



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DO EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE A
CAPACIDADE DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULAREM
CÉLULAS T**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e
Molecular como requisito
para obtenção do grau de
Mestre.

Autora

Luciana Farias Pereira

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Cristina Bonorino

Porto Alegre, Março de 2010

AGRADECIMENTOS

À Prof^a.dr^a. Cristina Bonorino, a quem admiro muito e tenho profundo carinho. Agradeço sua orientação, dedicação e incentivo que foram indispensáveis nessa jornada.

À minha mãe, Regina Farias, por ter sido a melhor mãe que poderia ser. Te amo!

Aos meus queridos colegas de laboratório por todo carinho, apoio e principalmente por serem as pessoas maravilhosas e divertidíssimas que são. À Ana Paula Duarte por sua imensa geniosidade, Caren de Oliveira pela amizade e pelos momentos alegres que me proporcionasse até nas horas difíceis.

A todos os professores que contribuíram para minha formação, e todas as pessoas que de alguma forma tenham colaborado direta ou indiretamente para que esse objetivo fosse alcançado. Muito obrigada!

Aos camundongos que deram suas vidas para que fosse possível a realização desse trabalho.

E finalmente meu maior agradecimento, ao meu querido filho, Kalian, por existir e ser a força motivadora de todas as minhas realizações, te amo mais que tudo no mundo... Mais que o infinito!

RESUMO

O envelhecimento está associado com o declínio progressivo nas funções do sistema imunológico (imunosenescência), tanto na imunidade humoral quanto na imunidade mediada por células, resultando em maior suscetibilidade a infecções e câncer, além da diminuição na capacidade de responder a vacinas. As células dendríticas (DCs) são as mais poderosas e eficientes apresentadoras de antígenos (APC), desempenhando um papel primordial na apresentação e consequente resposta imune mediada por células T. Poucos estudos enfocam a atividade das células dendríticas no envelhecimento, sendo que a maioria dos dados são relativos às funções das células T. As interações entre as células dendríticas e as células T afetam o processamento e consequente apresentação de antígenos, influenciando a efetividade das respostas imunes mediadas por células T. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade estimulatória de células dendríticas de camundongos velhos em uma resposta específica T CD4⁺ comparada à resposta imune de camundongos jovens. Para isso, células T de camundongos transgênicos TEa, específicas para o complexo Ea:IA^b foram transferidas para camundongos normais C57Bl/6, células T de camundongos jovens para animais velhos e jovens, e células T de camundongos velhos para animais velhos e jovens. Os resultados demonstram que, após imunização com o antígeno EaRFP, tanto as células T jovens quanto as células T velhas foram estimuladas de modo semelhante por células dendríticas jovens. Contudo, células dendríticas de animais velhos não foram capazes de estimular suficientemente as células T de animais velhos nem mesmo as células T de animais jovens. Enquanto ambas as células T, jovens e velhas, adquiriram o fenótipo CD44⁺ quando transferidas para os animais jovens, células T jovens transferidas para animais velhos não adquiriram o mesmo fenótipo. Esse fato sugeriu que células dendríticas de animais velhos possuem baixa capacidade de estimular células T, mesmo que essas células venham de um animal jovem. Nós hipotetizamos que esse resultado poderia estar ligado a um número extremamente diminuído de células dendríticas nos animais velhos, ou ainda em uma deficiência em um dos sinais fornecidos pelas células dendríticas no priming de linfócitos T (apresentação de antígeno ou sinais coestimulatórios). O número total de células dendríticas foi significativamente menor em camundongos velhos comparado a camundongos jovens. Além disso, o número de células apresentando antígeno foi menor no linfonodo drenante de animais velhos, e a expressão de CD86 por células dendríticas de animais velhos não foi diferente da dos animais jovens. Os resultados sugerem que a diminuição da capacidade de apresentação de antígeno apresentada no envelhecimento é crítica para a perda do potencial estimulatório de células T CD4⁺ por células dendríticas.

Palavras-chave: Células dendríticas; Envelhecimento; Imunosenescência; Células T

ABSTRACT

Aging is associated with the gradual decline in the immune system function (immunosenescence), both in humoral immunity as well in cell-mediated responses, resulting in an increased susceptibility to infections and cancer, as well as reduced response to vaccination. Dendritic cells (DCs) are the most powerful and efficient antigen-presenting cells (APC), playing a pivotal role in the presentation and consequent T-cell mediated immune response. However, most of the studies focusing on immunosenescence focus on T cells. Also, most of the data on aged dendritic cells come from *in vitro* studies. The interaction between dendritic and T cells affects the processing and consequent presentation of antigens, influencing the effectiveness of T cell-mediated immune responses. The goal of this study was to evaluate the stimulatory capacity of dendritic cells from old mice in a specific T CD4⁺ response compared to young mice *in vivo*. Transgenic T cells from TEa mice, specific for the Ea:IA^b complex were transferred to normal C57Bl/6 mice. T cells from young mice being transferred into young and old animals, and T cells from old mice transferred into young and old animals. The results demonstrate that, after immunization with EaRFP antigen, young dendritic cells stimulated equally young and old T cells. However, dendritic cells from old animals were less capable of stimulating old as well as young T cells. While both T cells, young and old, acquired CD44⁺ phenotype when transferred to young animals, young T cells when transferred to old animals did not acquired the same phenotype. This fact suggested that dendritic cells from old animals possess lower capacity to stimulate T cells, even if these cells come from a young animal. We hypothesized that this could be due to an extremely diminished dendritic cells number in old animals, or rather to some deficiency in one of the signals supplied by dendritic cells in T lymphocyte priming (antigen presentation or co-stimulatory signals). The dendritic cells total number was lower in old mice compared to young mice. Also, the number of antigen presenting cells was lower in draining lymph nodes of old animals and the expression of CD86 by dendritic cells did not differ between old and young animals. Altogether, the results suggest that the impairment of antigen presentation capacity presented by aged dendritic cells is critical for their loss of stimulatory potential of CD4⁺ T cells.

Keywords: Dendritic cells; Aging; Immunosenescence; T cells

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 BIOLOGIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	8
1.1.1 Subpopulações de DCs.....	12
1.1.2 Migração das células dendríticas.....	13
1.2 INTERAÇÃO CÉLULAS DENDRÍTICAS – CÉLULAS T.....	14
1.2.1 Captura de antígenos.....	14
1.2.2 Resultados divergentes na literatura.....	16
1.2.3 DCs, tumores e infecções no envelhecimento.....	18
1.2.4 Outros aspectos da imunosenescência.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO	23
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo complexo que tem impacto negativo na manutenção do sistema imune e de suas funções. Imunosenescência é o termo que se refere à deterioração progressiva das funções do sistema imunológico relacionadas ao envelhecimento em humanos e animais (Pawelec e Solana, 1997). Esse declínio nas funções imunes afeta tanto a imunidade inata quanto adaptativa. A maior parte dos dados relacionando envelhecimento e sistema imune se concentra nas alterações que afetam as células T, como: defeitos nas rotas de sinalização, diminuição na taxa de proliferação em resposta a antígenos específicos, aumento nos fenótipos de memória (Miller, 1996; Yung, 2000), alteração na produção de citocinas, e diminuição das respostas por células T citotóxicas (Saltzman e Peterson, 1987; Powers e Belshe, 1993; Pawelec, Barnett *et al.*, 2002). Foi também relatado que a resposta mediada por células T em indivíduos idosos é menos eficaz se comparada com indivíduos jovens, em humanos (Miller, 1991, 1996; Haynes, Eaton *et al.*, 2000) e camundongos (Linton, Haynes *et al.*, 1996; Haynes, Schmitz *et al.*, 1999; Haynes, Eaton *et al.*, 2002; Eaton, Burns *et al.*, 2004; Haynes, Eaton *et al.*, 2004). As respostas T CD4⁺ parecem ser especialmente prejudicadas no envelhecimento (Grolleau-Julius, Garg *et al.*, 2006; Agrawal, Agrawal *et al.*, 2007; Paula, Motta *et al.*, 2009). Entretanto, as conhecidas modificações no funcionamento dos linfócitos T, podem não explicar completamente os defeitos observados nas respostas imunológicas durante o processo de envelhecimento, outros componentes do sistema imune podem ter um papel igualmente importante no desenvolvimento da imunosenescência. As

células dendríticas têm recebido cada vez mais atenção devido ao seu potencial como adjuvante biológico no desenvolvimento de vacinas antitumorais e no papel que apresentam na tolerância imunológica e autoimunidade. No entanto, apesar da grande importância, as bases para compreensão do processo de imunosenescência não são completamente esclarecidas.

As células dendríticas (DCs) são as mais poderosas e eficientes apresentadoras de antígenos (APC), desempenhando um papel primordial na apresentação e consequente resposta imune mediada por células T. São consideradas apresentadoras de antígenos “profissionais”, por sua característica única e exclusiva de expressar constitutivamente níveis elevados de moléculas de MHC (Major Histocompatibility Complex) classes I e II e moléculas coestimulatórias. Além disso, sua localização estratégica e o trânsito das células dendríticas entre os meios externo (tecidos) e interno (órgãos linfóides) possibilita a conexão entre a imunidade inata e adaptativa (Kapsenberg, 2003; Hackstein e Thomson, 2004; Hugues, Boissonnas *et al.*, 2006; Reis E Sousa, 2006; Schuurhuis, Fu *et al.*, 2006).

1.1 BIOLOGIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Células tronco hematopoiéticas da medula óssea geram células progenitoras multipotentes que se diferenciam em precursores linfóides ou mielóides, que por sua vez podem dar origem a todos os subtipos de células dendríticas. Sob condições inflamatórias - presença de GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), monócitos podem se diferenciar em

DCs convencionais (Wu e Liu, 2007). As células dendríticas imaturas (iDCs) são então recrutadas para a periferia onde estão continuamente capturando e processando antígenos através da via endossomal-MHC II. Ao encontrarem antígenos, as DCs imaturas, migram até os linfonodos onde estes são processados e apresentados na forma de peptídeos, nas moléculas de MHC, na superfície celular (Shortman e Liu, 2002). Nos linfonodos as DCs maturam fenotipicamente e expressam várias moléculas de superfície celular, além de secretar diversas citocinas que atuam em seus processos de migração e interação com as células T, B e Natural Killer (NK).

