ISADORA MARIA VILLAS BOAS SILVA

**Caracterização biológica e imunoquímica da peçonha da lagarta
de *Premolis semirufa*, agente etiológico da pararamose,
doença ocupacional dos seringueiros da Amazônia**

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

São Paulo
2013

ISADORA MARIA VILLAS BOAS SILVA

**Caracterização biológica e imunoquímica da peçonha da lagarta
de *Premolis semirufa*, agente etiológico da pararamose,
doença ocupacional dos seringueiros da Amazônia**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof. Dra. Denise Vilarinho Tambourgi

Versão original

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Isadora Maria Villas Boas.

Caracterização biológica e imunoquímica da peçonha da lagarta de *Premolis semirufa*, agente etiológico da pararamose, doença ocupacional dos seringueiros da Amazônia / Isadora Maria Villas Boas Silva. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Denise Vilarinho Tambourgi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Caracterização imunoquímica e funcional das toxinas de venenos animais / Ação de venenos e toxinas animais sobre o Sistema Complemento.

Versão do título para o inglês: Immunochemical and biological characterization of the venom from caterpillar *Premolis semirufa*, etiological agent of pararamose, occupational disease of rubber tappers in the Amazon.

1. Venenos 2. Imunologia 3. Imunoquímica 4. Toxinas 5. Imunologia celular 6. Imunoproteínas I. Tambourgi, Profa. Dra. Denise Vilarinho II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB044/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Isadora Maria Villas Boas Silva.

Título da Tese: Caracterização biológica e imunoquímica da peçonha da lagarta de *Premolis semirufa*, agente etiológico da pararamose, doença ocupacional dos seringueiros da Amazônia.

Orientador(a): Profa. Dra. Denise Vilarinho Tambourgi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Caracterização biológica e imunoquímica da peçonha da lagarta de *Premolis semirufa*, agente etiológico da pararamose, doença ocupacional dos seringueiros da Amazônia”, protocolo nº 413/07, sob a responsabilidade de Denise Vilarinho Tambourgi e Isadora Maria Villas Boas, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/09/2007.

“We certify that the Research entitled Biological and immunochemical characterization of *Premolis semirufa* caterpillar poison, the etiological agent of the pararamosis, an occupational disease of the Amazonian rubber tapers, protocol nº 413/07, under the responsibility of Denise Vilarinho Tambourgi and Isadora Maria Villas Boas, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 09/12/2007”.

São Paulo, 12 de setembro de 2007.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **028** nas fls. **55** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Denise Vilarinho Tambourgi, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Caracterização biológica e imunoquímica da Peçanha da lagarta de Premolis semirufa, agente etiológico da pararamose, doença ocupacional dos seringueiros da Amazônia"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Isadora Maria Villas Boas e os pesquisadores Osvaldo Augusto Esteves Sant'Anna, Rute Maria Gonçalves de Andrade** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **12.05.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 12 de maio de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 27 de novembro de 2012.

PARECER 1094/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data **APROVOU** o projeto intitulado: "*Caracterização biológica e imunoquímica da peçonha da lagarta de Premolis semirufa, agente etiológico da pararamose, doença ocupacional dos seringueiros da Amazônia* " dos autores **DENISE V. TAMBOURGI E ISADORA MARIA VILLAS BOAS SILVA.**

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **27.11.2013.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

DEDICATÓRIA

A Deus

Força singular em todos os momentos... Tristezas, fraquezas, felicidades e, principalmente, conquistas.

Aos meus queridos pais, Cyro e Maria de Lourdes,
precursores de toda esta história construída em minha vida.
Sem dúvida, o alicerce que permanece por toda a vida de um filho.

Ao meu marido Fábio,
pessoa maravilhosa que Deus colocou ao meu lado...
sempre me apoiando e, acima de tudo, sendo totalmente paciente
com o meu ritmo de vida e as minhas mudanças de humor.
"As pessoas não se precisam, elas se completam... não por serem metades,
mas por serem inteiras, dispostas a dividir objetivos comuns,
alegrias e vida." (Mario Quintana)

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos

À minha querida orientadora Dra. Denise Vilarinho Tambourgi, pela confiança depositada em mim. Por todos os momentos de aprendizado, paciência, comprometimento, dedicação, amizade e alegria que passamos juntas, tendo contribuído muito, ao longo destes anos, para o meu enriquecimento intelectual.

À Dra. Rute Gonçalves de Andrade por todo o apoio a este trabalho e, principalmente, por ter me concedido, juntamente com a minha orientadora, o prazer de trabalhar com a pararama.

Aos Professores Drs. Wilmar Dias da Silva e Osvaldo Sant'Anna, pelo dia a dia na convivência com excelências na pesquisa. Por todos os ensinamentos e sugestões dedicadas ao meu trabalho e à minha vida.

A todos os colaboradores deste projeto: Dra. Giselle Pidde Queiroz, Dra. Suely Rais Assaf, Dra. Fernanda Portaro, Dra. Carmen van den Berg, Fábio Magnoli, Dr. Osvaldo Sant'Anna, Dra. Carla Squaiella, enfim, a todos que, de alguma forma, tiveram influência neste trabalho.

À amiga que ganhei neste laboratório, Carla ou "Chemis", pessoa iluminada que Deus colocou em meu caminho. Muito obrigada pela sua sincera amizade, pelo seu total apoio, ajuda intelectual e pelas nossas conversas.

Às amigas Priscila, Cinthya, Daniela, Gabriela, Karina, Giselle e Luciana, pela amizade, pelos momentos de muita alegria, companhia, aprendizado e ajuda quando precisei, vocês estão guardadas em meu coração.

À Dra. Danielle Paixão, pela amizade e pelo auxílio conferido a mim, antes mesmo de me conhecer direito.

Aos colegas de laboratório Mariana, Daniel, Lygia, Angela, Felipe França, Estevam, Joel, Marie, Felipe Guidolin e Aurélio, pelos momentos de descontração e auxílios.

Às secretárias do laboratório de Imunoquímica, Elaine e Lia, sempre muito sorridentes e prestativas, além da amizade depositada em mim.

Aos funcionários do laboratório: Ricardo, Ramos, Ana Cláudia, Ana Freire, Márcia, Alécio, Guilherme, Osmair, e até aqueles que já passaram pelo laboratório, Silvia, Maura, Cassiano e

João, pelo cuidado e carinho com que se dedicam ao laboratório, sem vocês a rotina no laboratório seria mais difícil. Muito obrigada pela ajuda e amizade de todos!

Aos meus queridos pais, Cyro e Maria de Lourdes, às minhas irmãs Mariângela e Andréia, e aos meus queridos sobrinhos, meu bebês, André e Lucas, pelos momentos bons ao lado de todos, que contribuíram muito para o meu crescimento como pessoa.

Ao meu marido Fábio, sempre presente e me apoiando, pessoa dedicada, que transforma meu dia mais feliz. Agradeço por tudo!

À minha sogra Aparecida e ao meu sogro Venâncio, pessoas de enorme bondade, por me darem todo o amor de pais para uma filha.

Aos meus gatos, Todd e Mike, por tornarem meus dias mais alegres. Por transmitirem todo o seu amor, não em palavras, mas em gestos de carinho.

Ao técnico do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Ivan Novaski Avino, por ter me auxiliado na utilização do microscópio de fluorescência, sempre disposto a ajudar e me dando total liberdade para tal utilização.

À Bibliotecária Monica, pela atenção, eficiência, simpatia e ajuda com as normas na minha tese.

À secretária da Pós Graduação em Imunologia, Maria Eni, pela simpatia, atenção e disponibilidade com que sempre me atendeu.

À Comissão julgadora da minha tese, por terem aceitado o convite e pela disponibilidade.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A todos os animais incluídos nesta pesquisa!

O meu sincero respeito.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro:

"I do the very best I know how, the very best I can,
and I mean to keep on doing so until the end."

Abraham Lincoln

RESUMO

VILLAS BOAS-SILVA, I. M. **Caracterização biológica e imunoquímica da peçonha da lagarta de *Premolis semirufa*, agente etiológico da pararamose, doença ocupacional dos seringueiros da Amazônia.** 2013. 206 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Presente na região amazônica brasileira, a lagarta de *Premolis semirufa* (Pararama) é parasita da seringueira do gênero *Hevea*. O contato com as cerdas, na maioria dos casos, desperta sensação pruriginosa intensa, seguida dos sintomas da inflamação aguda como dor, calor e rubor, com duração de três a sete dias. Por outro lado, as formas crônicas estão frequentemente presentes nos indivíduos poli-acidentados, ocorrendo espessamento da membrana sinovial articular, muitas vezes, com deformidades comuns às sinovites crônicas mono ou oligoarticulares. Até o momento, não existe tratamento eficaz para os acidentes com a pararama. Trabalhos sobre a pararamose são escassos não só no que concerne à caracterização das substâncias tóxicas liberadas pelas cerdas da lagarta, bem como sobre os mecanismos moleculares envolvidos em sua patogênese. O presente trabalho teve por objetivo avaliar as propriedades tóxicas e imunoquímicas das cerdas da lagarta de *P. semirufa*, bem como suas propriedades pró-inflamatórias, em modelo murino, e sua ação sobre o Sistema Complemento. Em adição, pretendeu-se isolar e caracterizar o(s) componente(s) presentes no extrato responsável(is) pela interferência sobre o Sistema Complemento. Extratos das cerdas de lagartas, analisados por eletroforese, apresentaram várias bandas com M_r entre 20 e 200 kDa, sendo a de 82 kDa majoritária. Este componente também apresentou atividade gelatinolítica, dependente, principalmente, da ação de serinoproteínases, como determinado pelo uso de inibidor específico (PMSF). Em adição, foi detectada uma intensa atividade proteolítica sobre o peptídeo Abz-FRSSRQ-EDDnp, também inibida por PMSF. O extrato foi capaz de ativar as vias Alternativa e das Lectinas do Sistema Complemento, promover hidrólise da cadeia alfa dos componentes C3, C4 e C5 e induzir a geração das anafilatoxinas C3a, C4a e C5a no soro humano. A análise cromatográfica do extrato das cerdas permitiu o isolamento de uma protease com forte atividade gelatinolítica, capaz de ativar as três vias do Sistema Complemento, promover hidrólise da cadeia alfa dos componentes C3, C4 e C5 e induzir a geração das anafilatoxinas C3a, C4a e C5a. O extrato não foi letal, como analisado em modelo murino, mas após múltiplas inoculações, foi capaz de induzir edema e uma pronunciada reação inflamatória, caracterizada pela presença de macrófagos e neutrófilos. A imunofenotipagem das células dos linfonodos poplíteos e sanguíneas revelou que o extrato promoveu aumento do número de células nos linfonodos, ativação de linfócitos T e das células apresentadoras de antígeno. Em adição, induziu aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. Houve produção de altos títulos de anticorpos nos camundongos, embora vários componentes presentes no extrato foram reconhecidos não só pelo soro imune, como também pelos soros de animais não imunizados. Os dados obtidos demonstram a existência, no extrato das cerdas da pararama, de várias enzimas que podem em conjunto talvez atuar na geração e desenvolvimento das manifestações clínicas da pararamose. A resposta imune celular ao extrato tem um perfil pró-inflamatório; isto, somado à ativação do sistema complemento, geração de anafilatoxinas e presença de anticorpos naturais, com reatividade cruzada aos componentes do extrato, podem contribuir na gênese das reações inflamatórias observadas na pararamose.

Palavras-chave: *Premolis semirufa*. Lagarta. Pararamose. Proteases. Sistema complemento. Inflamação. Citocinas. Linfócitos. Anticorpos.

ABSTRACT

VILLAS BOAS-SILVA, I. M. **Immunochemical and biological characterization of the venom from caterpillar *Premolis semirufa*, etiological agent of pararamose, occupational disease of rubber tappers in the Amazon.** 2013. 206 p. Ph. D. Thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Found in the Brazilian Amazon region, the caterpillar of *Premolis semirufa* (Pararama) is a parasite of the rubber tree *Hevea* genus. Contact with bristles, in most cases, causes an intense itching sensation, followed by symptoms of an acute inflammation such as pain, heat and redness, which last for three to seven days. On the other hand, a chronic inflammatory reaction, characterized by articular synovial membrane thickening with joint deformities common to chronic synovitis, frequently occurs in individuals after multiple accidents. This chronic inflammatory reaction is called "Pararamose". So far, there is no effective treatment for accidents with pararama. Studies about "pararamose" are scarce not only regarding the characterization of the toxic substances released by the caterpillar bristles, but also on the molecular mechanisms involved in its pathogenesis. The aim of the present study was to evaluate the toxic and immunochemical properties of the *Premolis semirufa*'s bristles extract, as well as its proinflammatory properties in a murine model, and its action on the Complement System. In addition, we intended to isolate and characterize the component present in the extract acting on the Complement System. Electrophoresis analysis showed the presence of several components in the caterpillar bristle extract, with Mrs between 20 and 200 kDa, and a major band with Mr around 82 kDa. This band showed gelatinolytic activity, predominantly dependent of serine proteinases, as determined by the use of a specific inhibitor (PMSF). In addition, an intense proteolytic activity was detected on the peptide Abz-FRSSRQ-EDDnp, which was also inhibited by PMSF. The bristles extract was able to activate the alternative and the lectin Complement System pathways and induce the cleavage of C3, C4 and C5 alpha chains, with the generation of C3a, C4a and C5a anaphylatoxins in human serum. Chromatographic analysis of the bristles extract allowed the isolation of a protease with high gelatinolytic activity, able to activate the three Complement System pathways, promote direct cleavage of C3, C4 and C5 alpha chains and induce the generation of the C3a, C4a and C5a. The extract did not present lethal toxicity, as analyzed in murine model, but after multiple inoculations, it was able to induce edema and a pronounced inflammatory reaction, characterized by the presence of macrophages and neutrophils. Popliteal lymph nodes and blood cells immunophenotyping revealed that the extract promoted increase of the total cell number and the activation of T and antigen-presenting cells. In addition, the extract induced the generation of proinflammatory cytokines. There was production of high antibody titers in mice, although a variety of components present in the extract were also recognized by sera from non-immunized animals. The data demonstrate the existence, in the pararama bristles extract, of numerous enzymes that can act together in the generation and development of clinical manifestations of pararamose. The potent cellular and humoral immune responses in association with complement activation can contribute to the genesis of inflammatory reactions observed in patients after contact with *P. semirufa* caterpillar bristles.

