banchereau, 2012; Steinman, 2012).

1.2. Receptores semelhantes à Toll (TLRs) e expressão em DCs

Todos os animais superiores estão associados a uma ampla variedade de micro-organismos patogênicos ou não patogênicos, como bactérias, vírus, fungos e protozoários. Muitos destes micro-organismos estão presentes na superfície mucosa do hospedeiro. Assim, é fundamental um equilíbrio entre o hospedeiro e sua microbiota, bem como uma proteção adequada contra a invasão de micróbios patogênicos (Sommer & Backhed 2013).

É essencial que o sistema imune tenha a capacidade de distinguir entre micro-organismos comensais e patogênicos, assim, células do sistema imunológico desenvolveram uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs),

como os *Toll-like receptors* (TLRs) (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004; Sommer e Backhed, 2013), que são expressos principalmente por DCs (Uematsu *et al.*, 2006).

A descoberta dos TLRs demonstrou que o reconhecimento de patógenos pelo sistema imune inato é específico e que organismos multicelulares evoluíram para reconhecer micro-organismos estranhos a partir de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Akira *et al.*, 2001; Janeway e Medzhitov, 2002).

TLRs são moléculas conservadas durante a evolução das espécies e identificadas em vertebrados como homólogos da proteína Toll encontrados em *Drosophila melanogaste*. Foi verificado que Toll estimulava a produção de proteínas antimicrobianas e desempenhavam importante papel na determinação da resistência destes insetos quando infectados por fungos ou bactérias Gram-positivas (Lemaitre *et al.*, 1996).

TLRs são proteínas transmembranas do tipo I com domínios contendo repetições ricas em leucina que medeiam o reconhecimento de PAMPs. Possuem um motivo citoplasmático com domínio homólogo de sinalização do receptor de IL-1, denominado Toll/IL-1R (TIR) importante para a transdução de sinais intracelular (Akira *et al.*, 2006).

TLRs podem reconhecer uma variedade de PAMPs, como por exemplo, lipídios, carboidratos, peptídeos e ácidos nucleicos (Hemmi *et al.*, 2003). Vários eventos realizados por DCs, como a migração para os órgãos periféricos e a apresentação de antígenos a linfócitos T, ocorrem após o reconhecimento dos PAMPs através de PRRs em especial os TLRs (Iwasaki e Medzhitov, 2004).

Diversos organismos expressam uma variedade de TLRs, principalmente mamíferos, sendo que 13 tipos de TLRs já foram identificados. TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 e TLR9 são conservados tanto em camundongos e seres humanos, porém TLR10 em camundongos não é funcional. TLR11, TLR12 e TLR13 não estão presentes em humanos (Kawai e Akira, 2010; Celhar *et al.*, 2012).

Estes TLRs apresentam localizações diferentes, por exemplo, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 são expressos na superfície celular e TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13 estão presentes no endossomo celular. Estudos em camundongos deficientes de TLRs demonstram que cada um destes receptores desempenha funções distintas em relação ao reconhecimento de diferentes PAMPs (Celhar *et al.*, 2012; Satoh e Akira, 2016).

TLR4 foi o primeiro a ser descrito, identificado com a capacidade de responder a lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana exterior de bactérias Gram-negativas. Juntamente com MD2, TLR4 forma um complexo na superfície celular que funciona

como principal componente para ligação com LPS. Outras proteínas como a proteína de ligação de LPS (LBP) e CD14 estão envolvidas no reconhecimento de LPS (Akashi-Takamura e Miyake, 2008). LBP é uma proteína plasmática que se liga ao LPS solúvel contribuindo para formação do complexo TLR4-MD2. TLR4 também é capaz de reconhecer proteínas do vírus respiratório sincicial, proteínas de fusão do envelope do vírus de tumor mamário de camundongos e *Streptococcus* (Akira *et al.*, 2006).

TLR2 pode reconhecer uma variedade de PAMPs, incluindo lipopeptídeos, peptidoglicano e ácido lipoteicóico de bactérias Gram-positivas ou zymosam derivado de fungos. TLR2 comumente forma heterodímeros como TLR2-TLR1 que podem reconhecer lipopeptídeos triacilados de bactérias Gram-negativas (Jin *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009).

TLR2 pode ser expresso em cDCs tanto de camundongos e humanos e agonistas deste receptor tem mostrado um grande potencial como adjuvantes, aumentando a eficácia de cDCs (Cohn e Delamarre, 2014). Estudos recentes mostram que tanto TLR2 e TLR4 são importantes no combate da infecção por *Brucella microti*, onde camundongos deficientes nestes receptores possuem dificuldades para combater esta bactéria (Arias *et al.*, 2016).

TLR3 possui a capacidade de reconhecer moléculas presentes em vírus, como, por exemplo, o RNA de rinovírus, vírus sincicial respiratório, vírus da encefalomiocardite e vírus do Nilo Ocidental (Akira *et al.*, 2006; Kawai e Akira, 2008). As respostas imunes antivirais desencadeadas por TLR3 é promovida principalmente pela produção de IFN tipo I e citocinas inflamatórias, onde os estudos mostram que camundongos deficientes de TLR3 são mais suscetíveis a infecções com citomegalovírus. Além disso, humanos com deficiência deste receptor possuem uma maior suscetibilidade ao vírus herpes simplex 1 (Tabeta *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007).

TLR5 é eficiente no reconhecimento de flagelina bacteriana e é altamente expresso em DCs CD11c+CD11b+ na lâmina própria do intestino de camundongos. Estas células foram capazes de detectar *Salmonella typhimurium* e de produzirem citocinas pró-inflamatórias após a infecção dependente da expressão de TLR5. (Uematsu *et al.*, 2006).

TLR7 é expresso principalmente por pDC e reconhecem RNA de dupla fita (dsRNA) derivado de vários vírus. Em cDCs, este receptor reconhece RNA de *Streptococcus* do grupo B e está envolvido na produção de IFN tipo I (Mancuso *et al.*, 2009). TLR7 e TLR8 são filogeneticamente semelhantes ao TLR7. Aparentemente,

TLR8 é mais expresso em humanos e pode reconhecer ssRNA viral e TLR7 é mais expresso em camundongos (Akira *et al.*, 2006; Kawai e Akira, 2008).

TLR9 reconhece os motivos de CpG de DNA bacterianos e virais não metilados e também são capazes de reconhecer hemozoina de cristal insolúvel de *Plasmodium falciparum* durante o processo de desintoxicação (Coban *et al.*, 2010). CpG sintético é utilizado como agonista deste receptor e pode ativar tanto DCs, macrófagos ou células B. pDCs também possuem uma alta expressão deste receptor, o que auxilia no reconhecimento de DNA de citomegalovírus murino, HSV-1 e HSV-2 (Akira *et al.*, 2006; Kawai e Akira, 2008).

TLR11 é expresso em células presentes no rim e bexiga, onde são importantes para reconhecer componentes de bactérias uropatogênicas como flagelina ou constituintes de *Escherichia coli*. Camundongos deficientes deste receptor são mais suscetíveis a infecções por estas bactérias. TLR11 também é caracterizado por reconhecer profilina derivado de *Toxoplasma gondii*. TLR12 é predominantemente expresso em células mielóides e é muito semelhante ao TLR11, podendo também reconhecer profilina de *T. gondii* (Yarovinsky *et al.*, 2005).

TLR13 é importante para o reconhecimento de uma longa sequência de nucleotídeos bacterianos 23S rRNA em modelos murinos (Oldenburg *et al.*, 2012). TLR13 está localizado no endossomo de forma semelhante aos TLR7 e TLR9 e seus ligantes permaneceram por muito tempo desconhecidos. Assim como os demais TLRs intracelulares, TLR13 necessita da proteína Unc93b1 para transportá-lo do retículo endoplasmático para o endossomo, tornando-o funcional. Estudos mostram que a deleção de Unc93b1 impossibilita a resposta de TLRs intracelular, incluindo TLR13 (Lee *et al.*, 2013). Estudos mais recentes mostraram que TLR13 é importante para o reconhecimento de rRNA de *Streptococcus pyogenes* em BMDCs e cDCs e que seu reconhecimento é no endossomo e dependente da fagocitose (Fieber *et al.*, 2015).

mDCs expressam TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6 e TLR8 e alguns estudos relatam a presença de TLR7 tanto em pDCs e mDCs (Ito *et al.*, 2002). TLR4 é pouco expresso em DCs do baço, porém é frequentemente expresso em DCs CD11c+CD11b+ derivadas da medula óssea de camundongos (Boonstra *et al.*, 2003). DCs obtidas de paciente com artrite reumatoide expressam TLR3, TLR2, TLR4 e TLR7 e a ligação a estes receptores promovem a maturação dessas células e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-6 (Roelofs *et al.*, 2005).

Após a ligação de PAMPs a TLRs, várias moléculas adaptadoras são ativadas. MyD88, IRAK4 e IRAK2 são críticos mediadores nas sinalizações via TLRs, pois ativam uma cascata de sinalizações, levando a produção de vários mediadores inflamatórios, como IFNs, quimiocinas e outras proteínas (Lin *et al.*, 2010). Muitos avanços têm ocorrido para a melhor compreensão dos papéis dos TLRs devido a grande importância desses receptores no reconhecimento de patógenos e na defesa do hospedeiro e há evidências de que as sinalizações de PRRs citosólicos em células não imunes também tem um papel para promover a maturação de DCs e subsequente ativação de células T específicas. Desta forma, o uso de PAMPs ou agonistas de TLRs que possam estimular tanto células imunes ou não imunes pode ser uma ferramenta muito útil para o estudo de adjuvantes e vacinas (Kawai e Akira, 2010).

1.3. Produção de citocinas por DCs e sua influência na indução dos diferentes perfis de linfócitos TC4+ auxiliares (Th)

Citocinas são proteínas moduladoras da resposta imune, envolvidas na homeostase e regulação das respostas inflamatórias, promovendo o controle de patógenos e também estão envolvidas nos mecanismos de tolerância. Mais de 100 citocinas já foram descritas (McLaren *et al.*, 2011). Quando são produzidas no local da entrada de algum patógeno, citocinas inflamatórias, por exemplo, regulam a capacidade de fagócitos residentes ou recrutados para destruir o agente infeccioso. As citocinas também regulam a apresentação de antígenos feita pelas DCs para linfócitos em órgãos linfóides secundários (Chabalgoity *et al.*, 2007).

Os diferentes tipos de células TCD4+ auxiliares (Th) contribuem para a proteção de uma variedade de patógenos em diferentes tecidos e adquirem funções efetoras distintas de acordo com a sua diferenciação. As citocinas produzidas por DCs durante a apresentação de antígenos aos linfócitos são fundamentais no processo de diferenciação de células Th (Germain *et al.*, 2012).

A definição de cada tipo de linfócito Th é baseada nos tipos de citocinas de assinatura produzidas por estas células e em seus fatores de transcrições específicos (Sallusto, 2016). Atualmente, há pelo menos quatro subpopulações de células Th bem definidos, sendo Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Treg). (Yamane e Paul, 2013). Outros perfis de células Th também vêm sendo descritos, como o perfil Th9 (Dardalhon

et al., 2008), o perfil Th22 (Eyerich *et al.*, 2009), células T foliculares (Tfh) (Ramiscal e Vinuesa, 2013), entre outros.

A IL-12 e IFN- γ são as principais citocinas que induzem a sinalização para a diferenciação de linfócitos Th1 e os fatores de transcrição T-bet, STAT1 e STAT4 são necessários para geração desta subpopulação celular. A IL-12 é secretada em grande quantidade por APCs, principalmente DCs após a sua ativação via PAMPs que irá induzir as células natural Killer (NK) a produzir IFN- γ importante para iniciar a geração deste perfil de linfócitos (Yamane e Paul, 2013).

IFN- γ promove a expressão de T-bet que é o fator de transcrição responsável pela indução de linfócitos Th1 (Szabo *et al.*, 2000). T-bet possui a capacidade de promover um aumento da expressão do receptor de IL-12 nestes linfócitos, fazendo com que estas células se tornem mais responsivas a esta citocina (Usui *et al.*, 2006). O perfil Th1 é importante para a eliminação de patógenos intracelulares, onde IFN- γ é fundamental para a ativação de fagócitos, principalmente macrófagos, resultando em um aumento de sua atividade microbicida (Luckheeram *et al.*, 2012; Oestreich e Weinmann, 2012).

O perfil de linfócitos Th2 é caracterizado pela produção de IL-4, IL-5, IL-9, e IL-13, sendo a IL-4 a citocina de assinatura deste perfil e também a principal citocina para diferenciação de linfócitos T virgens em Th2 (Goswami e Kaplan, 2011). Muitos distúrbios alérgicos estão relacionados ao perfil Th2, onde as citocinas deste perfil participam, por exemplo, dos eventos associados à asma incluindo a ativação de eosinófilos e indução da produção de anticorpos do isotipo IgE (Holgate, 2012). A resposta Th2 também é relevante contra infecções helmínticas, controle da inflamação e expulsão de vermes (Gause *et al.*, 2013).

O principal fator de transcrição envolvido na diferenciação do perfil Th2 é STAT6 que é induzido por IL4 e regula a expressão de GATA3 (Zhu *et al.*, 2001). Quando GATA3 é ativado ocorre a inibição da diferenciação do perfil Th1 e estudos relatam que camundongos deficientes em GATA3 possuem maior facilidade em desenvolver resposta do tipo Th1 (Zhu *et al.*, 2006).

A subpopulação Th17 é induzido sobre a influência das citocinas TGF- β , IL-1 e IL-6, produzidas principalmente por DCs. As citocinas IL-21 e IL-23 desempenham as funções de amplificação e manutenção deste perfil de resposta respectivamente (Bettelli *et al.*, 2006). O fator de transcrição ROR γ t é crítico para a diferenciação deste perfil e as principais citocinas produzidas por linfócitos Th17 são IL17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Estas citocinas possuem a capacidade de agir em células imunes inatas e células

epiteliais, aumentando a produção de CXCL8, que induz o recrutamento de neutrófilos para o tecido (Bettelli *et al.*, 2006).

Células Th17 também induzem a produção de GM-CSF que promove a proliferação de granulócitos e monócitos na medula óssea. A IL-22 ainda pode atuar sobre células epiteliais e de tecidos de barreira, como intestino, pulmões e pele, melhorando a defesa antimicrobiana nestes locais (Weaver *et al.*, 2013).

As células Tregs naturais são identificadas por expressarem FoxP3+CD25+, podendo se desenvolver no timo. Nos tecidos periféricos são geradas as Tregs induzidas onde TGF- β e IL-10 são importantes para a diferenciação deste perfil. Tregs são importantes para a manutenção e auto tolerância do sistema imune regulando e controlando as respostas desencadeadas. Um desequilíbrio destas células pode gerar uma variedade de doenças autoimunes e danos teciduais (Sakaguchi *et al.*, 2008).

Tregs são importantes, por exemplo, para suprimir a proliferação e as funções de células efectoras, onde a deficiência nesta população pode induzir o desenvolvimento espontâneo de doenças autoimunes (Gratz e Campbell, 2014; De Rosa *et al.*, 2017). Os mecanismos de supressão mediados por Tregs inclui uma variedade de moléculas, como a proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos CTLA-4, gene de ativação de linfócitos 3 (LAG3) e também pela produção das citocinas IL-10, TGF- β e IL-35 (Tanaka e Sakaguchi, 2017).

DCs ou seus progenitores devem se diferenciar para que sejam capazes de induzir cada um desses tipos de respostas de células Th, ou para que sejam capazes de induzir tolerância de cada uma delas. Esta capacidade desempenhada pelas DCs, dependerá não apenas do tipo de micro-organismo presente em uma infecção, mas também do local onde a infecção está ocorrendo e do seu hospedeiro (Trinchieri, 2012).

1.4. A família IL-12

Entre as inúmeras citocinas que já foram descritas até o momento, a família da IL-12 possui características únicas. Esta família agrupa citocinas heterodiméricas, que apesar de possuírem semelhanças estruturais, possuem atividades biológicas diferentes e singulares (Collison e Vignali, 2008). As citocinas da família IL-12 são produzidas principalmente por DCs mielóides e macrófagos durante respostas a agentes infecciosos (Vignali e Kuchroo, 2012).

A IL-12 foi descrita no ano de 1989 com o nome de “*natural killer stimulator factor-NKSF*”, mas posteriormente foi chamada apenas de IL-12. Foi visto que diferente das outras citocinas, para que a estrutura molecular da IL-12 fosse formada era necessária a combinação de duas cadeias, a p40 e a p35 (Trinchieri *et al.*, 2003).

Estudos posteriores mostraram que outras citocinas compartilhavam as mesmas cadeias da IL-12, originando assim a família IL-12, cuja citocinas IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35 fazem parte e utilizam uma das combinações das cadeias α p19, p28 e p35 com uma das cadeias β p40 ou Ebi3 para se tornarem biologicamente ativas (Vignali e Kuchroo, 2012).

A subunidade p40 pode se combinar com a subunidade p35 para formar a IL-12p70 ativa ou ainda se combinar com a cadeia p19 para formar a IL-23 ativa. A subunidade Ebi3 pode se combinar com a cadeia p28 formando a IL-27 ativa ou ainda se combinar com a cadeia p35 para formar a IL-35 ativa (Vignali e Kuchroo, 2012) (Figura 1).

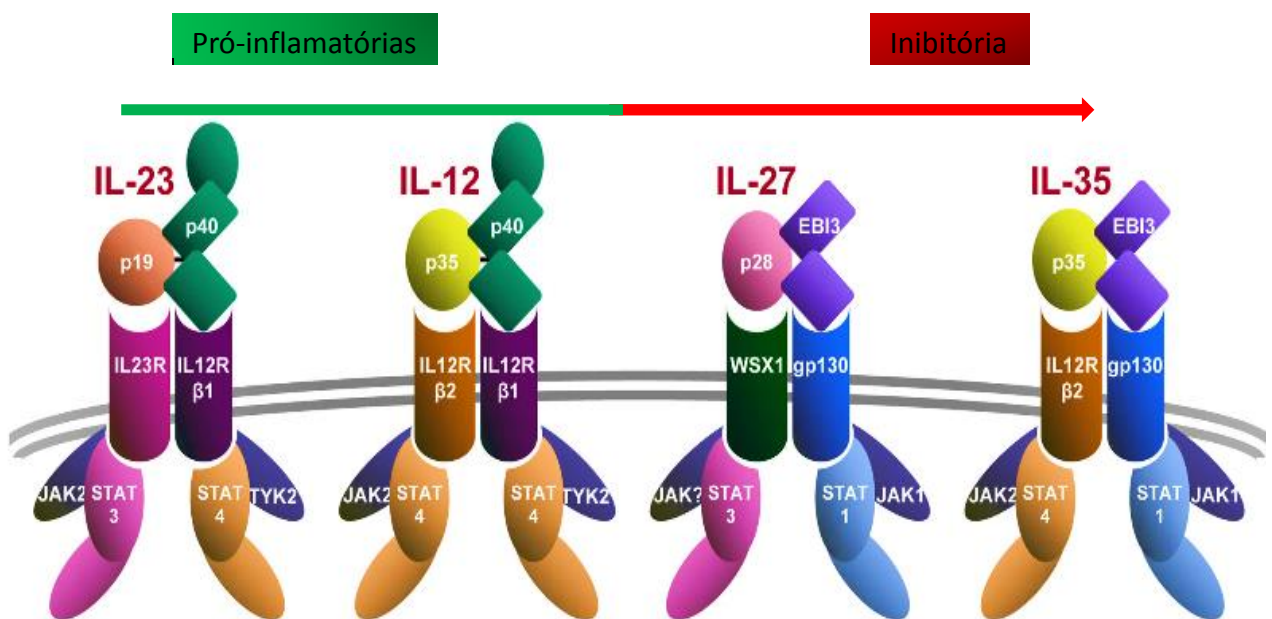


Figura 1: Subunidades compartilhadas pelas citocinas da família IL-12 (Modificado de Vignali & Kuchroo..2012).

A IL-12 e a IL-23 são citocinas pró-inflamatórias e participam de forma significativa na indução e manutenção dos perfis de resposta Th1 e Th17 respectivamente (Langrish *et al.*, 2004; Trinchieri, 2012). Uma das principais funções da IL-12p70 é a de induzir a produção de IFN- γ , que, durante a resposta imune inata é produzida por células

NK e posteriormente por linfócitos Th1 ou linfócitos T citotóxicos (LTc) (Trinchieri, 2012).

A IL-12p70 secretada por DCs também é capaz de aumentar a citotoxicidade das células NK contra células alvo e, além disso, esta comunicação entre DCs e células NK, pode promover a regulação positiva de moléculas co-estimuladoras tais como CD86 em DCs (Mailliard *et al.*, 2003). A subunidade p40 da IL-12 é geralmente secretada em quantidades de 10 a 1000 vezes mais elevadas que o heterodímero p70 (Oliveira *et al.*, 2003; Trinchieri *et al.*, 2003).

A IL-23, semelhante a IL-12p70 é secretada de forma predominante por fagócitos como macrófagos e principalmente DCs ativadas, sendo purificada em sua forma natural como um heterodímero a partir de DCs do sangue periférico de humanos e camundongo (Parham *et al.*, 2002). Tanto em DCs de camundongos quanto de humanos, foi visto uma atividade biológica semelhante da IL-23 que é diferente da IL-12p70 (Tang *et al.*, 2012).

Inicialmente, a IL-23 foi descrita como importante para induzir um perfil de resposta Th17 e na atuação do desenvolvimento e manutenção da inflamação de algumas doenças autoimunes, como colite, psoríase e artrite (Oppmann *et al.*, 2000; Bettelli *et al.*, 2006). Porém, estudos posteriores relataram que as citocinas do perfil Th17 têm uma importante participação na resposta imune contra fungos e bactérias extras e intracelulares e que a IL-23 não é essencial para geração de Th17, mas para a expansão e manutenção deste perfil (Khader e Gopal, 2010; Espinosa e Rivera, 2012).

A utilização de anticorpos específicos para subunidade p19 evidencia a importância da IL-23 na manutenção do perfil Th17, onde o bloqueio da ligação da subunidade ao seu receptor em células THP-1 humanas induzem a supressão de células Th17 (Krizova *et al.*, 2017). A IL-23, também foi identificada como importante na iniciação de alguns tumores e de seu crescimento, sugerindo que, em alguns casos, a sua supressão poderia ter um elevado valor terapêutico não só em doenças autoimunes, mas também para o tratamento do câncer (Yao *et al.*, 2014).

Muitos agentes patogênicos e agonistas de TLRs, como LPS, CpG e PolyI:C podem induzir o aumento da expressão das subunidades p40, p35 e p19, que consequentemente induzirá a maior produção de IL-12p70 ou IL-23. A produção dessas citocinas ainda pode ser aumentada por DCs devido a interação de moléculas co-estimuladoras como CD40/ CD40L (Kastelein *et al.*, 2007).

Devido aos importantes papéis destas citocinas principalmente IL-12 e IL-23 na indução do perfil Th1 ou manutenção do perfil Th17 respectivamente, elas podem ser

importantes alvos de várias pesquisas para o controle de doenças inflamatória, infecções ou doenças autoimunes (Macdonald *et al.*, 2016). Assim, um melhor entendimento dos mecanismos que induzem a produção destas citocinas poderá ser útil para propor mecanismos para induzir ou controlar essas respostas.

1.5. Agonistas de TLRs e produção de IL-12 e IL-23

A ativação de TLRs com agonistas sintéticos pode auxiliar em uma resposta imune celular eficaz contra vários patógenos (Goff *et al.*, 2015). Além disso, a ativação de TLRs em fagócitos como macrófagos e DCs constitui uma estratégia terapêutica eficiente na imunidade anticancerígena (Maisonneuve *et al.*, 2014). O novo agonista para TLR2 SUP3 melhora a ativação de linfócitos T *in vivo* por aumentar a apresentação cruzada por DCs. Este agonista também foi capaz de induzir a maturação de DCs e aumentar a sua capacidade de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Guo *et al.*, 2017).

O agonista quimérico PamadiFect pode ativar tanto TLR2 e TLR7 e induzir a maturação de moDCs que é visto pela maior expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e também pode induzir a produção de IL-12 através da via de sinalização MyD88 (Gutjahr *et al.*, 2017). O ácido polinosínico-policitidílico (PIC), agonista de TLR3, induz a resistência contra o vírus HSV-2 em camudongos tratados 24 h antes de serem infectados com vírus (Herbst-Kralovetz e Pyles, 2006). Resultados similares foram vistos após a utilização de resiquimod ou CpG, agonistas de TLR7/8 e TLR9 respectivamente (Ashkar *et al.*, 2004).

Monócitos e moDCs de pacientes alérgicos estimulados com Pam3CSK4 agonista de TLR1/2, FSL-1 agonistas de TLR2/6 monophosphoril lipídio (MPL)-A, LPS e flagelina induz a maior expressão de moléculas CD80, CD86, CD40 em moDCs, induzem a expressão da quimiocina CCR7 e também aumentam a produção de IL-12p70 e IL-23 principalmente após o estímulo com flagelina (Deifl *et al.*, 2014).

Resiquimod também induz o aumento da subunidade IL12p35 em DCs após primagem com IFN- γ além do aumento da produção de IL-23. Agonistas como LTA, LPS e poly(I:C) também são capazes de induzir IL-23 por DCs, porém é necessário a utilização destes agonistas em conjunto ou a primagem com IFN- γ para que ocorra a produção de IL12p70. Neste mesmo estudo é evidenciado que DCs mudam o seu aspecto

morfológico, aumentando o seus dendritos após estímulo com resiquimod ou LPS (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Roses *et al.*, 2008).

Pam3cys tem sido utilizado para avaliar a função de TLR2-TLR6 e foi visto que Pam3cys possui a capacidade de induzir a produção de IL-12p70 e IL-23 em diferentes populações de fagócitos murinos (Dillon *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2008).

Apesar da ativação de TLRs por Pam3cys induzir o aumento destas citocinas, a utilização deste agonista diminui a produção de IL-12p70 induzida por bactérias íntegras ou por ligantes de outros TLRs em DCs de camundongos (Dillon *et al.*, 2004; Barkman *et al.*, 2008; Vanhoutte *et al.*, 2008).

A deficiência de TLR2 está associada a uma inibição de IL-12, quando comparados com células de animais selvagens após infecção com *Staphylococcus sp* (Kielian *et al.*, 2005; Holley *et al.*, 2012). A produção desta citocina após estímulos com antígenos de alguns patógenos é prejudicada na ausência de TLR2, onde é visto que antígenos de *Schistosoma japonicum*, são incapazes de induzir IL-12p70 em DCs de camundongos deficientes de TLR2 (Gao *et al.*, 2012).

TLR2/9 são importantes para o reconhecimento de *Mycobacterium tuberculosis*, onde camundongos desprovidos destes receptores mostram maior susceptibilidade a infecção e diminuem a produção de IL-12 (Bafica *et al.*, 2005). E DCs a partir de camundongos deficientes de TLR2 também mostram uma redução na capacidade de responder ao estímulo T. e consequente redução de IL-12p40, sendo que uma boa resposta imune após estímulos com BCG também se mostra dependente de TLR2/4/9 (Von Meyenn *et al.*, 2006).