As células dendríticas são capazes de ativar células T virgens e modular respostas imunes. As interações das células dendríticas fenotipicamente maduras com as células T, B e NK promovem suas respostas específicas e as diferenciam em células dendríticas maduras funcionais. A maturação das células dendríticas está associada com diversos eventos coordenados, incluindo a perda de receptores endocíticos/fagocíticos, super-regulação de moléculas coestimulatórias, modificações morfológicas (Banchereau e Palucka, 2005), mudanças nas moléculas de adesão, super-regulação das moléculas de MHC e secreção de um grande número de citocinas e outros mediadores inflamatórios que possibilitam a comunicação entre as próprias células dendríticas e com outras células do sistema imune (Schuurhuis, Fu *et al.*, 2006). DCs maduras e imaturas possuem diferentes funções, DCs imaturas induzem tolerância. Nos tecidos as DCs estão constantemente monitorando o ambiente, capturando antígenos e migrando em pequenos números para os linfonodos drenantes. Na ausência de inflamação as DCs permanecem no estado imaturo, e os antígenos são apresentados às células T no linfonodo

sem coestimulação, levando à deleção das células T ou à geração de células T regulatórias (Banchereau e Palucka, 2005). Porém foi sugerido que DCs maduras quiescentes também geram tolerância, enquanto DCs maduras completamente ativadas geram imunidade (Shortman e Heath, 2001). Foi demonstrado que células dendríticas provenientes de linfonodos de camundongos velhos apresentam características degenerativas como diminuição na expressão de moléculas de adesão, menor formação de dendritos e capacidade de capturar antígenos reduzida, sugerindo alterações na atividade funcional das DCs com o envelhecimento (Grewe, 2001).

As DCs são capazes de modular as respostas imunes adaptativas de duas formas: modulando a expressão de moléculas coestimulatórias e inibitórias, o que regula a apresentação para as células T e B, e através da produção de citocinas em resposta a patógenos, que é em grande parte responsável pela determinação do tipo de resposta – TH1/TH2/TH3 (Kapsenberg, 2003).

É possível induzir a maturação das células dendríticas *in vitro* com citocinas, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) ou com lipopolisacarídeo (LPS). Células dendríticas maduras são caracterizadas por apresentarem habilidade reduzida na captura de antígenos e maior capacidade coestimulatória sobre as células T (Grolleau-Julius, Garg *et al.*, 2006). Células dendríticas imaturas podem ser geradas a partir de células progenitoras da medula óssea pela estimulação com GM-CSF e interleucina 4 (IL-4) (Palucka e Banchereau, 1999) essas células apresentam alta atividade endocítica/fagocítica e baixa expressão de moléculas acessórias para ativação de células T (Guermonprez, Valladeau *et al.*, 2002). Um estudo demonstrou

que a geração de células dendríticas através de monócitos provenientes do sangue, na presença de GM-CSF e IL-4, foram similares entre culturas de indivíduos jovens e idosos. Tanto as DCs de jovens quanto de idosos foram capazes de estimular a proliferação de células T e a produção de citocinas pelas mesmas (Lung, Saurwein-Teissl *et al.*, 2000). Em um estudo *in vitro*, comparando DCs humanas derivadas de monócitos, não foram constatadas diferenças no padrão de expressão de moléculas de superfície e na capacidade de apresentação de antígenos entre DCs geradas de indivíduos jovens e idosos. Interessantemente as DCs de indivíduos idosos sobreviveram melhor em cultura (Steger, Maczek *et al.*, 1996). Em um modelo de senescência *in vitro*, o mesmo grupo verificou que em relação à responsividade das células T a antígenos, as DCs de indivíduos idosos, se apresentaram tão eficazes quanto as DCs de indivíduos jovens (Steger, Maczek *et al.*, 1997). Porém, é possível que as células dendríticas *in vivo* apresentem menor potencial para cruzar as barreiras dos tecidos e produzir respostas imunes (Wick e Grubeck-Loebenstein, 1997). Apesar de a demarcação entre as células dendríticas e os macrófagos ter sido recentemente questionada (Hume, 2008) e de os basófilos apresentarem um papel na resposta Th2 (Perrigoue, Saenz *et al.*, 2009), as células dendríticas ainda são, por consenso, uma população distinta, com capacidades únicas de estimularem as células T (Heath e Carbone, 2009).

1.1.1 Subpopulações de DCs

As células dendríticas constituem uma população de células derivadas da medula óssea, amplamente distribuídas. Existem várias subpopulações de DCs que desempenham diferentes funções no sistema imune (Shortman e Liu, 2002). A principal subdivisão encontrada tanto em humanos quanto em camundongos inclui as células dendríticas plasmacitóides (pDC), conhecidas por secretarem grandes quantidades de interferon α e β após infecções virais ou microbianas (Cella, Jarrossay *et al.*, 1999) e as células dendríticas convencionais (cDC), encontradas nos tecidos não-linfóides, na circulação e nos tecidos linfóides. As cDCs podem ser divididas em células de Langerhans (LC) encontradas na epiderme e em células dendríticas dermais, além de outras classificações dependentes de sua localização (Wu e Liu, 2007). As células dendríticas convencionais (cDC) possuem a capacidade de fazer apresentação cruzada – habilidade de apresentar antígenos exógenos nas moléculas de MHC classe I (Villadangos e Schnorrer, 2007). Estudos têm demonstrado que as DCs CD103+, são as maiores responsáveis pela apresentação de antígenos restritos ao MHC I (Belz, Smith *et al.*, 2004; Del Rio, Rodriguez-Barbosa *et al.*, 2007; Bedoui, Whitney *et al.*, 2009). Em relação às células de Langerhans, foi demonstrado que a frequência de células LC MHC II+ foi significativamente menor na epiderme de camundongos velhos comparada com camundongos jovens (Cumberbatch, Dearman *et al.*, 2002).

A heterogeneidade entre as células dendríticas isoladas de diferentes órgãos linfóides pode ser determinada pela análise de seus marcadores de superfície celular.

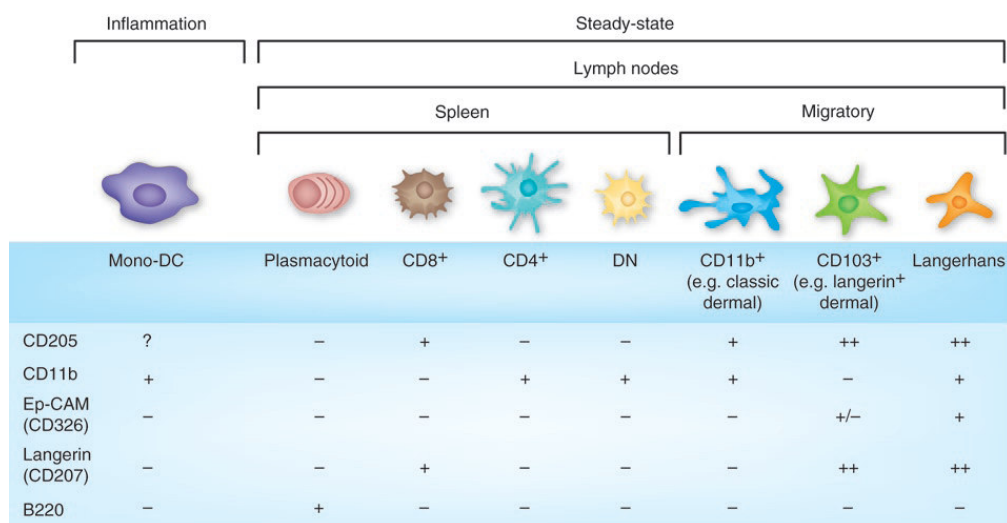


Figura 1 – Fenótipo e localização das subpopulações das DCs. DN, duplo negativas (CD4⁻ CD8⁻); Mono-DC, DCs derivadas de monócitos.

Fonte: HEATH; CARBONE, 2009. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat. Immunol.* p. 1239.

1.1.2 Migração das células dendríticas

Durante o processo de migração, a expressão do receptor de quimiocina CCR7 é aumentada em resposta à quimiocina CCL19, permitindo a migração das DCs para as regiões das células T nos órgãos linfóides (Ardehna, Pizzey *et al.*, 2002; Caux, Vanbervliet *et al.*, 2002). Como as células dendríticas de camundongos *knockout* para o receptor CCR7 não conseguem migrar para os linfonodos, a interação entre esse receptor e seus ligantes parece ser essencial para o funcionamento adequado do processo de migração das DCs periféricas para os linfonodos (Forster, Schubel *et al.*, 1999). Apesar de a expressão basal de CCR7 nas DCs, e de CCL19 e CCL21 no microambiente tecidual ser comparável entre camundongos jovens e velhos, a habilidade de super-regular essas moléculas após imunização é significativamente afetada em camundongos velhos (Linton, Li *et al.*, 2005; Grolleau-Julius, Garg *et al.*, 2006).

Defeitos observados no processo de migração de DCs de indivíduos idosos podem ser em parte responsáveis pela alteração das respostas imunes adaptativas no envelhecimento (Cumberbatch, Dearman *et al.*, 2002; Linton, Li *et al.*, 2005).

O comportamento migratório não é igual entre as diferentes subpopulações de DCs. As DCs plasmacitóides, por exemplo, apresentam um padrão de migração consistente com um papel relacionado à apresentação de antígenos e/ou imuno-modulação nos sítios de infecção ou inflamação, enquanto a função de transportar antígenos aos linfonodos locais, para apresentação às células T, é mais relacionada com as DCs convencionais (Villadangos e Schnorrer, 2007).

Como o processo de migração está intimamente ligado com a maturação das DCs e conseqüentemente com sua função sobre as células T, falhas na migração das células dendríticas podem apresentar um papel relevante na imunosenescência (Agrawal, Agrawal *et al.*, 2007).