Keywords: *Premolis semirufa*. Caterpillar. Pararamose. Proteases. Complement system. Inflammation. Cytokines. Lymphocytes. Antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Perfil eletroforético dos extratos	67
Figura 2 - Análise da presença de resíduos de açúcares no extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i> ...	68
Figura 3 - Análise da inibição da atividade gelatinolítica dos extratos de pararama.....	69
Figura 4 - Atividade proteolítica do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i> sobre o substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp	70
Figura 5 - Atividade hialuronidásica do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	71
Figura 6 - Atividade fosfolipásica do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	72
Figura 7 - Atividade do extrato de <i>P. semirufa</i> sobre a Via Alternativa do Complemento.....	74
Figura 8 - Atividade do extrato de <i>P. semirufa</i> sobre a Via das Lectinas do Complemento.....	75
Figura 9 - Atividade do extrato de <i>P. semirufa</i> sobre a Via Clássica do Complemento	76
Figura 10 - Determinação da geração de anafilatoxinas em SHN tratado com o extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	78
Figura 11 - Atividade proteolítica do extrato das cerdas sobre C3, C4 e C5	79
Figura 12 - Cromatografia de exclusão molecular do extrato de cerdas da <i>Premolis semirufa</i> ...	80
Figura 13 - Atividade proteolítica das frações do extrato das cerdas sobre o componente C3 ...	81
Figura 14 - Perfil eletroforético da Ps82.....	82
Figura 15 - Análise da atividade gelatinolítica da Ps82	83
Figura 16 - Atividade da Ps82 sobre a Via Alternativa do Complemento	84
Figura 17 - Atividade da Ps82 sobre a Via das Lectinas do Complemento	85
Figura 18 - Atividade da Ps82 sobre a Via Clássica do Complemento	86
Figura 19 - Atividade da Ps82 sobre a deposição de C4.....	87
Figura 20 - Determinação da geração de anafilatoxinas em SHN tratado com a Ps82	89
Figura 21 - Atividade proteolítica da Ps82 sobre C3, C4 e C5	90
Figura 22 – Determinação da geração de C5a pela Ps82.....	91
Figura 23 - Determinação dos títulos de anticorpos antiextrato de <i>P. semirufa</i>	92
Figura 24 - <i>Western blot</i>	93
Figura 25 - Imunogenicidade do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	95

Figura 26 - Análise da presença de autoanticorpos da classe IgG anti-DNA ou anti-Colágeno tipo II	97
Figura 27 - Ação edematogênica do extrato de cerdas de <i>Premolis semirufa</i>	99
Figura 28 - Determinação das porcentagens de leucócitos no sangue periférico de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de <i>Premolis semirufa</i>	102
Figura 29 - Determinação das porcentagens de linfócitos TCD4 ⁺ CD44 ⁺ e expressão de CD44 no sangue periférico de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de <i>Premolis semirufa</i>	103
Figura 30 - Determinação das porcentagens de linfócitos B CD19 ⁺ CD40 ⁺ , CD19 ⁺ CD80 ⁺ , CD19 ⁺ MHC II ⁺ e de monócitos CD11b ⁺ CD80 ⁺ , CD11b ⁺ CD86 ⁺ , CD11b ⁺ MHC II ⁺ no sangue periférico de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de <i>Premolis semirufa</i>	104
Figura 31 - Determinação do número total de leucócitos nos linfonodos poplíteos de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de <i>Premolis semirufa</i>	108
Figura 32 - Determinação do número total de linfócitos TCD4 ⁺ CD44 ⁺ e expressão de CD44 nos linfonodos poplíteos de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de <i>Premolis semirufa</i>	109
Figura 33 - Determinação do número total de linfócitos B CD19 ⁺ CD40 ⁺ , CD19 ⁺ CD80 ⁺ , CD19 ⁺ CD86 ⁺ e CD19 ⁺ MHC II ⁺ e expressão destas moléculas co-estimuladoras nos linfonodos poplíteos de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de <i>Premolis semirufa</i> ..	110
Figura 34 - Determinação do número total de linfócitos T CD4 ⁺ IL17 ⁺ , células IL17 ⁺ e células IL17R ⁺ nos linfonodos poplíteos de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de <i>Premolis semirufa</i>	111
Figura 35 - Análise histológica das patas de camundongos 48 horas após a inoculação do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	113
Figura 36 - Análise histológica das patas de camundongos 48 horas após a inoculação do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	114
Figura 37 - Inoculação do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i> induz o aparecimento de infiltrado de neutrófilos no sítio da inoculação	116

Figura 38 - Inoculação do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i> induz o aparecimento de infiltrado de macrófagos no sítio da inoculação	117
Figura 39 - Concentração de citocinas das patas de camundongos inoculados com o extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	119
Figura 40 - Esquema ilustrativo das atividades encontradas no extrato das cerdas de <i>Premolis semirufa</i>	136

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Biologia	23
1.2 Famílias de importância médica	23
1.3 Pararamose	25
1.3.1 Histórico da doença	25
1.3.2 Os acidentes	26
1.3.3 Ação do extrato das cerdas	27
1.3.4 Quadro clínico da pararamose	28
1.3.5 Tratamento	29
1.4 Toxinas	29
1.5 Aspectos da artrite reumatoide	31
1.6 O sistema imune e suas citocinas	31
1.7 O sistema complemento	34
1.7.1 Anafilatoxinas	38
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Animais	42
3.2 Extrato de cerdas da <i>Premolis semirufa</i>	42
3.3 Venenos	43
3.4 Dosagem proteica	43
3.5 Caracterização biológica e enzimática do extrato das cerdas da lagarta da <i>Premolis semirufa</i>	44
3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida	44
3.5.2 Avaliação, por “western blot”, da presença de resíduos de açúcares no extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	44
3.5.3 Atividade gelatinolítica	44
3.5.4 Atividade proteolítica	45
3.5.5 Atividade hialuronidásica	46

3.5.6 Atividade fosfolipásica.....	46
3.5.7 Determinação da dose letal (DL_{50}).....	47
3.6 Avaliação da atividade do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i> sobre elementos da resposta imune humoral.....	47
3.6.1 Ação sobre o sistema complemento (C)	47
<u>3.6.1.1 Soro humano normal (SHN)</u>	<u>47</u>
<u>3.6.1.2 Processamento do SHN com a peçonha da lagarta da <i>P. semirufa</i></u>	<u>48</u>
<u>3.6.1.3 Ensaio hemolítico</u>	<u>48</u>
<u>3.6.1.4 Via alternativa.....</u>	<u>48</u>
<u>3.6.1.5 Ação da peçonha da lagarta sobre a via das lectinas.....</u>	<u>49</u>
<u>3.6.1.6 Via clássica</u>	<u>50</u>
<u>3.6.1.7 Análise da produção de anafilatoxinas em soros humanos tratados com o extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i></u>	<u>50</u>
<u>3.6.1.8 Análise da atividade dos extratos das cerdas de <i>P. semirufa</i> sobre os componentes do complemento</u>	<u>51</u>
3.6.2 Cromatografia em coluna de gel filtração do extrato das cerdas de <i>Premolis semirufa</i>	51
<u>3.6.2.1 Caracterização biológica e enzimática da Ps82</u>	<u>52</u>
<u>3.6.2.1.1 Via clássica por ELISA.....</u>	<u>53</u>
<u>3.6.2.1.2 Análise da produção de anafilatoxinas em soros humanos tratados com a Ps82</u>	<u>53</u>
<u>3.6.2.1.3 Análise da atividade da Ps82 sobre os componentes do complemento</u>	<u>54</u>
3.6.3 Imunogenicidade e caracterização imunoquímica do extrato das cerdas da pararama	54
<u>3.6.3.1 Imunizações</u>	<u>55</u>
<u>3.6.3.2 Determinação dos títulos de anticorpos</u>	<u>55</u>
<u>3.6.3.3 “Western blot”</u>	<u>56</u>
3.6.4 Estabelecimento de modelo experimental para o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na pararamose.....	56
<u>3.6.4.1 Preparo das amostras de soros dos animais envenenados</u>	<u>57</u>
<u>3.6.4.2 Quantificação dos isotipos de anticorpos nos soros de animais tratados com o extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>.....</u>	<u>57</u>

3.6.4.3 Detecção de anticorpos anti-DNA ou anti-colágeno tipo II.....	58
3.7 Avaliação da atividade do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i> sobre elementos da resposta imune celular.....	59
3.7.1 Determinação da atividade edematogênica	59
3.7.2 Imunofenotipagem das células do sangue de animais tratados com o extrato das cerdas da pararama	60
3.7.3 Imunofenotipagem das células do linfonodo poplíteo de animais tratados com o extrato das cerdas da pararama	61
3.7.4 Análise histopatológica	62
3.7.5 Análise imunohistoquímica.....	62
3.7.6 Marcação por imunofluorescência.....	63
3.7.7 Quantificação de citocinas das patas de animais tratados com o extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	64
3.7.8 Quantificação de citocinas dos soros de animais tratados com o extrato	65
3.8 Análise estatística	65
4 RESULTADOS	67
4.1 Caracterização biológica e enzimática do extrato das cerdas da lagarta da <i>Premolis semirufa</i>.....	67
4.1.1. Análise eletroforética dos extratos.....	67
4.1.2 Análise da presença de resíduos de açúcares no extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	68
4.1.3 Zimografia para análise da presença de gelatinases nos extratos de cerdas da pararama	69
4.1.4 Atividade proteolítica	70
4.1.5 Atividade hialuronidásica	71
4.1.6 Atividade fosfolipásica.....	72
4.1.7 Determinação da dose letal (DL_{50}).....	73
4.2 Avaliação da atividade do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i> sobre elementos do sistema imune humoral.....	74
4.2.1 Atividade sobre a via alternativa do sistema complemento	74
4.2.2 Atividade sobre a via das lectinas do sistema complemento.....	75

4.2.3 Atividade sobre a via clássica do sistema complemento	76
4.2.4 Análise da geração de anafilatoxinas em soro humano tratado com o extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	77
4.2.5 Ação do extrato de cerdas sobre os componentes do sistema complemento	79
4.2.6 Cromatografia em coluna de gel filtração do extrato das cerdas de <i>Premolis semirufa</i>	80
4.2.6.1 Análise eletroforética das frações ativas do extrato sobre C3	82
4.2.6.2 Atividade gelatinolítica da Ps82	83
4.2.6.3 Atividade da Ps82 sobre a via alternativa do sistema complemento	84
4.2.6.4 Atividade da Ps82 sobre a via das lectinas do sistema complemento	85
4.2.6.5 Ação da Ps82 sobre a via clássica do sistema complemento	86
4.2.6.6 Via clássica determinada por ELISA	87
4.2.6.7 Avaliação da produção de anafilatoxinas em soros humanos tratados com a Ps82	88
4.2.6.8 Análise da atividade da Ps82 sobre C3, C4 e C5	90
4.2.6.9 Avaliação da produção de C5a/C5a desArg em amostras de C5 humano tratadas com a Ps82	91
4.2.7 Imunogenicidade e caracterização imunoquímica do extrato das cerdas da pararama	92
4.2.7.1 Determinação dos títulos de anticorpos	92
4.2.7.2 Avaliação do reconhecimento dos soros antiextrato de pararama por western blot	93
4.2.8 Estabelecimento de modelo experimental para o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na pararamose	94
4.2.8.1 Quantificação dos isotipos de anticorpos nos soros de animais tratados com o extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i>	94
4.2.8.2 Detecção de anticorpos anti-DNA ou anti-colágeno tipo II	96
4.3 Avaliação da atividade do extrato das cerdas de <i>P. semirufa</i> sobre elementos da resposta imune celular	98
4.3.1 Análise da atividade edematogênica do extrato de cerdas da pararama	98
4.3.2 Imunofenotipagem das células do sangue de animais tratados com o extrato da pararama	100

4.3.3 Imunofenotipagem das células dos linfonodos poplíteos de animais tratados com o extrato da pararama	105
4.3.4 Análise histopatológica	112
4.3.5 Análises por imunohistoquímica e imunofluorescência	115
4.3.6 Quantificação de citocinas nas patas de animais tratados com o extrato das cerdas de <u>P. semirufa</u>	118
4.3.7 Quantificação de citocinas dos soros de animais tratados com o extrato	120
5 DISCUSSÃO	121
6 CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS	137
APÊNDICE - Artigos de periódicos	162

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biologia

A Ordem Lepidoptera, que compreende as borboletas e mariposas, constitui uma das ordens de insetos mais abundante, com aproximadamente 146.000 espécies descritas (HEPPNER, 1991), compreendidas em quatro subordens e 71 famílias (RICHARDS; DAVIES, 1997). São insetos que possuem asas recobertas por escamas pigmentadas na fase adulta e corpo vermiforme na fase larval, na qual, determinadas espécies apresentam cerdas (BARNES; RUPPERT, 1996). As borboletas apresentam hábitos diurnos, enquanto as mariposas, geralmente, hábitos noturnos (CARDOSO; HADDAD JR., 2005; MORAES, 2003).