A proteína de ligação a maltose de *E.coli* (MBP) pode estimular a resposta imune em modelos murinos através da ativação de TLR4 em DCs, assim como possuem a capacidade de ativar a via de sinalização NF- κ B (Fernandez *et al.*, 2007). MBP também é capaz de ativar TLR2/4 em macrófagos e induzir uma resposta Th1. Outros estudos relatam a capacidade de MBP mais BCG ativaram de forma sinérgica TLR2/4/9 também levando a uma resposta Th1 (Wang *et al.*, 2015), e que TLR2 é responsável pela maturação de DCs após estes estímulos, onde DCs de camundongos deficientes de TLR2 não expressam aumento das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 ou maior expressão de MHC II, e MBP mais BCG induz aumento da produção de IL-12p40 em camundongos que expressam TLR4 (Jiang *et al.*, 2017). Estudos sugerem que para uma ótima produção de IL-12p70 e IL-23 deve haver uma ativação sinérgica entre diferentes ligantes de TLRs (Trinchieri *et al.*, 2003; Napolitani *et al.*, 2005) e células do sistema

imune principalmente DCs interagem com PAMPs a partir de seus receptores e podem induzir uma diversidade de sinalizações. Essas interações vem sendo cada vez mais estudadas ao longo dos anos, porque promovem a produção de diferentes citocinas e interferem com a geração dos diferentes perfis de resposta imune. Portanto, uma melhor compreensão dessas interações são necessárias.

1.6. Geração de DCs *in vitro*

Embora as DCs sejam amplamente distribuídas em diferentes tecidos e órgãos, o número de DCs obtidas por diferentes protocolos é limitado para o seu estudo, o que dificulta as pesquisas sobre a biologia destas células e suas aplicações clínicas (Guo *et al.*, 2016). Diferentes fontes têm sido utilizadas para obtenção de DCs humanas ou de camundongos. A forma mais comum utilizada é através do estímulo com GM-CSF, onde DCs podem ser derivadas a partir de células da medula óssea (Chopin *et al.*, 2012).

Procedimentos utilizando outros estímulos foram relatados para a obtenção de DCs (Guo *et al.*, 2016). Subpopulações de DCs também podem ser geradas a partir da adição de Flt3L em cultura gerando células CD24⁺CD8⁺ ou CD172⁺CD8⁻, as quais adquirem perfis equivalentes a cDCs encontradas no baço de camundongos (Naik *et al.*, 2005). Outros estudos relatam que DCs CD103⁺ podem ser geradas a partir da adição de Flt3L e GM-CSF. Para isto, células de medula de camundongos são cultivadas com estes estímulos por 9 dias e posteriormente as células não aderentes são isoladas e cultivadas novamente por 6 a 7 dias nas mesmas condições (Mayer *et al.*, 2014).

O cultivo de células de medula de camundongos ou monócitos do sangue periférico com GM-CSF e IL-4 pode dar origem a DCs inflamatórias ou moDCs. Estas células expressam CD11c e moléculas de MHC, sendo que MHC são mais expressos por estas células em relação as células estimuladas apenas com GM-CSF (Labeur *et al.*, 1999; Leon *et al.*, 2004).

Todos estes métodos podem fornecer grandes quantidades de DCs *in vitro*, contudo há a grande desvantagem da necessidade de repetidas eutanásias de camundongos ou de grandes quantidades de amostras de sangue humano (Fuertes Marraco *et al.* 2012). Além disso, culturas geradas a partir de GM-CSF são heterogêneas, podendo ter a presença de granulócitos e macrófagos, além de DCs (Inaba *et al.*, 1992), sendo necessária uma seleção mais minuciosa destes grupos celulares, para obtenção de

uma cultura mais homogênea como, por exemplo, a separação magnética das células por seus marcadores específicos (Shalek *et al.*, 2013).

Estudos recentes relatam a heterogeneidade de BMDCs derivadas com GM-CSF, onde pode ser encontradas DCs CD11c+MHC+ com perfil maduro, que expressam moléculas co-estimulatórias ou macrófagos CD11c+CD11b+MHC+ com características de células imaturas. Nestas culturas observa-se a expressão de CD135, CCR7, CD107 característicos de DCs e CD64, CD115 e CD14, marcadores característicos de macrófagos (Helft *et al.*, 2015).

Assim, a utilização GM-CSF para gerar DCs *in vitro* é trabalhosa (Fuertes Marraco et al. 2012) e pode ter a necessidade de se realizar uma melhor separação de DCs nessas culturas (Helft *et al.*, 2015). Mesmo que DCs geradas a partir progenitores de medula forneça uma quantidade razoável de células, BMDCs são células de vida curta, sem capacidade proliferativa e o seu isolamento ainda pode alterar o seu estado de maturação (Liu e Malissen, 2016)

A utilização de linhagens de DCs imortalizadas traz vantagens em relação à DCs geradas a partir desses estímulos (Fuertes Marraco et al. 2012), não havendo a necessidade de repetidas eutanásia de camundongos, além da garantia de uma linhagem de DCs mais homogênea e ainda a obtenção de células em quantidade indefinida.

1.7. Linhagens de DCs imortalizadas e células AP284

As linhagens de DCs imortalizadas foram obtidas de diferentes em diferentes linhagens de camundongos. As principais formas utilizadas para a indução de um perfil de DC imortalizado é através da utilização de oncogenes retrovirais, fatores de crescimento e isolamento a partir de tumores murinos. Esta última forma traz alguns benefícios sobre as demais, pois estas células possuem um perfil proliferativo e são mais fáceis de serem cultivadas, pois não necessitam de nenhum tipo de fator de crescimento, sendo assim uma forma mais econômica de cultivo (Hargadon, 2016).

A partir de 1993 deu início os primeiros estudos sobre a geração de DCs murinas imortalizadas (Paglia, Girolomoni et al. 1993). A linhagem CB1 foi a primeira DC imortalizada descrita obtida com a inserção de retrovírus recombinante (Paglia, Girolomoni et al. 1993). Com esta mesma técnica foi gerada a linhagem D2SC/1 isolada de camundongos BALB/c (Granucci, Girolomoni et al. 1994); a linhagem FSDC obtidas de camundongos após o cruzamento entre C57Bl/6 x DBA/2 Fl (Girolomoni, Lutz et al.

1995) e a linhagem tsDC, obtida de camundongo transgênico com inserção do gene da oncoproteína termo sensível do vírus de símios 40 (SV40) (Volkman, Neefjes et al. 1996).

Outras linhagens, como a linhagem DC2.4, uma das mais bem caracterizadas entre as DCs murinas, (Shen, Reznikoff et al. 1997, Hargadon 2016) a D1 (Winzler, Rovere et al. 1997) e a linhagem JAWSII (Jiang, Shen et al. 2008) dependentem de fatores de crescimento.

Dentre as isoladas de tumores, destacam-se a linhagem CY15 de um histiocitoma de camundongos C57BL/6 (Kammertoens, Willebrand et al. 2005) e a linhagem mutuDC isolada de camundongos C57BL/6 transgênicos para SV40LT a partir de um tumor do baço (Fuertes Marraco, Grosjean et al. 2012). A linhagem AP284 também é uma linhagem de origem tumoral isolada a partir de um tumor espontâneo do baço de um camundongo macho (F1: C57bL/6 X CBA-H2^{b/q}) (Klasen *et al.*, 1988), descritas inicialmente como macrófagos maduros expressando CD11b, CD107b, MAC-2, FCYRII, e MHCII. Como estas células foram capazes de capturar antígenos e apresentá-los a clones de linfócitos T reativos a albumina bovina (Klasen *et al.*, 1988) sugeriu-se que estas podiam ser células dendríticas.

2. JUSTIFICATIVA

As DCs são APCs essenciais para a ativação da imunidade adquirida. DCs possuem a capacidade de reconhecer uma variedade de moléculas microbianas principalmente através de receptores como TLRs e apresentar esses micróbios a linfócitos T naives, fazendo assim uma ponte entre a imunidade inata e a adquirida (Steinman, 2012). As diferentes citocinas produzidas por DCs durante o reconhecimento de microorganismos favorece a diferenciação dos perfis de linfócitos T auxiliares (Germain *et al.*, 2012).

As citocinas da família IL-12 produzidas por DCs, como IL-12p70 e IL-23 são fundamentais para a geração do perfil de resposta Th1 e manutenção do perfil Th17 respectivamente. O perfil Th1 é importante para combater patógenos intracelulares e o Th17 está relacionado com o controle de bactérias e fungos extracelulares, além destes dois perfis estarem relacionados com algumas doenças autoimunes (Espinosa e Rivera, 2012) Assim, torna-se crucial o entendimento dos mecanismos que geram estes perfis de resposta nas diferentes doenças.

Muitas fontes de DCs são utilizadas para o estudo da interação destas com patógenos e linfócitos T. A forma mais comum de obtê-las é através da derivação de células tronco de medula óssea estimuladas com GM-CSF (Belz e Nutt, 2012). Porém, além das culturas de células derivadas por GM-CSF serem heterogêneas, GM-CSF pode influenciar na maturação de DCs e ainda induzir a produção de citocinas como IL-12p40, podendo interferir na conclusão de alguns resultados (Inaba *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 2003). Além disto, a geração de DCs *in vitro* fornece um número células é limitado e isso dificulta o seu estudo.

Linhagens de células imortalizadas são boas alternativas para o estudos de DCs e diferentes linhagens com diferentes características já foram descritas. Um maior número de linhagens imortalizadas bem caracterizadas pode facilitar o entendimento das diferentes subpopulações de DCs presentes no organismo e o estudo de sua biologia e suas aplicações clínicas, uma vez que a melhor compreensão sobre a interação de DCs com patógenos e apresentação de antígenos é de grande importância para o desenvolvimento de vacinas e imunoterapias (Savina *et al.*, 2006). Para estas questões, é fundamental ter um grande número de DCs disponíveis para estudos em laboratório.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar melhor as células AP284 como uma linhagem de DC de acordo com seus marcadores de superfícies, expressão de TLRs e da capacidade de induzir um perfil de linfócitos T auxiliares.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Comparar a expressão dos marcadores CD11c, MHCII, 33D1, CD11b, CD107b, CD40, CD80 na superfície de BMDCs, AP284 e RAW264;

3.2.2. Avaliar a expressão de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9 nas células AP284;

3.2.3 Avaliar a produção de IL-12p40, IL12p70 e IL-23 após o estímulo de células AP284 e BMDCs com diferentes agonistas de TLR

3.2.4 Avaliar a produção de IL-12p40, IL12p70 e IL-23 após o estímulo de células AP284 e BMDCs com LPS e *E. coli* na presença ou ausência de IFN- γ ;

3.2.5 Avaliar a produção de IFN- γ , IL17 e IL-10 por células do baço de camundongos após imunização dos mesmos com Adjuvante Completo de Freund e reestímulo com BCG.

4. ARTIGOS

Artigo 1 – Dendritic cell line AP284 supports Th17 generation

Pollyana Guimarães de Oliveira^a, Clayson Moura Gomes^b, Lucilla Ribeiro Ávila^{a,c},
Fatima Ribeiro-Dias^a, Pieter Johannes Maria Leenen^d, Milton Adriano Pelli de Oliveira^{a*}.

^aInstituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N, Goiânia, Goiás, 74605-050, Brazil.

^bPontifícia Universidade Católica de Goiás, Av, Universitária 1069, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, 74605-010, Brazil.

^cUniCerrado – Centro Universitário de Goiatuba, Rodovia GO320, S/N – Jardim Santa Paula, Goiatuba, Goiás, 75600-000, Brazil.

^dDepartment of Immunology, Erasmus University Medical Center, Wytemaweg 80, 3015 CN, Rotterdam, Netherlands.

Revista: Cellular Immunology - Fator de Impacto atual: 2.995

Artigo 2 – Células dendríticas murinas imortalizadas: uma alternativa para o estudo de DCs

Pollyana Guimarães de Oliveira^a, Fatima Ribeiro-Dias^a, Pieter Johannes Maria Leenen^b,
Milton Adriano Pelli de Oliveira^{a*}.

^aInstituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N, Goiânia, Goiás, 74605-050, Brazil.

^bDepartment of Immunology, Erasmus University Medical Center, Doctor Molewaterplein 40, 3015 GD, Rotterdam, Netherlands.

Revista (a decidir)

Artigo 1 – Dendritic cell line AP284 supports Th17 generation

Pollyana Guimarães de Oliveira^a, Clayson Moura Gomes^b, Lucilla Ribeiro Ávila^{a,c},
Fatima Ribeiro-Dias^a, Pieter Johannes Maria Leenen^d, Milton Adriano Pelli de Oliveira^{a*}.

^aInstituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N, Goiânia, Goiás, 74605-050, Brazil.

^bPontifícia Universidade Católica de Goiás, Av, Universitária 1069, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, 74605-010, Brazil.

^cUniCerrado – Centro Universitário de Goiatuba, Rodovia GO320, S/N – Jardim Santa Paula, Goiatuba, Goiás, 75600-000, Brazil.

^dDepartment of Immunology, Erasmus University Medical Center, Wytemaweg 80, 3015 CN, Rotterdam, Netherlands.

*Corresponding author: Milton Adriano Pelli de Oliveira. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N, Goiânia, Goiás, 74605 050, Brazil. Phone: +55 62 32096126; FAX +55 62 32096363. e-mail: miltonoliveira.ufg@gmail.com

Abstract

Dendritic cells (DC) have the unique ability to capture microorganisms and activate naive T lymphocytes. Obtaining DC derived from progenitors demands high cost and prolonged cultivation. Different immortalized DC has been isolated but most of them have immature phenotype and depending on growing factors or other stimuli to be used. In this study we characterized the cell line AP284 as a DC. AP284 cells express high levels of CD11b, MHC class II, 33D1 and CD209b. They also express high amounts of CD80 costimulatory molecule and different toll like receptors (TLR). After stimuli with TLR agonist they produce surprising amount of IL-12p40 related to IL-23 formation but not IL-12p70. They are also able to produce IL-6 and favor development of a Th17 but not Th1 profile. This DC line may be useful for a better understanding of factors and cellular interactions responsible for the induction of IL-12p40, IL-23 and Th17 generation.

Keywords: immortalized dendritic cell; IL-12p40; IL-23; Th17; Toll like receptor

1. Introduction

Dendritic cells (DC) were initially described in 1973 by Steinman and Cohn as a novel cell type with unique morphological characteristics [1]. Currently, several DC populations have been described and separated based on different criteria, such as expression of surface markers, function and location [2]. DC have the unique ability to capture microorganisms, migrate to peripheral lymphoid organs and activate naive T lymphocytes [3]. To recognize microorganisms, DC present a variety of Pattern Recognition Receptor (PRR), of which, the Toll-like receptors (TLR) are studied most extensively [4, 5].

When activated, DC produces different types of cytokines that stimulate differentiation of distinct CD4⁺ T lymphocyte profiles [6]. For instance, IL-12 induces generation of Th1 lymphocytes, which are important to control intracellular microorganisms [7, 8]. IL-4 induces generation of Th2 lymphocytes, which are important in helminthic infections, but have a pathogenic role in allergic diseases [9]. Production of IL-6 and TGF- β induces generation of the Th17 profile, important for the control of

extracellular bacteria and fungi [10], while TGF- β can also lead to induction of T regulatory cells (Treg), important for the control of the immune response [11].

IL-12 belongs to a family of cytokines that share subunits [12]. The IL-12p40 subunit links covalently to IL-12p35 to form IL-12p70 [13]. IL-12p40 can also combine with a IL-23p19, subunit forming IL-23 [12]. IL-23 is produced mainly by DC and is indispensable for the maintenance and amplification of Th17 cells, although it is not essential for their initial differentiation [14].

Due to the importance of DC in inducing differentiation of T lymphocytes, and their key role in regulating immune responses, DC are a potential target for vaccine generation and immunotherapy [15]. The main way to generate murine DC for research is by stimulating bone marrow progenitor cells with Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). However, the yield of DC derived from hematopoietic progenitors may be limiting for some experimental approaches. In addition, obtaining these cells *in vitro* demands high cost and prolonged cultivation [16]. To overcome these difficulties, immortalized DC have been isolated and are widely used in research [16].

The first immortalized murine DC generated was the CB1 cell line derived from DBA/2 mice followed by the D2SC/1 derived from BALB/c mice. They were immortalized by retroviral infection of spleen cells with a recombinant retrovirus encoding the v-myc oncogene of the avian MH2 virus fused to the env gene of the AKR leukemia virus [17, 18]. Both the CB1 and the D2SC/1 line present a semi-mature phenotype with intermediate to high expression of MHC I, MHC II and CD80 molecules. Another murine immortalized DC generated is the fetal skin line, FS57 from C57BL/6 [19]. This line has an immature cell profile, and is therefore less effective in activation of T lymphocytes *in vitro*, but can be stimulated to mature in the presence of GM-CSF and IFN- γ [19]. The DC2.4 cell line was derived from bone marrow of C57BL/6 mice [20], and the cells exhibit a semi-mature phenotype in their resting state, but increase the expression of MHC molecules, costimulatory molecules, and the production of various proinflammatory cytokines following viral infection or stimulation with cytokines or TLR agonists [21-23]. The SVDC line (C57BL/6 origin) requires GM-CSF for its maintenance *in vitro*. This cell line grows at 33 $^{\circ}$ C, but stops to grow at 37 $^{\circ}$ C and dies at a 39 $^{\circ}$ C [24]. The SRDC line from CBA/J mice also has an immature phenotype and can become mature in the presence of LPS or *Toxoplasma gondii* antigen [25], similar to the D1 line isolated from the spleens of C57BL/6 mice that depend on LPS and GM-CSF to become mature [20, 26, 27]. Since most immortalized DC have immature phenotype and

because AP284 cells was isolated from a spontaneous spleen tumor and was described as mature macrophage able to capture and present antigens to reactive T lymphocyte clones, inducing proliferation of the latter [28], we decided to investigate whether AP284 cells are more related to DC than a macrophage cell line. Here we showed that AP284 cells express DC markers, and have the ability to amplify an immune response *ex vivo* and skew T helper cell differentiation by producing IL-12 family cytokines after stimulation with different TLR agonists. We observed that AP284 cells are able to produce significant amounts of IL-12p40, IL-6 and IL-23. In agreement, these cells promote the generation of Th17 cells.

2. Material and methods

2.1. Mice

Male C57BL/6 mice were bred at the animal facilities of the Federal University of Goiás/IPTSP, Brazil. The mice used were 6-12 weeks old and were maintained in a clean conventional mouse facility with *ad libitum* access to water and food. All experimental procedures were conducted according to the guidelines of the Animal Research Ethical Committee (CETEA) of the Federal University of Goiás, approved under the protocol 038/2013.

2.2. Cell preparation and cultures

Bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) were obtained by stimulating bone marrow cells freshly isolated from the femurs and tibias of mice. The cell suspension was cultured in 6-well culture dishes (TPP Switzerland) at 4×10^6 cells/ml for 6 days in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MD, USA) supplemented with 1.0 g/L sodium bicarbonate (Labsynth, São Paulo, Brazil), 2 mM L-glutamine 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 50 µM 2-mercaptoethanol, 1M HEPES (all reagents were from Sigma-Aldrich), 10% fetal calf serum (SBF-Cripion, Andradina, São Paulo) inactivated (56°C for 30 min) and GM-CSF at 10 ng/mL. The cultures were refreshed every 2 days by gently swirling the plates, aspirating the medium, and adding back fresh medium with GM-CSF at 10 ng/mL [29]. RAW264 cells (American Type Culture Collection) were cultured in 6-well plates in RPMI-supplemented medium as described above, without GM-CSF. Cultures were started at 2×10^5 cells/mL and expanded every 3 or 4 days.

2.3. Antibodies for cell markers

The following specific antibodies were obtained from hybridoma cultures: anti-CD11b (clone M1/70), anti-MHCII (clone ER-TR3), anti-CD209b SIGNR1 (clone ERTR9), 33D1 (clone 33D1), anti-CD4 (clone GK1.5), anti-CD8 (clone 31M), anti-CD16/32 (clone 2.4G2), control antibodies IgG1 (clone GL113) and IgG2b (clone GL117). Commercial antibodies anti-CD107b (clone MAC3, Bioscience-BD, New Jersey, USA), **anti-TLR2 FITC-labeled (clone T2.5, Abcam, Cambridge, UK), anti-TLR4/MD2 FITC-labeled (clone MTS510, Abcam), anti-TLR3 PE-labeled (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-TLR5 Alexa Fluor- labeled (Biolegend), anti TLR7 FITC- labeled (Invitrogen, Waltham, USA), anti-TLR9 FITC-labeled (Molecular Probes, Eugene, USA),** anti-CD40 (clone 1C10, Bioscience-BD), anti-CD80 (clone 1G10/B7, Bioscience-BD), anti-CD11c (clone HL3, eBioscience).

2.4. Flow cytometry

AP284, BMDC and RAW264 cells were collected from culture, centrifuged and suspended at 2×10^5 cells in 100 μ L PBS containing 2% FBS, 5 mM EDTA and 0.02% sodium azide (FACS buffer). To label surface markers, the cells were incubated with specific antibody either or not conjugated with fluorescent probe, or with the respective control isotype for 20 min at room temperature. Cells incubated with unlabeled antibodies were washed with FACS buffer and suspended in FACS buffer containing FITC-conjugated goat anti-rat IgG antibody (eBioscience) and incubated again for 20 min. Finally, cells were washed and suspended in 100 μ L FACS buffer. Twenty thousand events were acquired for each sample in a flow cytometer (BD Accuri™ C6 Cytometer - BD Biosciences). The percentage of labeled cells and the fluorescence increase were analyzed in FCS Express version 4.0 software (De Novo Software, Los Angeles, CA., USA).

To label intracellular markers the cells were suspended in 50 μ l FACS buffer and incubated for 15 min with 4% paraformaldehyde (Merk, Darmstadt, Germany) in PBS. The cells were washed twice with FACS buffer and suspended in 0.02% saponin (Sigma-Aldrich) in PBS for 15 min. After washing the cells twice with FACS buffer cells were incubated with anti-TLR3, TLR7 and TLR9 antibodies.

2.5. Stimuli

AP284 and BMDC cells were treated for 24 h with the following TLR agonists:

a TLR4 agonist lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* O111: B4; Sigma-Aldrich); a TLR2 agonist zymosan from *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich); a TLR2/TLR6 agonist FSL-1 Syn from *Mycoplasma salivarium* (Pam2CGDPKHPKSF; InvivoGen, San Diego, California, EUA); a TLR7/TLR8 agonist resiquimod (1-4 Amino 2-ethoxymethylimidazo 4,5C, R848; Sigma-Aldrich); a TLR9 agonist CpG (ODN 2006 MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); a TLR5 agonist Flagellin from *Salmonella typhimurium* (Sigma-Aldrich) or heat-killed *Escherichia coli* (ATCC® 11229™). *E. coli* were cultured in thioglycollate medium (NIH Thioglycollate Broth, Himedia, India) at 37°C for 48 h, washed twice in PBS and heated at 90°C for 30 min prior to use. The number of bacteria was quantified by turbidity as previously described [30]. In some experiments, cells were pretreated with 0.2 ng/ml IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, USA) for 2 h prior to addition of the stimuli. AP284 and BMDC were also stimulated with gamma-irradiated Bacillus Calmette- Guérin (BCG, Statens Serum Institut, Artillerivej, Denmark)

2.6. Determination of nitric oxide (NO) production

AP284 and BMDC (5×10^5) were stimulated with LPS or *E. coli* bacteria and incubated for 24h. After this time, culture supernatant was collected and NO production assessed by Griess method [31]. Briefly, culture supernatant (50 μ L) was incubated with an equal volume of the Griess reagent (0.5% sulfanilamide, 0.05% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride and 2.5% ortho-phosphoric acid) for 10 min at room temperature. The absorbance at 550 nm was determined in a microplate reader (Multiskan, Thermo Labsystems, Finland). The results were expressed as μ M of nitrite based on a standard curve established with known concentrations of sodium nitrite (NaNO₂, Sigma-Aldrich) dissolved in culture medium with a detection limit of 1.5 μ M.

2.7. Cytokine detection

Cytokine levels in the culture supernatants were measured by two-site sandwich ELISA. The following antibodies pairs were used, and the second cited was biotinylated: IL-12p40 (clones C17.8 and C15.6) and IL-12p70 (clones C18.2 and C17.15) were from hybridomas donated by Dr. Giorgio Trinchieri (National Cancer Institute, Frederick, MD, USA); IL-23, G23.8 (Biolegend) and C17.15; IFN- γ (clones XMG 1.2 and ASN-18) were from hybridomas donated by Dr. Ises Abrahamssohn (University of São Paulo, Brazil). Commercial kits were used for detection of IL-17 (R&D Systems), IL-10 (eBioscience),

TNF- α (eBioscience), IL-6 (Invitrogen). Standard curves were obtained with recombinant mouse cytokines (Biolegend). The reaction was developed with peroxidase-conjugated streptavidin followed by the substrate TMB (Invitrogen) and the reaction was stopped with H₂SO₄. The supernatants were tested in serial dilutions, and the results expressed as the mean of duplicate determinations. The absorbance at 450 and 620 nm was determined in an ELISA reader (Multiskan).

2.8. Viability analysis

AP284 cells were stimulated with LPS and IFN- γ and incubated for 24h with sterile MTT reagent [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich] [32] at 36°C for 6 h. The reaction was stopped by the addition of 100 μ L of aqueous solution containing 50% dimethyl sulfoxide and 10% sodium dodecyl sulfate to each well. The plate was incubated at 36°C for 12 h, and the absorbance at 550 nm was determined in an ELISA reader (Multiskan). AP284 were killed by heat at 60°C for 30 min to obtain the negative control.

2.9. Generation of BCG-specific lymphocytes and restimulation ex vivo DC

C57BL/6 mice were immunized with three doses of subcutaneous injections of emulsified Freund's Complete Adjuvant (CFA-Sigma-Aldrich) at 21 day intervals. After immunization, mice were euthanized for subsequent spleen extraction. Spleens were disrupted macerated and cells were washed in PBS and subsequently treated with red blood cells lysis solution (17 mM Tris-HCl + 0.144 M ammonium chloride pH 7.2) for 5 minutes. Cells were washed with PBS and cultured in 6-well plates with RPMI without serum at 36°C for 2 h to allow macrophage adherence. Non-adherent cells, as source of lymphocytes, were collected and 1x10⁶ cells were cultured in a 24-well plate together with AP284 (2x10⁴) or BMDC (4x10⁴) cells previously incubated for 24 h with 2 x 10⁵ gamma-irradiated BCG. Non-adherent cells from spleens of non-immunized mice were used as controls. After 72 h of culture, the supernatant was collected to evaluate the production of IL-17 and IFN- γ .

2.10. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation and compared for significance by Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Fisher's test using Graph-Pad Prism Software 6.0 (Inc. San Diego, CA, USA). The value of $p < 0.05$ is considered significant.

3. Results

3.1. AP284 cells share more characteristics with dendritic cells than macrophages

AP284 cells were initially characterized as mature macrophages able to present antigens and activate T lymphocytes [28]. As features of DC as exquisite antigen presenting cells have been defined more extensively since then, we reanalyzed this cell line and found that they share more characteristics with DC than macrophages. We observed that, in culture, AP284 cells were weakly adherent and had long dendrites, in particular after stimulation with Zymosan or LPS (Fig. S1A-D). Comparing cell surface marker expression of mononuclear phagocytes present on the RAW264 cell line, representing macrophages, BMDC, representing conventional DC and AP284 showed that AP284 are closer to DC than macrophages. As observed in Fig 1, AP284 cells express high levels of CD11c and MHC class II. In addition, the DC subpopulation markers 33D1 and CD209b was also observed in this cell line, which also expresses high amounts of CD80 costimulatory molecule. In contrast, RAW264 macrophages do not express significant levels of CD11c, 33D1 and MHC II molecules, but express common markers of mononuclear phagocytes such as the CD11b and the CD40 costimulatory molecule, which are present on all cell types analyzed (Fig. 1). The Gr-1, CD8, CD4, NK1.1 and B220 markers that may be present in DC subpopulations were absent in cell populations tested (data not shown). Taken together, these data strongly suggest that AP284 cells share more characteristics with dendritic cells than macrophages, in particular by their spontaneous expression of MHC II and costimulatory molecules.