1.2 INTERAÇÃO CÉLULAS DENDRÍTICAS – CÉLULAS T

1.2.1 Captura de antígenos

As células dendríticas capturam antígenos através de diversos processos, incluindo micropinocitose, fagocitose de células necróticas e apoptóticas, vírus e bactérias, endocitose mediada por receptores de lectina do tipo C ou receptores Fcγ (partículas opsonizadas ou complexos imunes) e internalização de proteínas de choque térmico, como a hsp70, através de

múltiplos receptores, incluindo TLR2/TLR4 (Toll-like receptors) (Medzhitov e Janeway, 2000; Dubsky, Ueno *et al.*, 2005). Foi demonstrado que APCs de animais velhos apresentam expressão reduzida de TLR e moléculas coestimulatórias (Plowden, Renshaw-Hoelscher *et al.*, 2004). A diminuição na capacidade de capturar antígenos pode afetar também o processamento e a apresentação dos mesmos, alterando a efetividade das respostas mediadas por células T no envelhecimento. As DCs diferenciam células apoptóticas de células necróticas, os antígenos gerados de ambos os tipos de morte celular são capturados e apresentados às células T. Sob condições fisiológicas, células dendríticas imaturas estão continuamente capturando amostras de antígenos próprios oriundos de células apoptóticas resultando na autotolerância periférica. Em contraste, a captura de antígenos provenientes de células necróticas promove a maturação das células dendríticas levando à super-regulação das moléculas coestimulatórias e subsequente geração de imunidade contra antígenos endógenos (Gallucci, Lolkema *et al.*, 1999; Sauter, Albert *et al.*, 2000). Então, processos eficientes de fagocitose e remoção de células apoptóticas são fundamentais para a manutenção da autotolerância periférica. Como a fagocitose de células apoptóticas desencadeia uma resposta antiinflamatória pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e indução de citocinas antiinflamatórias, defeitos nos processos de captação de antígenos e consequente remoção de células apoptóticas pelas células dendríticas de indivíduos idosos podem desencadear estados inflamatórios e autoimunidade, geralmente associados ao envelhecimento. Níveis elevados de mediadores inflamatórios e inflamação crônica têm sido relatados em indivíduos idosos (Penninx, Kritchevsky *et al.*, 2004; Trzonkowski,

Mysliwska *et al.*, 2004). Foi também relatado que mudanças oxidativas afetam o processo de fagocitose em macrófagos murinos (Swift, Burns *et al.*, 2001; Videla, Tapia *et al.*, 2001).

1.2.2 Resultados divergentes na literatura

Resultados diferentes são encontrados na literatura em relação ao processo de imunosenescência. Em humanos, a capacidade de secretar as citocinas TNF- α e IL-6 em resposta ao LPS não demonstra ter sofrido alteração com o envelhecimento (Luz, Dornelles *et al.*, 2003), ou mostra-se aumentada (Agrawal, Agrawal *et al.*, 2007). Em contraste, em camundongos, também em resposta ao LPS, observou-se a diminuição na produção das mesmas citocinas e aumento na produção de IL-10 (Chelvarajan, Collins *et al.*, 2005; Grolleau-Julius, Garg *et al.*, 2006) em camundongos velhos. Células dendríticas derivadas de monócitos de indivíduos idosos não apresentaram alterações na habilidade de induzir respostas mediadas por células T (Grewe, 2001) ou na proliferação de linhagens de células T (Steger, Maczek *et al.*, 1997). Entretanto a eficácia de vacinas antitumorais autólogas baseadas em DCs apresentou-se prejudicada em indivíduos idosos (Sharma, Dominguez *et al.*, 2006).

Outro estudo mostrou que enquanto o número de células dendríticas mielóides, no sangue periférico de humanos não apresentou diferença com a idade, a proporção de células dendríticas plasmacitóides diminuiu significativamente nos idosos (Teig, Moses *et al.*, 2002). Em humanos idosos saudáveis foi detectada a diminuição significativa de pDCs circulantes em relação ao grupo jovem (Shodell e Siegal, 2002). Entretanto, em outro estudo

foi demonstrado que o número de mDCs na circulação periférica aumentou significativamente com o envelhecimento, porém o número de pDCs não demonstrou diferença significativa com o envelhecimento (Della Bella, Bierti *et al.*, 2007). Como as diferentes subpopulações de DCs reconhecem preferencialmente diferentes patógenos e produzem diferentes tipos de citocinas, as alterações relacionadas ao envelhecimento, podem ter um papel importante no desenvolvimento das respostas imunológicas.

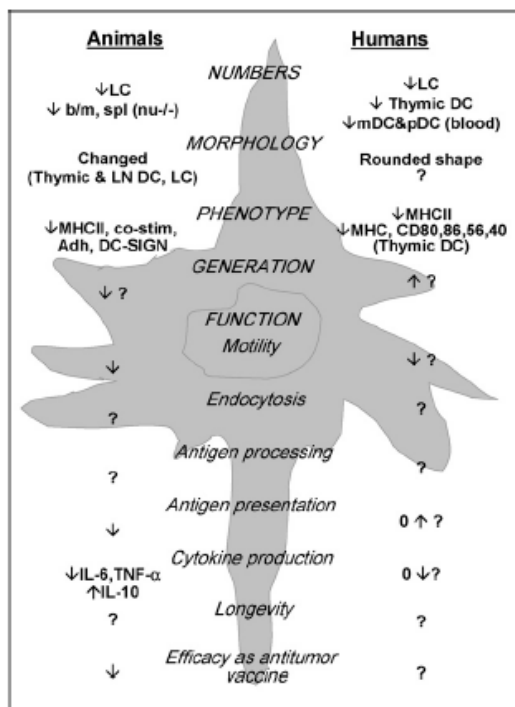


Figura 2 – Alterações nas células dendríticas associadas ao envelhecimento em animais e humanos. DC, célula dendrítica; mDC, DC mielóide; pDC, DC plasmacitóide; LC, células de Langerhans; LN, linfonodo; co-stim, moléculas coestimulatórias; Adh, moléculas de adesão; spl, baço; b/m, medúla óssea; (↑) super-regulação; (↓) regulação negativa; 0, sem efeito; (?) a ser determinado

Fonte: SHURIN; CHATTA, 2007. Aging and the dendritic cell system: implications for cancer. Crit. Rev. Oncol. Hematol. p. 95.

Como os dados em relação às células dendríticas e envelhecimento são relativamente escassos e algumas vezes conflitantes, a realização de estudos nessa área é fundamental, pois pouco se sabe ainda sobre os efeitos do envelhecimento sobre essas poderosas células apresentadoras de antígenos.

1.2.3 DCs, tumores e infecções no envelhecimento

A resposta imune mediada por células T contra tumores e infecções virais ou bacterianas baseia-se essencialmente no reconhecimento de peptídeos antigênicos processados e apresentados às células T pelas células dendríticas (Timmerman e Levy, 1999; Steinman, Turley *et al.*, 2000; Steinman e Nussenzweig, 2002). Foi demonstrado que em comparação com camundongos jovens, camundongos velhos foram dez vezes mais suscetíveis ao desafio com células tumorais (Shi, Bi *et al.*, 2005) sugerindo que o microambiente envelhecido afeta a resposta antitumoral pelas células dendríticas (Sharma, Dominguez *et al.*, 2006). Porém um estudo utilizando camundongos receptores jovens demonstrou que células dendríticas pulsadas com o peptídeo ovalbumina (OVA PP-DC) oriundas de camundongos velhos, foram menos efetivas do que as OVA PP-DCs de camundongos jovens, em induzir a regressão do melanoma B16 que expressa OVA (B16-OVA) (Grolleau-Julius, Garg *et al.*, 2006), indicando que existem também defeitos intrínsecos das células dendríticas envelhecidas. As DCs são um alvo importante no estudo e desenvolvimento de possíveis tratamentos antitumorais e vacinas envolvendo principalmente a população idosa, já que essa é

preferencialmente afetada por doenças com potencial de tratamento com imunoterapias baseadas em células dendríticas (Shurin, Shurin *et al.*, 2007).

A proteção imune contra infecções é também atribuída aos anticorpos circulantes e às células T CD8+ antígeno-específicas. Foi demonstrado que não há geração robusta e persistente de células de memória T CD8+, após infecção, em camundongos velhos, porém, as células de memória geradas na juventude, persistem e são funcionais durante o envelhecimento (Kapasi, Murali-Krishna *et al.*, 2002). Assim como as células T CD8+, células de memória T CD4+ geradas na juventude geralmente funcionam bem na velhice, entretanto as células de memória geradas na idade avançada não apresentam bom funcionamento (Haynes e Eaton, 2005).

A estimulação crônica das células T pela apresentação constante de antígenos persistentes, principalmente o Citomegalovírus (CMV), reduz o número de células T virgens que ainda não foram expostas a antígenos, além de aumentar o número de células T que encontraram antígenos, sofreram expansão clonal e agora apresentam fenótipos de memória e efetores (Ouyang, Wagner *et al.*, 2004). Essa expansão clonal está ligada à imunosenescência e a um perfil de risco imunológico (Pawelec, Ouyang *et al.*, 2002)

1.2.4 Outros aspectos da imunosenescência

As alterações associadas ao envelhecimento do sistema imune afetam diversos componentes tanto da imunidade inata quanto adaptativa. Células tronco hematopoiéticas são capazes de proliferar e se auto-renovar além de

gerar células mais diferenciadas, das quais as linhagens linfóides e mielóides se desenvolvem (Kondo, Wagers *et al.*, 2003). Portanto defeitos que possam ocorrer no sistema de geração de linfócitos devido ao envelhecimento podem afetar diretamente o sistema imunológico. Foi demonstrado que a capacidade de replicação das células tronco hematopoiéticas diminui com o envelhecimento (Geiger e Van Zant, 2002). Também já foi demonstrado que células-tronco hematopoiéticas derivadas de medula óssea ou purificadas, de camundongos velhos, não geram eficientemente linhagens linfóides (Sharp, Kukulansky *et al.*, 1990; Sudo, Ema *et al.*, 2000).

Outro fator associado aos efeitos observados no processo de imunosenescência é a involução do timo, que resulta em menor eficiência no desenvolvimento de células T e diminuição das células T virgens que são exportadas para os órgãos linfóides secundários, tanto em camundongos quanto em humanos, com o decorrer dos anos (Lynch, Goldberg *et al.*, 2009) e pode estar associada às alterações relacionadas às células T observadas na velhice.

Assim como as células T CD4+, as células T CD8+ também apresentam um declínio na responsividade a novos antígenos com o envelhecimento (Murasko e Jiang, 2005). A falta de estímulo adequado das células T CD4+, também prejudicadas com o envelhecimento, às células T CD8+, pode ser um dos fatores que afetam o funcionamento das células T CD8+ na idade avançada.

Apesar da diminuição na geração de células T virgens, indivíduos idosos, frequentemente retém alguma capacidade de gerar novas células T funcionais (Vasto, Malavolta *et al.*, 2006). Entretanto células T virgens de

indivíduos idosos apresentam telômeros mais curtos e um repertório de receptores de antígenos mais limitado do que as de indivíduos jovens, sugerindo que as células T virgens de idosos tenham passado por várias divisões celulares e podem ser consideradas células “velhas”, apesar de apresentarem fenótipo de células T virgens (Pawelec, Akbar *et al.*, 2004).