As lagartas desta ordem têm corpo cilíndrico dividido em cabeça, tórax e abdômen. A cabeça é composta pelo aparelho bucal mastigador, estruturas para visão, antenas e inúmeras cerdas com diversas funções. O tórax é composto por três pares de pernas verdadeiras. O abdômen contém quatro pares de pernas falsas na maioria das lagartas, munidas de ganchos que servem para fixação e locomoção. Além destas características, o corpo das lagartas urticantes é ornamentado, dorsolateralmente, por cerdas de origem diversa que contêm glândulas secretoras de toxinas (MORAES, 2003).

Os lepidópteros se desenvolvem por holometabolia, ou desenvolvimento completo, que consiste num ciclo biológico caracterizado pelas fases de ovo – larva ou lagarta – pupa e adulto; sua alimentação consiste em folhas de vegetais diversos (BARNES; RUPPERT, 1996; CARDOSO, 1992; CARRERA, 1991; MORAES, 2003).

1.2 Famílias de importância médica

Relatos de lesões dermatológicas, após contato com as lagartas irritantes, são descritos desde a Grécia antiga (ALEXANDER, 1984; FONSECA, 1949). Entre as famílias que compõem o grande grupo de importância médica, seis despertam interesse: Megalopygidae, Saturniidae, Arctiidae, Limntriidae, Notodontidae e Limacodidae. No Brasil, as famílias que contêm espécies

causadoras de acidentes são Saturniidae, Megalopygidae, Limacodidae e Arctiidae (MORAES, 2003).

Os saturnídeos, que apresentam suas espécies distribuídas pelo mundo (SCOBLE, 1995), apresentam cerdas organizadas em um “tronco central”, com ramificações laterais contendo, em seu ápice, a glândula de veneno (BARTH, 1954a). Já os megalopigídeos, encontrados nas regiões Neotropical e Neoártica (SCOBLE, 1995), apresentam cerdas longas, sedosas e inofensivas, assemelhando-se a pelos, com a coloração variando do cinza até o vermelho (MORAES, 2003), que escondem as verdadeiras cerdas que contêm a glândula de veneno na base (BARTH, 1954b).

O representante da família Limacodidae, predominantemente tropical, é *Sibine* sp (BARTH; JUNQUEIRA, 1954; SCOBLE, 1995). Essas lagartas são lentas, possuem a maior parte do dorso nu e suas cerdas de veneno são restritas às regiões cefálica e anal (MORAES, 2003).

Da família Arctiidae, que inclui cerca de 11.000 espécies com 6.000 representantes na região neotropical (SCOBLE, 1995), o único exemplar de relevância em saúde pública é *Premolis semirufa*, pertencente à ordem Lepidoptera, superfamília Noctuoidea, família Arctiidae, subfamília Arctiinae e tribo Phaegopterini, originalmente descrita por Walker em 1856 (In DRUCE, 1900) e reclassificada, no século passado, por Hampson (1901).

O gênero *Premolis* Hampson, 1901 contém quatro espécies: *P. semirufa* registrada na região Amazônica do Brasil, na Guiana Francesa, no Equador, no Peru e no Panamá; *P. excavata* Forbes, 1839 presente no Panamá; *P. rhyssa* (DRUCE, 1906) no Peru e *P. amaryllis* Schaus, 1905 na Guiana Francesa. Embora a espécie *P. semirufa* apresente a maior distribuição geográfica, o gênero se restringe às Américas Central e do Sul.

Vulgarmente chamada de *PARARAMA*, seu habitat são as plantações de seringueiras da região Amazônica, planta nativa pertencente ao gênero *Hevea*, família Euphorbiaceae. São descritas 11 espécies de *Hevea* no Brasil, encontradas em margens de rios e lugares inundáveis da mata de terra firme. O maior valor dessa planta reside no látex extraído do seu tronco, que é transformado em borracha de excelente qualidade (CARDOSO; HADDAD JR., 2005; COSTA, 1981, 1994; COSTA et al., 1993, 1995a,b; DIAS, 1986; DIAS; AZEVEDO, 1991; MATOS; AZEVEDO, 1991; RODRIGUES, 1976).

Sua ornamentação assemelha-se, morfológicamente, à de Megalopygidae (MORAES, 2003), mas apesar de apresentar cerdas inofensivas, as que contêm veneno são de coloração castanho escuro e estão dispostas sobre “verrugas” (COSTA, 1991, 2003; MORAES, 2003). A larva é bastante ativa ao se movimentar, sendo favorecida pelas falsas pernas vermelhas (COSTA, 1991, 2003).

1.3 Pararamose

1.3.1 Histórico da doença

Médicos da antiga Companhia Ford Industrial do Brasil foram os responsáveis pelas primeiras observações da doença, durante a fase de extração do látex da *Hevea brasiliensis* nas cidades de Aveiro e Santarém do Estado do Pará, na década de 40 (COSTA; SOUZA; COSTA, 1978; DIAS, 1986; DIAS; AZEVEDO, 1991; DIAS; RODRIGUES, 1997; FONSECA, 1949). No entanto, os primeiros relatos sobre alterações osteoarticulares, causadas pelo contato acidental com as cerdas da “pararama”, ocorreram nas plantações de seringueiras nos anos sessenta (COSTA et al., 1993; DIAS; RODRIGUES, 1997). Os casulos, igualmente responsáveis por acidentes, são também encontrados nos troncos das seringueiras e revestidos de cerdas pequenas, provenientes da última troca de pele da larva, servindo como defesa na sua fase inerte (COSTA, 1991, 2003; COSTA et al., 1995b).

A pararamose, como é conhecida a doença causada pela penetração acidental das cerdas da pararama na pele, é uma entidade clínica com sintomatologia definida que acomete o aparelho osteoarticular, predominantemente das mãos, tendo sido descrita em 1967 por Vianna e Azevedo, em seringueiros da Amazônia. Dias e Azevedo (1973) foram capazes de reproduzir, em macacos e cobaias, as reações patológicas, utilizando as cerdas da *P. semirufa*, demonstrando, assim, a ação lesiva das mesmas e permitindo uma melhor avaliação clínica e identificação do agente causal.

Com o título de “Periartrite falangeana por pararama”, devido à sua importância como doença ocupacional, a pararamose foi inserida no “Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos”, lançado pelo Ministério da Saúde em 1992.

1.3.2 Os acidentes

Os acidentes por lepidópteros têm sido subnotificados, dificultando, dessa forma, seu real dimensionamento (BRASIL, 2001).

Como as cerdas conferem às lagartas um mecanismo de defesa biológica contra predadores naturais, o contato com os seres humanos é acidental (CARDOSO; HADDAD JR., 2005). As propriedades urticantes destas decorrem da presença, em seu interior, de líquido tóxico secretado por células situadas na base das mesmas, denominadas tricógenas. As cerdas, quando penetram na pele e se quebram, liberam uma secreção que exerce ação irritante (ALEXANDER, 1984; DIAS; RODRIGUES, 1997; FONSECA, 1949).

O acidente causado pelo lepidóptero *Premolis semirufa* foi descrito e encontrado apenas nos seringais da Amazônia, comprometendo quase com exclusividade os extratores do látex das seringueiras (DIAS; RODRIGUES, 1997), não havendo referências em outras regiões do planeta (COSTA, 2003; MORAES, 2003). Considerada doença ocupacional e de natureza inflamatória, causada pelo contato com as cerdas, apresenta manifestações agudas e crônicas que podem evoluir para deformidade por alterações osteoarticulares (COSTA, 1991, 2003; COSTA et al., 1995a; DIAS, 1986, 1990; DIAS; AZEVEDO, 1973, 1991).

A maioria dos acidentes, que são causados por pequenas cerdas encontradas no dorso dos segmentos abdominais II a VIII da larva da mariposa *Premolis semirufa* (COSTA, 1981; COSTA; SOUZA; COSTA, 1978; DIAS; AZEVEDO, 1991; DIAS; RODRIGUES, 1997), ocorre durante o ato de retirar, com os dedos, o coágulo de látex depositado no fundo da tigela utilizada para sua coleta dos cortes das seringueiras. Esse mecanismo facilita o contato das mãos com as cerdas soltas nas vasilhas (DIAS, 1986; COSTA, 1991, 2003). Outras formas de acidentes são decorrentes do contato acidental com casulos ou lagartas camufladas no tronco das árvores. Dessa forma, as cerdas ficam incrustadas como espinhos na epiderme humana, desencadeando

reação pruriginosa que é agravada pelo ato de coçar (COSTA, 1991, 2003; COSTA; SOUZA; COSTA, 1978; DIAS; AZEVEDO, 1991).

Os acidentes ocorrem durante o ano todo, havendo discreta redução nos meses de novembro a janeiro, época desfavorável para extração do látex. Há descrições de acidentes nos pés, pescoço e região abdominal, porém, a maioria dos eventos acontece nas mãos (COSTA, 1991, 2003; VIANNA; AZEVEDO, 1967), o que corresponde a mais de 90% dos casos (DIAS; RODRIGUES, 1997).

1.3.3 Ação do extrato das cerdas

Experimentos em camundongos, reproduzindo a reação inflamatória induzida pelo contato com as larvas ou suas cerdas isoladas, sugeriram a existência de substâncias associadas às cerdas que poderiam facilitar a penetração através do tecido após a injúria na pele. Estudos histopatológicos mostraram um processo granulomatoso ao redor dos fragmentos de cerdas afetando o periósteo, membrana sinovial e cartilagem articular (DIAS, 1986; DIAS; AZEVEDO, 1973).

Em ensaios utilizando ratos, processo inflamatório foi induzido pela injeção de extrato salino das cerdas, caracterizado pela presença de grande número de células inflamatórias dispersas ao redor do sítio da lesão. Tal achado sugere a existência de substâncias químicas solúveis nas cerdas, com a habilidade de participar no recrutamento das células, sendo que somente a presença física das cerdas pode não ser suficiente para o desencadeamento de todas as manifestações inflamatórias observadas na pararamose (COSTA et al., 1995b).

Matos e Azevedo (1991) relataram a presença de corpos elétron-densos no interior das cerdas e sua associação com elementos glandulares, sugerindo que substâncias secretadas podem exercer função na etiopatogênese do processo articular. Costa et al. (1995a) mostraram que tanto as cerdas, quanto o extrato salino, inativam a atividade hemolítica do sistema complemento e do componente C2; geram C3d, a partir da clivagem de C3, sem afetar os níveis de C1q.

Observações clínicas e experimentais (COSTA, 1991) sugerem que o primeiro contato é autolimitado e com cura espontânea; porém, para as manifestações crônicas, há uma longa permanência das cerdas nos tecidos, devido à sua composição quitinosa, de lenta absorção, provocando, por sua vez, a reação inflamatória granulomatosa, com subsequente fibrose.

1.3.4 Quadro clínico da pararamose

Quando se trata do primeiro acidente, o contato com as cerdas causa, na maioria dos casos, sensação pruriginosa intensa, seguida dos sintomas da inflamação aguda como dor, calor e rubor, que duram de três a sete dias (COSTA, 1981; COSTA, 2003; COSTA et al., 1995a, b; DIAS; AZEVEDO, 1991; DIAS, RODRIGUES, 1997). A dor pode atingir maior intensidade e o processo pode se cronificar levando à imobilidade articular (COSTA et al., 1993; COSTA et al., 1995a,b; DIAS; AZEVEDO, 1991). Quando as manifestações imediatas não são exuberantes, torna-se difícil o diagnóstico pela similitude com as demais sinovites crônicas que também ocorrem por corpo estranho exógeno (SILLS, 1973).