Activation of DC by pathogens depends on the recognition of microbial molecules that bind to standard recognition receptors, such as TLRs. AP284 cells express significant levels of membrane TLR2 and TLR4 and intracellular TLR3, TLR7 and TLR9 (Fig. S2).

3.2. AP284 cells produce high amounts of IL-12p40 after stimulation with different TLR agonists

In addition to presenting specific antigens, DC must produce cytokines to induce polarization and differentiation of T lymphocytes. To evaluate the cytokines produced by AP284 cells and BMDC, cells were incubated with different TLR agonists at different concentrations for 24h. In Fig. 2 we observed that LPS (TLR4 agonist), Zymosan (TLR2 agonist), FSL-1 (TLR2/TLR6 agonist), resiquimod (TLR7/TLR8 agonist) and flagellin (TLR5 agonist) were able to induce a surprising production of IL-12p40 (above 500

ng/mL). Except for flagellin, the same agonists also induced significant production of IL-12p40 in BMDC, but in lower amounts (approximately 10 ng/mL). CpG (TRL9 agonist) was not able to induce significant production of IL-12p40 in our experiments. The IL-12p40 subunit together with the IL-12p35 subunit forms the active IL-12p70 which is important for induction of a Th1 response profile [33]. Interestingly, AP284 cells were not able to produce IL-12p70 with any stimuli used. In contrast, BMDC produced IL-12p70 after stimulation with LPS, Zymozan, FSL-1 and Resiquimod (Fig. S3 A-J). As IFN- γ induces IL-12p35 subunit expression and favors the production of IL-12p70 [33], AP284 and BMDC were primed for 2h with IFN- γ and subsequently stimulated with LPS or *Escherichia coli*. The whole pathogen *E. coli* was used because it could bind to a higher number of PPRs and consequently increase the possibility for cytokine production. Surprisingly, the priming with IFN- γ followed by LPS or intact *E. coli* stimulation inhibited the IL-12p40 production by AP284 cells and was not able to favor the IL-12p70 production (Fig. S4A and B). In contrast, the priming of BMDC with IFN- γ stimulated the production of IL-12p40 and IL-12p70 (Fig. S4D and E). Inhibition of IL-12p40 production in AP284 cells by IFN- γ was not due to cell death (analyzed by MTT metabolism), high production of NO or TNF- α , since AP284 cells remained alive after stimulation with IFN- γ (Fig. S5); NO production was similar for AP284 and BMDC cells (Fig S6) and TNF- α production was also inhibited in AP284 after the addition of IFN- γ (Fig.S7).

3.3 AP284 cells produce IL-23 and IL-6 after stimulation with the different TLR agonists

The IL-23 is also a heterodimeric cytokine sharing the IL-12p40 subunit with IL-12p70. As AP284 cells can produce large amounts of IL-12p40 but not IL-12p70, we evaluated whether IL-12p40 produced after stimulation with different TLR agonists was related to IL-23 synthesis.

Similar to what was observed for IL-12p40, we observed that stimulation with LPS, zymozan, FSL-1 and resiquimod was able to induce significant production of IL-23 by AP284 cells (Fig. 3). FSL-1 was the more efficient TLR agonist to induce expression of IL-23 by AP284, reaching a production of around 10 ng/mL (Fig. 3C) and CpG did not induce the production of IL-23 (Fig. 3E). These data demonstrate that part of IL-12p40 produced by AP284 cells is being used for IL-23 production. Unlike AP284 cells, the IL-23 produced by BMDC did not reach statistical significance for any of stimuli used even after priming with IFN- γ (Fig. 3G-L and Fig.S4F). Similar to what was observed for the

production of IL-12p40, the priming with IFN- γ also inhibited the IL-23 production in AP284 cells (Fig. S4A and C).

Since IL-23 is a cytokine related to the polarization and differentiation of Th17 cells, and AP284 cells are able to produce IL-23 but not IL-12p70, we investigated the ability of AP284 cells to produce IL-6, another key cytokine related to Th17 generation. Both AP284 and BMDC produced high levels of IL-6 after stimulation with all TLR agonists (Fig. 4A-K), and the amounts of IL-6 produced by both cell types are similar. These data suggest that AP284 cells might have more potential to generate Th17- rather than Th1 cells.

3.4. AP284 cells restimulate Th17 cells ex vivo but not a Th1 cells.

In order to evaluate which T cell profile the AP284 cells are able to enforce, C57BL/6 mice were immunized repeatedly with CFA. After 21 days the spleen was removed and non-adherent cells, representing primarily lymphocytes, were cultured with AP284 or BMDC in presence or absence of BCG for 72 h, and the cytokines IL-17, IFN- γ and IL-10 were assayed by ELISA (Fig. 5). Both AP284 and BMDC were able to increase the production of IL-17 by non-adherent spleen cells from CFA immunized mice when BCG was added in culture (Fig 5A and D). In contrast, only BMDC were able to increase the production of IFN- γ by CFA-immunized non-adherent spleen cells, while AP284 cells significantly inhibited IFN- γ production (Fig 5B and E). In addition, both AP284 cells and BMDC failed to increase IL-10 production by immunized spleen cells above the spontaneous level of production (Fig 5C and F).

4. Discussion

In this study we identified the cell line AP284, formerly characterized as macrophage [28], as a dendritic cell line with unique antigen-presenting features. Our new data show that AP284 cells share more phenotypic characteristics with myeloid DC than with macrophages. It was also previously described that AP284 cells were able to capture antigens and present them to T lymphocyte clones, inducing their proliferation, in accordance with the notion that this is a dendritic cell line [28]. Activation of naïve CD4⁺ T lymphocytes depends on the expression of MHC class II molecules and costimulatory molecules by mature DC such as CD40, CD80 and CD86 [3], and we show that AP284 cells express MHC class II, CD40 and CD80 molecules, indicating that they have

characteristics of mature DC. This contrasts with the phenotype of the RAW264 macrophage cell line, which only showed CD40 expression.

The origin of this cell line from mouse spleen can be the reason for the expression of the DC markers 33D1 and CD11c. The 33D1 marker was reported in a large population of myeloid DC from spleen that are 33D1+CD11bint [34] and preferentially stimulate CD4+ T cells based upon their unique migratory profile in the T cell zone of the white pulp [35].

To recognize and present pathogen antigens, DC must express PRRs that bind to PAMPs [36], which is crucial for activation and maturation of DC [37]. AP284 cells express high levels of extracellular TLR2 and TLR4 and intracellular TLR3, TLR7 and TLR9 showing that they can recognize different group of pathogens from extracellular fungi and bacteria to intracellular virus. The ability of AP284 cells to respond to PAMPs was confirmed by the cytokines secreted when TLR agonists were used. The profile of cytokines produced by DC is crucial to define the fate of activated T lymphocytes. Among these, the group of cytokines belonging to the IL-12 family deserves special attention due to their action in the skewing and maintenance of major profiles of Th cells [12]. IL-12p70 and IL-23 are members of the IL-12 family sharing the IL-12p40 subunit, and are secreted primarily by activated DC. [12]. It was shown before that murine BMDC are able to produce significant amounts of IL-12p40 when stimulated with LPS, resiquimod, CpG, zymosan and FSL-1, a finding that we could confirm here [38-41]. IL-12p40 is generally produced in excess when compared to the IL-12p70 heterodimer, and free IL-12p40 can be produced 10 to 1000 times more than IL-12p35 [42, 43]. Interestingly, AP284 cells produce 10-100 times more IL-12p40 than BMDC do, but were unable to produce IL-12p70, even after IFN- γ stimulation. It is important to emphasize that some biological functions have been identified for the IL-12p40 subunit, such as the induction of NO production by mouse microglial cells [31] and inhibition of the expression of FOXP3 in murine spleen T cells, indicating a role in Treg-mediated suppression [32]. However, we did not observe alterations in the production of NO by stimulated AP284 cells or IL-10 when AP284 cells were used to stimulate BCG immunized spleen cells. The explanation for this remarkably strong production of IL-12p40 by AP284 cells is a matter for further study and several mechanisms can be involved. This regulation may involve proteins such as p38 or microRNA such as miR 128 that modulate the expression of IL-12p40 [44].

We were unable to explain the absence of IL-12p70 production by AP284 cells. It was suggested before that a second stimulus, such as IFN- γ , is necessary for IL-12p70 production by DC [45]. IFN- γ participates in transcriptional activation of the IL-12p35 subunit and favors IL-12p70 production [46]. In the present study we found that BMDC produce IL-12p70 independent of IFN- γ , as was also demonstrated by others [40, 41, 44]. Additionally, IFN- γ increased IL-12p70 production by BMDC, but not by AP284 cells. Our data suggest that the excessive production of IL-12p40 may be associated with the production of the p19 subunit, forming active IL-23. Alternatively, IL-12p40 may associate in a homodimer form to generate IL-12p80 that binds to the IL-12 receptor, but has an antagonistic function [47].

While the production of IL-12p70 by DC is important for the generation of a Th1 profile, the cytokines TGF- β and IL-6 are required for differentiation of Th17 cells. IL-23 is critical for stabilization and maintenance of this response [10]. All TLR stimuli used were able to induce significant production of IL-6 and IL-23 by AP284 cells at similar levels as BMDC. Together, these results indicate that AP284 cells are DC involved in generation and amplification of a Th17 profile.

Studies by Wang and He [48] showed that immunization of mice with CFA for three weeks induced a mixed Th17- and Th1 profile with IL-17 and IFN- γ production by spleen cells. We used non-adherent spleen cells from CFA-immunized mice as responders to BCG processed and presented by AP284 or BMDC. While BMDC supported both IFN- γ and IL-17 production, AP284 cells were able to induce IL-17 production, but not IFN- γ production under these same conditions. This is in agreement with our previous data, which showed that AP284 cells are not able to produce IL-12p70, which is the cytokine critical for the generation of the Th1 response. In this model, both AP284 cells and BMDC were not able to increase IL-10 production beyond the level produced spontaneously by non-adherent splenocytes from immunized mice.

In our experiments we did not evaluate whether IL17 and IFN- γ came from different lymphocytes or from a Th17.1 population. However, it is possible that BMDC may stimulate Th17.1, while AP284 only stimulate Th17 cells that might even become more suppressive than pro-inflammatory [49].

Taken together, our data support the idea that AP284 cells are a new DC line associated with the Th17 rather than Th1 type response. Additionally this cell line can be an important tool to improve the knowledge about factors and cellular interactions

responsible for the induction of IL-12p40 and IL-23 and could be used to clarify the molecular pathways involved in the production of these cytokines. We also suggest that AP284 cells may be useful for the testing of new inhibitory or stimulatory drugs of IL-12p40 and IL-23.

CONCLUSION

In summary, our data provide evidence that AP284 cells constitute a newly identified DC line harboring several TLRs and producing surprising amount of IL-12p40. The IL-12p40 production is related to IL-23 formation but not IL-12p70. AP284 cells are also able to produce IL-6 and favor development of a Th17 profile. We believe that this new DC line may be useful for a better understanding of factors and cellular interactions responsible for the induction of IL-12p40 and IL-23 and test new drugs that may potentially inhibit or stimulate these cytokines

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Daniel Silva Goulard, Ms Marco Vitor Silva de Melo and Iraci Maria Cardoso for animal care.

Funding

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). Milton Adriano Pelli de Oliveira and Fátima Ribeiro Dias are fellows from (CNPq).

Figure Legends

Figure 1: Expression of cell surface markers on AP284, BMDC and RAW264 cells. AP284, BMDC, and RAW264 cells were incubated with antibodies for 33D1, CD11c, CD11b, CD107b, CD40, CD80, MHC class II and CD209b for analysis by flow cytometry. The histograms show the fluorescence intensity of a representative experiment

from three independent experiments of the cells labeled with control isotype (red) and specific antibody (black).

Figura 2: AP284 cells produce high amount of IL-12p40 after stimulation with TLR agonists. AP284 cells (A-F) and BMDC (G-L) were stimulated with TLR agonists lipopolysaccharide (LPS); zymosan (Zy); Pam2CGDPKHPKSF (FSL-1); resiquimod (resiq) CpG-ODN (CPG) and flagellin (flag) at different concentrations for 24 h and production of IL-12p40 was evaluated by ELISA. The bars represent the mean \pm SD of cytokine production from three independent experiments * indicates statistical difference between unstimulated (CT) and cells stimulated with TLR agonists by oneway ANOVA followed by Fisher's ($p < 0.05$).

Figure 3: AP284 cells produce IL-23 after stimulation with TLR agonists. AP284 cells (A-F) and BMDC (G-L) were stimulated with TLRs agonists lipopolysaccharide (LPS); zymosan (Zy); Pam2CGDPKHPKSF (FSL-1); resiquimod (resiq) CpG-ODN (CPG) and flagellin (flag) at different concentrations for 24 h and production of IL-23 was evaluated by ELISA. The bars represent the mean \pm SD of cytokine production from three independent experiments. * indicates statistical difference between unstimulated (CT) and cells stimulated with TLR agonists by one-way ANOVA followed by Fisher's ($p < 0.05$).

Figure 4: AP284 cells produce IL-6 after stimulation with TLRs agonists. AP284 cells (A-F) and BMDC (G-K) were stimulated with TLRs agonists lipopolysaccharide (LPS); zymosan (Zy); Pam2CGDPKHPKSF (FSL-1); resiquimod (resiq) CpG-ODN (CPG) and flagellin (flag) at different concentrations for 24 h and production of IL-6 was evaluated by ELISA. The bars represent mean \pm SD of three independent experiments. * indicates statistical difference between unstimulated (CT) and cells stimulated with TLR agonists by one-way ANOVA followed by Fisher's ($p < 0.05$).

Figure 5: AP284 cells increase production of IL-17 by CFA-immunized spleen cells. Spleen cells from C57BL/6 mice immunized with CFA or spleen cells from unimmunized mice were stimulated *in vitro* with gamma-irradiated BCG for 72h in presence or absence of AP284 or BMDC. Production of IL-17, IFN- γ and IL-10 was evaluated in culture supernatant by ELISA. The bars represent mean \pm SD of three

independent experiments. * indicates statistical difference between unstimulated (CT) and cells stimulated one-way ANOVA followed by Fisher's ($p < 0.05$).

Supplementary Figure 1: Morphology of AP284 cells before and after stimulation with LPS or Zymosan. AP284 cells were cultured for 24 h in the absence (A and C) or presence of 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zymosan (B) or 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS (D). The figures show the morphological changes observed under inverted microscope.

Supplementary Figure 2: Expression of different TLRs in AP284 cells. AP284 were cultured for 24 h and labeled with specific antibodies for TLR2, TLR4, TLR3, TLR5, TLR7 and TLR9. The histograms represent isotype control (red) and specific antibody (black).

Supplementary Figure 3: AP284 cells fail to produce IL-12p70 after stimulation with TLR agonists. AP284 cells (A-F) and BMDC (G- L) were cultured with different TLR agonists for 24 h to evaluate the production of IL-12p70. Cytokine production was assessed by ELISA. The bars represent the mean \pm SD of cytokine production from three independent experiments * indicates statistical difference between un stimulated (CT) and stimulated cells by one-way ANOVA followed by Fisher's ($p < 0.05$).

Supplementary Figure 4: Priming with IFN- γ inhibits IL-12p40, IL-12p70 and IL-23 production by AP284 cells. AP284 cells (A-C) and BMDC (D-F). were primed with IFN- γ for 2 h followed by addition of LPS or heated-killed *Esheria coli* for 24 h. Production of IL-12p40 (A, D) IL-12p70 (B, E) and IL-23 (C, F) was evaluated by the ELISA. The bars represent the mean \pm SD of cytokine production from three independent experiments. * indicates statistical difference between unstimulated (CT) and stimulated cells by one-way ANOVA followed by Fisher's ($p < 0.05$). ND not detectable.

Supplementary Figure 5: Viability of AP284 cells was maintained after INF- γ priming. AP284 cells were primed with IFN- γ for 2 h followed by addition of LPS 24 h. After this period MTT was added and cells remained in culture for 6h in culture. A solution of 10% SDS was added for crystal dissolution for 12 h. Cells cultured at 600C for 30 min was used as control of dead cells. The bars represent the percentage of viable

cells from three independent experiments. * indicates statistical difference between heat killed cells and live cells by one-way ANOVA followed by Fisher's ($p < 0.05$).

Supplementary Figure 6: Nitric oxide production is similar between AP284 cells and BMDC after stimulation with IFN- γ and LPS. AP284 cells and BMDC were primed with IFN- γ for 2 h followed by addition of LPS or *E. coli* 24h to evaluate NO production. The bars represent the amount of nitrite in culture as determined in three independent experiments. * indicates statistical difference by one-way ANOVA followed by Fisher's ($p < 0.05$).

Supplementary Figure 7: Priming with IFN- γ inhibits TNF- α production by AP284 cells. AP284 cells were primed with IFN- γ for 2 h followed by addition of LPS for 24 h. Production of TNF- α was evaluated by the ELISA. The bars represent the mean \pm SD of cytokine production from three independent experiments. * indicates statistical difference by one-way ANOVA followed by Fisher's ($p < 0.05$).

References

- [1] R.M. Steinman, Z.A. Cohn, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution, *The Journal of experimental medicine*, 137 (1973) 1142-1162.
- [2] M. Chopin, R.S. Allan, G.T. Belz, Transcriptional regulation of dendritic cell diversity, *Frontiers in immunology*, 3 (2012) 26.
- [3] K. Shortman, S.H. Naik, Steady-state and inflammatory dendritic-cell development, *Nat Rev Immunol*, 7 (2007) 19-30.
- [4] S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho, Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, *Nature immunology*, 2 (2001) 675-680.
- [5] H. Hemmi, T. Kaisho, K. Takeda, S. Akira, The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets, *Journal of immunology*, 170 (2003) 3059-3064.
- [6] R.N. Germain, E.A. Robey, M.D. Cahalan, A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system, *Science*, 336 (2012) 1676-1681.
- [7] R.V. Luckheeram, R. Zhou, A.D. Verma, B. Xia, CD4(+)T cells: differentiation and functions, *Clin Dev Immunol*, 2012 (2012) 925135.
- [8] H. Yamane, W.E. Paul, Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets, *Immunological reviews*, 252 (2013) 12-23.
- [9] R. Goswami, M.H. Kaplan, A brief history of IL-9, *Journal of immunology*, 186 (2011) 3283-3288.
- [10] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, V.K. Kuchroo, Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature*, 441 (2006) 235-238.

- [11] S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Regulatory T cells and immune tolerance, *Cell*, 133 (2008) 775-787.
- [12] D.A. Vignali, V.K. Kuchroo, IL-12 family cytokines: immunological playmakers, *Nat Immunol*, 13 (2012) 722-728.
- [13] G. Trinchieri, Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts, *Annual review of immunology*, 30 (2012) 677-706.
- [14] C.L. Langrish, B.S. McKenzie, N.J. Wilson, R. de Waal Malefyt, R.A. Kastelein, D.J. Cua, IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity, *Immunological reviews*, 202 (2004) 96-105.
- [15] A.D. Garg, P.G. Coulie, B.J. Van den Eynde, P. Agostinis, Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape, *Trends in immunology*, 38 (2017) 577-593.
- [16] K.M. Hargadon, Murine and Human Model Systems for the Study of Dendritic Cell Immunobiology, *International reviews of immunology*, 35 (2016) 85-115.
- [17] P. Paglia, G. Girolomoni, F. Robbiati, F. Granucci, P. Ricciardi-Castagnoli, Immortalized dendritic cell line fully competent in antigen presentation initiates primary T cell responses in vivo, *The Journal of experimental medicine*, 178 (1993) 1893-1901.
- [18] F. Granucci, G. Girolomoni, M.B. Lutz, M. Foti, G. Marconi, P. Gnocchi, L. Nolli, P. Ricciardi-Castagnoli, Modulation of cytokine expression in mouse dendritic cell clones, *Eur J Immunol*, 24 (1994) 2522-2526.
- [19] G. Girolomoni, M.B. Lutz, S. Pastore, C.U. Assmann, A. Cavani, P. Ricciardi-Castagnoli, Establishment of a cell line with features of early dendritic cell precursors from fetal mouse skin, *Eur J Immunol*, 25 (1995) 2163-2169.
- [20] Z. Shen, G. Reznikoff, G. Dranoff, K.L. Rock, Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules, *Journal of immunology*, 158 (1997) 2723-2730.
- [21] K.M. Hargadon, Tumor-altered dendritic cell function: implications for antitumor immunity, *Frontiers in immunology*, 4 (2013) 192.
- [22] M. Brown, Y. Zhang, S. Dermine, E.A. de Wynter, C. Hart, H. Kitchener, P.L. Stern, M.A. Skinner, S.N. Stacey, Dendritic cells infected with recombinant fowlpox virus vectors are potent and long-acting stimulators of transgenespecific class I restricted T lymphocyte activity, *Gene therapy*, 7 (2000) 1680- 1689.
- [23] A. Rhule, B. Rase, J.R. Smith, D.M. Shepherd, Toll-like receptor ligand-induced activation of murine DC2.4 cells is attenuated by *Panax notoginseng*, *Journal of ethnopharmacology*, 116 (2008) 179-186.
- [24] S. Ebihara, S. Endo, K. Ito, Y. Ito, K. Akiyama, M. Obinata, T. Takai, Immortalized dendritic cell line with efficient cross-priming ability established from transgenic mice harboring the temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene, *Journal of biochemistry*, 136 (2004) 321-328.
- [25] S. Ruiz, C. Beauvillain, M.N. Mevelec, P. Roingeard, P. Breton, D. Bout, I. Dimier Poisson, A novel CD4-CD8 α +CD205+CD11b- murine spleen dendritic cell line: establishment, characterization and functional analysis in a model of vaccination to toxoplasmosis, *Cellular microbiology*, 7 (2005) 1659- 1671.
- [26] A. Mortellaro, M. Urbano, S. Citterio, M. Foti, F. Granucci, P. Ricciardi- Castagnoli, Generation of murine growth factor-dependent long-term dendritic cell lines to investigate host-parasite interactions, *Methods Mol Biol*, 531 (2009) 17-27.
- [27] C. Winzler, P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V.S. Zimmermann, J. Davoust, P. Ricciardi-Castagnoli, Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures, *The Journal of experimental medicine*, 185 (1997) 317-328.

- [28] I.S. Klasen, J.P. de Jong, J.S. Voerman, R.M. Ladestein, P.J. Leenen, R. Benner, Murine macrophage cell line AP284 presents antigen to cloned MT4+, Lyt-2- T cells in vitro and in vivo, *Immunobiology*, 178 (1988) 261-274.
- [29] K. Inaba, M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, R.M. Steinman, Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, *J Exp Med*, 176 (1992) 1693-1702.
- [30] E. Neumann, M.A. Oliveira, C.M. Cabral, L.N. Moura, J.R. Nicoli, E.C. Vieira, D.C. Cara, G.I. Podoprigora, L.Q. Vieira, Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice, *Braz J Med Biol Res*, 31 (1998) 1565-1573.
- [31] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids, *Anal Biochem*, 126 (1982) 131-138.
- [32] A. Dutta, S. Bandyopadhyay, C. Mandal, M. Chatterjee, Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis, *Parasitol Int*, 54 (2005) 119-122.
- [33] G. Trinchieri, Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nat Rev Immunol*, 3 (2003) 133-146.
- [34] J.M. Stolley, D.J. Campbell, A 33D1+ Dendritic Cell/Autoreactive CD4+ T Cell Circuit Maintains IL-2-Dependent Regulatory T Cells in the Spleen, *Journal of immunology*, 197 (2016) 2635-2645.
- [35] S. Calabro, D. Liu, A. Gallman, M.S. Nascimento, Z. Yu, T.T. Zhang, P. Chen, B. Zhang, L. Xu, U. Gowthaman, J.K. Krishnaswamy, A.M. Haberman, A. Williams, S.C. Eisenbarth, Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Subsets Tailors Adaptive Immunity, *Cell reports*, 16 (2016) 2472-2485.
- [36] M. Matsumoto, Y. Takeda, M. Tatematsu, T. Seya, Toll-Like Receptor 3 Signal in Dendritic Cells Benefits Cancer Immunotherapy, *Frontiers in immunology*, 8 (2017) 1897.
- [37] M.J. Jimenez-Dalmaroni, M.E. Gerswhin, I.E. Adamopoulos, The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review, *Autoimmunity reviews*, 15 (2016) 1-8.
- [38] C. Ma, M. Muranyi, C.H. Chu, J. Zhang, W.M. Chu, Involvement of DNAPKcs in the IL-6 and IL-12 response to CpG-ODN is mediated by its interaction with TRAF6 in dendritic cells, *PloS one*, 8 (2013) e58072.
- [39] E.C. Slack, M.J. Robinson, P. Hernanz-Falcon, G.D. Brown, D.L. Williams, E. Schweighoffer, V.L. Tybulewicz, C. Reis e Sousa, Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan, *Eur J Immunol*, 37 (2007) 1600-1612.
- [40] K. Kiura, H. Kataoka, T. Nakata, T. Into, M. Yasuda, S. Akira, N. Inoue, K. Shibata, The synthetic analogue of mycoplasmal lipoprotein FSL-1 induces dendritic cell maturation through Toll-like receptor 2, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46 (2006) 78-84.
- [41] S. Kasahara, E.A. Clark, Dendritic cell-associated lectin 2 (DCAL2) defines a distinct CD8alpha- dendritic cell subset, *J Leukoc Biol*, 91 (2012) 437-448.
- [42] G. Trinchieri, S. Pflanz, R.A. Kastelein, The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses, *Immunity*, 19 (2003) 641-644.
- [43] G. Trinchieri, Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity, *Advances in immunology*, 70 (1998) 83-243.

- [44] X. Liang, W. Shangguan, M. Zhang, S. Mei, L. Wang, R. Yang, miR-128 enhances dendritic cell-mediated anti-tumor immunity via targeting of p38, *Molecular medicine reports*, 16 (2017) 1307-1313.
- [45] R.E. Roses, S. Xu, M. Xu, U. Koldovsky, G. Koski, B.J. Czerniecki, Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists, *J Immunol*, 181 (2008) 5120-5127.
- [46] J. Liu, X. Guan, T. Tamura, K. Ozato, X. Ma, Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein, *J Biol Chem*, 279 (2004) 55609-55617.
- [47] C. Holscher, R.A. Atkinson, B. Arendse, N. Brown, E. Myburgh, G. Alber, F. Brombacher, A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection, *Journal of immunology*, 167 (2001) 6957-6966.
- [48] H.P. Wang, Z.G. He, Treatment with incomplete Freund's adjuvant and *Listeria monocytogenes* delays diabetes via an interleukin-17-secretion-independent pathway, *Exp Ther Med*, 9 (2015) 1934-1938.
- [49] N. Gagliani, M.C. Amezcua Vesely, A. Iseppon, L. Brockmann, H. Xu, N.W. Palm, M.R. de Zoete, P. Licona-Limon, R.S. Paiva, T. Ching, C. Weaver, X. Zi, X. Pan, R. Fan, L.X. Garmire, M.J. Cotton, Y. Drier, B. Bernstein, J. Geginat, B. Stockinger, E. Esplugues, S. Huber, R.A. Flavell, Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation, *Nature*, 523 (2015) 221-225.