Uma visão diferente sobre imunosenescência é proposta por alguns pesquisadores e sugere que o processo de envelhecimento do sistema imune seria o resultado da remodelagem das funções imunológicas, onde algumas funções são reduzidas enquanto outras são aumentadas ou permanecem inalteradas, através de mecanismos compensatórios, considerando a imunosenescência um processo altamente dinâmico e não apenas um declínio unidirecional de todas as funções do sistema imune (Globerson e Effros, 2000).

Este trabalho visou analisar especificamente se há declínio na função estimulatória de células dendríticas sobre as células T CD4+ no envelhecimento, especialmente no tocante à estimulação antigênica, componente fundamental para que essas células adquiram fenótipo efetor in vivo.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade estimulatória de células dendríticas de camundongos velhos em uma resposta específica T CD4+.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a proliferação de células transgênicas TEa transferidas adotivamente para camundongos velhos ou jovens em resposta à imunização com EaRFP
- Analisar a diferenciação em fenótipo efetor das células TEa transferidas em resposta à estimulação antigênica.
- Investigar se possíveis alterações na resposta das células transferidas para animais velhos podem ser devidas às modificações no número ou função das células dendríticas nos linfonodos drenantes dos animais velhos.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Impaired antigen presentation capacity by dendritic cells of aged mice is associated with failure of memory CD4⁺ T cell generation in vivo

Luciana F. Pereira, Ana Paula Souza, Thiago Borges and Cristina Bonorino

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Impaired antigen presentation capacity by dendritic cells of aged mice is associated with failure of memory CD4+ T cell generation in vivo

Luciana F. Pereira, Ana Paula Souza, Thiago Borges and Cristina Bonorino*

Departamento de Biologia Celular e Molecular (FABIO) and Instituto de

Pesquisas Biomédicas, PUCRS

Tel +55 51 33203545

Av. Ipiranga, 6690 2o andar, 90610-000

Porto Alegre, RS, Brazil

* To whom correspondence should be addressed: e-mail:

cbonorino@pucrs.com.br

ABSTRACT

Aging is associated with a gradual decline in immune system function (immunosenescence), both in humoral immunity as well in cell-mediated responses, resulting in an increased susceptibility to infections and cancer, and reduced responses to vaccination. In this study, we investigated the in vivo stimulatory capacity of dendritic cells (DC) from old mice in a specific T CD4⁺ response. We adoptively transferred transgenic TEa cells into old and young mice, and immunized them with their specific Ea antigen, following their differentiation in vivo. While young recipients stimulated old T cells, aged recipients showed markedly decreased capacity to stimulate both old but especially young T cells, which not only proliferated poorly, but failed to acquire CD44 expression. Analysis of antigen presenting cells in these animals revealed not only a decrease in total number of DC in aged hosts, but specifically in the number of DC presenting the antigen and in the total number of MHC-peptide complexes on the surface of these DC, analyzed with the YAe antibody. The expression of CD86 in DC of both hosts, however, was not different, both before and after immunization. Taken together, our results indicate that decrease in antigen presentation ability is a major mechanism of the impairment of CD4⁺ T cell function observed in aging.

INTRODUCTION

Immunosenescence, the progressive decline in immune function that accompanies aging, results from alterations in both adaptive and innate immunity. The reduction in immune responsiveness is due to several defects in different immune system components, such as observed in T lymphocytes: decreased response to specific antigens, altered cytokine secretion patterns, changes in naïve and memory T cells, decreased cytotoxic T cell responses, failure to produce high affinity antibodies, generation of long lasting memory response, and defects in signal transduction (Saltzman e Peterson, 1987; Gupta, 1989; Mcelhaney, Meneilly *et al.*, 1992; Powers e Belshe, 1993; Pawelec, Barnett *et al.*, 2002). Several studies demonstrate that the response of T cells in aged individuals is decreased compared to young individuals, both in humans (Miller, 1991, 1996; Haynes, Eaton *et al.*, 2000) and mice (Linton, Haynes *et al.*, 1996; Haynes, Schmitz *et al.*, 1999; Haynes, Eaton *et al.*, 2002; Eaton, Burns *et al.*, 2004; Haynes, Eaton *et al.*, 2004). However, the recognized changes in T lymphocyte function may not completely explain the defect in immune responsiveness observed in old age, and also exactly which factors are most important in immunosenescence and what causes these age-associated changes remain largely unclear.

Dendritic cells (DCs) are heterogenous, professional antigen-presenting cells that are uniquely equipped with molecules and strategically placed between internal and external environment, which enable them to link innate and adaptive immunity (Hugues, Boissonnas *et al.*, 2006; Schuurhuis, Fu *et al.*,

2006). DCs are present in peripheral tissues, where they capture antigens, which are subsequently processed as the DCs mature and move towards the draining secondary lymphoid organs (Mellman e Steinman, 2001), and thus immune responses are initiated by DCs. In this study, we investigated the relative contribution of aged DCs to the decrease in CD4⁺ T cell function that is associated with age. The results indicate that while young DCs can rescue at least in part CD4⁺ T cell function, aged DCs have a decreased stimulatory potential in vivo in aged mice, and that is linked mainly to impairment in antigen presentation.

MATERIALS AND METHODS

Mice

C57Bl/6 female mice were purchased from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, RS, Brazil between 1 and 6 months old and kept at the animal facility of Faculdade de Biociências - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (FABIO-PUCRS) for 2 and 18 months, respectively, until reaching the desired age for experimental procedures. Mice were maintained in specific pathogen-free conditions at 22 °C, under controlled light (12h light/12h darkness), and fed ad libitum with autoclaved NUVITAL mouse chow (Colombo-PR). Autoclaved water was also provided ad libitum. Cages, water and food were changed twice a week. Mice were kept in groups of five per cage. Young mice were 2–4 months of age and old mice were 20–24 months of age. TEa transgenic mice backcrossed into a RAG^{-/-} background, expressing a transgenic specific TCR for the Ea58-62:I-Ab

complex obtained from Dr. Marc Jenkins (University of Minnesota) were kept at the same conditions. This study was approved by the University Ethics Committee for Animal Use (CEUA-PUCRS).

EaRFP protein

This protein was produced as previously described (Itano, Mcsorley *et al.*, 2003). Briefly, the plasmid vector pTcrHis2 TOPO (Invitrogen) encoding the fusion protein EaRFP was transformed into *E. coli* BL21 competent cells. These cells were grown in LB media at 37°C with agitation of 250 rpm with Ampiciline and 1 mM of IPTG (Sigma). After 24hs the cells were lysed by sonication in cell lysis buffer (20mM Tris pH8.0; 500mM NaCl; 0.01% Tween 20). The protein was purified from bacterial lysate using Ni²⁺ resin His-Bind Kit (Novagen). The protein concentration was estimated measuring the optical density (OD) in a Spectrophotometer (Shindzu model UV-1201) at 558 nm and using its extinction coefficient (52) and molecular weight (30kDa). The protein buffer was changed to PBS using a PD-10 desalting column (GE).

Adoptive transfers

The peptide-MHC II complex derived from processing of the Ea antigen was visualized using the YAe antibody (Murphy, Lo *et al.*, 1989) and specific T cell stimulation and proliferation were assessed by transferring transgenic TEa (Grubin, Kovats *et al.*, 1997) cells to C57BL/6 host mice. TEa CD4⁺ T cells express Thy1.1 (CD90.1) and V β 6 and recognize the I-Ed α -chain peptide 52-

68 (Perrigoue, Saenz *et al.*, 2009) presented by I-A^b. Pooled spleen cells from naïve TEa transgenic young or old mice donors were intravenously injected in caudal vein into naïve C57BL/6 young and old hosts as adoptive transfer. A total of 10^5 splenocytes were transferred. After 24 hours, 5µl of recombinant LPS-free EaRFP in 50µl of PBS or 50µl of PBS only (as control) were inoculated subcutaneously in the back thighs. Twenty-four hours later, one group was sacrificed in a CO₂ chamber and the draining lymph nodes were harvested. At the day 6 after the immunization, other group went to the same procedure in order to measure CD44 expression. All subcutaneous injections were done after anesthesia with 83 mg/Kg ketamine and 17 mg/kg of xilazine.

Flow cytometry

Twenty-four hours after the immunization, single cell suspensions were prepared from draining lymph nodes by mechanical disruption and incubated with collagenase D (Roche, Basel-Switzerland). Before staining, the viable cells were counted and the Fc receptors were blocked with blocking buffer (24G2 cells supernatant, 10% rat serum, 5% mice serum) for 15 minutes on ice. The cells were divided in two groups, both stained for thirty minutes on ice, one stained with anti-CD4 PE, anti-CD90.1 PerCP and CD11c FITC and the other group with anti-CD11c Cy, anti-CD86 PE, anti-YAe FITC and Streptavidin FITC. Six days after the immunization, another mice group was sacrificed and the draining lymph nodes also divided for two different antibodies stains: one stained for anti-CD44 FITC, anti-CD4 PE and anti-CD90.1 PerCP. All data were

collected on FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA) and analyzed with FlowJo software (TreeStar, San Carlos, CA). Absolute numbers of cells were calculated using the percentages of the respective gates and the count numbers for each lymph node.

Statistical analysis

Differences between two groups were analyzed by Mann-Whitney test. The Kruskal Wallis test, with Dunn post-hoc tests, was used to compare differences between more than two groups. Statistical analysis and graphs were performed using GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

TEa cells proliferate poorly when transferred to old hosts

To investigate the potential of DC from old hosts to stimulate CD4⁺ T cells, we transferred 10^5 TEa cells from young or old donors into young or old C57Bl/6 mice (Figure 1). Twenty-four hours later, recipient mice were immunized with EaRFP diluted in PBS, subcutaneously, on one leg. Control recipient mice were injected only with PBS. After another 24h, the inguinal draining lymph node was removed and a single cell suspension was obtained,

after treatment with collagenase D, and the cells were analyzed by flow cytometry.