As manifestações crônicas irreversíveis e, frequentemente, presentes nos indivíduos poli-acidentados, constituem o mais importante problema clínico, pois podem levar a uma permanente incapacidade funcional da articulação falangeana, por anquilose (DIAS; RODRIGUES, 1997). Elas são caracterizadas por espessamento da membrana sinovial articular, muitas vezes, com deformidades comuns as sinovites crônicas mono ou oligoarticulares, como ocorre na artrite reumatoide (COSTA, 1981, 1991, 2003). O estudo radiológico apenas constata, nas fases mais precoces, edema periarticular e, nas fases mais tardias, diferentes graus de danos primários ou secundários, periarticulares e articulares, de fibrose evoluindo para a anquilose (DIAS; AZEVEDO, 1991; DIAS; RODRIGUES, 1997).

Em biópsias dos tecidos periarticular e sinovial, de pacientes com lesões de longa duração, foram observadas fibrose densa e hialinização. Porém, nas lesões mais recentes, de 24-48 horas, edema e infiltrado leucocitário agudo estavam presentes, com posterior formação de células gigantes e granulomas envolvendo as cerdas, com graus variáveis de proliferação fibrosa (DIAS; AZEVEDO, 1973, 1991).

1.3.5 Tratamento

Como não existe tratamento adequado, a evolução para a deformidade é facilitada nos pacientes que sofreram múltiplos acidentes, ao contrário do primeiro contato, que tende a evoluir para cura total (COSTA, 2003). Corticosteroides têm sido utilizados com a finalidade de diminuir ou evitar a instalação do quadro crônico (CARDOSO; HADDAD JR., 2005; DIAS, 1986; DIAS; AZEVEDO, 1991). O ato de coçar e as condições higiênicas permitem o aparecimento de infecção secundária, que pode evoluir para artrite piogênica (COSTA, 2003).

A redução na ocorrência da doença, nos últimos anos, foi atribuída à implantação de medidas profiláticas como o uso de luvas, botas e óculos protetores, embora as condições sociais e culturais dos extrativistas de látex prejudiquem a instituição de medidas preventivas, principalmente pela falta de suporte de programas educacionais (COSTA et al., 1993).

1.4 Toxinas

Os venenos de serpentes, escorpiões, aranhas e outros animais peçonhentos são uma fonte rica de toxinas, capazes de comprometer a função vital de outros organismos, entre as quais se destacam fosfolipases A_2 , metaloproteinases, serinoproteinases e hialuronidases.

As Fosfolipases A_2 pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam fosfolipídios, catalisam a deacilação dos glicerofosfolipídios gerando ácidos graxos livres e lisofosfolipídios, que são potentes agentes ativos da membrana (BANKS; SHIPOLINI, 1986; KINI, 2006; SEIBERT et al., 2006; WATALA; KOWALCZYK, 1990). Têm sido descritas em vertebrados (mamíferos, lagartos e muitos venenos de serpentes) e insetos (abelhas e vespas) (CHAKRABORTI, 2003; DENNIS, 1994; KINI, 2003). As fosfolipases A_2 são classificadas em grupos de acordo com a fonte, localização celular, massa molecular, sequência de aminoácidos e dependência de cálcio (CHAKRABORTI, 2003; DENNIS, 1994, 1997). Os venenos que contêm fosfolipase A_2 podem causar uma extensa variedade de efeitos tóxicos e farmacológicos, tais como neurotoxicidade, cardiotoxicidade, inibição da agregação plaquetária, miotoxicidade, necrose, anticoagulação,

hemorragia, hipotensão, formação de edema e hemólise (DOLEY; MUKHERJEE, 2003; FULY et al., 2002; SERRANO et al., 1999; TOYAMA et al., 2003).

Metaloproteinases de venenos são enzimas endoproteolíticas cuja atividade catalítica é dependente de íons zinco (Zn^{2+}) (BJARNASON; FOX, 1995; FOX; SERRANO, 2005). São responsáveis pelo efeito hemorrágico característico dos envenenamentos por serpentes (BJARNASON; FOX, 1994; HATI et al., 1999; KAMIGUTI et al., 1998), além de estarem envolvidas na patogênese da mionecrose local (GUTIÉRREZ et al., 1995b), lesão da pele (RUCAVADO; NÚÑEZ; GUTIÉRREZ, 1998), edema e outras reações como a inflamação (GUTIÉRREZ et al., 1995a; MOURA DA SILVA et al., 1996). Grande número de metaloproteinases são fibrinogenases, capazes de liberar peptídeos da porção C-terminal do fibrinogênio (OUYANG; TENG, 1976).

As serinoproteinases, encontradas em muitos venenos animais (NEURATH, 1984, 1985), afetam várias etapas da cascata da coagulação sanguínea, de forma não específica, por degradação proteolítica ou, seletivamente, ativando ou inibindo fatores sanguíneos envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (KINI; EVANS, 1990; MARKLAND, 1997; MITRAKUL, 1979). Elas também interferem na cascata do sistema complemento (YAMAMOTO et al., 2002). Estas enzimas compartilham muitas propriedades bioquímicas e estruturais, tais como uma tríade catalítica conservada, composta por histidina, ácido aspártico e serina (His, Asp, Ser), e são classificadas em três grupos: serinoproteinases semelhantes à tripsina, subtilisina e carboxipeptidase (PERONA; CRAIK, 1995).

As hialuronidases são uma família de enzimas que degrada o ácido hialurônico e vários outros constituintes como glicosaminoglicanos da matriz extracelular de vertebrados (STERN; JEDRZEJAS, 2006). Em insetos, as hialuronidases são bem conhecidas compondo os venenos de Hymenópteros e representam alérgenos, clinicamente importantes, em abelhas e vespas (BILO et al., 2005; KING et al., 1996; MARKOVIC-HOUSLEY et al., 2000). No envenenamento, as hialuronidases exercem importante função para acesso ao sangue, uma vez que a degradação do ácido hialurônico, abundante na pele, aumenta a permeabilidade tecidual para outros componentes presentes no veneno (CHARLAB et al., 1999; RIBEIRO et al., 2000). Por esse motivo, as hialuronidases são frequentemente chamadas de “fatores de difusão” (KREIL, 1995).

Recentemente, foi demonstrado que fragmentos do ácido hialurônico apresentam propriedades imunomoduladoras, interferindo com a maturação e migração de células dendríticas, indução da óxido sintase induzível (iNOS), secreção de quimiocinas pelos macrófagos e proliferação de células T ativadas (MUMMERT, 2005).

1.5 Aspectos da artrite reumatoide

Como mencionado, as manifestações clínicas, os aspectos histopatológicos das lesões e as deformidades anatômicas descritas na pararamose guardam similaridade com as observadas na artrite reumatoide (AR). A artrite reumatoide é uma doença multifatorial, caracterizada por autoimunidade, infiltração de células inflamatórias ativadas, hiperplasia sinovial, neo-angiogênese e destruição progressiva da cartilagem e osso. Fatores ambientais e genéticos estão envolvidos na patogênese da destruição das articulações e da desabilidade. Na artrite reumatoide, a sinóvia se apresenta altamente infiltrada por células T CD4⁺, linfócitos B e macrófagos (KAROUZAKIS et al., 2006).

A etiologia da artrite reumatoide não é conhecida, mas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1, parecem ter um papel crucial na patogênese dessa doença, levando a um aumento na produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases (AREND; DAYER, 1995; KAROUZAKIS et al., 2006; WEISSMANN, 2004). Os linfócitos T representam uma grande proporção das células que invadem o tecido sinovial na artrite reumatoide. Interessantemente, a grande maioria das células T de memória produz IL-17, que é regulada positivamente na fase inicial da doença, e que pode contribuir para a inflamação associada à AR (CHABAUD et al., 1999; RAZA et al., 2006). Com base nesses achados, uma questão interessante é se tais elementos do sistema imune estariam também envolvidos na etiologia da pararamose.

1.6 O sistema imune e suas citocinas

Em resposta a um estímulo infeccioso, dois tipos de resposta imune podem ocorrer: a inata e a adquirida. Estas são distintas, mas intimamente ligadas. O sistema imune inato é um

mecanismo de defesa que fornece proteção imediata contra a infecção ou inflamação. Este age por meio do recrutamento de células do sistema imunológico, pela ativação do Sistema Complemento, pela identificação e remoção de substâncias estranhas, e pela ativação do sistema imune adquirido. Com o início da resposta imune inata, as células fagocíticas, tais como neutrófilos, monócitos e macrófagos, dão início a liberação de citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL), como IL-1 e IL-6; além disso, ocorre a ativação do sistema complemento e da resposta de fase aguda (JANEWAY JR; MEDZHITOV, 2002), que auxiliam os anticorpos na remoção de patógenos ou sinalizam para a destruição por outras células.

Além da imunidade inata, o organismo é capaz de estabelecer uma resposta mais específica, a adquirida (HANSSON et al., 2002). Quando a lesão ocorre, há a proliferação de células T e B antígeno específicas e, para isso, é necessário o estabelecimento de uma precisa sequência de eventos, incluindo apresentação do antígeno, liberação de mediadores inflamatórios e uma complexa dinâmica celular em tecidos periféricos e linfoides. Este processo, que envolve linfócitos e células acessórias, inclui a ativação e expansão de células T, contração e geração de memória (REINER; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2007).

As células T reconhecem o antígeno apresentado pelas células apresentadoras de antígenos e estimulam as células B a produzirem anticorpos para o dado antígeno (HANSSON et al., 2002). A quantidade e a duração da apresentação de peptídeos antigênicos e o meio inflamatório, resultante do reconhecimento de padrões de “não-self”, por receptores “scavenger” como Toll (TLRs) e Nod, que podem ser encontrados na superfície ou no citoplasma das células apresentadoras de antígenos, exercem uma função crucial na determinação da qualidade das células T ativadas (FRITZ et al., 2006; IWASAKI; MEDZHITOV, 2004). A ativação das células T acontece, geralmente, em áreas especializadas de drenagem dos órgãos linfoides, tais como linfonodos e baço, locais onde os linfócitos T *naïve* são estimulados (CASTELLINO; GERMAIN, 2006; CASTELLINO et al., 2006).

Estudos sobre a função das células B têm indicado que estas não são apenas precursoras dos plasmócitos, mas desempenham um papel essencial na regulação da resposta imune. Dentre as funções das células B incluem-se a apresentação de antígenos, produção de citocinas,

organogênese linfóide, diferenciação das células T efectoras e modulação da função das células dendríticas (LIPSKY, 2001). As células B ativadas expressam, em níveis elevados, o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC) e moléculas co-estimuladoras, e são quase tão eficazes quanto as células dendríticas em sua capacidade de apresentar antígenos (MACATONIA et al., 1995).

A molécula CD19 é um coreceptor específico de células B e está expressa desde os estágios iniciais de desenvolvimento desta célula. Tem sido demonstrado que esta molécula apresenta capacidade de acentuar a sinalização através do BCR, reduzindo o limiar de ativação destas células (CARTER; FEARON, 1992). Na membrana plasmática das células B, a molécula CD19 é encontrada predominantemente associada a um complexo proteico composto por CD21 (CR2), CD81 (TAPA-1) e leu-13 (FEARON; CARROLL, 2000). O complexo CD19-CD21 é crucial para a função da célula B, como a secreção de anticorpos, formação de centros germinativos e maturação de afinidade (AHEARN et al., 1996; RICKERT; RAJEWSKY; ROES, 1995).

Os monócitos estão presentes nos sítios de entrada dos antígenos, podendo ser, também, encontrados no sítio de ativação das células T; estas células expressam receptores de reconhecimento de padrão, tais como receptores do tipo Toll. Alguns trabalhos têm sugerido que os monócitos possam ter efeitos importantes sobre a polarização e expansão de linfócitos e, também, possam contribuir para a ativação primária e resposta das células T de memória em humanos e camundongos (AUFRAY et al., 2007; EVANS et al., 2007; GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003; KRUTZIK, 2005; LEON; LOPEZ-BRAVO; ARDAVIN, 2007; PALFRAMAN et al., 2001; SERBINA; PAMER, 2006). Considerados precursores das células dendríticas (DC), foi mostrado, recentemente, que os monócitos podem exercer função distinta, quando comparados às células dendríticas, na indução da resposta imune (EVANS et al., 2007).

A função das células dendríticas (DC) é absolutamente essencial para a ativação e regulação das respostas das células T (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Elas são capazes de processar e apresentar os antígenos de patógenos, células infectadas ou, até mesmo, de células alteradas, expressando peptídeos ligados às moléculas do complexo de histocompatibilidade (MELLMAN; STEINMAN, 2001). No entanto, o resultado da apresentação do peptídeo antigênico

pelas DCs pode levar tanto a uma imunidade protetora, quanto a tolerância ou a autoimunidade (STEINMAN; BANCHEREAU, 2007; STEINMAN; NUSSENZWEIG, 2002).

A polarização das células TCD4 depende da diferenciação das células T *naïve* em subtipos de células efectoras tais como: Th1, Th2, Treg e Th17, com funções antagônicas como estabelecimento da inflamação ou tolerância, respostas imunes agressivas ou protetoras (SUNDRUD; RAO, 2007). Por outro lado, os linfócitos TCD8 representam as principais células efectoras na resposta imune adaptativa contra microrganismos intracelulares (BADOVINAC; HARTY, 2006).