Figure 1

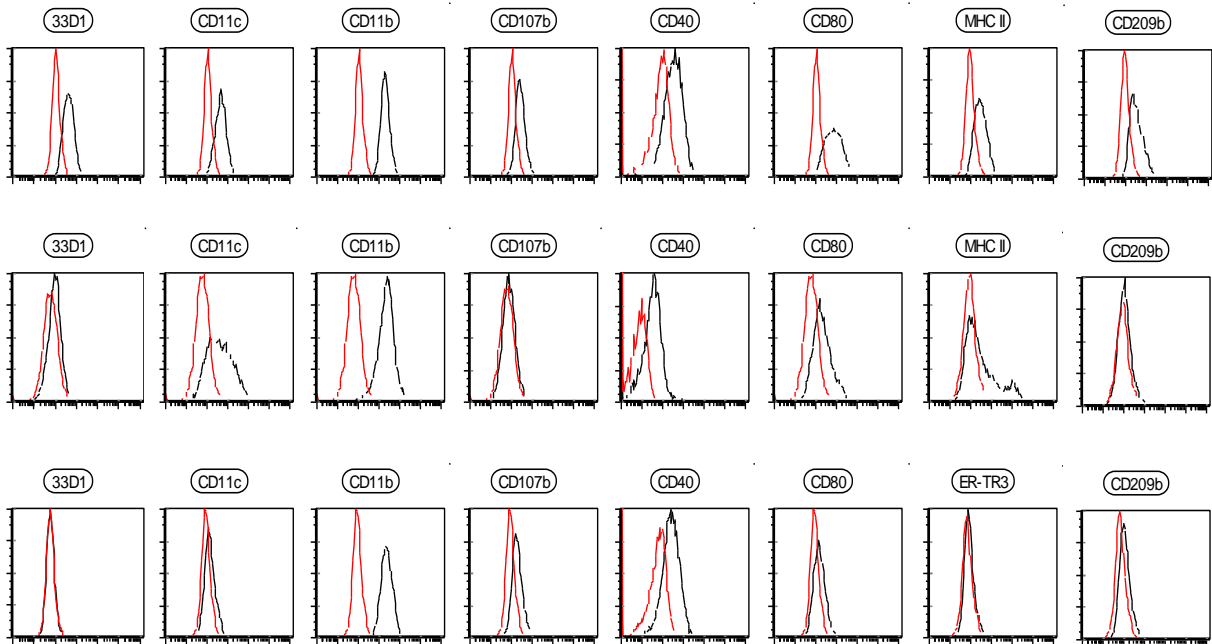


Figure 2

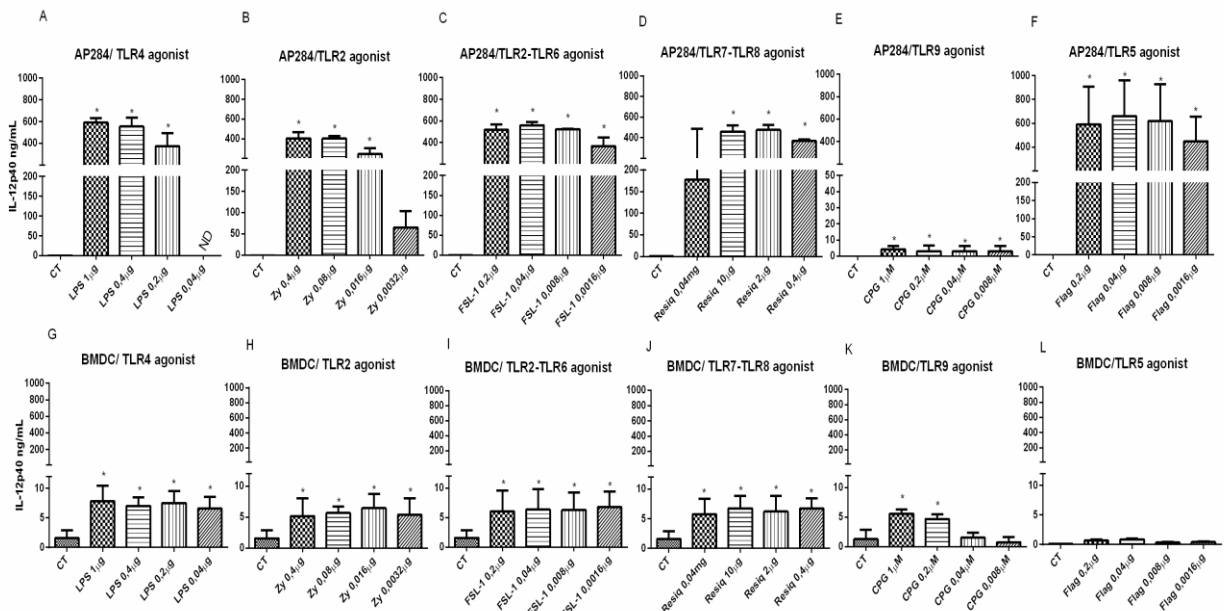


Figure 3

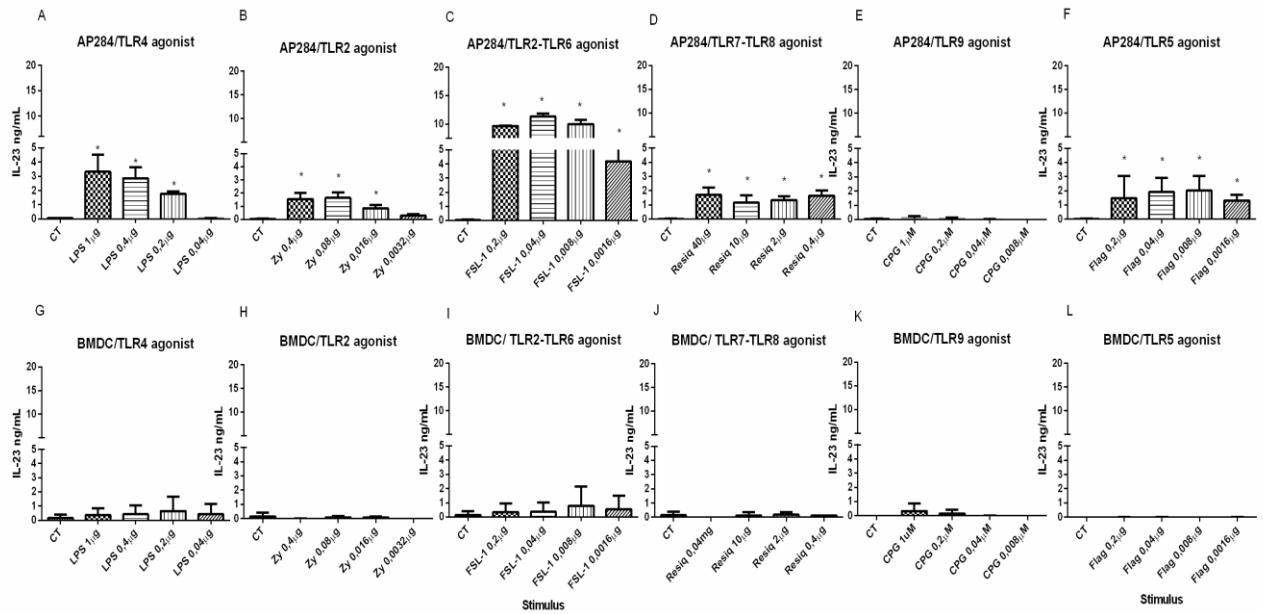


Figure 4

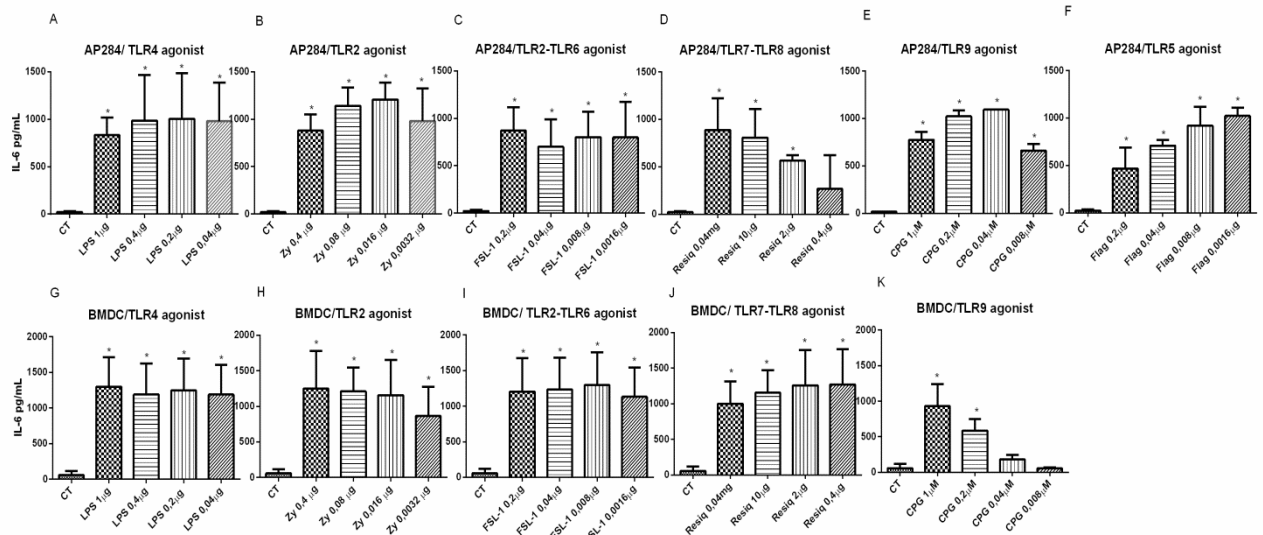


Figure 5

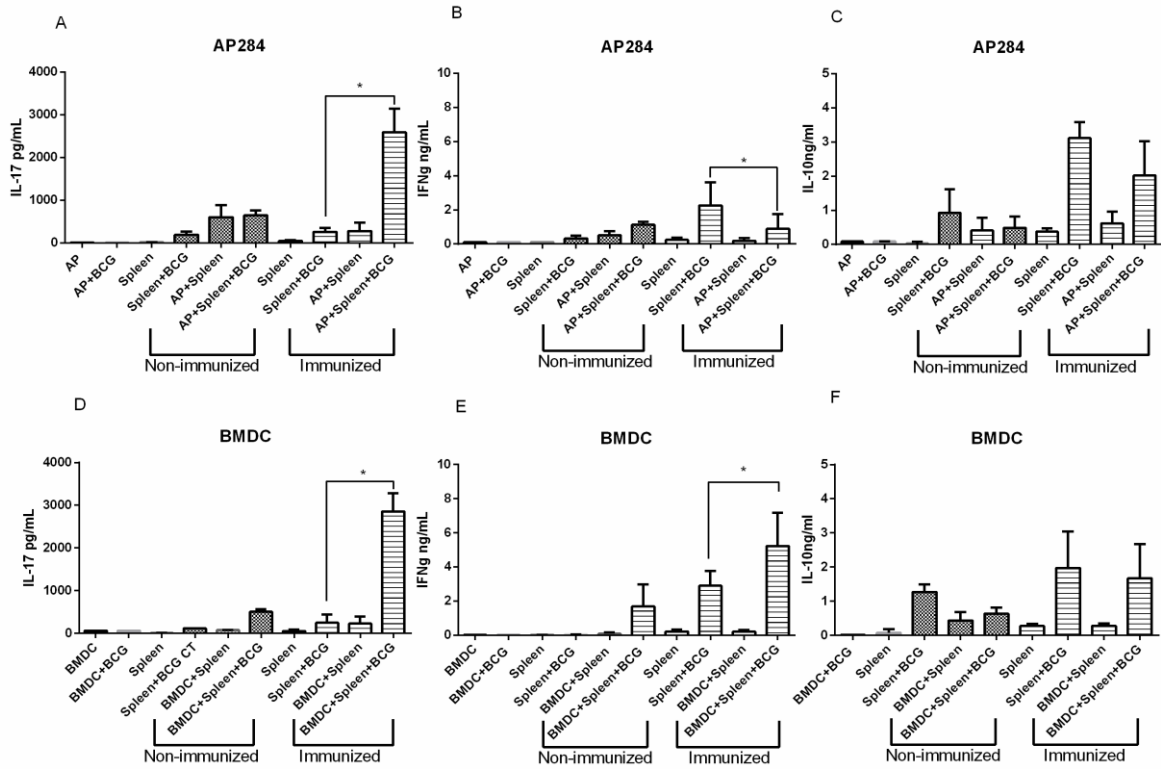


Figure S1

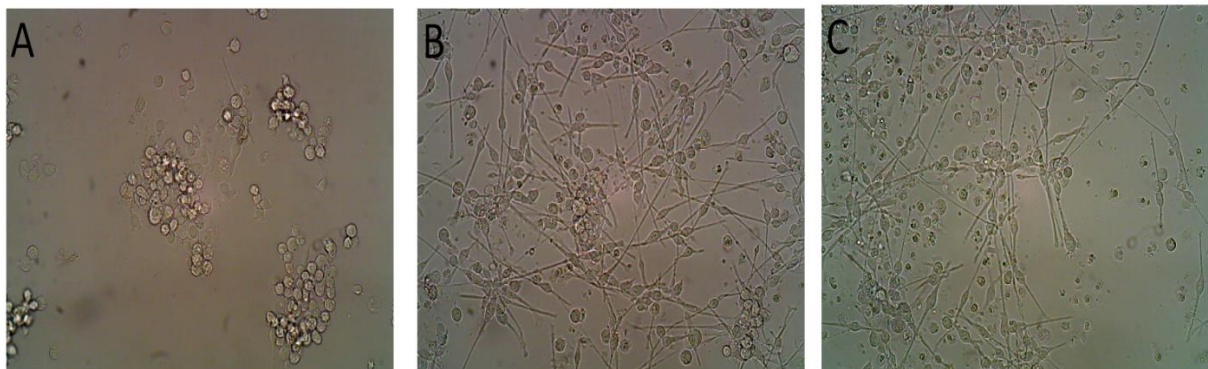


Figure S2

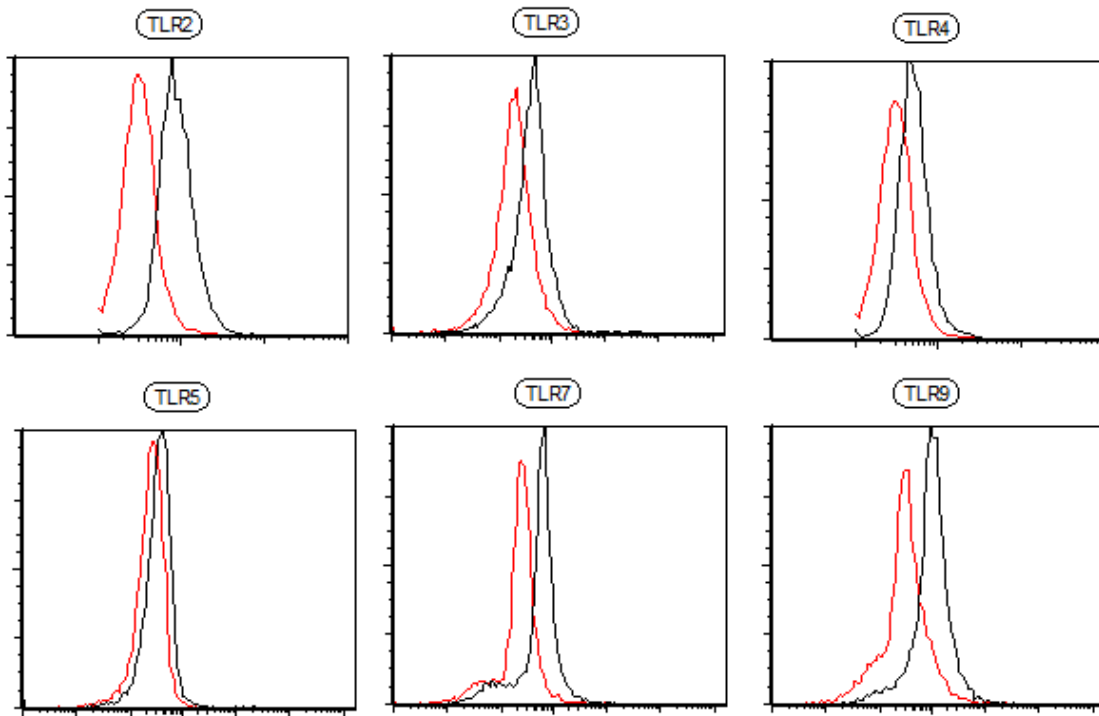


Figure S3

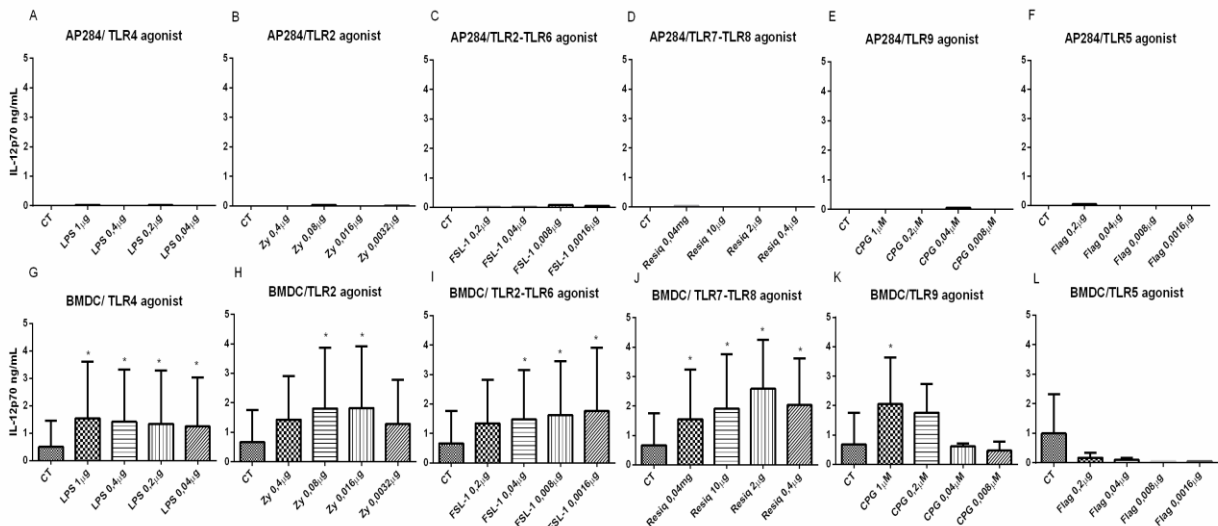


Figure S4

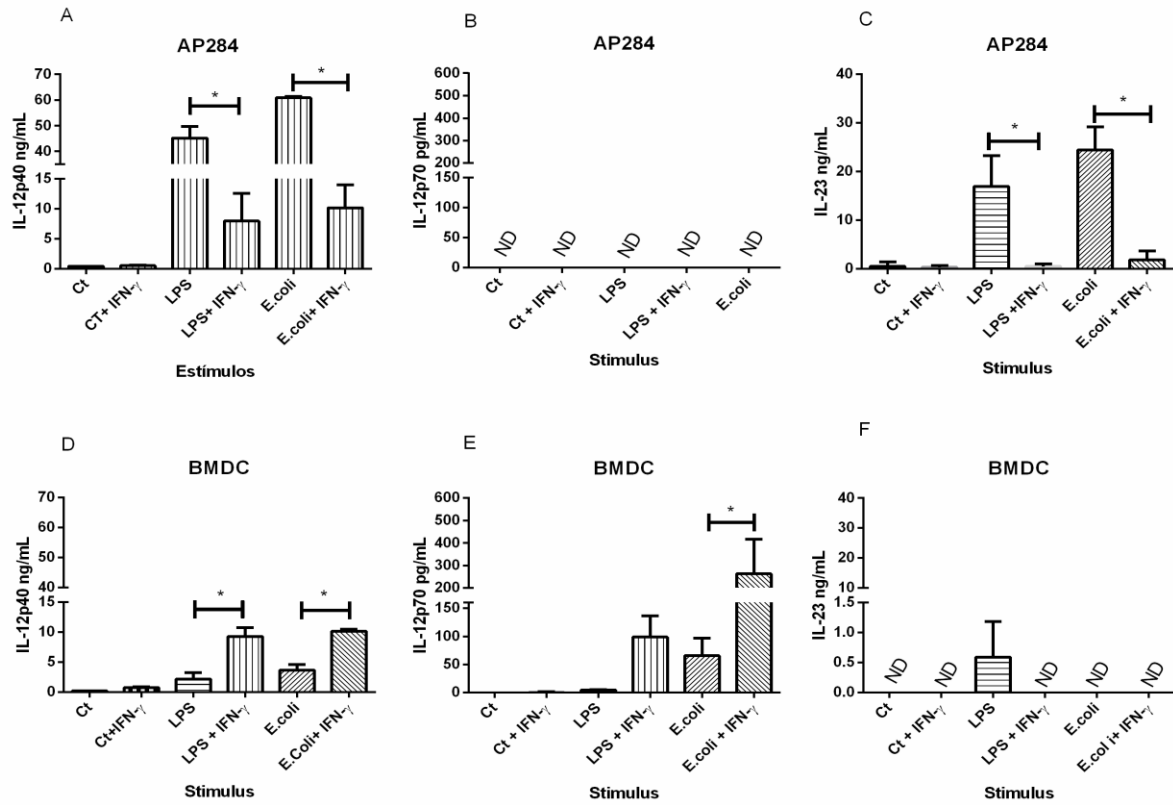


Figure S5

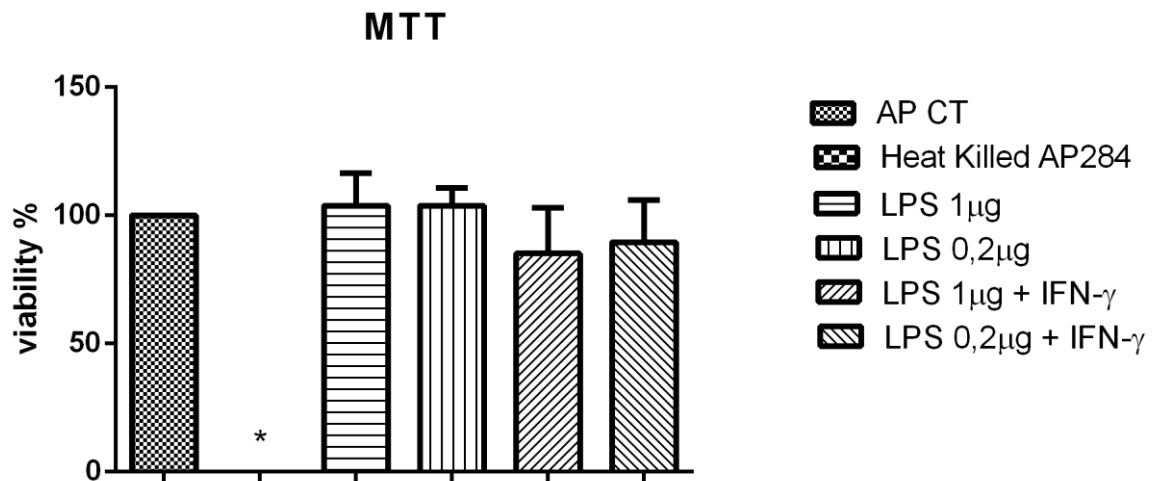


Figure S6

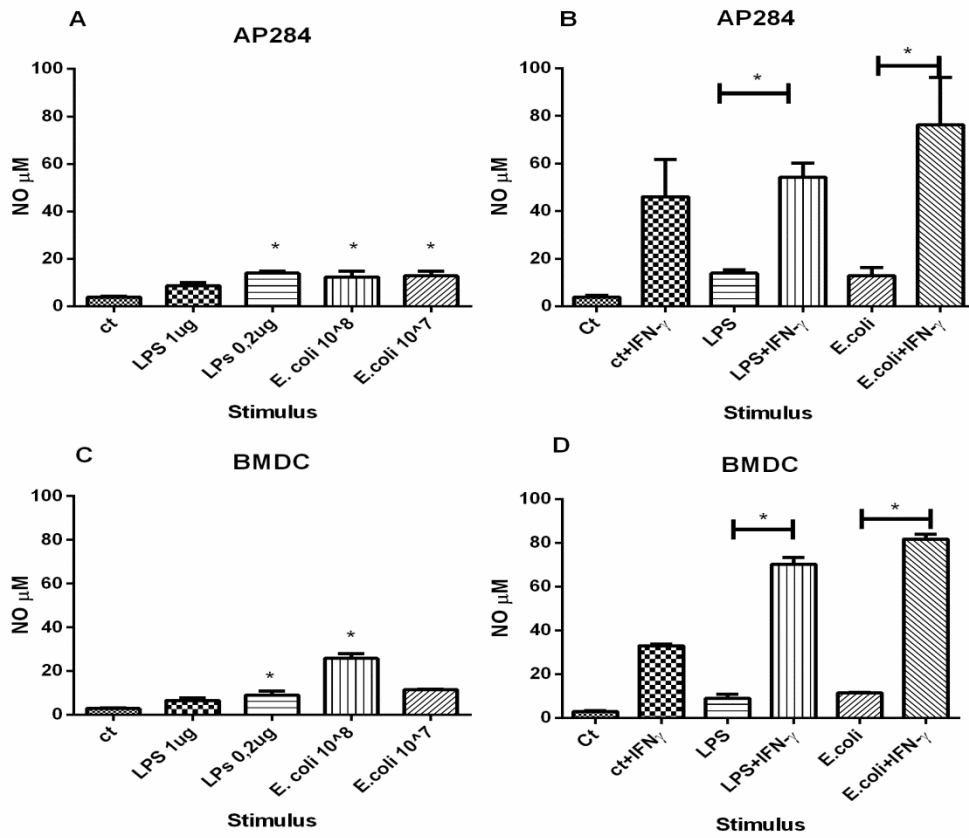
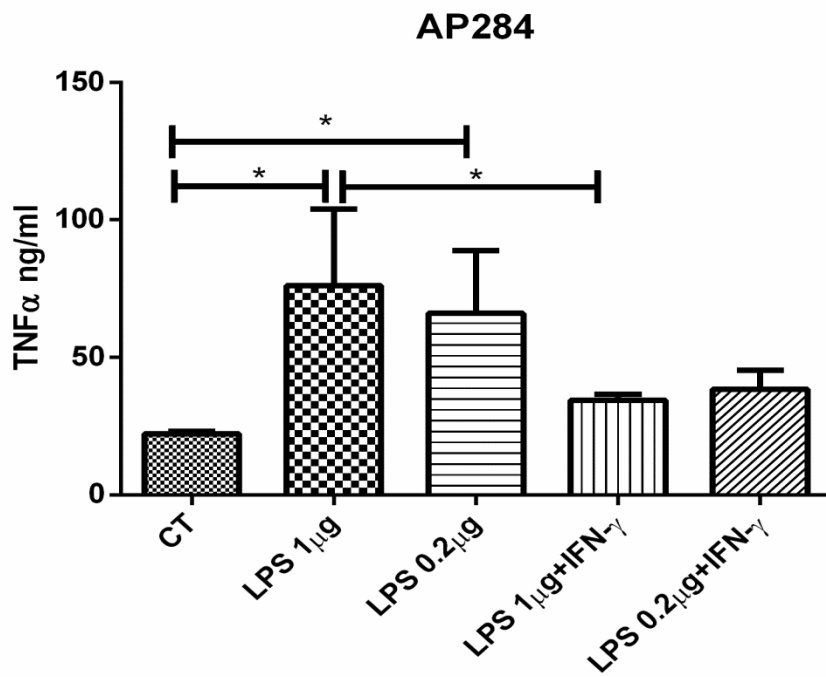


Figure S7



ARTIGO 2

Título Células dendríticas murinas imortalizadas: uma alternativa para o estudo de DCs

Pollyana Guimarães de Oliveira^a, Fatima Ribeiro-Dias^a, Pieter Johannes Maria Leenen^b, Milton Adriano Pelli de Oliveira^{a*}.

^aInstituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N, Goiânia, Goiás, 74605-050, Brazil.

^bDepartment of Immunology, Erasmus University Medical Center, Doctor Molewaterplein 40, 3015 GD, Rotterdam, Netherlands.

*Corresponding author: Milton Adriano Pelli de Oliveira. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N, Goiânia, Goiás, 74605-050, Brazil. Phone: +55 62 32096126; FAX +55 62 32096363. e-mail: miltonoliveira.ufg@gmail.com

Resumo

Células dendríticas (DCs) são células chave do sistema imune e possuem um importante papel de ligar a imunidade inata à imunidade adquirida. A principal forma de se obter DCs para estudos derivando estas células de precursores é do sangue periférico da medula óssea. Porém, porém ambos os procedimentos trazem desvantagens e são trabalhosos. A utilização de DCs murinas imortalizadas constitui uma excelente alternativa, uma vez que estas células são de fácil cultivo e podem ser congeladas por longos períodos. Uma variedade de DCs imortalizadas já foram descritas e todas as apresentam as características fundamentais de DCs, como prolongamentos de membranas, perfil pouco aderente em cultura, expressão de moléculas de MHC e moléculas co-estimuladoras. Grande parte destas células imortalizadas foi obtida por inserção de retrovírus oncogênicos, gerando células que podem ser ou não dependentes de fatores de crescimento. Outras são mantidas com fatores de crescimento, mas não possuem oncogenes. Outras ainda são derivadas de tumores espontâneos e são as de mais fácil manutenção. Nesta revisão serão comparadas as diversas características das DCs murinas imortalizadas descritas até hoje, como origem, marcadores e citocinas produzidas.

Introdução

As Células dendríticas (DCs) são responsáveis por iniciar a resposta imune adquirida, pois possuem o importante papel de capturar e apresentar antígenos a linfócitos T virgens. A apresentação de antígenos por DCs ocorre através de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade MHC de classe I ou II, que são menos expressos quando DCs apresentam um perfil imaturo e mais expressos após o seu amadurecimento. Além disso, DCs maduras possuem uma maior expressão de moléculas co-estimuladoras como DC80 e CD86, o que potencializa a capacidade dessas células em ativar linfócitos T virgens (Young, Koulova et al. 1992, Shortman and Liu 2002).

DCs não só possui a capacidade de iniciar a resposta de linfócitos, como também a de induzir a geração de diferentes perfis destas células. Essa diferenciação depende principalmente das citocinas produzidas no ambiente de ativação dos linfócitos T, especialmente aquelas produzidas por DCs (Ganguly, Haak et al. 2013). A IL-12 e IFN- γ são as principais citocinas que induzem a diferenciação do perfil de resposta Th1. A IL-12 é produzida principalmente por DCs e o IFN- γ é produzido inicialmente por células NK. Posteriormente, a principal fonte de IFN- γ passa a ser os próprios linfócitos Th1 (Yamane and Paul 2013).

A IL-4 é importante para a ativação do perfil de linfócitos Th2, porém esta citocina não é produzida por DCs (Goswami and Kaplan 2011). Alguns estudos relatam que a diferenciação de linfócitos Th2 é induzida a partir da IL-4 produzida por mastócitos e outras células da imunidade inata ou durante processos alérgicos. Posteriormente, a principal fonte de IL-4 também passa a ser os próprios linfócitos Th2 (Holgate 2012). O perfil Th17 é gerado a partir das citocinas TGF- β e IL-6, que assim como a IL-12 são produzidas principalmente por DCs. A principal citocina produzida pelo perfil de resposta Th17 é a IL-17 (Bettelli, Carrier et al. 2006). A IL-23 produzida por DCs é uma citocina que tem sido descrita como importante para manutenção e amplificação deste último perfil (Espinosa and Rivera 2012, Hargadon 2013).

DCs funcionam como células sentinelas e estão distribuídas em locais estratégicos para o reconhecimento e captura de micro-organismos (Banchereau and Steinman 1998). Elas vêm recebendo diferentes classificações ao longo do tempo, pois podem desempenhar diferentes funções de acordo com o local em que estejam e podem expressar diferentes marcadores em suas superfícies, além disso, DCs podem ter origem de diferentes progenitores. Sendo assim, algumas populações já classificadas são as DCs clássicas ou convencionais (cDCs), células dendríticas plasmocitóides (pDCs), células de

Langerhans na pele (LC), células dendríticas derivadas de monócitos (moDC) e células dendríticas inflamatórias (inf-DC) (Guilliams, Henri et al. 2010, Austyn 2016)

Devido as importantes funções desempenhadas por DCs, elas são amplamente utilizadas em pesquisas científicas. Para o estudo em laboratórios, DCs podem ser obtidas a partir de monócitos do sangue periférico de humanos ou a partir da extração da medula óssea de camundongos (Chopin, Allan et al. 2012). Em relação a está última abordagem, sabe-se que não é possível recuperar uma quantidade satisfatória de DCs para alguns experimentos e que isso leva a eutanásia de muitos animais (Guo, Zhou et al. 2016). Algumas linhagens de DCs com perfil imortalizado vêm sendo geradas para facilitar o estudo destas células em laboratório. Estas linhagens têm sido uma alternativa para superar as dificuldades de obtenção de uma quantidade satisfatória de DCs e consequente diminuição da eutanásia de animais. Além disso, estas linhagens podem ser cultivadas *in vitro* de acordo com os padrões clássicos de cultivo e mantidas em cultura por um longo tempo (Fuertes Marraco, Grosjean et al. 2012).

A disponibilidade de diferentes populações de DCs imortalizadas para estudos é de grande relevância, uma vez que elas podem disparar diferentes perfis de reposta imune, produzir diferentes tipos de citocinas e apresentarem diferentes estágios de maturação. Todas estas variações contribuem para uma melhor compreensão destas células e possibilita a manipulação do seu comportamento *in vitro* e *in vivo* para alterar a resposta imune adquirida desejada, inclusive para a elaboração de vacinas eficientes. Como existe uma grande variedade de DCs murinas imortalizadas descritas, esta revisão tem o objetivo de comparar estas diferentes linhagens de DCs. Relatamos aqui como estas células foram originadas e quais as suas principais características fenotípicas e quais as principais citocinas que elas produzem. Destacamos também a mais recente DC imortalizada descrita, AP284 e seu papel na indução de uma resposta Th17.

Linhagens de DC murinas geradas pela utilização da inserção de retrovírus oncogênicos independentes de fatores de crescimento.

A geração de DC imortalizadas teve início em 1993 (Paglia, Girolomoni et al. 1993), tendo como referência as metodologias para geração de macrófagos imortalizados (Ricciardi-Castagnoli and Paglia 1992). A primeira DC imortalizada descrita foi a CB1 originada de camundongos DBA/2. As células CB1 foram geradas a partir da utilização de retrovírus recombinantes possuindo o v-myCMH2, um oncogene aviário. O genoma retroviral foi clonado e transfectado em células do baço de camundongos DBA/2 em

cultura, as quais expressavam a molécula co-estimuladora B7 e a molécula de adesão ICAM-1 (Paglia, Girolomoni et al. 1993).

Células CB1 apresentam alta expressão de moléculas MHC I, uma expressão intermediária ou alta de moléculas MHC II e alta expressão de CD86 (Paglia, Girolomoni et al. 1993). Elas são capazes de estimular a proliferação de linfócitos T, induzindo uma reação mista de linfócitos (MLR). O estímulo com GM-CSF, tem a capacidade de aumentar a capacidade de ativação de linfócitos por células CB1 e após serem estimuladas, elas passam a apresentar um perfil maduro, com maior expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC II (Paglia, Girolomoni et al. 1993).

Outra linhagem de DC gerada de forma semelhante foi à linhagem D2SC/1. A linhagem D2SC/1 foi isolada a partir de camundongos BALB/c, seguindo protocolo semelhante à geração das células CB1 (Granucci, Girolomoni et al. 1994). Esta linhagem de DC também é caracterizada por expressar moléculas de superfícies características de DCs e também possuem a capacidade de estimular linfócitos *in vitro* (Granucci, Girolomoni et al. 1994). Células D2SC/1, assim como células CB1, possuem alta expressão de molécula de MHC I e intermediária a alta expressão de moléculas MHC II, porém, menor expressão de CD86, sendo caracterizada com um perfil semi-maduro (Granucci, Girolomoni et al. 1994).

Outra linhagem de DC imortalizada pela utilização da metodologia de oncogene retroviral foi a FSDC obtidas de camundongos após o cruzamento C57Bl/6 x DBA/2 F1 (Girolomoni, Lutz et al. 1995). Estas células foram geradas para se obter populações de DC que se assemelhassem às células de Langerhans na pele (LC) e substituir aquelas derivadas a partir de progenitores da medula óssea (Guilliams, Henri et al. 2010). A infecção de células da epiderme retiradas de fetos de camundongos foi feita em cultura com o vetor retroviral MIB-YN11 recombinante, (Girolomoni, Lutz et al. 1995).

As FSDCs apresentam dendritos em suas membranas, são pouco aderentes inicialmente e tornam-se mais aderentes com o passar dos dias em cultura. Elas apresentam baixa expressão do receptor scavenger, como ocorre com as LCs, e compartilham características entre DCs e macrófagos como a alta capacidade de proliferar na presença de GM-CSF, mas baixa na presença de M-CSF. Células FSDC, apresentam um perfil mais imaturo que as células CB1 e D2SC/1, sendo reportada uma baixa expressão de moléculas de MHC I e MHC II, baixa expressão de moléculas co-estimuladoras CD86 e ausência de CD80. Normalmente, são capazes de estimular poucos linfócitos T, fortalecendo a ideia que se apresentam em um estágio imaturo, porém, são

capazes de ativar linfócitos T eficientemente após estímulos com GM-CSF e IFN- γ , sugerido que podem amadurecer após estes estímulos (Girolomoni, Lutz et al. 1995).

A linhagem tsDC foi gerada a partir de camundongo transgênico com inserção do gene da oncoproteína termo sensível do vírus de símios 40 (SV40) sob o controle do promotor de MHC II e retrocruzado em camundongos da linhagem CBA. Como a proteína é termolábil, observa-se proliferação celular na temperatura de 33°C, mas não em temperaturas iguais ou superiores a 37°C (Volkman, Neefjes et al. 1996). Na temperatura de 33°C, as células tsDC exibem características de células imaturas e após mudança de temperatura para 39°C, elas param de se dividir e aumentam a expressão de alguns marcadores de superfície como CD80 CD40 e CD11c (Volkman, Neefjes et al. 1996). Na temperatura de 37°C, estas células não expressam moléculas de MHC I e possuem de baixa a intermediária expressão de moléculas de MHC II, CD40, CD80 e CD86 (Volkman, Neefjes et al. 1996, Hargadon 2016). Células tsDCs também são capazes em apresentar antígenos e ativar linfócitos T de maneira dependente da ligação a CD28 (Volkman, Neefjes et al. 1996).

Linhagens de DC murinas geradas pela utilização da inserção de retrovírus oncogênicos dependentes de fator de crescimento

Algumas linhagens de DCs murinas, além de serem geradas pela inserção de oncogenes, necessitam de fatores de crescimento para sua proliferação. A linhagem DC2.4 foi obtida da medula óssea de camundongos C57/BL6 e depende da adição de GM-CSF para a sua proliferação. Células DC2.4 estão dentre as DCs mais bem caracterizadas até o momento (Shen, Reznikoff et al. 1997, Hargadon 2016). Os clones de DC2.4 possuem características fenotípicas semelhantes a DCs convencionais, apresentam longos dendritos de membrana e possuem um perfil em cultura de células aderentes ou flutuantes. Elas são capazes de sobreviver em cultura por até 6 meses e podem ser congeladas após este prazo (Shen, Reznikoff et al. 1997). Esta linhagem também apresenta característica semi-madura em repouso, porém, é capaz de aumentar a expressão de moléculas de MHC e moléculas co-estimuladoras após estímulos com citocinas ou estímulos com agonistas de TLRs (Brown, Zhang et al. 2000, Rhule, Rase et al. 2008, Hargadon 2013). Células DC2.4 possuem alta expressão de moléculas MHC I e expressão baixa ou intermediária de moléculas MHC II, CD80 e CD86 (Hargadon 2016).

Dentre os ensaios funcionais das células DC2.4 destaca-se a capacidade dessas células capturar, processar e apresentar os antígenos do vírus recombinante da varicela de

aves e raposa (rFWPV) em moléculas de MHC I para ativar linfócitos T após infecção. A infecção com rFWPV, por sua vez aumenta a expressão de moléculas co-estimuladoras por DC2.4 (Brown, Zhang et al. 2000). Células DC2.4 também mostraram-se eficientes em na apresentação cruzada de antígenos exógenos a linfócitos T, contribuindo para ampliar os conhecimentos sobre esta forma de apresentação para potencialização de ativação do sistema imune (Imai, Hasegawa et al. 2005). Células DC2.4 também foram utilizados em estudos com células tumorais, sendo demonstrado que células de melanoma foram capazes de inibir a maturação de DC2.4 evidenciado pela diminuição da expressão de moléculas co-estimuladoras e de MHC II (Hargadon, Forrest et al. 2012).

A linhagem SVDC foi gerada de forma semelhante à tsDC de camundongo transgênico com a oncoproteína T grande do SV40. Entretanto, células SVDC foram isoladas da medula óssea de camundongos retrocruzados na linhagem C57BL/6. Ao contrário da tsDC, células SVDC precisam de GM-CSF em cultura para a sua proliferação. O fenótipo das células SVDC é similar ao fenótipo da tsDC a 33 °C (Ebihara, Endo et al. 2004). Elas possuem um perfil viável por até 12 meses em cultura são capazes de induzir a proliferação de células T e produção de anticorpos específicos quando tratadas com OVA *in vivo* (Ebihara, Endo et al. 2004). A linhagem SVDC possui alta expressão de moléculas de MHC I e moderada expressão de moléculas de MHC II, não expressam a molécula CD40, mas expressam moléculas CD80 e CD86 de forma intermediária e alta respectivamente (Hargadon 2016).

Linhagens de DCs murina dependentes de fator de crescimento

A geração de DCs pela inserção de oncogenes virais pode estar diretamente ligado ao fato de que a maioria dessas linhagens já possui um perfil semi-maduro, isso devido à interferência viral (Hargadon 2016). Para superar este impasse e diminuir a interferência de constituintes virais nas DCs, várias outras linhagens foram geradas de forma totalmente dependente de fatores de crescimento (Hargadon 2016). A linhagem de DC denominada D1 foi à primeira linhagem de DC gerada dependente de fator de crescimento. Esta linhagem foi isolada a partir do baço de camundongos C57BL/6 adultos e em cultura foram suplementadas com GM-CSF mais sobrenadante de fibroblastos NIH-3T3. Células D1 apresentam um perfil imaturo inicialmente e podem ser cultivadas *in vitro* por mais de 12 meses (Winzler, Rovere et al. 1997).

Os estudos iniciais com células D1 permitiram identificar pelo menos três estágios de maturação das DC. Células no estágio 1 foram caracterizadas como aderentes, com

alta taxa de proliferação e poucos dendritos. Neste primeiro estágio, células D1 apresentam baixa expressão da molécula CD40 e B7 e possuem alta capacidade de captação e processamento de antígenos (Winzler, Rovere et al. 1997). Células D1 passam do estágio 1 para o estágio 2 após serem estimuladas por bactérias vivas ou agonistas de TLRs, passando a produzir citocinas pró inflamatórias. Neste estágio, há baixa capacidade proliferativa das células, alta motilidade, perda de aderência, maior projeções de membranas e aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras (Winzler, Rovere et al. 1997). No estágio 3, células D1 demonstram incapacidade de proliferar e ao serem congeladas neste estágio, permanecem com o mesmo perfil maduro após descongelamento, logo entrando em apoptose, concluindo que células nos estágios 2 conservam genes de proliferação e renovação (Winzler, Rovere et al. 1997).

A linhagem D1 imatura é útil nos estudos dos mecanismos de apresentação cruzada (Rodriguez, Regnault et al. 1999, Guermonprez, Saveanu et al. 2003), ativação de células Th e CTL (Schuurhuis, Laban et al. 2000) e regulação da produção de exossomos. Células D1 no estágio maduro são úteis para geração de memória induzidas por DC (Thery, Regnault et al. 1999).

Outra linhagem de DC imortalizada dependente de fatores de crescimento é a JAWSII, derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 deficientes no gene p53, um gene supressor de tumores (Jiang, Shen et al. 2008). Células JAWSII possuem um perfil imaturo, porém são capazes de amadurecer após infecção por clamídia e induzir uma resposta protetora contra esta bactéria. Além disso, após os estímulos com clamídia, esta linhagem aumenta expressão de moléculas co-estimuladoras e são capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T (Jiang, Shen et al. 2008). Células JAWSII possuem uma sobrevivência de 50% a 80% maior após infecção por clamídia em comparação com BMDCs (Jiang, Shen et al. 2008) e tem sido utilizada para o estudo de resposta imune contra tumores e em vacinas (Otsu, Gotoh et al. 2006).

Outra linhagem de DC é a denominada SP37A3 obtida a partir de esplenócitos de camundongos C57BL/6 dependente de M-CSF e GM-CSF (Bros, Jahrling et al. 2007). Células SP37A3 possuem fenótipo de DCs imaturas e podem amadurecer após estímulos com citocinas pró-inflamatórias, além de serem capazes de ativar linfócitos T (Bros, Jahrling et al. 2007). Esta linhagem em seu estado imaturo, apresenta baixa expressão de moléculas MHC I e média expressão de MHC II, apresentando também baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, como CD40, CD80 e CD86 (Hargadon 2016).

Algumas linhagens de DCs dependentes de fatores de crescimento foram originadas a partir de pele de camundongos (Hargadon 2016). As células 80/1 e 86/2 foram obtidas a partir da epiderme de fetos de camundongos C3H. A geração destas linhagens foi induzida por ativação com GM-CSF, IL-2 e ConA, sendo que esta linhagem pode ser mantidas por mais de dois anos em cultura depende da presença destes fatores de crescimento. Dentre as suas características destaca-se a capacidade de ativar células TCD8+, devido à elevada expressão de moléculas de MHC I, porém, elas são incapazes de ativar células TCD4+, pois não expressam MHC II. As linhagens 80/1 e 86/2 exibem morfologia semelhante às outras DCs descritas anteriores, como a presença de prolongamentos semelhantes a dendritos em suas membranas. A ausência de moléculas de MHC II nestas células indica um perfil celular parecido com LCs fetal (Elbe, Schleisnitz et al. 1994).

Outras linhagens com perfil semelhante à LCs foram obtidas da epiderme de camundongos BALB/c e camundongos A/J na presença de GM-CSF e sobrenadante de fibroblastos NS47 (Ariizumi, Shen et al. 2000). Estas linhagens foram denominadas como séries XS. Estudos com a linhagem XS52 têm contribuído para o conhecimento molecular das DC, uma vez que o intuito de avaliar a expressão gênica em DCs e macrófagos J744, foram construídas bibliotecas de cDNA, onde foi verificado que a linhagem XS52 expressa genes específicos, que não estão presentes em macrófagos J744. O principal gene verificado foi o gene para dectina-1, um receptor que reconhece moléculas fúngicas. Foi visto que dectina-1 nesta linhagem de DC funcionou como uma molécula co-estimuladora, aumentando a interação desta linhagem com linfócitos T e aumentando a ativação destes linfócitos (Ariizumi, Shen et al. 2000).

Linhagens de DCs murina derivadas de tumores

Algumas células com perfil de DCs podem ser isoladas a partir de tumores. Além de essas células possuírem a vantagem de crescerem como todas as demais descritas, elas não necessitam de nenhum fator de crescimento para sua manutenção em cultura e podem ser mantidas por longos períodos. A linhagem CY15 foi isolada de um histiocitoma de camundongos C57BL/6 deficientes para IFN- γ que sofreram metástase para o baço (Hargadon 2016). A partir de análises mais detalhadas destas células tumorais, foi visto sua capacidade em capturar e apresentar antígenos, além de produzirem citocinas (Kammertoens, Willebrand et al. 2005). Células CY15 possuem um perfil imaturo, com

uma baixa expressão de moléculas MHC I e MHC II e também uma baixa expressão de moléculas co-estimuladoras (Kammertoens, Willebrand et al. 2005).

A linhagem mutuDC foi isolada de camundongos C57Bl/6 transgênicos para SV40LT a partir de um tumor do baço (Fuertes Marraco, Grosjean et al. 2012). Células mutuDC são eficientes na apresentação cruzada de antígenos, pois possuem alta expressão tanto de moléculas MHC I quanto MHC II, além de serem positivas para as moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 (Hargadon 2016). Após 50 passagens da linhagem em cultura, as mesmas se tornam inviáveis para o uso, pois perdem a sua capacidade de produzir algumas citocinas e se tornam menos eficientes na ativação de linfócitos T (Fuertes Marraco, Grosjean et al. 2012). A linhagem mutuDCs pode ser modificada por lentivirus para produção de proteínas de interesse relacionadas à DC, como geração de linhagens positivas para TLRs específicos, bem como linhagens que expressam fatores de transcrições também específicos. Estas abordagens contribuem para a melhor compreensão do comportamento de DC *in vitro* e sua utilização *in vivo* (Fuertes Marraco, Grosjean et al. 2012).

A mais recente linhagem de DC de origem tumoral descrita é a AP284. As células AP284 foram obtidas de um tumor espontâneo do baço de um camundongo macho (F1: C57bL/6 X CBA-H2b/q) (Klasen, de Jong et al. 1988). Estas células foram descritas inicialmente como macrófagos maduros, porém, em um estudo recente foi demonstrado que células AP284 possuem características fenotípicas semelhantes à DC, como prolongamentos semelhantes a dendritos nas membranas, alta expressão de MHC II e capacidade de apresentar antígenos para linfócitos T de forma eficiente (Klasen, de Jong et al. 1988) (Oliveira et al., Submetido)

Células AP284 são capazes de responder a vários agonistas de TLRs em cultura, o que leva a sua ativação e aumento de projeções em suas membranas e estes estímulos são capazes de induzir o aumento da produção de uma variedade de citocinas por estas células (Oliveira et al., Submetido). A linhagem AP284 é facilmente mantida em cultura, uma vez que possuem aderência intermediária, podem ser mantidas por um longo período, havendo recuperação de um grande número das células. Além do mais, células AP284 podem ser mantidas por anos congeladas sem perder a sua capacidade proliferativa e características iniciais (Oliveira et al., Submetido).

Marcadores de superfícies expressos por linhagens de DCs murinas imortalizadas

Além da expressão de moléculas de MHC I ou II e moléculas co-estimuladoras, as DC expressam diferentes marcadores que são importantes para a caracterização de diferentes subtipos celulares. Neste tópico será descrito os marcadores mais expressos pelas linhagens imortalizadas descritas até aqui, bem como os marcadores em comum entre elas (Tabela 1).

As células CB1 expressam moléculas de adesão como CD44, CD11c e ICAM-1 e possuem expressão intermediária de 33D1, FLA-1 e MAC-1. A expressão de 33D1 e CD11c tem sido relatada em populações de DCs do baço, importantes para ativação de linfócitos T neste local (Stolley and Campbell 2016). Células CB1 expressam baixos níveis de F4/80 e FcγRII quando comparados a uma linhagem de macrófago (Paglia, Girolomoni et al. 1993). Células FSDC expressam altos níveis de CD45 e são negativas para marcadores CD3, CD4 e CD8. Diferentes de células CB1, células FSDC expressam altos níveis de F4/80 e semelhante a elas expressam CD11b (MAC-1) e baixos níveis de CD11c, ICAM-1 e receptor FcγRII. Desta forma, células FSDC são semelhantes a células progenitoras mielóides que compartilham características de DCs e macrófagos (Girolomoni, Lutz et al. 1995).

A linhagem SRDC expressa as moléculas CD8, CD11c, CD205 e a molécula Fas CD95. A expressão dessas moléculas aumenta após o estímulo com LPS. Estas células não expressam CD4, CD11b ou CD107b (Ruiz, Beauvillain et al. 2005). A linhagem tsDC expressa as molécula de adesão ICAM-1 e VCAM1 e também expressam marcadores encontrados em macrófagos como receptores Fc, F4/80 e CD11b. Porém, diferentes de macrófagos, células tsDC expressam de forma constitutiva NLDC145 (CD205) e CD11c (Volkman, Neefjes et al. 1996).

A linhagem DC2.4 expressam uma variedade de receptores comuns de DC e não possuem marcadores de células T ou células B. Células DC2.4 expressam o receptor CD32 (FcγRII), a molécula de adesão CD54, DEC-205, 33D1 e CD11b (Shen, Reznikoff et al. 1997). A linhagem SVDC também se mostrou negativa para marcadores de linfócitos T e B e positivas para o marcador hematopoiético CD45, além de expressarem CD11c e CD11b (Ebihara, Endo et al. 2004).

A linhagem D1 é uma linhagem que expressa uma variedade de marcadores. Possuem marcadores característicos de células mielóides, como CD11c e marcadores comuns a leucócitos como FcFγRII/III e F4/80 e CD145, este último com baixa expressão. Os receptores de adesão e homing, como CD11a, CD11b, D54 e VLA-4, são

altamente expressos por esta linhagem (Winzler, Rovere et al. 1997). A linhagem JAWS II em repouso se assemelha a um tipo de DC mielóides com alta expressão de CD11b, CD11c, MHC I e ICAM-1 / CD54 (Jiang, Shen et al. 2008). As células SP37A3 também se assemelha a DCs de origem mielóide, com expressão de CD11c, CD11b, CD32 e CD205. Células SP37A3 expressam a molécula acessória CD54, envolvida na interação de DCs com linfócitos T e expressa o receptor CD25, importante para a proliferação celular, pela resposta a IL-2 e o receptor para TNF- α CD120 (Bros, Jahrling et al. 2007). Alguns estudos conseguiram isolar tipos de DCs semelhantes à LC, como citado anteriormente, alguns exemplos dessas linhagens, são as células 80/1, 86/2. Estas células são CD3 negativas e positivas para Mac-2, CD18, CD44, CD32. São positivas também para moléculas de adesão ICAM-1 (Elbe, Schleisitz et al. 1994).