The results are summarized in Figure 2. As expected, the number of old CD4⁺CD90.1⁺ cells recovered from the lymph nodes of old recipients were significantly lower than the number of young TEa cells recovered from young recipients. Interestingly, young DC were able to rescue old TEa proliferation, since old TEa cells showed an approximately three-fold increase in numbers compared to what was observed when they were transferred to old mice. The most striking result, however, was that old DC were unable to stimulate young TEa cells upon antigen stimulation.

Old DC cannot provide appropriate stimuli for CD4⁺ T cells to acquire a memory phenotype

Following encounter with their cognate antigen in the lymphoid organs, T cells proliferate and differentiate into an effector phenotype that includes upregulation of CD44 and production of interferon- γ . We evaluated this transition in our system, transferring TEa cells as described above, immunizing with EaRFP 24h later, and then after six days, removing the lymph nodes for analysis. The results, shown in Figure 3, indicate that while young TEa cells acquire the expression of CD44 six days after antigen stimulation in young hosts, they remain CD44 negative when transferred to old hosts, even though both hosts receive the same amount of antigen by immunization. DC from young hosts lead to increased CD44 expression by old TEa cells, to a level that is not different from what happens to young TEa cells in young hosts. Taken

together, the results from both experiments indicate that old hosts suffer significant changes in their capacity to stimulate CD4⁺ T cells, even if they come from young donors, while young hosts can rescue both proliferation and differentiation of T cells from old donors.

The absolute number of DC is decreased in the draining lymph node of old mice

DC are the most potent antigen presenting cell, and their interactions with T cells in the lymphoid organs in vivo shape the entire T cell response. Different studies have reported a decrease in DC numbers in aged individuals. Studies have demonstrated that the number of pDCs declines with age (Shodell e Siegal, 2002; Perez-Cabezas, Naranjo-Gomez *et al.*, 2007) and another study indicates that the number of mDCs in human blood progressively declines with age, but no significant difference was found in the number of pDCs (Della Bella, Bierti *et al.*, 2007).

We analyzed the absolute numbers of DC in the draining lymph nodes of our aged and young hosts by flow cytometry. We found that, indeed, the numbers of CD11c⁺ cells in the inguinal lymph nodes of old mice is decreased compared to the young mice (Figure 4, A-B), and that could partly explain the results of impaired proliferation and differentiation for the TEa cells.

However, our system also allows us to estimate the number of cells effectively presenting antigen in the lymph node, using the YAE antibody that recognizes the IA^b-Ea peptide complex (Murphy, Lo *et al.*, 1989) (Figure 4, C-D). This analysis revealed that the absolute number of CD11c⁺ cells presenting

cognate antigen to the TEa cells in the lymph node was also significantly decreased in the old mice.

Antigen presentation, but not CD86 expression, is significantly decreased in old DC in vivo

The proliferation and differentiation of CD4⁺ T cells after encountering antigen in the lymphoid organs depends on three signals provided by the antigen presenting cell, signal one being the antigen, signal two, co-stimulatory molecules, and signal three, the cytokines produced by the APC. Because we had observed that the number of cells presenting antigen was decreased in old mice, we wondered if this could be compensated by a higher number of MHC-peptide complexes on the surface of DCs, or yet by the expression of the co-stimulatory molecule CD86. We thus analyzed the mean fluorescence intensity (Shurin, Pandharipande *et al.*) of both YAe and CD86 stain on the surface of CD11c⁺ cells in the lymph nodes of the old and young immunized mice. The results are shown in Figure 5. While the MFI for YAe was significantly decreased in old animals, expression of CD86 was not different in the CD11c⁺ cells in the lymph node of aged and young mice, before or after immunization with EaRFP. That result supported antigen presentation, but not co-stimulation, as a critical CD4⁺T cell activation property that is decreased with age in dendritic cells.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that age affects not only the function of T cells, but also that the entire microenvironment where the T cell is stimulated is altered in aged hosts. More importantly, our data suggests that such alterations are so profound that young T cells can no longer be induced to differentiate in response to antigen in this environment.

Aging is associated with a decline in T cell function, and DCs are the major cells directing T cell activation, proliferation and differentiation. Thus, it is remarkable that so few studies to date have focused on the alterations suffered by DC with age. Different studies report a decrease in DC numbers in lymphoid organs (Shurin, Pandharipande *et al.*, 1997) as well as in skin (Sprecher, Becker *et al.*, 1990) and peripheral circulation (Della Bella, Bierti *et al.*, 2007). We have previously observed a decreased capacity of aged bone marrow to generate DC in vitro (Paula, Motta *et al.*, 2009), and in this study we verified significantly fewer CD11c⁺ cells in the inguinal lymph node. Moreover, we observed that the DC in old animals showed impaired capacity to present cognate antigen to the TEa cells, as assessed with the YAe antibody. Previous works have found a decreased stimulatory capacity for DC of aged mice in primary mixed leukocyte reactions (MLR) (Tourkova, Yurkovetsky *et al.*, 2001), and that was associated with reduced MHC expression, but unaltered CD86 expression, similarly to what we have observed. Because CD4⁺T cells greatly depend on continued antigen presentation in order to proliferate and differentiate (Obst, Van Santen *et al.*, 2005), it is likely that the loss of antigen

presenting potential by aged DCs plays a major role in the age associated decrease in CD4+ T cell function.

A striking finding of this study was the inability of young TEa cells to acquire CD44 expression after immunization with the Ea antigen. CD44 is an adhesion molecule, upregulated in naive T cells after activation through the T cell receptor (TCR). Memory T cells maintain a high expression of this molecule, that has recently been demonstrated to activate the Akt pathway and promote cell survival of TH1 cells (Baatzen, Li *et al.*). Our results indicate the antigen presenting cells in aged individuals lose the capacity to provide major signals, such as TCR stimulation, that direct CD4+ T cells into a long lived compartment. Consequently, CD4+T cell immunosenescence is not solely due to intrinsic T cell defects acquired with age.

Recently, it was demonstrated that DC from old mice were less effective than young DC in promoting CD4+ T cell expansion (Grolleau-Julius, Garg *et al.*, 2006) and the major alterations observed in these cells were related to cytokine expression. Further studies are necessary to determine, in our model, the relative role that alterations in cytokine production play in the *in vivo* differentiation of specific CD4+ T cell responses.

REFERENCES

Baaten, B. J., C. R. Li, *et al.* CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. Immunity, v.32, n.1, Jan 29, p.104-15.

Della Bella, S., L. Bierti, *et al.* Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. Clin Immunol, v.122, n.2, Feb, p.220-8. 2007.

Eaton, S. M., E. M. Burns, *et al.* Age-related defects in CD4 T cell cognate helper function lead to reductions in humoral responses. J Exp Med, v.200, n.12, Dec 20, p.1613-22. 2004.

Grolleau-Julius, A., M. R. Garg, *et al.* Effect of aging on bone marrow-derived murine CD11c+CD4-CD8alpha- dendritic cell function. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, v.61, n.10, Oct, p.1039-47. 2006.

Grubin, C. E., S. Kovats, *et al.* Deficient positive selection of CD4 T cells in mice displaying altered repertoires of MHC class II-bound self-peptides. Immunity, v.7, n.2, Aug, p.197-208. 1997.

Gupta, S. Membrane signal transduction in T cells in aging humans. Ann N Y Acad Sci, v.568, p.277-82. 1989.

Haynes, L., S. M. Eaton, *et al.* Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo. J Immunol, v.172, n.9, May 1, p.5194-9. 2004.

Haynes, L. W., S. Schmitz, *et al.* Expression of neurofilament L-promoter green-fluorescent protein constructs in immortalized Schwann cell-neuron coculture. Neurosci Lett, v.271, n.3, Aug 27, p.155-8. 1999.

Hugues, S., A. Boissonnas, *et al.* The dynamics of dendritic cell-T cell interactions in priming and tolerance. Curr Opin Immunol, v.18, n.4, Aug, p.491-5. 2006.

Linton, P. J., L. Haynes, *et al.* Antigen-independent changes in naive CD4 T cells with aging. J Exp Med, v.184, n.5, Nov 1, p.1891-900. 1996.

Mcelhaney, J. E., G. S. Meneilly, *et al.* The effect of influenza vaccination on IL2 production in healthy elderly: implications for current vaccination practices. J Gerontol, v.47, n.1, Jan, p.M3-8. 1992.

Mellman, I. e R. M. Steinman. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell, v.106, n.3, Aug 10, p.255-8. 2001.

Miller, R. A. Aging and immune function. Int Rev Cytol, v.124, p.187-215. 1991.

Murphy, D. B., D. Lo, *et al.* A novel MHC class II epitope expressed in thymic medulla but not cortex. Nature, v.338, n.6218, Apr 27, p.765-8. 1989.

Obst, R., H. M. Van Santen, *et al.* Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response. J Exp Med, v.201, n.10, May 16, p.1555-65. 2005.

Paula, C., A. Motta, *et al.* Alterations in dendritic cell function in aged mice: potential implications for immunotherapy design. Biogerontology, v.10, n.1, Feb, p.13-25. 2009.

Pawelec, G., Y. Barnett, *et al.* T cells and aging, January 2002 update. Front Biosci, v.7, May 1, p.d1056-183. 2002.

Perez-Cabezas, B., M. Naranjo-Gomez, *et al.* Reduced numbers of plasmacytoid dendritic cells in aged blood donors. Exp Gerontol, v.42, n.10, Oct, p.1033-8. 2007.

Perrigoue, J. G., S. A. Saenz, *et al.* MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. Nat Immunol, v.10, n.7, Jul, p.697-705. 2009.

Powers, D. C. e R. B. Belshe. Effect of age on cytotoxic T lymphocyte memory as well as serum and local antibody responses elicited by inactivated influenza virus vaccine. J Infect Dis, v.167, n.3, Mar, p.584-92. 1993.

Saltzman, R. L. e P. K. Peterson. Immunodeficiency of the elderly. Rev Infect Dis, v.9, n.6, Nov-Dec, p.1127-39. 1987.

Schuurhuis, D. H., N. Fu, *et al.* Ins and outs of dendritic cells. Int Arch Allergy Immunol, v.140, n.1, p.53-72. 2006.

Shodell, M. e F. P. Siegal. Circulating, interferon-producing plasmacytoid dendritic cells decline during human ageing. Scand J Immunol, v.56, n.5, Nov, p.518-21. 2002.

Shurin, M. R., P. P. Pandharipande, *et al.* FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. Cell Immunol, v.179, n.2, Aug 1, p.174-84. 1997.