As células apresentadoras de antígenos desempenham um papel fundamental na diferenciação dos linfócitos Th. As células dendríticas, preferencialmente, induzem uma resposta Th1 pela produção de IL-12 (MACATONIA et al., 1995), enquanto as células B promovem o desenvolvimento de células Th2 (MASON, 1996). Alternativamente, as células B podem influenciar o balanço Th1/Th2 pela regulação da função das células dendríticas e, dessa forma, a IL-10 produzida pelas células B ativadas inibe a produção de IL-12 pelas células dendríticas, promovendo, assim, a diferenciação em células Th2 (SKOK; POUDRIER; GRAY, 1999).

Como visto, muitos são os fatores que influenciam a diferenciação das células em Th1 ou Th2, incluindo a dose de antígeno, a natureza e o grau de coestimulação, e o meio de citocinas em torno das células em diferenciação.

1.7 O sistema complemento

O sistema complemento, uma das primeiras linhas de defesa da imunidade inata, é um dos principais mecanismos pelo qual o corpo reconhece substâncias estranhas e patógenos (HOLERS, 2003). Este sistema é composto por mais de 35 proteínas, dentre elas reguladores e receptores ligados à membrana, bem como proteínas do plasma que interagem com várias células e mediadores do sistema imune (MASTELLOS et al., 2003). Estas interações variam de acordo com o contexto fisiopatológico e ocorrem em diferentes etapas da reação imune.

A principal função do complemento tem sido associada ao reconhecimento e eliminação de patógenos por meio da lise direta (MOFFITT; FRANK, 1994) e/ou estimulação da fagocitose

(BROWN, 1991; MUELLER-ORTIZ; DROUIN; WETSEL, 2004). Entretanto, nas últimas décadas tem se comprovado que este pode também exercer funções imunorreguladoras importantes, tais como de potencializar a resposta imune humoral (BARRINGTON, et al., 2009; FEARON; LOCKSLEY, 1996; MOLINA et al., 1996), por meio da interação dos fragmentos C3d aos receptores CD21 (CR2) e CD35 (CR1), presentes em células dendríticas foliculares e células B; auxiliar na manutenção de células secretoras de anticorpos e células B de memória (BARRINGTON et al., 2001); reduzir o limiar de ativação das células T específicas (KAYA et al., 2001); modelar o desenvolvimento do repertório de anticorpos naturais (FLEMING et al., 2002) e regular a tolerância a antígenos nucleares próprios, tais como DNA e cromatina (BOACKLE et al., 2001; CARROLL, 2000; PICKERING et al., 2000; PRODEUS et al., 1998; WU et al., 2002). Outra função biológica do sistema complemento inclui a remoção de “debris” indesejáveis, tais como células apoptóticas e necróticas (MARKIEWSKI; LAMBRIS, 2007). Em adição às suas funções imunorreguladoras, muitos estudos têm sido realizados sobre a função patogênica do complemento em doenças inflamatórias, autoimunes e isquêmicas (HOLERS, 2003).

O sistema complemento é ativado por três mecanismos, os quais permitem que o organismo responda a eventos inflamatórios, infecciosos, isquêmicos ou necróticos, bem como a antígenos próprios e estranhos (CARROLL, 1998; DALMASSO, 1986). Assim, a Via Clássica é ativada pela ligação de C1q, que forma um complexo pentamérico, na presença de Ca^{2+} , com um tetrâmero de serinoproteases C1r₂ e C1s₂, às regiões Fc de anticorpos IgM (DUNCAN; WINTER, 1988; REID, 1986) e certos isotipos de IgG, complexados aos antígenos (LACHMANN; HUGHES-JONES, 1984). A interação de C1q ao anticorpo permite a ativação de C1r, e este, ativado, cliva C1s, que por sua vez atua sobre os componentes C4 e C2 formando o complexo C3 convertase (C4b2a) e agindo, posteriormente, sobre C3 e formando a C5 convertase C4b2a3b (SIM; REID, 1991).

Em adição, a via clássica pode ser ativada, de maneira independente de anticorpo, por outros agentes como a proteína C reativa (CRP) e a proteína amiloide sérica (SAP) (GEWURZ; ZHANG; LINT, 1996; STEEL; WHITEHEAD, 1996), que podem se ligar a alvos tais como cromatina, permitindo que o complemento seja ativado na superfície de células que estão morrendo por necrose (BICKERSTAFF et al., 1999; BIRO et al., 2007). Além disso, esta via também pode ser

ativada por fosfatidilserina, mecanismo importante para a eficiente remoção de células apoptóticas (PAIDASSI et al., 2008).

A Via Alternativa é a forma mais ancestral de ativação do complemento, pois em invertebrados marinhos, como os equinodermos, foram identificados o componente C3 e uma sequência semelhante a do fator B, indicando a presença da via alternativa já nestas espécies animais (SMITH; CLOW; TERWILLIGER, 2001). Ela é primeiramente ativada sobre a superfície de patógenos ou outros alvos por um processo denominado de “tickover”, mecanismo de autoativação (MULLER-EBERHARD, 1988).

O “tickover” ocorre em uma razão de 1% por hora do total de C3 do soro, quando este sofre, espontaneamente e em solução, alteração conformacional, gerando uma forma denominada C3(H₂O), o que então permite que o fator B interaja com esta forma molecular. Quando ligado ao C3(H₂O) e na presença de Mg²⁺, o fator B pode ser clivado em Ba e Bb, pelo fator D. Este processo gera uma C3 convertase, C3(H₂O)Bb, que é relativamente instável, com uma meia-vida de 90 segundos sob condições fisiológicas (MEDICUS; GOTZE; MULLER-EBERHARD, 1976; PANGBURN; MULLER-EBERHARD, 1986), sendo, dessa forma, estabilizada pela properdina (FEARON, 1979; FEARON; AUSTEN, 1975). A C3 convertase cliva moléculas adicionais de C3, resultando na geração de C3b que se liga covalentemente a superfícies alvo, por meio da sua ligação tioéster.

Em adição, a via alternativa pode ser iniciada por um mecanismo chamado “alça de amplificação”, no qual o C3b, gerado pela ativação das vias clássica ou das lectinas, é fixado sobre uma superfície alvo e este se liga ao fator B, resultando, novamente, em mudança conformacional do fator B e permitindo sua clivagem pelo fator D, de forma similar ao processo de “tickover” (MULLER-EBERHARD, 1988; THURMAN; HOLERS, 2006). De outro modo, ela também pode ser ativada ou amplificada, respectivamente, por imunocomplexos contendo IgA (SCHAAPHERDER et al., 1995) e por certos autoanticorpos, designados fatores nefríticos, que podem estabilizar a C3 convertase e impedir seu decaimento espontâneo (LEVY et al., 1998).

Recentemente, outro mecanismo de ativação da via alternativa foi proposto. Neste, a properdina reconheceria a superfície alvo, se ligaria e iniciaria a ativação local da via alternativa (KEMPER; HOURCADE, 2008; KIMURA et al., 2008; SPITZER et al., 2007; STOVER et al., 2008).

A mais recente via identificada, de ativação do complemento, é a das Lectinas, ativada pela interação da lectina de ligação a manose (MBL) a resíduos repetitivos de manose, presentes na superfície de microrganismos (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006). As MBLs estão complexadas à serinoproteases denominadas de MASP (*Mannan-binding lectin Associated Serine Protease*) (WONG et al., 1999). A família MASP consiste das enzimas MASP-1, -2 e -3 e a MAP-19 (proteína de 19 kDa associada à MBL), forma truncada de MASP-2 com ausência de atividade enzimática, também chamada de sMAP. As três MASPs têm organização de domínios idêntica, os quais são semelhantes as duas serinoproteases da via clássica, C1r e C1s (SWIERZKO et al., 2009). Dessa forma, uma vez a MBL ligada ao alvo, as MASPs são ativadas de maneira similar a C1r e C1s, resultando na clivagem de C4 e C2, para formar a C3 convertase C4b2a, produto comum à ativação das vias clássica e das lectinas (HARMAT et al., 2004; THIEL et al., 1997).

Acredita-se que MASP-2 exerça importante função na ativação inicial da via das lectinas, clivando C4 e C2, com alta eficiência (DUNCAN; WIJEYEWICKREMA, 2008; GAL et al., 2007; HAJELA et al., 2002; MATSUSHITA; ENDO; FUJITA, 2000; ROSSI et al., 2001; THIEL et al., 2000), pois após a ligação do complexo MASP-MBL ou MASP-ficolina à estrutura alvo, esta pode sofrer auto-ativação (GAL et al., 2005). Recentemente, a cooperação entre MASP-2 e MASP-1 na ativação do complemento foi descrita por Moller-Kristensen et al. (2007) e Takahashi et al. (2008). Alguns estudos demonstraram que MASP-1 pode clivar diretamente C3, de maneira a contornar a clivagem de C4/C2, resultando na ativação da via alternativa (MATSUSHITA; FUJITA, 1995; ROSSI et al., 2001; TAKAHASHI et al., 2007). A função de MASP-3 ainda não está esclarecida, embora alguns estudos tenham mostrado que ela é capaz de inibir a atividade de MASP-2 (DAHL et al., 2001; FUJITA, 2002).

As ficolinas M (ficolina-1), L (ficolina-2) e H (ficolina-3), que compõem outra família de lectinas do soro e que estão igualmente associadas às MASPs (LUH et al., 2002; MATSUSHITA et al., 2000; THIEL, 2007), além de imunocomplexos contendo IgA (ROOS et al., 2001), podem também ativar a via das lectinas. Enquanto a MBL reconhece padrões de carboidratos, as ficolinas têm ampla especificidade de reconhecimento e se ligam, além de outras estruturas, a componentes acetilados (THIEL, 2007).

A ativação das vias iniciais do complemento, por qualquer um dos três mecanismos, resulta na formação das C5 convertases, C3b₂Bb, para a via alternativa, e C4b2a3b para as vias clássica e das lectinas, que por sua vez clivam C5 que inicia a via lítica do complemento. C5a é uma potente anafilatoxina e C5b permite a associação dos componentes terminais do complemento, formando o complexo C5b-9, também conhecido como MAC (MOLLNES; SONG; LAMBRIS, 2002; WALPORT, 2001a, b). A via terminal é altamente potente e responsável por muitas reações inflamatórias induzidas pela ativação inicial, particularmente por meio do receptor para C5a. Uma reduzida amplificação da via alternativa, em muitos casos, pode atenuar os efeitos da ativação da via terminal, embora ativação direta de C5, sem o prévio envolvimento de C3, tenha sido também recentemente postulada (HUBER-LANG et al., 2006).

1.7.1 Anafilatoxinas

As anafilatoxinas, geradas pela ativação do sistema complemento, C3a, C4a e C5a, exercem importantes funções no processo inflamatório (GASQUE, 2004; MARCEAU; LUNDBERG; HUGLI, 1987; MULLER-EBERHARD, 1988). Elas são pequenos polipeptídeos, constituídos de 74 a 77 aminoácidos, com 38% de identidade de aminoácidos, compartilhando, portanto, alto grau de homologia estrutural, bem como sobreposição de funções na geração da resposta inflamatória. No entanto, tem sido mostrado que C5a é mais potente que C3a e C4a na indução de respostas biologicamente relevantes (EMBER; HUGLI, 1997; KOHL, 2001). As anafilatoxinas possuem sequências pentapeptídicas na porção C-terminal, altamente conservadas, necessárias à ativação de seus receptores (CAPORALE et al., 1980; FERNANDEZ; HUGLI, 1976, 1978; GORSKI; HUGLI; MÜLLER-EBERHARD, 1979).

As diferenças quantitativas entre as atividades de C4a e de C3a e C5a são consideráveis. C4a expressa somente 1% da atividade espasmogênica de C3a e somente 0,05% da de C5a. Na pele humana, C3a é 100 vezes e C5a, aproximadamente, 25.000 vezes mais ativos do que C4a (GORSKI; HUGLI; MÜLLER-EBERHARD, 1979).

As anafilatoxinas são potentes mediadores inflamatórios que atuam sobre um amplo espectro de células imunes e não imunes e podem regular a vasodilatação, aumentar a

permeabilidade dos vasos sanguíneos e induzir a contração dos músculos lisos (EMBER; JAGELS; HUGLI, 1998). Em macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, podem ativar a explosão respiratória (ELSNER et al., 1994a,b). Basófilos (KRETZSCHMAR et al., 1993) e mastócitos (el LATI; DAHINDEN; CHURCH, 1994) reagem à estimulação das anafilatoxinas com liberação de histamina. Em eosinófilos, C3a e C5a regulam a produção da proteína catiônica eosinofílica, a adesão às células endoteliais, bem como sua migração (DISCIPIO et al., 1999; TAKAFUJI; TADOKORO; ITO, 1996). Em adição, as anafilatoxinas são também conhecidas por influenciar a geração de respostas imunes adaptativas (TEMPERO et al., 1997; ULRICH et al., 2000).