Das DC isoladas de tumores podemos citar que a linhagem CY15 exibe baixa expressão de moléculas CD11c e alta expressão de moléculas CD11b (Kammertoens, Willebrand et al. 2005). A linhagem mutuDC são CD8 α positivas, Clec9A (receptor de lectina), DEC205 e CD24 (molécula de adesão) positivas (Fuertes Marraco, Grosjean et al. 2012). A linhagem de DC mais recentemente caracterizada, AP284, expressa várias moléculas encontrada em DCs, como 33D1, CD11c, CD11b, CD107b e ER-TR9. Além de expressarem a molécula de MHC II (Oliveira et al., Submetido).

Tabela 1. Marcadores de superfícies presentes em linhagens de DCs murinas

Linhagem	Origem	Moléculas co-estimuladoras	Molécula MHC I	Molécula MHC II	Marcadores de superfícies
CB1	DB2/2 Baço	CD80	Sim	Sim	CD44 ⁺ CD11c ⁺ 33D1 ⁺
D2SC/1	Balb/c Baço	CD80	Sim	Sim	NT
FSDC	DBA/2 x C57Bl/6 Pele fetal	CD40/CD86	Sim	Sim	CD45 ⁺ CD11b ⁺ Cd11c ^{low}
SRDC	CBA/J	CD40/CD80/CD86	Sim	Sim	CD8 ⁺ CD11c ⁺ CD205 ⁺ CD95 ⁺
tsDC	CBA Medula óssea	CD40/CD80/CD86	NT	Sim	CD205 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺
DC2.4	C57Bl/6 Medula óssea	CD80/CD86	Sim	Sim	33D1 ⁺ CD11b ⁺ CD32 ⁺ CD54 ⁺ DEC205 ⁺
SVDC	C57Bl/6 Medula óssea	CD40/CD86	Sim	Sim	CD11b ⁺ CD11c ⁺ CD45 ⁺
D1	C57Bl/6 Baço	CD40/CD80/CD86	Sim	Sim	CD11c ⁺ CD11b ⁺ CD54 ⁺ CD45 ^{low}

JAWS II	C57Bl/6 Medula óssea	CD40/CD80/CD86	Sim	Sim	CD11c ⁺ CD11b ⁺ CD54 ⁺
SP37A3	C57Bl/6 Baço	CD40/CD80/CD86	Sim	Sim	CD120 ⁺ CD25 ⁺ CD54 ⁺
80/1 86/2	C3H pele fetal	CD80	Sim	Não	CD18 ⁺ CD44 ⁺ CD32 ⁺
CY15	Balb/c baço	CD40/CD80/CD86	Sim	Sim	CD11b ⁺ CD11c ^{low}
mutuDC	C57Bl/6 Baço	CD40/CD80/CD86	Sim	Sim	CD8 α ⁺ Clec9A ⁺ DEC205 ⁺ CD24 ⁺
AP284	C57bL/6 X CBA Baço	CD40/CD80	NT	Sim	CD11c ⁺ 33D1 ⁺ CD209 ⁺

Abreviações: NT= não testado

Produção de citocinas por DCs murinas imortalizadas e a surpreendente produção de IL-12p40 pela linhagem AP284

Sabe-se que uma das principais funções das DCs é produzir diferentes tipos de citocinas para direcionar os diferentes perfis de linfócitos T. (McLaren, Michael et al. 2011). As CB1 e D2SC/1 expressam mRNA para TGF- β que não se altera após estímulos com LPS ou IFN- γ . Células D2SC/1 aumentam a produção de TGF- β após o estímulo com GM-CSF (Granucci, Girolomoni et al. 1994). Células CB1 e D2SC/1 possuem baixa expressão de mRNA para TNF- α quando não estimuladas e aumentam a expressão 6 h após estímulos com LPS. Células CB1 e D2SC/1 não são capazes de produzir IL-12, sendo esta uma citocina de grande relevância para ativação do perfil de resposta Th1. Células D2SC/1, mas não CB1 expressam o gene para IL-1 α e IL-1 β após estímulos com LPS, mas não secretam IL-1 α em cultura. Ambas as linhagens apenas expressam levemente o gene para IL-6 (Granucci, Girolomoni et al. 1994).

A linhagem SVCD produz IL-12p70 24 e 48 h após estímulos com *Toxoplasma gondii*, e produz IL-4 após estímulo com LPS. Elas também produzem alta quantidade de IL-6 além da produção de IL-2, IL-5 e IL-10 (Ruiz, Beauvillain et al. 2005). A linhagem D1 madura é capaz de produzir IL-12p70 após estímulos com TNF- α . (Winzler, Rovere et al. 1997). Células JAWS II após estímulos com antígenos de *Chlamidia* por 48 h produzem quantidades significativas de IL-12p40 e não são capazes de produzir IL-10 (Jiang, Shen et al. 2008).

A linhagem DC2.4 é capaz de produzir alta quantidade de TNF- α e IL-6 após estímulos com agonistas de TLRs, como LPS, CpG e poly(I:C) (Rhule, Rase et al. 2008) e a linhagem CY15, produz quantidade significativa de IL-12p40 de TNF- α após

estímulos com LPS (Kammertoens, Willebrand et al. 2005). A linhagem mutuDC também após estímulos com CpG e poly(I:C) é capaz de produzir elevadas quantidades de IL-12p40/p70 (Fuertes Marraco, Grosjean et al. 2012).

Deve ser destacado que a linhagem mutoDC expressa em sua superfície diferentes TLRs, como TLR3, TLR4 e TLR9, porém não expressam TLR7 (Fuertes Marraco, Grosjean et al. 2012). A linhagem AP284 também expressa diferentes TLRs, como TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 e diferente da linhagem mutuDC, expressa TLR7 (Oliveira et al., Submetido). Estas últimas células respondem aos agonistas de LPS, zymosan, FSL-1, resiquemod, CpG e flagelina, produzindo uma quantidade surpreendente de IL-12p40 (quantidade superior a 500 ng/mL), o que não foi descrito para nenhuma outra linhagem de DC imortalizada até o momento. Além disso, células AP284 também são capazes de produzir IL-23 e IL-6 de forma significativa. Contudo, células AP284 não são capazes de produzir IL-12p70 (Oliveira et al., Submetido).

Todas as citocinas produzidas pelas diferentes linhagens de DCs descritas até aqui, são de importante relevância para melhor compreensão da atuação dessas células, tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro*. Uma vez que o melhor conhecimento dessas diferentes linhagens permite a interferência em suas funções, podendo isso ser de extrema importância para produção de fármacos, estudo de vacinas, supressão de doenças, entre outros.

AP284, uma linhagem de DC envolvida com o perfil de resposta Th17

Sabe-se que a geração de cada grupo de linfócito Th é dependente dos tipos de citocinas produzidas por DCs (Otsu, Gotoh et al. 2006, Sallusto 2016). Atualmente, há pelo menos quatro subpopulações de células Th bem definidos, sendo Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Treg) (Brossart, Goldrath et al. 1997, Yamane and Paul 2013). IL-12 e IFN- γ são as principais citocinas que induzem a sinalização para a diferenciação de linfócitos Th1 (Brossart, Goldrath et al. 1997, Yamane and Paul 2013). O perfil de linfócitos Th2 é dependente da produção de IL-4 (Elbe, Schleisnitz et al. 1994, Goswami and Kaplan 2011) e o perfil Th17 depende de TGF- β , IL-1 e IL-6 produzidas por DC. As citocinas IL-21 e IL-23 desempenham as funções de amplificação e manutenção deste perfil de resposta respectivamente (Bettelli, Carrier et al. 2006).

A linhagem AP284 tem a capacidade de produzir IL-12p40, IL-6 e IL-23, que podem ser relacionadas com a indução de um perfil Th17. A ausência da produção IL-12p70 favorece ainda mais a geração de Th17, já que os linfócitos não são estimulados

para o perfil Th1 eficientemente. Estudos *ex vivo* com esta linhagem celular confirmou a sua capacidade de induzir a produção da citocina IL-17 por linfócitos de camundongos imunizados com CFA (Oliveira et al., Submetido). Até o momento, todas as linhagens descritas foram mais relacionadas com a geração do perfil de resposta Th1, devido à produção de IL-12p70. A abordagem de que a linhagem AP284 esta relacionada com o perfil de resposta Th17 abre novas portas para a pesquisa de indução ou inibição deste perfil de resposta. Não podendo deixar de lado o fato de que a excessiva produção de IL-12p40 por células AP284 pode ser útil para o estudo da citocina, uma vez que o homodímero de IL12p40 possui funções biológicas como induzir a produção de NO por células da microgliais de camundongos (Dutta, Bandyopadhyay et al. 2005).

Perspectivas

Devido a sua importante atuação no sistema imunológico, DCs são amplamente utilizadas em laboratórios para pesquisa científica (Richter, Thieme et al. 2013). Sendo assim, muitos estudos vêm descrevendo uma ampla variedade de DCs imortalizadas, pois a disponibilidade destas células em laboratório trazem muitas vantagens. Linhagens imortalizadas podem ser cultivadas por um longo período, crescem de forma indefinida e conseqüentemente é possível obter uma quantidade satisfatória dessas células em cultura. Além do mais, a eutanásia de animais se torna desnecessária com a utilização destas células (Fuertes Marraco, Grosjean et al. 2012).

Todas as linhagens descritas até o momento apresentam as características fundamentais de DCs, como prolongamentos de membranas, perfil aderente em cultura e expressam moléculas de MHC, uma vez que a principal função destas células é a de apresentar antígenos a linfócitos T. As DCs imortalizadas foram geradas de diferentes formas. Uma das formas para geração destas células foi a utilização de retrovírus oncogênicos (Paglia, Girolomoni et al. 1993).

As linhagens CB1, D2SC/1, FSDC e tsDC são exemplos de linhagens de DCs geradas com a utilização de oncogenes (Hargadon 2016). Fatores de crescimento também são amplamente utilizados para isolar células em cultura e induzir a sua proliferação. Algumas linhagens de DCs, além de serem portarem oncogenes virais, também necessitam de estímulos com fatores de crescimento, o mais utilizado é o GM-CSF (Hargadon 2016). A linhagem DC2.4 e a linhagem SVDC são exemplos de DCs imortalizada com oncogenes dependente de GM-CSF (Shen, Reznikoff et al. 1997, Ebihara, Endo et al. 2004). Outras linhagens de DCs podem ser mantidas apenas com

fator de crescimento,, alguns exemplos destas linhagens são as células D1, a JAWSII, e SP37A3 (Winzler, Rovere et al. 1997, Bros, Jahrling et al. 2007, Jiang, Shen et al. 2008). Outras linhagens foram isoladas de tumores de camundongos pela sua capacidade proliferativa (Folkman 1992). A partir de alguns tumores, foi possível a identificação de células com perfil de DCs. As células CY15 foram isoladas a partir de um tumor histiócitos do baço e a linhagem de DC tumoral mais recente caracterizada, foi à linhagem AP284 (Klasen, de Jong et al. 1988, Kammertoens, Willebrand et al. 2005). Uma das vantagens de linhagens de DCs a partir de tumores é a maior facilidade em cultivá-las, uma vez que não necessitam da utilização de fatores de crescimento.

Dentre as principais características das DCs destaca-se a expressão de moléculas de MHC e de moléculas co-estimuladoras, sendo estas moléculas de extrema importância para a apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T respectivamente (Young, Koulova et al. 1992). Todas as linhagens de DCs imortalizadas descritas expressam moléculas de MHC II, com exceção das linhagens 80/1 86/2, que expressam apenas moléculas de MHC I. Além disto, todas expressam alguma molécula co-estimuladoras, como DD80, CD86 ou CD40. Os marcadores CD11c e 33D1 são marcadores típicos de DCs (Shortman and Liu 2002, Naik, Proietto et al. 2005), estando o primeiro presente em cDCs e o segundo em DCs localizadas no baço de camundongos. As linhagens SRDC, tsDC, SVDC, D1 e JAWS II expressam o marcador CD11c, porém as linhagens CB1 e AP284 expressam tanto CD11c quanto 33D1. A linhagem DC2.4 não expressa o marcador CD11c, mas expressa o marcador 33D1.

Algo que deve ser destacado é a capacidade dessas linhagens de produzir citocinas para desencadear um terceiro sinal de ativação de linfócitos T. Algumas das DCs imortalizadas são capazes de produzir IL-12 como as linhagens SVDC e D1, que produzem IL-12p70 e as linhagens JAWS II e CY15, que produzem IL-12p40. A linhagem SVDC também é capaz de produzir IL-6, assim como a DC2.4. É importante destacar que a linhagem DC2.4 além de IL-6, produz altas quantidades de TNF- α . A IL-12p70 é uma citocina que caracteriza o perfil de resposta Th1, assim, as linhagens que produzem esta citocina, provavelmente pode ter um perfil de resposta relacionado ao Th1, porém essa questão ainda não é totalmente elucidada.

A linhagem AP284 possui uma característica que a diferencia de todas as demais linhagens descritas até o momento, pois elas produzem uma quantidade surpreendente de IL-12p40. A quantidade de IL-12p40 produzida por células AP284 é única até o momento e isso pode ser de alta contribuição nos estudos sobre esta citocina, uma vez

que é descrito que o homodímero p40 pode desempenhar funções biológicas, além de poder formar o homodímero p80 que pode ter funções antagônicas aos da IL-12 (Holscher, Atkinson et al. 2001). Outra questão importante referente à linhagem AP284 é o seu envolvimento com o perfil de resposta Th17, uma vez que elas não são capazes de produzir IL-12p70, mas produzem IL-23 e IL-6 (Oliveira *et al.*, Submetido). Sabe-se que a IL-23 é importante para a manutenção e estabilização do perfil de resposta Th17 e a IL-6 é importante para a geração deste perfil de resposta (Langrish, McKenzie et al. 2004, Bettelli, Carrier et al. 2006). Essa ideia é ainda melhor sustentada devido ao fato de que linhagem AP284 induzir a produção de IL-17 por linfócitos de camundongos imunizados com CFA. Assim, esta linhagem pode ser uma boa ferramenta para o estudo e intervenção neste perfil de resposta (Oliveira *et al.*, Submetido).

É importante destacar que a maioria das linhagens de DCs imortalizadas foram isoladas a partir de camundongos de diferentes espécies e de tecidos distintos. Desta forma, estas células possuem perfis fenotípicos diferentes entre elas. Com isso, dependendo de suas características, podem vir a ser inseridas dentro de um dos perfis de classificação de DCs atuais. Esta questão é relevante, pois pode contribuir grandemente para aumentar os conhecimentos sobre as diferentes subpopulações de DCs descritas até o momento e ampliar as pesquisas em relação ao comportamento dessas células em cultura, sendo possível manipular o perfil de resposta imune de cada uma delas.

References

- Ariizumi, K., G. L. Shen, S. Shikano, S. Xu, R. Ritter, 3rd, T. Kumamoto, D. Edelbaum, A. Morita, P. R. Bergstresser and A. Takashima (2000). "Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning." *J Biol Chem* **275**(26): 20157-20167.
- Austyn, J. M. (2016). "Dendritic Cells in the Immune System-History, Lineages, Tissues, Tolerance, and Immunity." *Microbiol Spectr* **4**(6).
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-252.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-238.
- Bros, M., F. Jahrling, A. Renzing, N. Wiechmann, N. A. Dang, A. Sutter, R. Ross, J. Knop, S. Sudowe and A. B. Reske-Kunz (2007). "A newly established murine immature dendritic

cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid." *Blood* **109**(9): 3820-3829.

Brossart, P., A. W. Goldrath, E. A. Butz, S. Martin and M. J. Bevan (1997). "Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL." *J Immunol* **158**(7): 3270-3276.

Brown, M., Y. Zhang, S. Dermine, E. A. de Wynter, C. Hart, H. Kitchener, P. L. Stern, M. A. Skinner and S. N. Stacey (2000). "Dendritic cells infected with recombinant fowlpox virus vectors are potent and long-acting stimulators of transgene-specific class I restricted T lymphocyte activity." *Gene Ther* **7**(19): 1680-1689.

Chopin, M., R. S. Allan and G. T. Belz (2012). "Transcriptional regulation of dendritic cell diversity." *Front Immunol* **3**: 26.

Dutta, A., S. Bandyopadhyay, C. Mandal and M. Chatterjee (2005). "Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis." *Parasitol Int* **54**(2): 119-122.

Ebihara, S., S. Endo, K. Ito, Y. Ito, K. Akiyama, M. Obinata and T. Takai (2004). "Immortalized dendritic cell line with efficient cross-priming ability established from transgenic mice harboring the temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene." *J Biochem* **136**(3): 321-328.

Elbe, A., S. Schleisitz, D. Strunk and G. Stingl (1994). "Fetal skin-derived MHC class I+, MHC class II- dendritic cells stimulate MHC class I-restricted responses of unprimed CD8+ T cells." *J Immunol* **153**(7): 2878-2889.

Espinosa, V. and A. Rivera (2012). "Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation." *Cytokine* **58**(1): 100-106.

Folkman, J. (1992). "The role of angiogenesis in tumor growth." *Semin Cancer Biol* **3**(2): 65-71.

Fuertes Marraco, S. A., F. Grosjean, A. Duval, M. Rosa, C. Lavanchy, D. Ashok, S. Haller, L. A. Otten, Q. G. Steiner, P. Descombes, C. A. Luber, F. Meissner, M. Mann, L. Szeles, W. Reith and H. Acha-Orbea (2012). "Novel murine dendritic cell lines: a powerful auxiliary tool for dendritic cell research." *Front Immunol* **3**: 331.

Ganguly, D., S. Haak, V. Sisirak and B. Reizis (2013). "The role of dendritic cells in autoimmunity." *Nat Rev Immunol* **13**(8): 566-577.

Girolomoni, G., M. B. Lutz, S. Pastore, C. U. Assmann, A. Cavani and P. Ricciardi-Castagnoli (1995). "Establishment of a cell line with features of early dendritic cell precursors from fetal mouse skin." *Eur J Immunol* **25**(8): 2163-2169.

Goswami, R. and M. H. Kaplan (2011). "A brief history of IL-9." *J Immunol* **186**(6): 3283-3288.

Granucci, F., G. Girolomoni, M. B. Lutz, M. Foti, G. Marconi, P. Gnocchi, L. Nolli and P. Ricciardi-Castagnoli (1994). "Modulation of cytokine expression in mouse dendritic cell clones." *Eur J Immunol* **24**(10): 2522-2526.

Guermonprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert and S. Amigorena (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." *Nature* **425**(6956): 397-402.

Guilliams, M., S. Henri, S. Tamoutounour, L. Ardouin, I. Schwartz-Cornil, M. Dalod and B. Malissen (2010). "From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets." *Eur J Immunol* **40**(8): 2089-2094.

Guo, X., Y. Zhou, T. Wu, X. Zhu, W. Lai and L. Wu (2016). "Generation of mouse and human dendritic cells in vitro." *J Immunol Methods* **432**: 24-29.

Hargadon, K. M. (2013). "Tumor-altered dendritic cell function: implications for anti-tumor immunity." *Front Immunol* **4**: 192.

Hargadon, K. M. (2016). "Murine and Human Model Systems for the Study of Dendritic Cell Immunobiology." *Int Rev Immunol* **35**(2): 85-115.

Hargadon, K. M., O. A. Forrest and P. R. Reddy (2012). "Suppression of the maturation and activation of the dendritic cell line DC2.4 by melanoma-derived factors." *Cell Immunol* **272**(2): 275-282.

Holgate, S. T. (2012). "Innate and adaptive immune responses in asthma." *Nat Med* **18**(5): 673-683.

Holscher, C., R. A. Atkinson, B. Arendse, N. Brown, E. Myburgh, G. Alber and F. Brombacher (2001). "A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection." *J Immunol* **167**(12): 6957-6966.

Imai, J., H. Hasegawa, M. Maruya, S. Koyasu and I. Yahara (2005). "Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells." *Int Immunol* **17**(1): 45-53.

Jiang, X., C. Shen, J. Rey-Ladino, H. Yu and R. C. Brunham (2008). "Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in *Chlamydia muridarum* antigen presentation and induction of protective immunity." *Infect Immun* **76**(6): 2392-2401.

Kammertoens, T., R. Willebrand, B. Erdmann, L. Li, Y. Li, B. Engels, W. Uckert and T. Blankenstein (2005). "CY15, a malignant histiocytic tumor that is phenotypically similar to immature dendritic cells." *Cancer Res* **65**(7): 2560-2564.

Klasen, I. S., J. P. de Jong, J. S. Voerman, R. M. Ladestein, P. J. Leenen and R. Benner (1988). "Murine macrophage cell line AP284 presents antigen to cloned MT4+, Lyt-2- T cells in vitro and in vivo." *Immunobiology* **178**(3): 261-274.

Langrish, C. L., B. S. McKenzie, N. J. Wilson, R. de Waal Malefyt, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2004). "IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity." *Immunol Rev* **202**: 96-105.

McLaren, J. E., D. R. Michael, T. G. Ashlin and D. P. Ramji (2011). "Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy." *Prog Lipid Res* **50**(4): 331-347.

Naik, S. H., A. I. Proietto, N. S. Wilson, A. Dakic, P. Schnorrer, M. Fuchsberger, M. H. Lahoud, M. O'Keefe, Q. X. Shao, W. F. Chen, J. A. Villadangos, K. Shortman and L. Wu (2005). "Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures." *J Immunol* **174**(11): 6592-6597.

Otsu, S., K. Gotoh, T. Yamashiro, J. Yamagata, K. Shin, T. Fujioka and A. Nishizono (2006). "Transfer of antigen-pulsed dendritic cells induces specific T-Cell proliferation and a therapeutic effect against long-term *Helicobacter pylori* infection in mice." *Infect Immun* **74**(2): 984-993.

Paglia, P., G. Girolomoni, F. Robbiati, F. Granucci and P. Ricciardi-Castagnoli (1993). "Immortalized dendritic cell line fully competent in antigen presentation initiates primary T cell responses in vivo." *J Exp Med* **178**(6): 1893-1901.

Rhule, A., B. Rase, J. R. Smith and D. M. Shepherd (2008). "Toll-like receptor ligand-induced activation of murine DC2.4 cells is attenuated by Panax notoginseng." *J Ethnopharmacol* **116**(1): 179-186. Ricciardi-Castagnoli, P. and P. Paglia (1992). "New tools for investigating macrophage differentiation." *Res Immunol* **143**(1): 101-106.

Richter, C., S. Thieme, J. Bandola, M. Laugsch, K. Anastassiadis and S. Brenner (2013). "Generation of inducible immortalized dendritic cells with proper immune function in vitro and in vivo." *PLoS One* **8**(4): e62621.

Rodriguez, A., A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli and S. Amigorena (1999). "Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells." *Nat Cell Biol* **1**(6): 362-368.

Ruiz, S., C. Beauvillain, M. N. Mevelec, P. Roingeard, P. Breton, D. Bout and I. Dimier-Poisson (2005). "A novel CD4-CD8 α +CD205+CD11b- murine spleen dendritic cell line: establishment, characterization and functional analysis in a model of vaccination to toxoplasmosis." *Cell Microbiol* **7**(11): 1659-1671.

Sallusto, F. (2016). "Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes." *Annu Rev Immunol* **34**: 317-334.

Schuurhuis, D. H., S. Laban, R. E. Toes, P. Ricciardi-Castagnoli, M. J. Kleijmeer, E. I. van der Voort, D. Rea, R. Offringa, H. J. Geuze, C. J. Melief and F. Ossendorp (2000). "Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli." *J Exp Med* **192**(1): 145-150.

Shen, Z., G. Reznikoff, G. Dranoff and K. L. Rock (1997). "Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules." *J Immunol* **158**(6): 2723-2730.

Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." *Nat Rev Immunol* **2**(3): 151-161.

Stolley, J. M. and D. J. Campbell (2016). "A 33D1+ Dendritic Cell/Autoreactive CD4+ T Cell Circuit Maintains IL-2-Dependent Regulatory T Cells in the Spleen." *J Immunol* **197**(7): 2635-2645.

They, C., A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, L. Zitvogel, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo and S. Amigorena (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." *J Cell Biol* **147**(3): 599-610.

Volkman, A., J. Neefjes and B. Stockinger (1996). "A conditionally immortalized dendritic cell line which differentiates in contact with T cells or T cell-derived cytokines." *Eur J Immunol* **26**(11): 2565-2572.

Winzler, C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V. S. Zimmermann, J. Davoust and P. Ricciardi-Castagnoli (1997). "Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures." *J Exp Med* **185**(2): 317-328.

Yamane, H. and W. E. Paul (2013). "Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets." *Immunol Rev* **252**(1): 12-23.

Young, J. W., L. Koulova, S. A. Soergel, E. A. Clark, R. M. Steinman and B. Dupont (1992). "The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro." *J Clin Invest* **90**(1): 229-237

5. DISCUSSÃO

DCs são células centrais do sistema imune que promovem tanto a imunidade contra patógenos e participam dos processos de tolerância. A partir da sua descoberta por Ralph Steinman em 1973, DCs tem sido extensivamente estudadas (Worbs *et al.*, 2017). Contudo, muitos aspectos biológicos sobre as DCs e seu uso terapêutico ainda precisam ser esclarecidos. As dificuldades técnicas para obtenção de DCs em grandes quantidades para estudo *in vitro* a partir dos métodos conhecidos prejudicam uma melhor compreensão destas células (Van Helden *et al.*, 2008).

Algumas linhagens de DCs murinas imortalizadas foram isoladas e geradas de diferentes formas. Algumas dessas linhagens foram geradas pela utilização de retrovírus oncogênicos como, por exemplo, as linhagens CB1, D2SC/1, FSDC e tsDC. Outras linhagens, como a DC2.4 e a SVDC também possuem oncogenes virais, mas dependente de GM-CSF (Hargadon 2016). A linhagem CY15 foi isolada a partir de um tumor histiócitos do baço de camundongos C57BL/6, assim como células AP284 que também foram isoladas a partir de um tumor espontâneo do baço murino.

A classificação de DCs vêm evoluindo e um dos requisitos para a definição de diferentes subpopulações destas células é a expressão de marcadores em suas superfícies, que pode ser analisado, por exemplo, pela técnica de citometria de fluxo (Merad *et al.*, 2013) A expressão de CD45, CD11c, MHC II e Flt3 tem sido identificado em cDCs (Miller *et al.*, 2012) e DCs dermais são classificadas por expressarem MHC II, CD11b, CD11c e CD301 (Dupasquier *et al.*, 2004; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). Outro subconjunto, são as pDCs que expressam CD317, B220, CD11c, Ly6C (Guilliams *et al.*, 2016).

DCs murinas imortalizadas também expressam diferentes marcadores, sendo que alguns dos marcadores são compartilhados pelas diferentes linhagens de DCs ou por outras células como macrófagos. Outros marcadores expressos são mais relacionandos com DCs como, por exemplo o marcador CD11c e o 33D1, característicos da maior população de DCs do baço (Stolley & Campbell 2016).

A maturação e a migração das DCs ocorre após o reconhecimento de PAMPS por PRRs expressos na superfície ou endossodo destas células, principalmente após o reconhecimento de micro-organismos via TLRs (Iwasaki e Medzhitov, 2004). Células AP284 expressam altos níveis de TLR2, TLR3 e TLR4. A expressão de TLR2 e TLR3,

tem sido encontrada em mDCs de camundongos e TLR4 na maioria das DCs CD11c+ CD11b+ (Ito *et al.*, 2002; Boonstra *et al.*, 2003).