Sprecher, E., Y. Becker, *et al.* Effect of aging on epidermal dendritic cell populations in C57BL/6J mice. J Invest Dermatol, v.94, n.2, Feb, p.247-53. 1990.

Tourkova, I. L., Z. R. Yurkovetsky, *et al.* Mechanisms of dendritic cell-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. Immunol Lett, v.78, n.2, Sep 3, p.75-82. 2001.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Adoptive transfer regimen. 10^5 TEa cells from young or old donors were injected intravenously into young or old C57Bl/6 mice. Twenty-four hours later, recipient mice were immunized with EaRFP diluted in PBS, subcutaneously, on one leg. Control recipient mice were injected only with PBS. After another 24h, the inguinal draining lymph node was removed and a single cell suspension was obtained, after treatment with collagenase D, the cells were analyzed by flow cytometry. Six days after the immunization with EaRFP protein or PBS, another mice group was sacrificed and the draining lymph nodes were harvested in order to evaluate CD44⁺ phenotype expression, cells were also analyzed by flow cytometry.

Figure 2: In vivo TEa cells proliferation after specific antigen stimuli. Young TEa cells transferred to young mice (**A, B**) or old mice (**C, D**). EaRFP immunized (**A, C**) or PBS (**B, D**). Old TEa cells transferred to young mice (**E, F**) or old mice (**G, H**). EaRFP immunized (**E, G**) or PBS (**F, H**). (**I**) Absolute number of CD4⁺CD90.1⁺ transgenic T cells in the inguinal draining lymph node.

Figure 3: CD44⁺ expression in transferred TEa cells after immunization with cognate antigen. Six days after the immunization with 5 μ l EaRFP protein or PBS, mice were sacrificed and the draining lymph nodes were harvested in order to evaluate CD44⁺ phenotype expression. Young TEa cells transferred to young mice (**A, B**) or old mice (**C, D**). EaRFP immunized (**A, C**) or PBS (**B, D**). Old TEa cells transferred to young mice (**E, F**) or old mice (**G, H**). EaRFP

immunized (**E, G**) or PBS (**F, H**). (**I**) Absolute number of CD4⁺CD90.1⁺CD44⁺ transgenic T cells in the inguinal draining lymph node.

Figure 4: Numbers of YAe⁺CD11c⁺ in young and old mice. (**A**) Representative dot plot of lymph node cells stained for CD11c and B220 (**B**) Absolute numbers of CD11c⁺ cells recovered from LN of old and young mice. (**C**) Representative dot plot of CD11c⁺YAe⁺ cells in young mice immunized with EaRFP. (**D**) Representative dot plot of CD11c⁺YAe⁺ cells in old mice immunized with EaRFP. (**E**) Absolute number of CD11c⁺YAe⁺ cells.

Figure 5: Quantification of MHC-peptide complexes and CD86 expression in old and Young DC. (**A**) MFI of YAe stain in CD11c⁺ cells of mice that have been immunized with EaRFP and (**B**) MFI of CD86 stain in CD11c⁺ cells of mice that were immunized with PBS or EaRFP.