A anafilatoxina C3a é capaz de modular a síntese de IL-6 e TNF- α pelas células B e monócitos (FISCHER; HUGLI, 1997; FISCHER; JAGELS; HUGLI, 1999), além de suprimir a indução de resposta imune policlonal (FISCHER; HUGLI, 1997) e regular, negativamente, a resposta Th2 a antígenos inoculados epicutaneamente (KAWAMOTO et al., 2004). A anafilatoxina C5a tem habilidade de promover, além da expressão de TNF- α , PGE₂, IL-6 e IL-8, em macrófagos derivados de monócitos (EMBER et al., 1994; KACANI et al., 2001; SCHOLZ et al., 1990; SORURI et al., 2003), a capacidade de regular positivamente o receptor de complemento do tipo 3 (CR3) (MOLLNES et al., 2002; SCIESZKA et al., 1991). Esta anafilatoxina é também um poderoso quimioatraente para macrófagos, neutrófilos, células B ativadas, células T, basófilos e mastócitos (AKSAMIT; FALK; LEONARD, 1981; EHRENGRUBER; GEISER; DERANLEAU, 1994; LETT-BROWN; LEONARD, 1977; NATAF et al., 1999; OTTONELLO et al., 1999). Somente este último, migra em direção ao gradiente de C3a (HARTMANN et al., 1997). Observou-se que C4a é desprovido de atividade quimioatraente (GORSKI et al., 1979).

Em adição às suas propriedades pró-inflamatórias, as anafilatoxinas têm capacidade de regular a regeneração e a fibrose tecidual (ADDIS-LIESER; KÖHL; CHIARAMONTE, 2005; HILLEBRANDT et al., 2005; MASTELLOS et al., 2001; STREY et al., 2003).

As anafilatoxinas C3a e C5a se ligam a três receptores, pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR) (EMBER; HUGLI, 1997; GASQUE, 2004). Os receptores para C3a é o C3aR e para C5a são o C5aR e o C5L2. Eles compartilham alta homologia de sequência (LEE et al., 2001), mas diferem na especificidade do ligante, capacidade de transdução de sinal e função. Existem trabalhos demonstrando que, em humanos, o C3a não

compartilha o mesmo receptor com o C4a (AMES et al., 1997; LIENENKLAUS et al., 1998), sendo o receptor para C4a ainda desconhecido.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O acidente causado pelo lepidóptero *Premolis semirufa* foi registrado, até o momento, apenas nos seringais da Amazônia, não havendo referências em outras regiões do planeta (Costa, 2003). Pararamose, doença ocupacional de natureza inflamatória e causada pelo contato com as cerdas, apresenta manifestações agudas e crônicas que podem evoluir para deformidade por alterações osteoarticulares. Tais alterações são comuns às sinovites crônicas, como aquelas presentes na artrite reumatoide, doença de natureza autoimune na qual vários elementos do sistema imune parecem contribuir para sua etiologia. Trabalhos sobre a pararamose são escassos não só no que concerne à caracterização das substâncias tóxicas liberadas pelas cerdas da lagarta, bem como sobre os mecanismos moleculares envolvidos em sua patogênese. Por este motivo, este trabalho pretendeu avaliar algumas propriedades tóxicas e imunoquímicas do extrato das cerdas da *Premolis semirufa*, bem como suas propriedades pró-inflamatórias e ação sobre o Sistema Complemento. Além disso, teve como objetivo criar as condições experimentais para a indução da pararamose, em modelo murino, usando extrato de cerdas da lagarta, e identificar os elementos, do compartimento humoral e celular do sistema imune, possivelmente envolvidos na gênese da pararamose. Em adição, pretendeu-se isolar e caracterizar o(s) componente(s) presentes no extrato total das cerdas da lagarta com ação sobre o Sistema Complemento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, com dois meses de idade e pesando entre 18-22 g, obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan, foram utilizados para a determinação da dose letal 50% (DL50) e para o estabelecimento do modelo experimental da pararamose. Camundongos da linhagem H_{III}, geneticamente selecionada para o fenótipo de alta resposta de anticorpos (SANT'ANNA et al., 1982), fornecidos pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, foram utilizados para produção de soro específico e estudo da imunogenicidade do extrato de cerdas da pararama.

Todos os procedimentos envolvendo animais estão de acordo com os princípios éticos em pesquisas com animais, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pela Legislação Nacional nº 11.794/08. Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) nº 413/07 e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo nº 028, fls. 55 do livro 02.

3.2 Extrato de cerdas da *Premolis semirufa*

As lagartas da *Premolis semirufa* Walker, 1856 (HAMPSON, 1901) foram coletadas no estado do Pará, município de São Francisco, e mantidas no Biotério de Aranhas do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan.

As cerdas das lagartas foram cortadas e transferidas para tubos contendo tampão salina-fosfato PBS (8,1 mM de fosfato de sódio bibásico; 1,5 mM de fosfato de potássio monobásico; 137 mM de cloreto de sódio e 2,7 mM de cloreto de potássio - pH 7,4) ou tampão PBS com 0,1% do detergente CHAPS (USB, Baden-Württemberg, Alemanha). As amostras foram imediatamente congeladas a -80 °C durante 24 horas. Após este período, as amostras foram descongeladas e maceradas com auxílio de um bastão de vidro e, em seguida, o material

insolúvel foi removido por centrifugação a 2500 rpm por 20 minutos e a 4 °C. O sobrenadante foi alíquotado e conservado a -80 °C.

A concentração de Lipopolissacarídeo (LPS) nas amostras do extrato das cerdas de *Premolis semirufa* (10 µg), analisada pelo método de LAL (*Limulus* amebocyte lisate), foi realizada pela Seção de Controle Microbiológico (Serviço de controle de qualidade, Divisão Bioindustrial) do Instituto Butantan, com a utilização do Kit PYROGENT™ Plus Gel Clot LAL Assays (Lonza, Walkersville, MD, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração de endotoxina presente nas amostras, calculada de acordo com uma curva padrão de endotoxina de *E. coli*, com concentrações de 2,5 a 0,125 UE/mL, apresentou valores abaixo do limite de sensibilidade, ou seja, 0,125 UE/mL, o que sugere que todos os efeitos detectados no presente estudo foram decorrentes da ação de componentes do extrato.

3.3 Venenos

Os venenos das serpentes *Micrurus hemprichii* e *Bothrops jararaca*, utilizados como controle positivo nos ensaios de determinação das atividades fosfolipásica e hialuronidásica, respectivamente, foram fornecidos pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan na forma liofilizada e armazenados a -20 °C.

3.4 Dosagem proteica

A concentração proteica das amostras foi determinada por meio do ensaio de BCA em espectrofotômetro com λ de 540 nm, de acordo com as recomendações do fabricante (Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Inc., Ontário, Canadá). Alternativamente, quando a concentração não foi detectada pelo ensaio de BCA, o conteúdo proteico foi determinado utilizando-se o método de Lowry et al. (1951).

3.5 Caracterização biológica e enzimática do extrato das cerdas da lagarta da *Premolis semirufa*

3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O perfil eletroforético dos extratos (10 µg) foi determinado por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (12%) e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970), em condições redutoras e não redutoras, utilizando o sistema Mighty Small (Hoefer Pharmacia Biotech, Califórnia, EUA). A corrida eletroforética foi efetuada sob corrente de 100 V, por 3 horas em tampão Tris-Glicina, e o gel corado pelo método de impregnação pela prata (MORRISSEY, 1981).

3.5.2 Avaliação, por “western blot”, da presença de resíduos de açúcares no extrato das cerdas de *P. semirufa*

Com a finalidade de avaliar se o extrato das cerdas da *P. semirufa* era composto por proteínas contendo resíduos de açúcares, foi realizado ensaio de “Western blot”. Para tanto, amostras do extrato (10 µg) foram separadas eletroforéticamente em gel de 12% (SDS-PAGE) em condições redutoras e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Após a transferência, estas foram bloqueadas com PBS-BSA 5%, por 2 horas a 37 °C, e incubadas com as lectinas Concanavalina A (Con A) ou “Wheat Germ Agglutinin” – Lectina de *Triticum vulgaris* (WGA) conjugadas com peroxidase, na diluição de 1:1000, durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com o tampão PBS-Tween 0,05% e reveladas pela adição de diaminobenzidina-DAB (20 mg/mL).

3.5.3 Atividade gelatinolítica

A atividade gelatinolítica das amostras de extrato de pararama foi avaliada em ensaios de zimografia, de acordo com o estabelecido por Kleiner e Stetler-Stevenson (1994), com pequenas

modificações. Amostras de 0,5 µg do extrato foram solubilizadas em tampão de amostra, em condições não redutoras, e separadas eletroforicamente. Para isso, foi utilizado gel a 10% de acrilamida, acrescido de 1 mg/mL de gelatina e, para o empilhamento das amostras, gel a 4%. A corrida foi realizada sob amperagem constante de 20 mA e a 4 °C, no sistema Mighty Small (Hoefer Pharmacia Biotech, Califórnia, EUA). Após a corrida, o gel foi lavado por 30 minutos em Triton X-100 a 2,5% e incubado por 12 horas a 37 °C em tampão substrato (50 mM de Tris-HCl, 200 mM de cloreto de sódio, 10 mM de cloreto de cálcio e 0,05% de Brij-35 - pH 8,3). O gel foi corado em solução de “Coomassie Brilliant Blue” R-250 (LKB, Reactifs IBF, Villeneuve-la-Garenne, França) a 0,2% por 30 minutos sob agitação, para a análise da presença de zonas claras indicativas de digestão proteolítica.

Para determinar a(s) classe(s) de protease(s) presente(s) no extrato das cerdas de *Premolis semirufa* com atividade gelatinolítica, amostras de 0,5 µg do extrato foram incubadas com 10 mM dos inibidores 1,10-fenantrolina (inibidor de metaloproteinases) ou fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF (inibidor de serinoproteinases), por 30 minutos e a 37 °C, e em seguida, realizado o ensaio de zimografia.

3.5.4 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica do extrato das cerdas da lagarta de *P. semirufa* foi também avaliada em ensaios utilizando substratos peptídicos de fluorescência apagada (FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer) e as leituras realizadas em espectrofluorímetro (Victor 3[™], Perkin – Elmer, Massachusetts, EUA). Para tanto, o peptídeo Abz-FRSSRQ-EDDnp foi dissolvidos em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e, posteriormente, diluído em água Milli-Q de modo a permitir a utilização de volumes sem que a concentração do solvente orgânico ultrapassasse 5% do volume final de incubação (100 µL). Para o ensaio, amostras do extrato (1,0 µg) foram incubadas com amostras dos peptídeos (5,0 µM) em solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), utilizando placas de 96 poços, e analisadas em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 320 e 420 nm, respectivamente. A temperatura da reação foi mantida a 37 °C em compartimento termo-estabilizado, sob agitação (ARAÚJO et al., 2000). O

aumento da fluorescência foi monitorado, continuamente por 15 minutos, e a atividade proteolítica específica dos extratos expressa como μM de substrato clivado por minuto por micrograma de extrato ($\text{U}/\mu\text{g}$), sendo calculada pela fórmula:

$$\text{Velocidade de hidrólise } (\mu\text{M}/\text{min}) / [\text{prot}] (\mu\text{g})$$

A inibição relativa foi determinada em paralelo utilizando, nos ensaios, 5 mM de PMSF ou 5 mM de 1,10-fenantrolina, com período de incubação de 20 minutos. A porcentagem de inibição foi calculada comparando-se as atividades proteolíticas obtidas na presença ou ausência dos inibidores.

3.5.5 Atividade hialuronidásica

A possível presença de hialuronidases no extrato de cerdas da lagarta de *P. semirufa* foi testada segundo os procedimentos de Pukrittayakamee et al. (1988), com pequenas modificações. Amostras do extrato (8 μg) foram incubadas com 25 μL do substrato (ácido hialurônico 0,5 mg/mL) (Sigma, Missouri, EUA) e tampão acetato de sódio 200 mM (0,2 M de acetato de sódio e 0,15 M de cloreto de sódio, pH 6,0), em um volume final de 125 μL . Como controles da reação foram utilizados 125 μL do tampão acetato (Branco) e 25 μL do substrato em 100 μL do tampão acetato (100% de turbidez), ambos na ausência do extrato. As misturas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e, a seguir, acrescidas de 250 μL de brometo de cetil-trimetil-amônio 2,5% em NaOH 2%, para desenvolvimento de turbidez. As leituras foram feitas em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia), em λ de 405 nm, e a atividade hialuronidásica expressa como UTR (unidade de redução de turbidez) / mg. O veneno da serpente *Bothrops jararaca* (8,0 μg) foi utilizado como controle positivo da reação.