Outros importantes TLRs, são os TLRs 7 e 9, ambos expressos por pDCs, que possuem a capacidade de reconhecer dsRNA de vírus ou CpG não metilado respectivamente. (Akira *et al.*, 2006; Mancuso *et al.*, 2009) Células AP284 também mostraram alta expressão tanto de TLR7 como de TLR9, sugerindo que elas também possuem a capacidade de responder a estímulos com agonistas destes receptores. A expressão de TLRs por células AP284 também se assemelha a expressão de TLRs por algumas DCs imortalizadas, como a linhagem mutoDC que expressa TLR3, TLR4 e TLR9, porém não expressam TLR7 (Fuertes Marraco, Grosjean *et al.* 2012) diferente de células AP284.

Muitos estudos mostram que DCs produzem quantidades significativas de citocinas pró-inflamatórias após estímulos com diferentes agonistas de TLRs, como por exemplo, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-23 ou algumas citocinas inibitórias como IL-10 e IL-27 (Deifl *et al.*, 2014). As citocinas IL-12 e IL-23 fazem parte da mesma família, pois compartilham a subunidade p40, por exemplo, a cadeia p40 mais a p35 formam a IL-12p70 ativa, e a subunidade p40 mais a subunidade p19 formam a IL-23 ativa (Vignali & Kuchroo 2012). A IL-23 e IL-12p70 são secretadas principalmente por DCs ativadas.

Os diferentes tipos de linhagens de DCs murinas imortalizadas também secretam diferentes tipos de citocinas como, por exemplo, a linhagem SVCD que produz IL-12p70 e IL-6 após 24 de estímulos com *Toxoplasma gondii* (Ruiz, Beauvillain *et al.* 2005), a linhagem D1 madura também é capaz de produzir IL-12p70 após estímulos com TNF- α (Winzler, Rovere *et al.* 1997) a linhagem CY15, produz quantidade significativa de IL-12p40 (Kammertoens, Willebrand *et al.* 2005) e a linhagem DC2.4 é capaz de produzir alta quantidade de TNF- α e IL-6 após estímulos com agonistas de TLRs, como LPS, CpG e poly(I:C) (Rhule, Rase *et al.* 2008). Os dados do atual estudo mostram que células AP284 possuem um diferencial em relação a todas as DCs murinas imortalizadas descritas aqui, pois elas são capazes de produzir IL-12p40 de forma extremamente elevada, sendo isto uma característica marcante das células AP284.

É descrito que a IL-12p40 é geralmente produzida em excesso quando comparada com o heterodímero p70, sendo que a p40 livre pode ser produzida de 10 a 1000 vezes mais que a p35 (Trinchieri, 1998; Trinchieri *et al.*, 2003). Esta é uma das questões que pode justificar a elevada produção de IL-12p40 demonstrado neste trabalho. É descrito que BMDCs também são capazes de produzir quantidades significativas de IL-12p40

quando estimuladas com LPS, resiquimode e CpG (Ma *et al.*, 2013) e nossos dados confirmam estes resultados, onde BMDCs também foram capazes de produzir IL-12p40 de forma significativa com os mesmo estímulos. Contudo, células AP284 foram capazes de produzir uma quantidade de IL-12p40 surpreendentemente mais elevada do que BMDCs quando estimuladas com LPS, zymosam, FSL-1, resiquimode e flagelina..

Atualmente muitas pesquisas tem sido direcionada sobre a atuação dos microRNAs (miRNAs) em células do sistema imune (Kingsley e Bhat, 2017). Os miRNAs são curtas sequências de RNAs, não codificados que estão envolvidos em vários processos biológicos (Bartel, 2004). Vários estudos tem mostrado a importância dos miRNAs em relação ao desenvolvimento, proliferação, e maturação das células imunes. miRNAs podem estar envolvidos na supressão de respostas imunes, ou também podem estar relacionados a respostas excessivas em caso de disfunções (Mehta e Baltimore, 2016).

Estudos mostram que moDCs estimuladas com LPS expressam altos níveis do miRNA155, o qual está relacionado com a elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-23, TNF- α e IL-6. Este miRNA atua na supressão de SOCS1, uma proteína que atua na inibição de várias citocinas (Ceppi *et al.*, 2009; O'connell *et al.*, 2009). Assim, uma hipótese para a excessiva produção de IL-12p40 por células AP284 após os estímulos com os diferentes agonistas de TLRs, seria a indução de miRNAs que poderiam estar relacionados com a regulação negativa de genes responsáveis pela inibição da subunidade p40. Contudo, mais estudos devem ser realizados para avaliar esta questão.

Alguns estudos relatam que a subunidade p40 pode ter algumas funções biológicas no sistema imune, uma vez que o homodímero está presente em cerca de 20 a 40% no soro de camundongos após tratamento com endotoxina (Heinzel *et al.*, 1997) e é visto que p40 pode induzir a produção de NO induzindo a expressão de iNOS em células da microglia de camundongos (Pahan *et al.*, 2001). Outros estudos mostram que IL-12p40 pode estar relacionada coma indução de uma menor expressão de FOXP3 por células T do baço de camundongos, indicando um papel na supressão de células Treg (Brahmachari e Pahan, 2009). Assim, mais análises devem ser feitas para que possa ser verificado se a subunidade p40 pode estar relacionado com alguma função biológica das células AP284.

No atual estudo, BMDCs também foram capazes de produzir IL-12p70 após estímulo com os diferentes agonistas de TLRs, exeto quando estimulada com flagelina.

Uma das principais funções da IL-12p70 é de induzir maior produção de IFN- γ e consequente diferenciação de linfócitos T para Th1 (Trinchieri *et al.*, 2003; Goriely e Goldman, 2008). O perfil Th1 é de grande importância para combater patógenos intracelulares, pois possuem a capacidade de produzir IFN- γ de forma mais eficiente, sendo que esta citocina é importante para ativação de macrófagos, aumentando a atividade microbicida destas células (Luckheeram *et al.*, 2012; Oestreich e Weinmann, 2012).

Entretanto, nossos dados mostram que células AP284 não foram capazes de produzir IL-12p70 com nenhum dos estímulos utilizados, porém foram capazes de produzir IL-23 de forma significativa quando estimuladas com LPS, zymosan e principalmente FSL-1. De forma diferente, BMDCs produziram baixas quantidades da citocina com os mesmo estímulos. A IL-23 tem sido descrita como importante para a manutenção e amplificação do perfil Th17, e este perfil tem grande participação nas respostas contra fungos e bactérias extracelulares (Khader e Gopal, 2010; Espinosa e Rivera, 2012). A produção de IL-23 por células AP284 também pode ser descrita como um diferencial desta célula, uma vez que não foi descrito a produção desta citocina pelas demais linhagens de DCs murinas.

Desta forma, nossos dados sugerem que células AP284 podem estar relacionadas com o perfil de resposta Th17, uma vez que foram capazes de produzir altas concentrações de IL-12p40 e IL-23, mas não foram capazes de produzir IL-12p70. Sugerindo que parte da subunidade p40 produzida está associando à p19, formando a IL-23 ativa e não associando à subunidade p35, que formaria a IL12p70 ativa.

Na ausência de IFN- γ , DCs produzem principalmente a subunidade p40 e pouca quantidade de p35, a adição ou pré tratamento com IFN- γ induz a produção de IL-12p70 por DCs (Snijders *et al.*, 1996), uma vez que IFN- γ participa da ativação transcricional que codifica a subunidade p35 e consequentemente a produção de IL-12p70 (Liu *et al.*, 2004). Mesmo após as células AP284 terem sido estimuladas com IFN- γ não houve a produção de IL-12p70 e, de forma surpreendente, foi visto uma inibição da produção de IL-12p40 e da IL-23 quando as células foram previamente primadas com IFN- γ e posteriormente estimuladas com LPS ou com *E.coli*. Este último é capaz de se ligar a diversos TLRs e por isto foi usado neste estudo.

IFN- γ atua em fagócitos aumentando a atividade microbicida dessas células através da indução de NO (Chu, 2013). Estudos mostraram que algumas propriedades químicas do NO liberado durante uma resposta inflamatória podem ser tóxicas e causar

danos às células normais (Megson e Webb, 2000). Assim, surgiu a hipótese de que a produção excessiva de NO após ativação por IFN- γ poderia estar causando a morte das células devido a sua toxicidade e consequente inibição da produção das citocinas. Contudo, após análise da viabilidade das células que haviam sido primadas com IFN- γ , foi verificado que 100% delas continuaram viáveis. Desta forma, esta hipótese não foi confirmada.

Estudos evidenciam que NO pode induzir a inibição de IL-12 em células RAW264.7, uma linhagem de macrófago, através da regulação de c-rel, um membro da família do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B). Foi demonstrado nestas células que a produção de IL-12 aumenta em macrófagos que possuem alta expressão de c-rel (Boddupalli *et al.*, 2007) e que a ausência deste fator de transcrição pode levar a completa inibição de IL-12p40 na linhagem de macrófagos J744 (Sanjabi *et al.*, 2000). Outros estudos também relatam que NO pode inibir a expressão do mRNA de IL-12p40 em macrófagos derivados da medula óssea, DCs e também por RAW264 (Xiong *et al.*, 2004).

Contudo, tanto células AP284 como BMDCs produziram quantidades significativas de NO após primagem com IFN- γ e BMDCs mantiveram a produção de IL-12p70 em grandes quantidades e não alterou a produção de IL-12p40 após o estímulo. Com isso, nossos dados sugerem que o NO provavelmente não foi o responsável pela inibição na produção de IL-12p40 por AP284, porém, mais estudos devem ser feitos para confirmação desta hipótese.

A ativação da via TLR4 em fagócitos e outros TLRs podem induzir grandes quantidades de TNF- α (Beutler *et al.*, 2001). TNF- α pode cooperar com IFN- γ para ativar fagócitos e auxiliar na destruição de parasitas intracelulares como, por exemplo, *L. major* (Birkland *et al.*, 1992). Alguns estudos tem mostrado que TNF- α pode inibir a produção de IL-12 em macrófagos de camundongos estimulados com IFN- γ e LPS (Ma, 2001). Desta forma, outra hipótese que sugerimos, é que a produção de TNF- α poderia estar influenciando na produção de IL-12p40 e IL-23.

Células AP284 foram capazes de produzir altas concentrações TNF- α após estímulo com LPS, porém nas culturas em que as células foram primadas com IFN- γ e estimuladas com LPS também houve inibição da produção da citocina, o que indica que provavelmente não é a produção desta citocina que está influenciando na inibição da IL-12p40 e IL-23.

Novamente, estudos em relação aos miRNAs mostram que miRNA10 também em moDCs está envolvido na supressão da subunidade p40, inibindo a produção de IL-12/IL-23p40 (Xue *et al.*, 2011) e que miRNA21 pode suprimir a subunidade p35, impedindo a produção de IL-12p70 (Lu *et al.*, 2011), desta forma, outra sugestão, seria que estes miRNAs poderiam estar presentes em células AP284 e que estariam relacionados com a supressão de IL-12p40 e IL-23 após a primagem com IFN- γ e poderiam estar suprimindo também a produção de IL-12p70, uma vez que as células não produzem esta citocina. Porém, estudos em relação a isto também devem ser realizados.

Nossos dados até agora tem sugerido que as células AP284 podem estar comprometidas com o perfil de resposta Th17, isso devido a grande produção de IL-12p40, significativa produção de IL-6 e IL-23 e nenhuma produção de IL-12p70. Desta forma, a IL-12p40 produzida por células AP284 associa a subunidade p19 para produzir a IL-23 ativa.

A utilização de adjuvantes é importante para aumentar o efeito das respostas imunes inatas ou adquiridas (Petrovsky e Aguilar, 2004). Estudos mostram que a imunização de camundongos com CFA promove um aumento da população de células dendríticas CD11c+, células TCD4+, TCD8+ e também macrófagos e neutrófilos no baço destes camundongos. Além disso, a imunização induz aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6 (Fontes *et al.*, 2017).

Alguns estudos ainda mostram que a imunização de camundongos com CFA por três semanas, induz produção significativa de IL-17 e também de IFN- γ por células do baço destes camundongos (Wang e He, 2015). Em nossos dados foi visto que células do baço de camundongos imunizados com CFA e reestimuladas em cultura com BCG na presença de células AP284 produziram IL-17 de forma significativa, o que não foi visto em relação à produção de IFN- γ nessas mesmas condições. Havendo também uma inibição da produção de IL-10 pelas células do baço destes camundongos na presença de AP284 mais BCG. Desta forma, nossos dados suportam a ideia de que células AP284 podem estar contribuindo para o desvio de uma resposta do tipo Th17 e não Th1 e que ainda pode estar inibindo o perfil de resposta de células Treg, uma vez que estudos relatam que quando há o direcionamento para um determinado perfil de resposta imune, os demais são suprimidos (Luckheeram *et al.*, 2012)

Portanto, nossos dados indicam que células AP284 pertencem a uma linhagem de DC relacionada com a indução e manutenção de uma resposta do tipo Th17. Além do mais, foi descrito aqui, as distintas linhagens de DCs murinas imortalizadas, sendo de

fundamental importância esta descrição para a melhor compreensão das DCs. É necessário destacar que dentre todas as linhagens descritas, nenhuma foi relacionada com um perfil de resposta Th17.

Assim, nós sugerimos a linhagem de DC AP284 descrita neste trabalho pode ser utilizada como uma ferramenta importante para melhorar a compreensão sobre os fatores solúveis e as interações celulares responsáveis pela indução da IL-23 e poderá ser utilizada para esclarecer as vias moleculares envolvidas na produção desta citocina. Esta linhagem também poderá ser útil para o teste de novos fármacos potencialmente inibidores ou estimuladores da IL-23, bem como será útil para os estudos de intervenção e manipulação do perfil Th17.

6. CONCLUSÕES

- Células AP284 constituem uma linhagem de DC de acordo com a presença dos marcadores CD11c, 33D1, moléculas co-estimuladoras CD80 e moléculas MHC classe II, além da expressão de TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9.
- Células AP284 foram capazes de responder aos agonistas de TLRs com a produção significativa de IL-12p40, IL-6 e IL-23.
- Células AP284 não são capazes de produzir IL-12p70 com nenhum dos estímulos utilizados e a adição de IFN- γ às culturas ainda inibem a produção de IL-12p40 e IL-23.
- Células AP284 pode constituir uma linhagem DC17 uma vez que produza, IL-6, IL-23, não produz IL-12p70 IL-23 e ativa a produção de IL-17 por linfócitos, mas não a produção de IFN- γ .

7. REFERÊNCIAS

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V. et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, p. 942-9, Sep 2007. ISSN 1529-2908 (Print)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17676045> >.

AKASHI-TAKAMURA, S.; MIYAKE, K. TLR accessory molecules. **Curr Opin Immunol**, v. 20, n. 4, p. 420-5, Aug 2008. ISSN 0952-7915 (Print)
0952-7915 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18625310> >.

AKASHI, K. et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 193-7, Mar 9 2000. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10724173> >.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat Immunol**, v. 2, n. 8, p. 675-80, Aug 2001. ISSN 1529-2908 (Print)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477402> >.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 24 2006. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588> >.

ARIAS, M. A. et al. Toll-Like Receptors 2 and 4 Cooperate in the Control of the Emerging Pathogen *Brucella microti*. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 6, p. 205, 2016. ISSN 2235-2988 (Electronic)
2235-2988 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28119856> >.

ASHKAR, A. A. et al. Toll-like receptor (TLR)-3, but not TLR4, agonist protects against genital herpes infection in the absence of inflammation seen with CpG DNA. **J Infect Dis**, v. 190, n. 10, p. 1841-9, Nov 15 2004. ISSN 0022-1899 (Print)
0022-1899 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15499542> >.

ASSELIN-PATUREL, C. et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. **Nat Immunol**, v. 2, n. 12, p. 1144-50., 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11713464> >.

AUSTYN, J. M. Dendritic Cells in the Immune System-History, Lineages, Tissues, Tolerance, and Immunity. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 6, Dec 2016. ISSN 2165-0497 (Electronic)
2165-0497 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087939> >.

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **J Exp Med**, v. 202, n. 12, p. 1715-24, Dec 19 2005. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365150> >.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, Mar 19 1998. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521319> >.

BARKMAN, C. et al. Soluble bacterial constituents down-regulate secretion of IL-12 in response to intact Gram-positive bacteria. **Microbes Infect**, v. 10, n. 14-15, p. 1484-93, Nov-Dec 2008. ISSN 1286-4579 (Print)
1286-4579 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832044> >.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, Jan 23 2004. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438> >.

BELZ, G. T.; NUTT, S. L. Transcriptional programming of the dendritic cell network. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 2, p. 101-13, Jan 25 2012. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273772> >.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235-8, May 11 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648838> >.

BEUTLER, E.; GELBART, T.; WEST, C. Synergy between TLR2 and TLR4: a safety mechanism. **Blood Cells Mol Dis**, v. 27, n. 4, p. 728-30, Jul-Aug 2001. ISSN 1079-9796 (Print)
1079-9796 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11778656> >.

BIRKLAND, T. P.; SYPEK, J. P.; WYLER, D. J. Soluble TNF and membrane TNF expressed on CD4+ T lymphocytes differ in their ability to activate macrophage

antileishmanial defense. **J Leukoc Biol**, v. 51, n. 3, p. 296-9, Mar 1992. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347312> >.

BODDUPALLI, C. S. et al. Nitric oxide inhibits interleukin-12 p40 through p38 MAPK-mediated regulation of calmodulin and c-rel. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n. 5, p. 686-97, Mar 01 2007. ISSN 0891-5849 (Print)
0891-5849 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17291992> >.

BOONSTRA, A. et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. **J Exp Med**, v. 197, n. 1, p. 101-9, Jan 6 2003. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12515817 >.

BRAHMACHARI, S.; PAHAN, K. Suppression of regulatory T cells by IL-12p40 homodimer via nitric oxide. **J Immunol**, v. 183, n. 3, p. 2045-58, Aug 01 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587012> >.

CARRENO, L. J. et al. Modulation of the dendritic cell-T-cell synapse to promote pathogen immunity and prevent autoimmunity. **Immunotherapy**, v. 3, n. 4 Suppl, p. 6-11, Apr 2011. ISSN 1750-7448 (Electronic)
1750-743X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524159> >.

CELHAR, T.; MAGALHAES, R.; FAIRHURST, A. M. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. **Immunol Res**, v. 53, n. 1-3, p. 58-77, Sep 2012. ISSN 1559-0755 (Electronic)
0257-277X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22434514> >.

CEPPI, M. et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 8, p. 2735-40, Feb 24 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19193853> >.

CHABALGOITY, J. A. et al. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 18, n. 1-2, p. 195-207, Feb-Apr 2007. ISSN 1359-6101 (Print)
1359-6101 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17347024> >.

CHOPIN, M.; ALLAN, R. S.; BELZ, G. T. Transcriptional regulation of dendritic cell diversity. **Front Immunol**, v. 3, p. 26, 2012. ISSN 1664-3224 (Electronic)

1664-3224 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566910> >.

CHU, W. M. Tumor necrosis factor. **Cancer Lett**, v. 328, n. 2, p. 222-5, Jan 28 2013. ISSN 1872-7980 (Electronic)

0304-3835 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23085193> >.

COBAN, C. et al. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. **Cell Host Microbe**, v. 7, n. 1, p. 50-61, Jan 21 2010. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20114028> >.

COHN, L.; DELAMARRE, L. Dendritic cell-targeted vaccines. **Front Immunol**, v. 5, p. 255, 2014. ISSN 1664-3224 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910635> >.

COLLISON, L. W.; VIGNALI, D. A. Interleukin-35: odd one out or part of the family? **Immunol Rev**, v. 226, p. 248-62, Dec 2008. ISSN 1600-065X (Electronic)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19161429> >.

D'AMICO, A.; WU, L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. **J Exp Med**, v. 198, n. 2, p. 293-303, Jul 21 2003. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874262> >.

DARDALHON, V. et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 12, p. 1347-55, Dec 2008. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997793> >.

DE ROSA, V. et al. Regulatory T cells as suppressors of anti-tumor immunity: Role of metabolism. **Cytokine Growth Factor Rev**, Apr 11 2017. ISSN 1879-0305 (Electronic)

1359-6101 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28442214> >.

DEIFL, S. et al. Differential activation of dendritic cells by toll-like receptors causes diverse differentiation of naive CD4+ T cells from allergic patients. **Allergy**, v. 69, n. 12, p. 1602-9, Dec 2014. ISSN 1398-9995 (Electronic)

0105-4538 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25093709> >.

DILLON, S. et al. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. **J Immunol**, v. 172, n. 8, p. 4733-43, Apr 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15067049> >.

DUPASQUIER, M. et al. Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis. **J Invest Dermatol**, v. 123, n. 5, p. 876-9, Nov 2004. ISSN 0022-202X (Print)
0022-202X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15482474 >.

EDELSON, B. T. et al. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. **J Exp Med**, v. 207, n. 4, p. 823-36, Apr 12 2010. ISSN 1540-9538 (Electronic)
0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351058> >.

ESPINOSA, V.; RIVERA, A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. **Cytokine**, v. 58, n. 1, p. 100-6, Apr 2012. ISSN 1096-0023 (Electronic)
1043-4666 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133343> >.

EYERICH, S. et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. **J Clin Invest**, v. 119, n. 12, p. 3573-85, Dec 2009. ISSN 1558-8238 (Electronic)
0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19920355> >.

FERNANDEZ, S. et al. Potential role for Toll-like receptor 4 in mediating Escherichia coli maltose-binding protein activation of dendritic cells. **Infect Immun**, v. 75, n. 3, p. 1359-63, Mar 2007. ISSN 0019-9567 (Print)
0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220311> >.

FIEBER, C. et al. Innate immune response to Streptococcus pyogenes depends on the combined activation of TLR13 and TLR2. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119727, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25756897> >.

FOGG, D. K. et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. **Science**, v. 311, n. 5757, p. 83-7, Jan 6 2006. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16322423 >.

FONTES, J. A. et al. Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response. **Immun Inflamm Dis**, v. 5, n. 2, p. 163-176, Jun 2017. ISSN 2050-4527 (Electronic)

2050-4527 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28474508> >.

GAO, Y. et al. Deficiency in TLR2 but not in TLR4 impairs dendritic cells derived IL-10 responses to schistosome antigens. **Cell Immunol**, v. 272, n. 2, p. 242-50, 2012. ISSN 1090-2163 (Electronic)

0008-8749 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22063738> >.

GAUSE, W. C.; WYNN, T. A.; ALLEN, J. E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 8, p. 607-14, Aug 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23827958> >.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-61, Feb 05 2010. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133564> >.

GERMAIN, R. N. Accessory cell stimulation of T cell proliferation requires active antigen processing, Ia-restricted antigen presentation, and a separate nonspecific 2nd signal. **J Immunol**, v. 127, n. 5, p. 1964-6, Nov 1981. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6170681> >.

GERMAIN, R. N.; ROBEY, E. A.; CAHALAN, M. D. A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1676-81, Jun 29 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745423> >.

GINHOUX, F.; MERAD, M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. **Immunol Cell Biol**, v. 88, n. 4, p. 387-92, May-Jun 2010. ISSN 1440-1711 (Electronic)

0818-9641 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20309014> >.

GOFF, P. H. et al. Synthetic Toll-like receptor 4 (TLR4) and TLR7 ligands as influenza virus vaccine adjuvants induce rapid, sustained, and broadly protective responses. **J Virol**, v. 89, n. 6, p. 3221-35, Mar 2015. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25568203> >.

GORIELY, S.; GOLDMAN, M. Interleukin-12 family members and the balance between rejection and tolerance. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 13, n. 1, p. 4-9, Feb 2008. ISSN 1531-7013 (Electronic)
1087-2418 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18660699> >.

GOSWAMI, R.; KAPLAN, M. H. A brief history of IL-9. **J Immunol**, v. 186, n. 6, p. 3283-8, Mar 15 2011. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368237> >.

GRATZ, I. K.; CAMPBELL, D. J. Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance. **Front Immunol**, v. 5, p. 333, 2014. ISSN 1664-3224 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25076948> >.

GROUARD, G. et al. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. **J Exp Med**, v. 185, n. 6, p. 1101-11, Mar 17 1997. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9091583> >.

GUILLIAMS, M. et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. **Immunity**, v. 45, n. 3, p. 669-84, Sep 20 2016. ISSN 1097-4180 (Electronic)
1074-7613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27637149> >.

GUILLIAMS, M. et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 8, p. 571-8, Aug 2014. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25033907> >.

GUILLIAMS, M. et al. From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 8, p. 2089-94, Aug 2010. ISSN 1521-4141 (Electronic)
0014-2980 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20853491> >.

GUO, X. et al. The Novel Toll-Like Receptor 2 Agonist SUP3 Enhances Antigen Presentation and T Cell Activation by Dendritic Cells. **Front Immunol**, v. 8, p. 158, 2017. ISSN 1664-3224 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28270814> >.

GUO, X. et al. Generation of mouse and human dendritic cells in vitro. **J Immunol Methods**, v. 432, p. 24-9, May 2016. ISSN 1872-7905 (Electronic)
0022-1759 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26876301> >.

GUTJAHR, A. et al. Cutting Edge: A Dual TLR2 and TLR7 Ligand Induces Highly Potent Humoral and Cell-Mediated Immune Responses. **J Immunol**, Apr 21 2017. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28432147> >.

HEINZEL, F. P. et al. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. **J Immunol**, v. 158, n. 9, p. 4381-8., 1997. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9127002> >.

HELFT, J. et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. **Immunity**, v. 42, n. 6, p. 1197-211, Jun 16 2015. ISSN 1097-4180 (Electronic)
1074-7613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26084029> >.

HEMMI, H. et al. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. **J Immunol**, v. 170, n. 6, p. 3059-64, Mar 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626561> >.

HERBST-KRALOVETZ, M. M.; PYLES, R. B. Quantification of poly(I:C)-mediated protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. **J Virol**, v. 80, n. 20, p. 9988-97, Oct 2006. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005677> >.

HEUZE, M. L. et al. Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. **Immunol Rev**, v. 256, n. 1, p. 240-54, Nov 2013. ISSN 1600-065X (Electronic)
0105-2896 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24117825> >.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 673-83, May 04 2012. ISSN 1546-170X (Electronic)
1078-8956 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561831> >.

HOLLEY, M. M. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2)-TLR9 crosstalk dictates IL-12 family cytokine production in microglia. **Glia**, v. 60, n. 1, p. 29-42, Jan 2012. ISSN 1098-1136 (Electronic)
0894-1491 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901759> >.

HUEHN, J.; POLANSKY, J. K.; HAMANN, A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 2, p. 83-9, Feb 2009. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114986> >.

INABA, K. et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J Exp Med**, v. 176, n. 6, p. 1693-702., 1992. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=1460426> >.

ITO, T. et al. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. **J Exp Med**, v. 195, n. 11, p. 1507-12, Jun 3 2002. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045249> >.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol**, v. 5, n. 10, p. 987-95, Oct 2004. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454922> >.

JAKUBZICK, C. et al. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. **Immunity**, v. 39, n. 3, p. 599-610, Sep 19 2013. ISSN 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24012416> >.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861602> >.

JIANG, L. et al. The Combination of MBP and BCG-Induced Dendritic Cell Maturation through TLR2/TLR4 Promotes Th1 Activation In Vitro and Vivo. **Mediators Inflamm**, v. 2017, p. 1953680, 2017. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28293065> >.