Figure 1

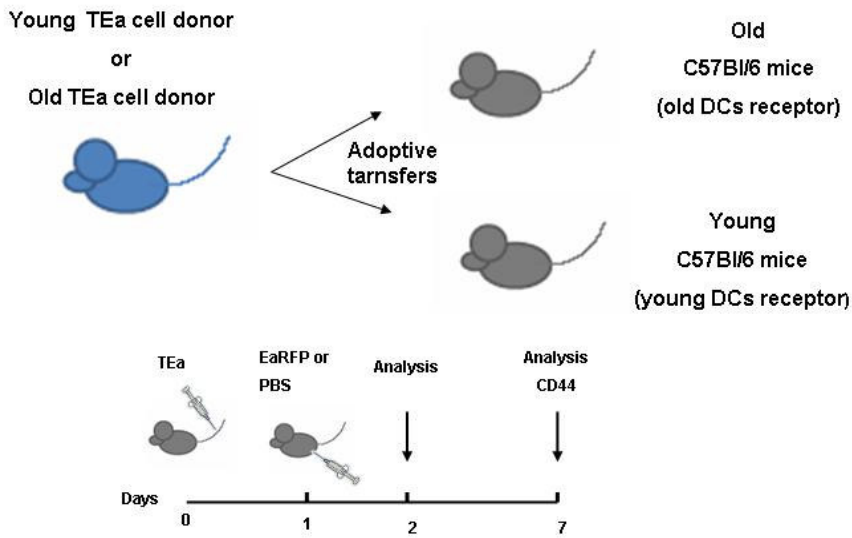


Figure 2

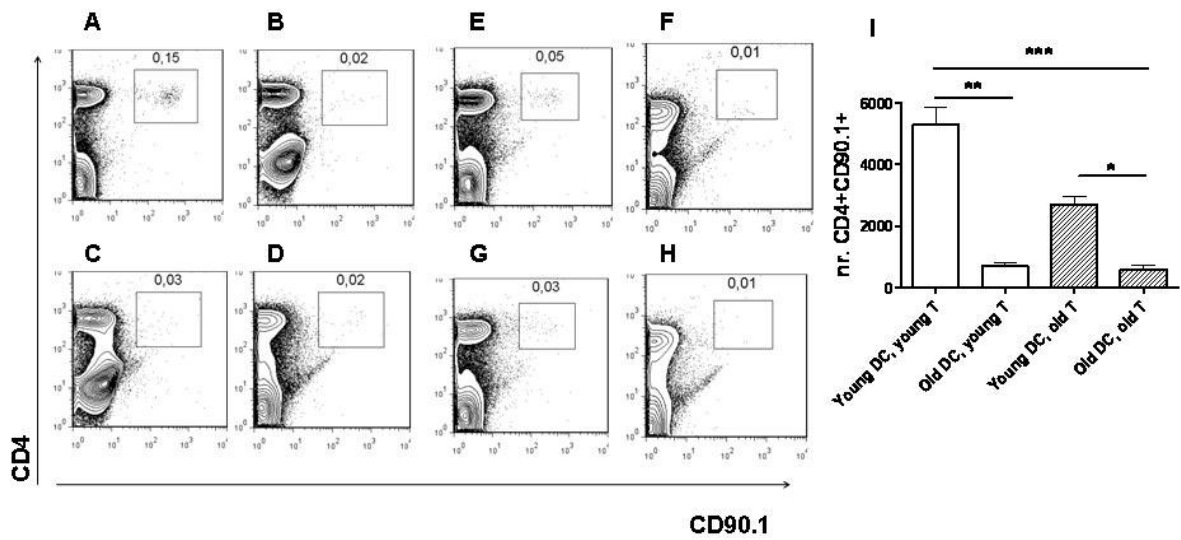


Figure 3

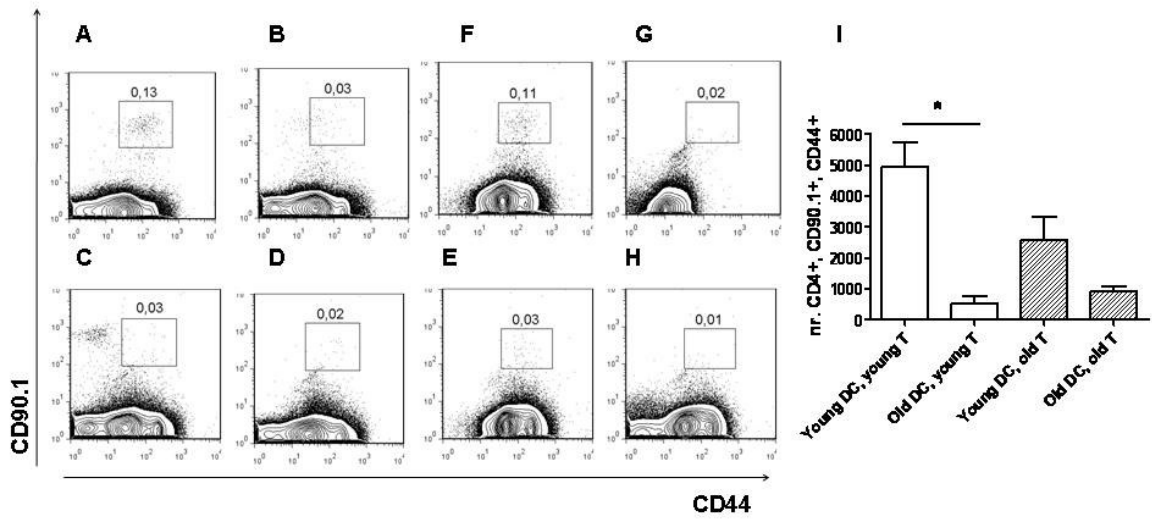


Figure 4

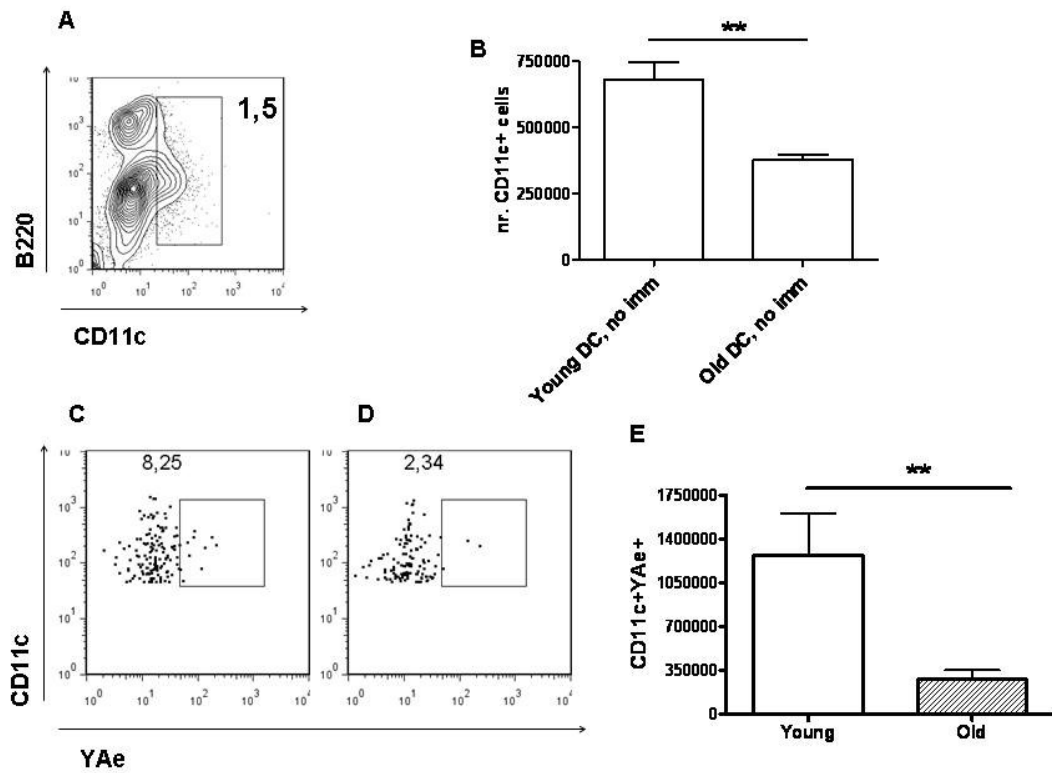
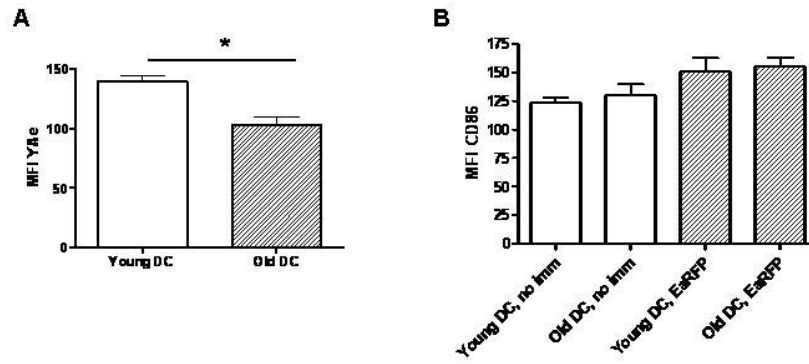


Figure 5



CAPÍTULO 3

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo nós estabelecemos que o potencial das DCs em estimular a proliferação das células T CD4⁺ é significativamente afetado com a idade. Um estudo prévio demonstrou que DCs velhas são menos eficientes em estimular a proliferação específica de células T CD4⁺ específicas para OVA (Grolleau-Julius, Garg *et al.*, 2006). Em relação à aquisição do fenótipo de memória, analisamos a expressão de CD44 seis dias após imunização com EaRFP e observamos que apesar das células TEa transferidas para animais velhos terem sobrevivido, elas não adquiriram fenótipo de memória. Quando transferimos células TEa para receptores jovens podemos observar a formação do fenótipo de memória pela expressão de células CD4⁺CD90.1⁺CD44⁺.

Para avaliar se o número de DCs poderia estar influenciando esses resultados analisamos o número total de células CD11c⁺. Verificamos que o número de células CD11c⁺ é significativamente menor em camundongos velhos. Existem resultados conflitantes em relação a diferenças no número de DCs entre jovens e velhos, enquanto alguns estudos relatam diminuição no número de pDCs (Shodell e Siegal, 2002; Perez-Cabezas, Naranjo-Gomez *et al.*, 2007) e mDCs (Della Bella, Bierti *et al.*, 2007), outros relatam que não foram constatadas diferenças significativas no número de DCs entre jovens e velhos (Steger, Maczek *et al.*, 1996; Agrawal, Agrawal *et al.*, 2007). Como o sistema que utilizamos nos permite estimar o número de células que estão efetivamente apresentando antígeno no linfonodo através do anticorpo YAe que reconhece o complexo IA^b-Ea (Murphy, Lo *et al.*, 1989), verificamos que a

apresentação de antígeno está significativamente prejudicada nos animais velhos.

O reconhecimento dos complexos MHC-peptídeos nas DCs pelos TCRs antígeno-específicos constituem o “sinal um” na interação DC-célula T. Essa fase inicial é reforçada pela alta expressão de diversas moléculas de adesão. A interação entre essas e outras moléculas acessórias expressas nas DCs (CD80, CD86, CD40) com os receptores nas células T, constituem o “sinal dois”, necessário para sustentar a ativação das células T. Como nós observamos que o número de células que efetivamente estavam apresentando antígenos era menor nos animais velhos, imaginamos se isso poderia ser compensado por um número maior de complexos MHC-peptídeos na superfície das DCs, ou ainda, pela expressão da molécula coestimulatória CD86. Para isso, analisamos a média de intensidade de fluorescência (Shurin, Pandharipande *et al.*) tanto de CD86 quanto de YAc nas células CD11c⁺ recuperadas do linfonodo drenante de camundongos imunizados jovens e velhos. Enquanto a MFI do anticorpo YAc estava significativamente menor em animais velhos, a expressão de CD86 não apresentou diferença significativa entre animais jovens e velhos, antes ou depois da imunização com EaRFP. Este resultado sustenta a hipótese de que a apresentação de antígeno, mas não a coestimulação, seja um fator crítico na ativação das células T CD4 que está diminuído com o envelhecimento.

Existe ainda a possibilidade de que o “sinal três”, ou seja, a produção de citocinas pelas DCs esteja alterada na velhice. Estudos prévios demonstraram uma redução na produção de TNF- α e IL-6 e um aumento de IL-10 em DCs derivadas da medula óssea de camundongos velhos (Grolleau-Julius, Garg *et*

al., 2006) e capacidade reduzida de produzir IL-12, sob estimulação, por indivíduos idosos (Della Bella, Bierti *et al.*, 2007).

Nós pretendemos investigar essas possibilidades em estudos posteriores, assim como outras alterações que possam estar acontecendo nas células TEa transferidas, como a produção de interferon-gama, produção de IL-21, e mesmo a expressão do receptor para IL-21 e CD27, marcadores relacionados à sobrevivência das células T CD4⁺ após estimulação antigênica.

Finalmente, acreditamos que os nossos resultados sugerem que as alterações sofridas pelas DCs no envelhecimento são acompanhadas por algum tipo de compensação em termos do limiar de estimulação das células T velhas. Nossos dados indicam que a resposta imune nos camundongos velhos está diminuída como um todo, contudo, a resposta ainda é capaz de ocorrer nas células T velhas, especialmente se houver estímulo por DCs jovens. Por outro lado, as células T jovens, necessitam de sinais para proliferar e desenvolver o fenótipo de memória, que não são mais fornecidos pelas DCs velhas. Nós pretendemos prosseguir na investigação dos mecanismos moleculares dessas alterações, que sem dúvida ajudarão a aperfeiçoar o desenho de terapias e vacinas para a população idosa.

CAPÍTULO 4

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal, A., S. Agrawal, *et al.* Dendritic cells in human aging. Exp Gerontol, v.42, n.5, May, p.421-6. 2007.

Ardeshna, K. M., A. R. Pizzey, *et al.* The upregulation of CC chemokine receptor 7 and the increased migration of maturing dendritic cells to macrophage inflammatory protein 3beta and secondary lymphoid chemokine is mediated by the p38 stress-activated protein kinase pathway. Br J Haematol, v.119, n.3, Dec, p.826-9. 2002.

Baaten, B. J., C. R. Li, *et al.* CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. Immunity, v.32, n.1, Jan 29, p.104-15.

Banchereau, J. e A. K. Palucka. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat Rev Immunol, v.5, n.4, Apr, p.296-306. 2005.

Bedoui, S., P. G. Whitney, *et al.* Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. Nat Immunol, v.10, n.5, May, p.488-95. 2009.

Belz, G. T., C. M. Smith, *et al.* Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.23, Jun 8, p.8670-5. 2004.

Caux, C., B. Vanbervliet, *et al.* Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. Transplantation, v.73, n.1 Suppl, Jan 15, p.S7-11. 2002.

Cella, M., D. Jarrossay, *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. Nat Med, v.5, n.8, Aug, p.919-23. 1999.

Chelvarajan, R. L., S. M. Collins, *et al.* The unresponsiveness of aged mice to polysaccharide antigens is a result of a defect in macrophage function. J Leukoc Biol, v.77, n.4, Apr, p.503-12. 2005.

Cumberbatch, M., R. J. Dearman, *et al.* Influence of ageing on Langerhans cell migration in mice: identification of a putative deficiency of epidermal interleukin-1beta. Immunology, v.105, n.4, Apr, p.466-77. 2002.

Del Rio, M. L., J. I. Rodriguez-Barbosa, *et al.* CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting

innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. J Immunol, v.178, n.11, Jun 1, p.6861-6. 2007.

Della Bella, S., L. Bierti, *et al.* Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. Clin Immunol, v.122, n.2, Feb, p.220-8. 2007.

Dubsky, P., H. Ueno, *et al.* Human dendritic cell subsets for vaccination. J Clin Immunol, v.25, n.6, Nov, p.551-72. 2005.

Eaton, S. M., E. M. Burns, *et al.* Age-related defects in CD4 T cell cognate helper function lead to reductions in humoral responses. J Exp Med, v.200, n.12, Dec 20, p.1613-22. 2004.

Forster, R., A. Schubel, *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. Cell, v.99, n.1, Oct 1, p.23-33. 1999.

Gallucci, S., M. Lolkema, *et al.* Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. Nat Med, v.5, n.11, Nov, p.1249-55. 1999.

Geiger, H. e G. Van Zant. The aging of lympho-hematopoietic stem cells. Nat Immunol, v.3, n.4, Apr, p.329-33. 2002.

Globerson, A. e R. B. Effros. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. Immunol Today, v.21, n.10, Oct, p.515-21. 2000.

Grewe, M. Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. Clin Exp Dermatol, v.26, n.7, Oct, p.608-12. 2001.

Grolleau-Julius, A., M. R. Garg, *et al.* Effect of aging on bone marrow-derived murine CD11c+CD4-CD8alpha- dendritic cell function. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, v.61, n.10, Oct, p.1039-47. 2006.

Grubin, C. E., S. Kovats, *et al.* Deficient positive selection of CD4 T cells in mice displaying altered repertoires of MHC class II-bound self-peptides. Immunity, v.7, n.2, Aug, p.197-208. 1997.

Guermonprez, P., J. Valladeau, *et al.* Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.20, p.621-67. 2002.

Gupta, S. Membrane signal transduction in T cells in aging humans. Ann N Y Acad Sci, v.568, p.277-82. 1989.

Hackstein, H. e A. W. Thomson. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. Nat Rev Immunol, v.4, n.1, Jan, p.24-34. 2004.