3.5.6 Atividade fosfolipásica

A possível presença de fosfolipases A_2 no extrato de cerdas da lagarta da *P. semirufa* foi avaliada por método colorimétrico, de acordo com Price III (2007), com algumas modificações. Amostras de 4 ou 16 μg do extrato, 20 μL de HCl (controle positivo), em diluições pré-

determinadas, ou 20 µL de tampão (controle negativo), foram adicionadas às placas de 96 poços contendo 180 µL de uma mistura composta por 10 mM de Triton X-100, 5 mM de fosfatidilcolina (Sigma, Missouri, EUA), 1,5 mM de tampão HEPES, 10 mM de cloreto de cálcio, 0,9% cloreto de sódio e 0,03% azul de bromotimol, em pH 7,5 e a temperatura de 37 °C. A placa foi analisada em espectrofotômetro (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia), em λ de 620 nm, após 5 minutos. A partir da curva de HCl foi estabelecida uma equação da reta e, a partir desta, foi calculada a atividade enzimática (nmol/min/µg) para o extrato das cerdas. Como controle positivo, utilizou-se uma amostra (4,0 µg) do veneno da serpente *Micrurus hemprichii*.

3.5.7 Determinação da dose letal (DL_{50})

A toxicidade letal do extrato de cerdas da *Premolis semirufa* foi avaliada em camundongos da linhagem BALB/c (4 animais por grupo), por meio da injeção intraperitoneal de três diferentes concentrações/grupo (25, 50 e 150 µg) do extrato em PBS, em um volume final de 200 µL. Um grupo controle recebeu somente PBS. A mortalidade, para cada uma das concentrações, foi acompanhada por 72 horas, e a DL_{50} calculada pelo método de Probita (FINNEY, 1971).

3.6 Avaliação da atividade do extrato das cerdas de *P. semirufa* sobre elementos da resposta imune humoral

3.6.1 Ação sobre o sistema complemento (C)

3.6.1.1 Soro humano normal (SHN)

O soro humano normal foi obtido de indivíduos adultos saudáveis. O sangue foi coletado por punção venosa, mantido à temperatura ambiente por 10 minutos e refrigerado a 4 °C por 4 horas, para retração do coágulo. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos e a 4 °C, o soro coletado, aliquotado e armazenado a – 80 °C até o momento do uso.

Todos os procedimentos utilizando soro humano normal foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos da Fundação ABC e do ICB (CEP) nº 155.621.

3.6.1.2 Processamento do SHN com a peçonha da lagarta da *P. semirufa*

Alíquotas de SHN (100 µL) foram tratadas com 100 µL das diferentes concentrações da peçonha (39, 78, 156, 312 e 625 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 1 hora, para os ensaios da Via Clássica, e por 30 minutos, para os ensaios da Via Alternativa. Para os ensaios da Via das Lectinas, amostras de 50 µL de SHN foram incubadas, na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina, com 50 µL do extrato (31,2 µg) a 37 °C por 30 minutos. Amostras controles, para as Via Clássica e Alternativa, foram tratadas com PBS, e para o ensaio da Via das Lectinas, com tampão BVB⁺⁺ (VBS⁺⁺ contendo 0,5 mM de cloreto de magnésio, 2,0 mM de cloreto de cálcio, Tween 20 0,05% e 0,1% de soro albumina bovina - BSA - pH 7,5).

3.6.1.3 Ensaios hemolíticos

Para os ensaios hemolíticos da Via Clássica do C foram utilizados eritrócitos de carneiro (E^S), sensibilizados com anticorpos de coelho anti-E^S (hemolisina) e para os ensaios da Via Alternativa do C, eritrócitos de coelho (E^R).

3.6.1.4 Via alternativa

Amostras de SHN, previamente incubadas com o extrato, foram diluídas 1:7 em tampão APB (5 mM de 5,5-dietilbarbiturato de sódio; 7 mM de cloreto de magnésio; 10 mM de EGTA e 150 mM de cloreto de sódio - pH 7,4). Alíquotas dessas diluições, variando de 10 a 100 µL, foram incubadas, em placas de 96 poços, com 50 µL da suspensão a 2% de E^R e volumes do tampão suficientes para completar volume final de 150 µL por poço. Como controles negativo (branco) ou positivo (100% de lise), amostras de E^R foram incubadas com tampão ou água destilada, respectivamente. A placa foi incubada a 37 °C por 30 minutos e, em seguida,

centrifugada a 1300 rpm por 5 minutos e a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de fundo chato e a hemólise determinada pela medida da absorbância da hemoglobina liberada, em λ de 414 nm, utilizando espectrofotômetro (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia).

Cálculo da atividade hemolítica - A partir dos valores da leitura de absorbância (Abs), as porcentagens de hemólise (y) foram calculadas utilizando a seguinte fórmula:

$$y = [(Abs^{SORO} - Abs^{BRANCO}) / (Abs^{100\%LISE} - Abs^{BRANCO})] \times 100\%$$

Os valores de AP₅₀, para as amostras de soro incubadas com o extrato, foram calculados a partir da curva construída com as porcentagens de hemólise.

3.6.1.5 Ação da peçonha da lagarta sobre a via das lectinas

Para a avaliação da atividade do extrato da *P. semirufa* sobre a Via das Lectinas, placas de poliestireno com 96 poços (Costar®, Corning Inc., Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas, “overnight” e a 4 °C, com 100 µg/mL de manose (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) diluída em tampão PBS, em volume final de 100 µL/poço. As placas foram lavadas e bloqueadas com PBS-BSA 1% durante 1 hora e a 37 °C. Posteriormente, as placas foram incubadas, por 1 hora e a 37 °C, com diluições seriadas do SHN (100 µL/poço), previamente tratado com o extrato das cerdas na presença ou ausência de fenantrolina. Como controle positivo, foram utilizadas amostras de SHN previamente incubadas com *Escherichia coli* e como controle negativo, SHN inativado por aquecimento a 56 °C por 30 minutos. As placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo anti-C4 humano (diluído 1:1000) produzido em cabra (Quidel Corporation, San Diego, Califórnia, EUA), por 1 hora e a 37 °C. Após este período, as placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpos anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase (diluído 1:5000) (Pierce, Washington, EUA), por 1 hora e a 37 °C. As placas foram lavadas e as reações reveladas pela adição de 50 µL do substrato (10 mg orto-dihidrocloreto de fenilediamina – OPD [Sigma, Missouri, EUA], diluído em 20 mL de tampão citrato/ fosfato/ H₂O₂ 0,3%). A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4N e as densidades ópticas determinadas por leitura espectrofotométrica (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia) em λ de 492 nm. Para

cálculo da atividade da Via das lectinas, os valores obtidos para as amostras de SHN foram arbitrariamente fixados como 1000 unidades por mL (1000 UA/mL).

3.6.1.6 Via clássica

Amostras de SHN, previamente incubadas com o extrato, foram diluídas 1:80 em VBS⁺⁺ (145,5 mM de cloreto de sódio; 0,9 mM de 5,5 dietilbarbiturato de sódio; 2,8 mM de ácido barbitúrico; 0,8 mM de cloreto de magnésio e 0,3 mM de cloreto de cálcio - pH 7,2). Alíquotas dessas diluições, variando de 10 a 100 µL, foram incubadas, em placa de 96 poços, com 50 µL da suspensão a 2% dos E^S sensibilizados e volumes de VBS⁺⁺ suficientes para completar o volume final de 150 µL por poço. Como controles negativo (branco) ou positivo (100% de lise), E^S sensibilizados foram incubados com VBS⁺⁺ ou água destilada, respectivamente. A placa foi incubada a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, centrifugada a 1300 rpm por 5 minutos e a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de fundo chato e a hemólise determinada pela medida da absorbância da hemoglobina liberada, em λ de 414 nm, utilizando espectrofotômetro (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia).

3.6.1.7 Análise da produção de anafilatoxinas em soros humanos tratados com o extrato das cerdas de *P. semirufa*

A geração das anafilatoxinas C3a/C3a desArg, C4a/C4a desArg, e C5a/C5a desArg, foi determinada em amostras de 50 µL de soro humano normal (SHN) incubadas com 31, 2 µg (em 50 µL) da peçonha da pararama a 37 °C por 30 minutos, na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina, um inibidor de metaloproteínases, utilizando-se o kit *Human Anaphylatoxin Cytometric Bead Array* (CBA - BD Biosciences, Califórnia, EUA). Resumidamente, foi preparada uma curva-padrão com concentrações conhecidas da mistura das três anafilatoxinas. Para cada tubo foram adicionados, além dos 50 µL de cada uma das amostras (SHN incubado com o extrato na presença ou ausência de fenantrolina), do branco (diluyente) e de cada diluição da curva-padrão, 50 µL da mistura dos *beads* de captura das três anafilatoxinas, recobertos com

anticorpos específicos para cada anafilatoxina. Os tubos foram incubados por 2 horas, no escuro a temperatura ambiente e, após a incubação, 1 mL do tampão de lavagem foi adicionado a cada tubo e estes foram centrifugados a 1300 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a cada tubo foram adicionados 50 µL da mistura de anticorpos anti-anafilatoxinas marcados com ficoeritrina (PE). Após incubação por 1 hora, no escuro e a temperatura ambiente, os tubos foram novamente lavados. O sobrenadante foi descartado e as esferas ressuspensas em 300 µL de tampão de lavagem. A aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton & Dickinson Immunocytometry Systems, Califórnia, EUA). As concentrações das anafilatoxinas foram determinadas a partir de curvas-padrão da concentração de anafilatoxina *versus* a intensidade média de fluorescência, utilizando o *Becton Dickinson Cytometric Bead Array CBA Analysis Software*.

3.6.1.8 Análise da atividade dos extratos das cerdas de *P. semirufa* sobre os componentes do complemento

Para avaliar se componentes do extrato das cerdas de *P. semirufa* poderiam clivar os componentes C3, C4 e C5 do Sistema Complemento, amostras de 3 µg de C3, C4 e C5 humanos (Quidel Corporation, San Diego, Califórnia, EUA) foram incubadas, na presença ou ausência de 10 mM dos inibidores 1,10-fenantrolina (inibidor de metaloproteínas) e PMSF (inibidor de serinoproteínas), com 2,0 µg ou 3,0 µg do extrato, por 1 hora a 37 °C em tampão PBS para um volume final de 20 µL. Após a incubação, as amostras foram, então, solubilizadas em tampão de amostra, em condições redutoras, e separadas eletroforéticamente em gel a 10% de acrilamida, e gel a 4%, para o empilhamento das amostras. A corrida eletroforética foi efetuada sob corrente de 100 V, e o gel corado pelo método de impregnação pela prata (MORRISSEY, 1981).

3.6.2 Cromatografia em coluna de gel filtração do extrato das cerdas de *Premolis semirufa*

Uma das atividades biológicas mais pronunciadas do extrato de cerdas da pararama é a proteolítica, responsável por efeitos como a clivagem de componentes do Sistema

Complemento e geração de anafilatoxinas. Tal protease parece pertencer à classe de serinoproteinases e para isolar, de forma ativa, tal componente, realizou-se a separação do extrato total das cerdas de *P. semirufa* por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare®, PA, EUA). Para tanto, foram aplicadas amostras de 100 µL do extrato por corrida, contendo aproximadamente 1 mg de proteínas, equilibradas com tampão Bicarbonato de Amônio 0,05 M, pH 7,4, totalizando 4 corridas. A eluição dos materiais foi realizada a um fluxo de 0,5 mL/min e os perfis cromatográficos foram monitorados a 280 nm (A280). Foram coletados picos de aproximadamente 5 mL sendo, posteriormente, liofilizados e ressuspensos em salina apirogênica (1,0 mL).

Após eluição das frações, estas foram analisadas quanto à habilidade de clivar o componente C3 do Sistema Complemento.

3.6.2.1 Caracterização biológica e enzimática da Ps82

A fração ativa sobre o componente C3 do complemento, denominada aqui como Ps82, foi analisada quanto:

- a) ao perfil eletroforético em gel de poliacrilamida: 100 µL da fração ativa foi concentrada em SPD 131DDA SpeedVac (Thermo Scientific, NY, EUA), ressuspensa em 30 µL de salina e avaliada eletroforeticamente como descrito em 3.5.1;
- b) a atividade gelatinolítica: Amostras de 0,5 µg do extrato (controle positivo) ou 0,05 µg da Ps82 foram incubadas com 10 mM dos inibidores 1,10-fenantrolina ou PMSF, por 30 minutos e a 37 °C; em seguida, a atividade gelatinolítica foi avaliada como descrito em 3.6.2;
- c) processamento do SHN com a Ps82: Alíquotas de SHN foram tratadas com o extrato (175 µg/mL) (controle positivo) ou com a Ps82 (0,5, 0,3 ou 0,25 µg/mL) e incubadas a 3°C por 1 hora, para os ensaios da Via Clássica, e por 30 minutos, para os ensaios da Via Alternativa. Para os ensaios da Via das Lectinas, amostras de SHN foram incubadas, na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina, com o extrato das cerdas de *Premolis semirufa* (175 µg/mL) ou com a Ps82 (0,5 µg/mL) a 37 °C por 30 minutos. Após o

tratamento das amostras de SHN, os ensaios foram realizados como descrito em 3.6.1.4, 3.6.1.5 e 3.6.1.6.