JIAO, Z. et al. The closely related CD103+ dendritic cells (DCs) and lymphoid-resident CD8+ DCs differ in their inflammatory functions. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91126, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24637385> >.

JIN, M. S. et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 1071-82, Sep 21 2007. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17889651> >.

KANG, J. Y. et al. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. **Immunity**, v. 31, n. 6, p. 873-84, Dec 18 2009. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931471> >.

KASTELEIN, R. A.; HUNTER, C. A.; CUA, D. J. Discovery and Biology of IL-23 and IL-27: Related but Functionally Distinct Regulators of Inflammation. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 221-242, Apr 23 2007. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17291186 >.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1143, p. 1-20, Nov 2008. ISSN 1749-6632 (Electronic)

0077-8923 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076341> >.

_____. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 373-84, May 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404851> >.

KHADER, S. A.; GOPAL, R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 423-7, Sep-Oct 2010. ISSN 2150-5608 (Electronic)

2150-5594 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21178483 >.

KIELIAN, T.; ESEN, N.; BEARDEN, E. D. Toll-like receptor 2 (TLR2) is pivotal for recognition of *S. aureus* peptidoglycan but not intact bacteria by microglia. **Glia**, v. 49, n. 4, p. 567-76, Mar 2005. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15593098> >.

KIM, T. S. et al. Up-regulated S100 calcium binding protein A8 in Plasmodium-infected patients correlates with CD4(+)CD25(+)Foxp3 regulatory T cell generation. **Malar J**, v. 14, p. 385, Oct 05 2015. ISSN 1475-2875 (Electronic)

1475-2875 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26438270> >.

KINGSLEY, S. M.; BHAT, B. V. Role of microRNAs in sepsis. **Inflamm Res**, Mar 03 2017. ISSN 1420-908X (Electronic)

1023-3830 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28258291> >.

KISSENFENNIG, A. et al. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 643-54, May 2005. ISSN 1074-7613 (Print)

1074-7613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894281> >.

KLASEN, I. S. et al. Murine macrophage cell line AP284 presents antigen to cloned MT4+, Lyt-2- T cells in vitro and in vivo. **Immunobiology**, v. 178, n. 3, p. 261-74, Dec 1988. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2906628 >.

KRIZOVA, L. et al. p19-targeted ABD-derived protein variants inhibit IL-23 binding and exert suppressive control over IL-23-stimulated expansion of primary human IL-17+ T-cells. **Autoimmunity**, v. 50, n. 2, p. 102-113, Mar 2017. ISSN 1607-842X (Electronic)

0891-6934 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28100093> >.

KUBO, A. et al. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. **J Exp Med**, v. 206, n. 13, p. 2937-46, Dec 21 2009. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995951> >.

LABEUR, M. S. et al. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. **J Immunol**, v. 162, n. 1, p. 168-75, Jan 01 1999. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886383> >.

LANGRISH, C. L. et al. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. **Immunol Rev**, v. 202, p. 96-105, Dec 2004. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546388> >.

LEE, B. L. et al. UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. **Elife**, v. 2, p. e00291, Feb 19 2013. ISSN 2050-084X (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23426999> >.

LEMAITRE, B. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973-83, Sep 20 1996. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808632> >.

LEON, B. et al. Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic

cells. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2668-76, Apr 1 2004. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14630812 >.

LI, C. et al. Dendritic cells sequester antigenic epitopes for prolonged periods in the absence of antigen-encoding genetic information. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 43, p. 17543-8, Oct 23 2012. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045695> >.

LIN, S. C.; LO, Y. C.; WU, H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. **Nature**, v. 465, n. 7300, p. 885-90, Jun 17 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20485341> >.

LIU, J. et al. Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein. **J Biol Chem**, v. 279, n. 53, p. 55609-17, Dec 31 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489234> >.

LIU, K.; MALISSEN, B. Advances in methods for studying dendritic cell biology. **J Immunol Methods**, v. 432, p. 1-3, May 2016. ISSN 1872-7905 (Electronic) 0022-1759 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27087430> >.

LU, T. X. et al. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. **J Immunol**, v. 187, n. 6, p. 3362-73, Sep 15 2011. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21849676> >.

LUCKHEERAM, R. V. et al. CD4(+)T cells: differentiation and functions. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 925135, 2012. ISSN 1740-2530 (Electronic) 1740-2522 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22474485> >.

MA, C. et al. Involvement of DNA-PKcs in the IL-6 and IL-12 response to CpG-ODN is mediated by its interaction with TRAF6 in dendritic cells. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58072, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23533581> >.

MA, X. TNF-alpha and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. **Microbes Infect**, v. 3, n. 2, p. 121-9., 2001. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11251298> >.

MACDONALD, J. K. et al. Anti-IL-12/23p40 antibodies for induction of remission in Crohn's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 11, p. CD007572, Nov 25 2016. ISSN 1469-493X (Electronic)
1361-6137 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27885650> >.

MAILLIARD, R. B. et al. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. **J Immunol**, v. 171, n. 5, p. 2366-73, Sep 01 2003. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12928383> >.

MAISONNEUVE, C. et al. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 34, p. 12294-9, Aug 26 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25136133> >.

MANCUSO, G. et al. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. **Nat Immunol**, v. 10, n. 6, p. 587-94, Jun 2009. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430477> >.

MARASKOVSKY, E. et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. **J Exp Med**, v. 184, n. 5, p. 1953-62, Nov 01 1996. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8920882> >.

MASHAYEKHI, M. et al. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 249-59, Aug 26 2011. ISSN 1097-4180 (Electronic)
1074-7613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21867928> >.

MAYER, C. T. et al. Selective and efficient generation of functional Baff3-dependent CD103+ dendritic cells from mouse bone marrow. **Blood**, v. 124, n. 20, p. 3081-91, Nov 13 2014. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100743> >.

MCLAREN, J. E. et al. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. **Prog Lipid Res**, v. 50, n. 4, p. 331-47, Oct 2011. ISSN 1873-2194 (Electronic)
0163-7827 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21601592> >.

MEGSON, I. L.; WEBB, D. J. Nitrate resistance in platelets from patients with stable angina pectoris. **Circulation**, v. 102, n. 11, p. E87, Sep 12 2000. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10982555> >.

MEHTA, A.; BALTIMORE, D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 5, p. 279-94, Apr 28 2016. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27121651> >.

MERAD, M. et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 563-604, 2013. ISSN 1545-3278 (Electronic)
0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516985> >.

MILLER, J. C. et al. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. **Nat Immunol**, v. 13, n. 9, p. 888-99, Sep 2012. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797772> >.

MOREL, P. A.; TURNER, M. S. Designing the optimal vaccine: the importance of cytokines and dendritic cells. **Open Vaccine J**, v. 3, p. 7-17, 2010. ISSN 1875-0354 (Print). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822455> >.

NAIK, S. H. et al. Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. **J Immunol**, v. 174, n. 11, p. 6592-7, Jun 01 2005. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905497> >.

NAPOLITANI, G. et al. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. **Nat Immunol**, v. 6, n. 8, p. 769-76, Aug 2005. ISSN 1529-2908 (Print)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15995707> >.

O'CONNELL, R. M. et al. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 17, p. 7113-8, Apr 28 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19359473> >.

OESTREICH, K. J.; WEINMANN, A. S. T-bet employs diverse regulatory mechanisms to repress transcription. **Trends Immunol**, v. 33, n. 2, p. 78-83, Feb 2012. ISSN 1471-4981 (Electronic)

1471-4906 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133865> >.

OLDENBURG, M. et al. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1111-5, Aug 31 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22821982> >.

OLIVEIRA, M. A. et al. Immature macrophages derived from mouse bone marrow produce large amounts of IL-12p40 after LPS stimulation. **J Leukoc Biol**, v. 74, n. 5, p. 857-67, Nov 2003. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14595006 >.

OPPMANN, B. et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 715-25., 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11114383> >.

PAHAN, K. et al. Induction of nitric-oxide synthase and activation of NF-kappaB by interleukin-12 p40 in microglial cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 11, p. 7899-905, Mar 16 2001. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11110796> >.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 4, p. 265-77, Apr 2012. ISSN 1474-1768 (Electronic)
1474-175X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437871> >.

PARHAM, C. et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. **J Immunol**, v. 168, n. 11, p. 5699-708, Jun 01 2002. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023369> >.

PERSSON, E. K. et al. IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 958-69, May 23 2013. ISSN 1097-4180 (Electronic)
1074-7613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23664832> >.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunol Cell Biol**, v. 82, n. 5, p. 488-96, Oct 2004. ISSN 0818-9641 (Print)
0818-9641 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479434> >.

RAKOFF-NAHOUM, S. et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 229-41, Jul 23 2004. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15260992> >.

RAMISCAL, R. R.; VINUESA, C. G. T-cell subsets in the germinal center. **Immunol Rev**, v. 252, n. 1, p. 146-55, Mar 2013. ISSN 1600-065X (Electronic)
0105-2896 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23405902> >.

RANDOLPH, G. J. et al. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. **Immunity**, v. 11, n. 6, p. 753-61, Dec 1999. ISSN 1074-7613 (Print)
1074-7613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10626897> >.

ROELOFS, M. F. et al. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 8, p. 2313-22, Aug 2005. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16052591> >.

ROSES, R. E. et al. Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists. **J Immunol**, v. 181, n. 7, p. 5120-7, Oct 1 2008. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18802116 >.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v. 133, n. 5, p. 775-87, May 30 2008. ISSN 1097-4172 (Electronic)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510923> >.

SALLUSTO, F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. **Annu Rev Immunol**, v. 34, p. 317-34, May 20 2016. ISSN 1545-3278 (Electronic)
0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27168241> >.

SANJABI, S. et al. Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 23, p. 12705-10, Nov 07 2000. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058167> >.

SATOH, T.; AKIRA, S. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 6, Dec 2016. ISSN 2165-0497 (Electronic)

2165-0497 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28084212> >.

SAVINA, A. et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 205-18, Jul 14 2006. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839887> >.

SERBINA, N. V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 421-52, 2008. ISSN 0732-0582 (Print)
0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18303997> >.

SHALEK, A. K. et al. Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. **Nature**, v. 498, n. 7453, p. 236-40, Jun 13 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685454> >.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 3, p. 151-61, Mar 2002. ISSN 1474-1733 (Print)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11913066> >.

SHORTMAN, K.; NAIK, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 1, p. 19-30, Jan 2007. ISSN 1474-1733 (Print)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170756> >.

SMITH, T. R.; KUMAR, V. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. **Trends Immunol**, v. 29, n. 7, p. 337-42, Jul 2008. ISSN 1471-4906 (Print)
1471-4906 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514574> >.

SNIJDERS, A. et al. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. **J Immunol**, v. 156, n. 3, p. 1207-12, Feb 01 1996. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557999> >.

SOMMER, F.; BACKHED, F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 227-38, Apr 2013. ISSN 1740-1534 (Electronic)
1740-1526 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435359> >.

STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 1-22, 2012. ISSN 1545-3278 (Electronic) 0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22136168> >.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J Exp Med**, v. 137, n. 5, p. 1142-62, May 1 1973. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4573839> >.

STEINMAN, R. M.; IDOYAGA, J. Features of the dendritic cell lineage. **Immunol Rev**, v. 234, n. 1, p. 5-17, Mar 2010. ISSN 1600-065X (Electronic) 0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20193008> >.

STEINMAN, R. M. et al. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. **J Exp Med**, v. 149, n. 1, p. 1-16, Jan 1 1979. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/762493> >.

STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 10, p. 5132-6, Oct 1978. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/154105> >.

STROBL, H. et al. flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. **Blood**, v. 90, n. 4, p. 1425-34, Aug 15 1997. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9269760> >.

SWIECKI, M.; COLONNA, M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 8, p. 471-85, Aug 2015. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26160613> >.

SZABO, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655-69, Mar 17 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10761931> >.

TABETA, K. et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 10, p. 3516-21, Mar 9 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993594> >.

TANAKA, A.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. **Cell Res**, v. 27, n. 1, p. 109-118, Jan 2017. ISSN 1748-7838 (Electronic)
1001-0602 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27995907> >.

TANG, C. et al. Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. **Immunology**, v. 135, n. 2, p. 112-24, Feb 2012. ISSN 1365-2567 (Electronic)
0019-2805 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22044352> >.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Adv Immunol**, v. 70, p. 83-243, 1998. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9755338> >.

_____. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 677-706, 2012. ISSN 1545-3278 (Electronic)
0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224761> >.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 641-4, Nov 2003. ISSN 1074-7613 (Print)
1074-7613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614851> >.

UEMATSU, S. et al. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. **Nat Immunol**, v. 7, n. 8, p. 868-74, Aug 2006. ISSN 1529-2908 (Print)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829963> >.

USUI, T. et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. **J Exp Med**, v. 203, n. 3, p. 755-66, Mar 20 2006. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16520391> >.

VAN HELDEN, S. F.; VAN LEEUWEN, F. N.; FIGDOR, C. G. Human and murine model cell lines for dendritic cell biology evaluated. **Immunol Lett**, v. 117, n. 2, p. 191-7, May 15 2008. ISSN 0165-2478 (Print)
0165-2478 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18384885> >.

VANHOUTTE, F. et al. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR3 synergy and cross-inhibition in murine myeloid dendritic cells. **Immunol Lett**, v. 116, n. 1, p. 86-94, Feb 15 2008. ISSN 0165-2478 (Print)
0165-2478 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18166232> >.

VIGNALI, D. A.; KUCHAROO, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nat Immunol**, v. 13, n. 8, p. 722-8, Jul 19 2012. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22814351> >.

VON MEYENN, F. et al. Toll-like receptor 9 contributes to recognition of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin by Flt3-ligand generated dendritic cells. **Immunobiology**, v. 211, n. 6-8, p. 557-65, 2006. ISSN 0171-2985 (Print)
0171-2985 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920494> >.

WANG, F. et al. Escherichia coli maltose-binding protein (MBP) directly induces mouse Th1 activation through upregulating TLR2 and downregulating TLR4 expressions. **Immunobiology**, v. 220, n. 6, p. 782-8, Jun 2015. ISSN 1878-3279 (Electronic)
0171-2985 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25601391> >.

WANG, H. P.; HE, Z. G. Treatment with incomplete Freund's adjuvant and Listeria monocytogenes delays diabetes via an interleukin-17-secretion-independent pathway. **Exp Ther Med**, v. 9, n. 5, p. 1934-1938, May 2015. ISSN 1792-0981 (Print)
1792-0981 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26136917> >.

WEAVER, C. T. et al. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. **Annu Rev Pathol**, v. 8, p. 477-512, Jan 24 2013. ISSN 1553-4014 (Electronic)
1553-4006 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23157335> >.

WILSON, N. S.; VILLADANGOS, J. A. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. **Immunol Cell Biol**, v. 82, n. 1, p. 91-8, Feb 2004. ISSN 0818-9641 (Print)
0818-9641 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14984600> >.

WORBS, T.; HAMMERSCHMIDT, S. I.; FORSTER, R. Dendritic cell migration in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 1, p. 30-48, Jan 2017. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking). Disponible em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27890914> >.

XIONG, H. et al. Inhibition of interleukin-12 p40 transcription and NF-kappaB activation by nitric oxide in murine macrophages and dendritic cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 11, p. 10776-83, Mar 12 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679201> >.

XUE, X. et al. Microbiota downregulates dendritic cell expression of miR-10a, which targets IL-12/IL-23p40. **J Immunol**, v. 187, n. 11, p. 5879-86, Dec 01 2011. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068236> >.

YAMANE, H.; PAUL, W. E. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. **Immunol Rev**, v. 252, n. 1, p. 12-23, Mar 2013. ISSN 1600-065X (Electronic) 0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23405892> >.

YAO, J.; LIU, L.; YANG, M. Interleukin-23 receptor genetic variants contribute to susceptibility of multiple cancers. **Gene**, v. 533, n. 1, p. 21-5, Jan 01 2014. ISSN 1879-0038 (Electronic) 0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076440> >.

YAROVINSKY, F. et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1626-9, Jun 10 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15860593> >.

ZHANG, S. Y. et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. **Science**, v. 317, n. 5844, p. 1522-7, Sep 14 2007. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17872438> >.

ZHOU, H.; WU, L. The development and function of dendritic cell populations and their regulation by miRNAs. **Protein Cell**, Mar 31 2017. ISSN 1674-8018 (Electronic) 1674-800X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28364278> >.

ZHU, J. et al. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. **J Immunol**, v. 166, n. 12, p. 7276-81, Jun 15 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390477> >.

ZHU, J. et al. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells

and inhibition of Th1 cell-specific factors. **Cell Res**, v. 16, n. 1, p. 3-10, Jan 2006. ISSN 1001-0602 (Print) 1001-0602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467870> >.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74-80, Oct 21 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628149> >.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1

Parecer do comitê de ética

8.2 Anexo 2

Comprovante de submissão de artigo

8.3 Anexo 3

Produção científica durante o período do doutorado

8.1 Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética



Goânia, 14 de outubro de 2013.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA
PROTOCOLADO NA CEUA SOB O Nº. 038/13**

I IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** Avaliação da produção de IL-12 e IL-23 por uma nova linhagem de célula dendrítica murina após o estímulo com diferentes ligantes dos receptores semelhantes ao toll (TLRs)
2. **Pesquisador Responsável:** Milton Adriano Pelli de Oliveira
3. **Unidade/Órgão:** IPTSP / UFG
4. **Pesquisadores Participantes:** Milton Adriano Pelli de Oliveira; Pollyana Guimarães de Oliveira; Jéssica Cristina dos Santos; Claysom Moura Gomes; Lucilla Ribeiro Ávila; Fátima Ribeiro Dias; Fernanda Dias Tomé; Nathália Oliveira de Carvalho.
5. **Unidade onde será realizado:** Instituto Patologia Tropical e Saúde Pública
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 28/05/2013
7. **Data de Atendimento das Pendências:** 12/09/2013

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios de pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08. Reiteramos a importância deste Parecer Consubienciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONSEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 15/01/2017.

III - Data da reunião: 14/10/2013

Dra. Ekaterina Aleksandra Benovchenko Rivera
Coordenadora do PRPPG/UFG

[Handwritten signature]

Prof.ª Ekaterina Aleksandra Benovchenko Rivera
Coordenadora do PRPPG/UFG
Membro Titular da Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Pólo da Relatoira, Piso I, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3321-1215.

8.2 Anexo 2 - Comprovante de submissão de artigo

[Home](#) [Reports](#)


CIMM_2018_322 | Research Paper

Dendritic cell line AP284 supports Th17 generation

Milton Oliveira | R. 235 S/N, Brazil.

Status: **With Editor (13 days)** | Submitted: **16/Oct/2018**[Overview](#)[Files](#)[Messages](#)**Other Authors** [Show Details](#)

Pollyana Oliveira (Universidade Federal de Goiás), Clayson Gomes (Universidade Federal de Goiás), Lucilla Avilla (Centro Universitário de Goiatuba), Fatima Ribeiro Dias (Universidade Federal de Goiás), Pieter Leenen (Erasmus University Medical Center)

Contact E**Abstract**

Dendritic cells (DC) have the unique ability to capture microorganisms and activate naive T lymphocytes. Obtaining DC derived from progenitors demands high cost and prolonged cultivation. Different immortalized DC has been isolated but most of them have immature phenotype and depending on growing factors or other stimuli to be used. In this study we characterized the cell line AP284 as a DC. AP284 cells express high levels of CD11b, MHC class II, 33D1 and CD209b. They also express high amounts of CD80 costimulatory molecule and different toll like receptors (TLR). After stimuli with TLR agonist they produce surprising amount of IL-12p40 related to IL-23 formation but not IL-12p70. They are also able to produce IL-6 and favor development of a Th17 but not Th1 profile. This DC line may be useful for a better understanding of factors and cellular interactions responsible for the induction of IL-12p40, IL-23 and Th17 generation.

Taxonomy

Microbiology, Immunology

Key

imrr



Milton Oliveira <miltonoliveira.ufg@gmail.com>

Your manuscript CIMM_2018_322 has been sent for review

1 message

Cellular Immunology <EvisSupport@elsevier.com>
 Reply-To: ci@elsevier.com
 To: miltonoliveira.ufg@gmail.com

Mon, Oct 29, 2018 at 9:29 PM

This message was sent automatically. Please do not reply.

Reference: CIMM_2018_322
 Title: Dendritic cell line AP284 supports Th17 generation
 Journal: Cellular Immunology

Dear Dr. Oliveira,

I am currently identifying and contacting reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer review is a voluntary service it can take time to find reviewers who are both qualified and available. While reviewers are being contacted, the status of your manuscript will appear in EVISE® as 'Reviewer Invited'.

Once a reviewer agrees to review your manuscript, the status will change to 'Under Review'. When I have received the required number of expert reviews, the status will change to 'Ready for Decision' while I evaluate the reviews before making a decision on your manuscript.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® and go to 'My Submissions' via:
http://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=CIMM

Kind regards,

Cellular Immunology

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

8.3 Anexo 3 - Produção científica durante o período do doutorado



Pathogens and Disease, 74, 2016, ftw023

doi: 10.1093/fems/di/ftw023
Advance Access Publication Date: 11 April 2016
Research Article

RESEARCH ARTICLE

Leishmania (Viannia) braziliensis amastigotes from patients with mucosal leishmaniasis have increased ability to disseminate and are controlled by nitric oxide at the early stage of murine infection

Clayson M. Gomes^{1,2}, Lucilla R. Ávila¹, Jéssica C. Santos¹, Pollyana G. Oliveira¹, Fernanda D. Tomé¹, Ledice I. A. Pereira¹, Miriam L. Dorta¹, Ruy S. Lino Jr.¹, Fátima Ribeiro-Dias¹ and Milton A. P. Oliveira^{1,*}

¹Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, GO 74605050, Brazil and ²Medical and Pharmaceutical Sciences School, Pontifical Catholic University of Goiás, Goiânia, GO 74605010, Brazil

*Corresponding author: Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, GO 74605050, Brazil. Tel: +55-62-32096126; Fax: +55-62-32096363; E-mail: miltonoliveira.ufg@gmail.com

One sentence summary: Parasites that cause mucosal leishmaniasis are different from parasites that cause only cutaneous lesions.
Editor: Patricia Bozza

ABSTRACT

Mucosal leishmaniasis (ML) caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* usually appears after the healing of the primary lesion when amastigotes disseminate from the infection site to the mucosal area. Here, we investigated murine infection with amastigotes obtained from patients with ML or localized cutaneous leishmaniasis (LCL). Amastigotes were used to infect wild type, IFN- γ KO and inducible nitric oxide synthase (iNOS) KO mice. Amastigotes from patients with LCL induced lesions that appeared earlier in IFN- γ KO than parasites from ML. The lesion after infection with ML appeared early in iNOS KO than in IFN- γ KO mice and in iNOS KO mice parasites from ML and LCL cause similar lesions at the initial phase of infection, while parasites from ML induced greater lesions than the ones from LCL at the late phase. A greater number of parasites were observed in spleen of IFN- γ KO and iNOS KO mice infected with amastigotes from patients with ML than those with LCL. Parasites from ML infect a lower percentage of macrophages and are killed independent on IFN- γ and dependent on NO. The data suggest that amastigotes responsible for mucosal lesion in humans develop slowly on the initial phase of infection due to high susceptibility to NO and they have an increased ability to disseminate.

Keywords: *Leishmania (V.) braziliensis*; amastigote; nitric oxide; mucosal leishmaniasis; Interferon-gamma

Received: 14 November 2015; Accepted: 24 March 2016
© FEMS 2016. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Downloaded from <http://fems.oxfordjournals.org/> by guest on April 27, 2016



Original article

Promastigote parasites cultured from the lesions of patients with mucosal leishmaniasis are more resistant to oxidative stress than promastigotes from a cutaneous lesion

Lucilla Ribeiro Ávila^a, Clayson Moura Gomes^{a, b}, Pollyana Guimarães Oliveira^a, Rodrigo Saar Gomes^a, Marina Clare Vinaud^a, Miriam Leandro Dorta^a, Silvia Reni Bortolin Uliana^c, Fátima Ribeiro-Dias^a, Milton Adriano Pelli de Oliveira^{a, *}

^a Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 2355/N, Goiânia, Goiás 74605-050, Brazil

^b Pós-graduação em Patologia Tropical, Universidade Católica de Goiás, Av. Universitária 1069, Setor Universitário, Goiânia, Goiás 74605-010, Brazil

^c Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Líneu Prestes 1374, São Paulo, SP 05508-000, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Leishmania (Viannia) braziliensis
Amastigote
Promastigote
Nitric oxide
Reactive oxygen species
Thiol-specific antioxidant protein

ABSTRACT

Human leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* can be presented as localized cutaneous leishmaniasis (LCL) or mucosal leishmaniasis (ML). Macrophages kill parasites using nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). The aim of this study was to evaluate the ability of parasites obtained from patients with LCL or ML to produce and resist NO or ROS. Promastigotes and amastigotes from LCL or ML isolates produced similar amounts of NO in culture. Promastigotes from ML isolates were more resistant to NO and H₂O₂ than LCL parasites in a stationary phase, whereas amastigotes from LCL isolates were more resistant to NO. In addition, in the stationary phase, promastigote isolates from patients with ML expressed more thiol-specific antioxidant protein (TSA) than LCL isolates. Therefore it is suggested that infective promastigotes from ML isolates are more resistant to microbicidal mechanisms in the initial phase of infection. Subsequently, amastigotes lose this resistance. This behavior of ML parasites can decrease the number of parasites capable of stimulating the host immune response shortly after the infection establishment.

3421897: Minor Revision Required

1 message

Daniela Novick <mi@hindawi.com>

Sat, Oct 20, 2018 at 6:49 AM

Reply-To: nourhan.mabrouk@hindawi.com

To: rosana@patge.uftm.edu.br

Cc: daniela.novick@weizmann.ac.il, marcosuftm@gmail.com, veralucialial@hotmail.com, wendyson.duarte@hotmail.com, nataliacascudo_c@hotmail.com, pollyana.bio@gmail.com, crislaine.0604@gmail.com, aline.souza_1@hotmail.com, marialuizapatologia@gmail.com, miltonoliveira.ufg@gmail.com, ruyfino@yahoo.com.br, rubia.celes@gmail.com, juliana.patologiageral@gmail.com

Dear Dr. Corrêa,

Following the review of your Research Article titled "up-regulation of cardiac il-10 and down-regulation of ifn- γ in balb-c il-4^{-/-} in acute chagasic myocardites due colombian strain of trypanosoma cruzi" by Marcos Vinícius da Silva, Vera Lúcia de Almeida, Wendyson Duarte de Oliveira, Natália Carasek Matos Cascudo, Pollyana Guimarães de Oliveira, Crislaine Aparecida da Silva, Aline Cristina Souza da Silva, Maria Luiza Gonçalves dos Reis Monteiro, Rosana Rosa Miranda Corrêa, Milton Adriano Pelli Oliveira, Ruy de Souza Lino Junior, Mara Rubia Celes and Juliana Reis Machado, I recommend that it should be revised taking into account the changes requested by the reviewer(s). As the submitting author, please log in to the Manuscript Tracking System to read the submitted review report(s) and submit the revised version of your manuscript no later than Saturday, November 03, 2018.

To submit your revised manuscript, please access "Author Activities" in your account and upload the PDF file of your revised manuscript. Also, please submit your replies to the comments of the reviewer(s) as an additional PDF file.

Best regards,

Daniela Novick
daniela.novick@weizmann.ac.il