Haynes, L. e S. M. Eaton. The effect of age on the cognate function of CD4+ T cells. Immunol Rev, v.205, Jun, p.220-8. 2005.

Haynes, L., S. M. Eaton, *et al.* Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo. J Immunol, v.172, n.9, May 1, p.5194-9. 2004.

Haynes, L. W., S. Schmitz, *et al.* Expression of neurofilament L-promoter green-fluorescent protein constructs in immortalized Schwann cell-neuron coculture. Neurosci Lett, v.271, n.3, Aug 27, p.155-8. 1999.

Heath, W. R. e F. R. Carbone. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. Nat Immunol, v.10, n.12, Dec, p.1237-44. 2009.

Hugues, S., A. Boissonnas, *et al.* The dynamics of dendritic cell-T cell interactions in priming and tolerance. Curr Opin Immunol, v.18, n.4, Aug, p.491-5. 2006.

Hume, D. A. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. J Immunol, v.181, n.9, Nov 1, p.5829-35. 2008.

Kapasi, Z. F., K. Murali-Krishna, *et al.* Defective generation but normal maintenance of memory T cells in old mice. Eur J Immunol, v.32, n.6, Jun, p.1567-73. 2002.

Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol, v.3, n.12, Dec, p.984-93. 2003.

Kondo, M., A. J. Wagers, *et al.* Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. Annu Rev Immunol, v.21, p.759-806. 2003.

Linton, P. J., L. Haynes, *et al.* Antigen-independent changes in naive CD4 T cells with aging. J Exp Med, v.184, n.5, Nov 1, p.1891-900. 1996.

Linton, P. J., S. P. Li, *et al.* Intrinsic versus environmental influences on T-cell responses in aging. Immunol Rev, v.205, Jun, p.207-19. 2005.

Lung, T. L., M. Saurwein-Teissl, *et al.* Unimpaired dendritic cells can be derived from monocytes in old age and can mobilize residual function in senescent T cells. Vaccine, v.18, n.16, Feb 25, p.1606-12. 2000.

Luz, C., F. Dornelles, *et al.* Impact of psychological and endocrine factors on cytokine production of healthy elderly people. Mech Ageing Dev, v.124, n.8-9, Aug-Sep, p.887-95. 2003.

Lynch, H. E., G. L. Goldberg, *et al.* Thymic involution and immune reconstitution. Trends Immunol, v.30, n.7, Jul, p.366-73. 2009.

- Mcelhanev, J. E., G. S. Meneilly, *et al.* The effect of influenza vaccination on IL2 production in healthy elderly: implications for current vaccination practices. J Gerontol, v.47, n.1, Jan, p.M3-8. 1992.
- Medzhitov, R. e C. Janeway, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol Rev, v.173, Feb, p.89-97. 2000.
- Mellman, I. e R. M. Steinman. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell, v.106, n.3, Aug 10, p.255-8. 2001.
- Miller, R. A. Aging and immune function. Int Rev Cytol, v.124, p.187-215. 1991.
- Murasko, D. M. e J. Jiang. Response of aged mice to primary virus infections. Immunol Rev, v.205, Jun, p.285-96. 2005.
- Murphy, D. B., D. Lo, *et al.* A novel MHC class II epitope expressed in thymic medulla but not cortex. Nature, v.338, n.6218, Apr 27, p.765-8. 1989.
- Obst, R., H. M. Van Santen, *et al.* Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response. J Exp Med, v.201, n.10, May 16, p.1555-65. 2005.
- Ouyang, Q., W. M. Wagner, *et al.* Dysfunctional CMV-specific CD8(+) T cells accumulate in the elderly. Exp Gerontol, v.39, n.4, Apr, p.607-13. 2004.
- Palucka, K. e J. Banchereau. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. J Clin Immunol, v.19, n.1, Jan, p.12-25. 1999.
- Paula, C., A. Motta, *et al.* Alterations in dendritic cell function in aged mice: potential implications for immunotherapy design. Biogerontology, v.10, n.1, Feb, p.13-25. 2009.
- Pawelec, G., A. Akbar, *et al.* Is immunosenescence infectious? Trends Immunol, v.25, n.8, Aug, p.406-10. 2004.
- Pawelec, G., Y. Barnett, *et al.* T cells and aging, January 2002 update. Front Biosci, v.7, May 1, p.d1056-183. 2002.
- Pawelec, G., Q. Ouyang, *et al.* Is human immunosenescence clinically relevant? Looking for 'immunological risk phenotypes'. Trends Immunol, v.23, n.7, Jul, p.330-2. 2002.
- Pawelec, G. e R. Solana. Immunosenescence. Immunol Today, v.18, n.11, Nov, p.514-6. 1997.
- Penninx, B. W., S. B. Kritchevsky, *et al.* Inflammatory markers and incident mobility limitation in the elderly. J Am Geriatr Soc, v.52, n.7, Jul, p.1105-13. 2004.

Perez-Cabezas, B., M. Naranjo-Gomez, *et al.* Reduced numbers of plasmacytoid dendritic cells in aged blood donors. Exp Gerontol, v.42, n.10, Oct, p.1033-8. 2007.

Perrigoue, J. G., S. A. Saenz, *et al.* MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. Nat Immunol, v.10, n.7, Jul, p.697-705. 2009.

Plowden, J., M. Renshaw-Hoelscher, *et al.* Impaired antigen-induced CD8+ T cell clonal expansion in aging is due to defects in antigen presenting cell function. Cell Immunol, v.229, n.2, Jun, p.86-92. 2004.

Powers, D. C. e R. B. Belshe. Effect of age on cytotoxic T lymphocyte memory as well as serum and local antibody responses elicited by inactivated influenza virus vaccine. J Infect Dis, v.167, n.3, Mar, p.584-92. 1993.

Reis E Sousa, C. Dendritic cells in a mature age. Nat Rev Immunol, v.6, n.6, Jun, p.476-83. 2006.

Saltzman, R. L. e P. K. Peterson. Immunodeficiency of the elderly. Rev Infect Dis, v.9, n.6, Nov-Dec, p.1127-39. 1987.

Sauter, B., M. L. Albert, *et al.* Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. J Exp Med, v.191, n.3, Feb 7, p.423-34. 2000.

Schuurhuis, D. H., N. Fu, *et al.* Ins and outs of dendritic cells. Int Arch Allergy Immunol, v.140, n.1, p.53-72. 2006.

Sharma, S., A. L. Dominguez, *et al.* Aging affect the anti-tumor potential of dendritic cell vaccination, but it can be overcome by co-stimulation with anti-OX40 or anti-4-1BB. Exp Gerontol, v.41, n.1, Jan, p.78-84. 2006.

Sharp, A., T. Kukulansky, *et al.* In vitro analysis of age-related changes in the developmental potential of bone marrow thymocyte progenitors. Eur J Immunol, v.20, n.12, Dec, p.2541-6. 1990.

Shi, M., X. Bi, *et al.* Increased susceptibility of tumorigenicity and decreased anti-tumor effect of DC vaccination in aged mice are potentially associated with increased number of NK1.1+CD3+ NKT cells. Exp Oncol, v.27, n.2, Jun, p.125-9. 2005.

Shodell, M. e F. P. Siegal. Circulating, interferon-producing plasmacytoid dendritic cells decline during human ageing. Scand J Immunol, v.56, n.5, Nov, p.518-21. 2002.

Shortman, K. e W. R. Heath. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. Nat Immunol, v.2, n.11, Nov, p.988-9. 2001.

- Shortman, K. e Y. J. Liu. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol, v.2, n.3, Mar, p.151-61. 2002.
- Shurin, M. R., P. P. Pandharipande, *et al.* FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. Cell Immunol, v.179, n.2, Aug 1, p.174-84. 1997.
- Shurin, M. R., G. V. Shurin, *et al.* Aging and the dendritic cell system: implications for cancer. Crit Rev Oncol Hematol, v.64, n.2, Nov, p.90-105. 2007.
- Sprecher, E., Y. Becker, *et al.* Effect of aging on epidermal dendritic cell populations in C57BL/6J mice. J Invest Dermatol, v.94, n.2, Feb, p.247-53. 1990.
- Steger, M. M., C. Maczek, *et al.* Morphologically and functionally intact dendritic cells can be derived from the peripheral blood of aged individuals. Clin Exp Immunol, v.105, n.3, Sep, p.544-50. 1996.
- Steinman, R. M. e M. C. Nussenzweig. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.1, Jan 8, p.351-8. 2002.
- Steinman, R. M., S. Turley, *et al.* The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. J Exp Med, v.191, n.3, Feb 7, p.411-6. 2000.
- Sudo, K., H. Ema, *et al.* Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. J Exp Med, v.192, n.9, Nov 6, p.1273-80. 2000.
- Swift, M. E., A. L. Burns, *et al.* Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. J Invest Dermatol, v.117, n.5, Nov, p.1027-35. 2001.
- Teig, N., D. Moses, *et al.* Age-related changes in human blood dendritic cell subpopulations. Scand J Immunol, v.55, n.5, May, p.453-7. 2002.
- Timmerman, J. M. e R. Levy. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. Annu Rev Med, v.50, p.507-29. 1999.
- Tourkova, I. L., Z. R. Yurkovetsky, *et al.* Mechanisms of dendritic cell-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. Immunol Lett, v.78, n.2, Sep 3, p.75-82. 2001.
- Trzonkowski, P., J. Mysliwska, *et al.* Immune consequences of the spontaneous pro-inflammatory status in depressed elderly patients. Brain Behav Immun, v.18, n.2, Mar, p.135-48. 2004.
- Vasto, S., M. Malavolta, *et al.* Age and immunity. Immun Ageing, v.3, p.2. 2006.
- Videla, L. A., G. Tapia, *et al.* Influence of aging on Kupffer cell respiratory activity in relation to particle phagocytosis and oxidative stress parameters in mouse liver. Redox Rep, v.6, n.3, p.155-9. 2001.

Villadangos, J. A. e P. Schnorrer. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. Nat Rev Immunol, v.7, n.7, Jul, p.543-55. 2007.

Wick, G. e B. Grubeck-Loebenstein. The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly. Exp Gerontol, v.32, n.4-5, Jul-Oct, p.401-13. 1997.

Wu, L. e Y. J. Liu. Development of dendritic-cell lineages. Immunity, v.26, n.6, Jun, p.741-50. 2007.

Yung, R. L. Changes in immune function with age. Rheum Dis Clin North Am, v.26, n.3, Aug, p.455-73. 2000.