3.6.2.1.1 Via clássica por ELISA

Alternativamente, as amostras de SHN, incubadas com a Ps82 ou o extrato total, foram avaliadas, em condições para ativação da via clássica, pela deposição do componente C4 do complemento. Para tanto, placas de poliestireno com 96 poços (Costar®, Corning Inc., Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas, “overnight” e a 4 °C, com 2 µg/mL de IgM humana (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) diluída em tampão PBS, em volume final de 100 µL/poço. As placas foram lavadas e bloqueadas com PBS-BSA 1% durante 3 horas e a 37 °C. Posteriormente, as placas foram incubadas, por 1 hora e a 37 °C, com diluições seriadas, em BVB⁺⁺, do SHN (100 µL/poço) previamente tratado com a Ps82. As placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo anti-C4 humano (diluído 1:1000) produzido em cabra (Quidel Corporation, San Diego, Califórnia, EUA), por 1 hora e a 37 °C. Após este período, as placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpos anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase (diluído 1:5000) (Pierce, Washington, EUA), por 1 hora e a 37 °C. As placas foram lavadas e as reações reveladas pela adição de 50 µL do substrato OPD, diluído em 20 mL de tampão citrato/ fosfato/ H₂O₂ 0,3%). A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4N e as densidades ópticas determinadas por leitura espectrofotométrica (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia) em λ de 492 nm. Para cálculo da atividade da Via Clássica, os valores obtidos para as amostras de SHN foram arbitrariamente fixados como 1000 unidades por mL (1000 UA/mL).

3.6.2.1.2 Análise da produção de anafilatoxinas em soros humanos tratados com a Ps82

A geração das anafilatoxinas C3a/C3a desArg, C4a/C4a desArg e C5a/C5a desArg, foi determinada em amostras de SHN incubadas com 175 µg/mL do extrato da pararama ou 0,33 µg/mL da Ps82, por 30 minutos a 37 °C, na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina, utilizando-se os kits “Human C3a ELISA Kit, Human C4a ELISA Kit e Human C5a ELISA Kit” (BD

OptEIA™ - BD Biosciences, Califórnia, EUA). Resumidamente, foi preparada uma curva-padrão com concentrações conhecidas de cada anafilatoxina. Em cada poço, foram adicionados 100 µL da curva-padrão e 100 µL de cada amostra diluída e incubados por 2 horas e à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas, por 1 hora e à temperatura ambiente, com o anticorpo de detecção biotinilado, previamente incubado com o reagente estreptavidina-HRP. Após as lavagens, as placas foram incubadas, por 30 min e à temperatura ambiente, com o reagente substrato Tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida pela adição da solução Stop do próprio kit e as densidades ópticas determinadas por leitura espectrofotométrica (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia) em λ de 450 nm. A concentração de cada anafilatoxina foi determinada pela construção da equação da reta da curva-padrão, colocando no eixo-x a concentração conhecida da curva e no eixo-y os valores obtidos de absorbância.

3.6.2.1.3 Análise da atividade da Ps82 sobre os componentes do complemento

Para avaliar se a fração obtida pela cromatografia poderia clivar os componentes C3, C4 e C5 do Sistema Complemento, amostras de 3 µg de C3, C4 e C5 humanos (Quidel Corporation, San Diego, Califórnia, EUA) foram incubadas, na presença ou ausência de 10 mM dos inibidores fenantrolina e PMSF, com 0,1 µg da Ps82, por 1 hora a 37 °C em tampão PBS, para um volume final de 20 µL. Após a incubação, as amostras foram, então, solubilizadas em tampão de amostra, em condições redutoras, e separadas eletroforéticamente em gel a 10% de acrilamida, e gel a 4%, para o empilhamento das amostras. A corrida eletroforética foi efetuada sob corrente de 100 V, e o gel corado pelo método de impregnação pela prata (MORRISSEY, 1981).

Alternativamente, amostras de C5 humano foram incubadas com a Ps82, por 30 minutos a 37 °C, na presença ou ausência de PMSF, e avaliadas quanto à presença de C5a/C5a desArg, como descrito em 3.6.2.1.2.

3.6.3 Imunogenicidade e caracterização imunoquímica do extrato das cerdas da pararama

3.6.3.1 Imunizações

A análise da imunogenicidade do extrato das cerdas foi realizada utilizando-se camundongos geneticamente selecionados para alta produção de anticorpos [Linhagem H_{III}]. Para tanto, os camundongos (n= 5) foram imunizados pela via subcutânea (200 µL) com 5 µg do extrato de cerdas da pararama adsorvidos em hidróxido de alumínio, em uma diluição de 1:25. Como controle, um grupo de camundongos (n= 5) foi inoculado da mesma forma com PBS em hidróxido de alumínio (200 µL). Após 38 e 75 dias, os animais receberam doses de reforço. Sangrias de prova foram realizadas, aproximadamente, a cada 15 dias, pela via retroorbital. A sangria final foi realizada 90 dias após o último reforço. Os soros foram mantidos a -20 °C até as titulações e as análises de reconhecimento epitópico realizadas por ELISA e “Western blot”, respectivamente.

3.6.3.2 Determinação dos títulos de anticorpos

Para a determinação dos títulos de anticorpos antiextrato de *P. semirufa*, placas de ELISA (Costar®, Corning Inc., Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas “overnight” com 100 µL da peçonha (10 µg/mL) em tampão PBS e, a seguir, bloqueadas com PBS-BSA 5% durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente, foram incubadas com 100 µL de diluições crescentes dos soros, obtidos dos animais imunizados e controles, por 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas e incubadas com anti-IgG de camundongo (1:30.000) conjugado com peroxidase (Sigma, Missouri, EUA), por 1 hora a 37 °C. As placas foram novamente lavadas e as reações reveladas pela adição de 50 µL do substrato OPD, diluído em 20 mL de tampão citrato/ fosfato/ H₂O₂ 0,3%). Para a reação, as placas foram mantidas no escuro, sendo interrompida pela adição de H₂SO₄ 4N e as densidades ópticas determinadas por leitura espectrofotométrica (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia) em λ de 492 nm.

Os títulos de anticorpos foram estabelecidos como a maior diluição dos soros experimentais, cujas D.O.s fossem cinco vezes superiores às obtidas para o soro normal na mesma diluição.

3.6.3.3 “Western blot”

Para a análise da reatividade dos soros imunes e normal frente ao extrato de cerdas de *P. semirufa*, 10 µg da peçonha da lagarta foram separados eletroforéticamente em gel de 12% (SDS-PAGE) em condições não redutoras. Os componentes presentes no gel foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose (TOWBIN et al., 1979) e, após a transferência, estas foram bloqueadas com PBS-BSA 5% e incubadas com os soros normal ou experimental na diluição de 1:10.000, durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com o tampão PBS-Tween 0,05% e incubadas com anticorpo secundário específico (1:7.500), marcado com fosfatase alcalina (Promega, Wisconsin, EUA), por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas e a reação revelada pela adição de NBT e BCIP (Promega, Wisconsin, EUA), segundo as recomendações do fabricante.

3.6.4 Estabelecimento de modelo experimental para o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na pararamose

Com a finalidade de analisar, ao longo do tempo, a instalação da pararamose, identificar os elementos do sistema imune envolvidos e a cinética do processo, quatro grupos de camundongos BALB/c (n=5) foram inoculados, pela via subcutânea, no coxim plantar da pata traseira esquerda, com 10 µg da amostra de extrato de cerdas diluído em salina. Como controle, quatro grupos de camundongos receberam salina apirogênica pela mesma via. Inoculações subsequentes foram realizadas a cada 15 dias, nas mesmas condições descritas para o 1º inóculo, por um período de três meses. Ao longo de todo o período, foram sendo observadas as possíveis alterações comportamentais e anatômicas dos animais. Além disso, o edema de pata foi determinado em todos os grupos, durante o período de realização do experimento.

Após 48 horas da 1ª, 3ª, 5ª e 7ª inoculações, um grupo controle e outro experimental foram eutanasiados e, destes, coletadas amostras de sangue para imunofenotipagem das células circulantes e para obtenção de soro, a ser utilizado na quantificação de citocinas e anticorpos. Além disso, suas patas traseiras esquerdas foram removidas e congeladas para

análise histopatológica, imunohistoquímica e de imunofluorescência. Órgãos como baço, rins, pulmão, coração e fígado foram também coletados para análises histopatológicas.

Adicionalmente, grupos de camundongos (n=10) foram injetados com salina apirogênica ou extrato, como descrito acima, e após 48 horas da 1ª, 4ª e 7ª inoculações, um grupo controle e outro experimental foram eutanasiados e seus linfonodos poplíteos, das patas traseiras esquerdas, coletados e processados para análise por citometria de fluxo. Concomitantemente, grupos de camundongos foram eutanasiados após 24 horas da 1ª, 4ª e 7ª inoculações e suas patas traseiras esquerdas coletadas e homogeneizadas para análise de citocinas.

Como controle positivo da reação inflamatória para a análise imunohistoquímica, camundongos BALB/c foram subcutaneamente injetados, no coxim plantar da pata traseira esquerda, com 50 µL de salina apirogênica contendo 200 µg de Carragenina (Sigma Chemical CO, Missouri, EUA), que é um polissacarídeo amplamente utilizado para a indução de reação inflamatória aguda em animais, uma vez que induz a liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como histamina e prostaglandinas (ALBERTINI et al., 2004).

3.6.4.1 Preparo das amostras de soros dos animais envenenados

As amostras de sangue coletadas pelo plexo retro-orbital, com auxílio de pipeta Pasteur, foram mantidas por 15 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, a 4 °C por 6 horas. Após centrifugação a 1500 rpm por 15 minutos e a 4 °C, os soros foram coletados e, imediatamente, congelados a -80 °C até a utilização.

3.6.4.2 Quantificação dos isotipos de anticorpos nos soros de animais tratados com o extrato das cerdas de *P. semirufa*

Para a quantificação das classes e subclasses de anticorpos nos soros de animais inoculados com o extrato de cerdas de *P. semirufa*, placas de ELISA (Costar®, Corning Inc., Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas, “overnight”, com 100 µL do extrato (10 µg/mL) em tampão PBS e, a seguir, bloqueadas com PBS-BSA 5% durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente,

foram incubadas com 100 µL de diluições crescentes dos soros, obtidos dos animais inoculados com o extrato e controles, por 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas e incubadas com soros anti-IgG total (Sigma, Missouri, EUA), -IgM, -IgG1 ou -IgG2a de camundongo, conjugados com peroxidase ou com anti-IgG2b ou -IgG3 de camundongo, conjugados com Biotina (BD Bioscience, Califórnia, EUA), por 1 hora a 37 °C. Para os anticorpos marcados com biotina, houve uma etapa adicional de incubação, por 30 minutos à temperatura ambiente, com estreptavidina marcada com peroxidase (Invitrogen, Califórnia, EUA). As placas foram, novamente, lavadas e as reações reveladas pela adição de orto-dihidrocloreto de fenilediamina – OPD (Sigma, Missouri, EUA), diluído em tampão citrato/ fosfato/ H₂O₂ 0,3%. As placas foram mantidas no escuro, sendo a reação interrompida pela adição de H₂SO₄ 4N, sendo as densidades ópticas determinadas por leitura espectrofotométrica (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia) em λ de 492 nm.

Os títulos de anticorpos foram estabelecidos como a maior diluição dos soros experimentais cujas D.O.s fossem duas vezes superiores às obtidas para o soro normal na mesma diluição.

3.6.4.3 Detecção de anticorpos anti-DNA ou anti-colágeno tipo II

A presença de anticorpos, das classes IgM e IgG, anti-DNA ou anti-colágeno tipo II, nos soros dos camundongos inoculados ou não com o extrato das cerdas da lagarta, foi também determinada por ELISA. Placas de fundo chato de 96 poços Immulon 2-HB (Thermo Scientific, NY, EUA) foram sensibilizadas com DNA nativo de esperma de salmão (1 µg/poço), diluído em 50 µL de Tris-HCl 10 mM contendo 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), em pH 7,5, ou com colágeno de cartilagem traqueal bovina (3 µg/poço), diluído em 100 µL de PBS, pH 7,5, e incubadas “overnight” a 4 °C. As placas foram bloqueadas com PBS-BSA 5% durante 2 horas a 37 °C e, em seguida, diluições crescentes dos soros (100 µL) foram adicionadas e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Os soros de camundongos [NZBxNZW]_{F1}, portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, foram obtidos como descrito por Marengo et al. (2011) e utilizados como controle positivo para a presença de autoanticorpos. As placas foram

lavadas com PBS 0,05% Tween-20 e incubadas com anti-IgG (Sigma, Missouri, EUA) ou anti-IgM de camundongo (BD Bioscience, Califórnia, EUA) conjugados com peroxidase, por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram, novamente, lavadas e as reações reveladas pela adição de OPD, diluído em tampão citrato/ fosfato/ H_2O_2 0,3%. As placas foram mantidas no escuro, sendo a reação interrompida pela adição de H_2SO_4 4N, sendo as densidades ópticas determinadas por leitura espectrofotométrica (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia) em λ de 492 nm.

3.7 Avaliação da atividade do extrato das cerdas de *P. semirufa* sobre elementos da resposta imune celular

3.7.1 Determinação da atividade edematogênica

A atividade edematogênica foi determinada segundo o método de Yamakawa et al. (1976), com algumas modificações. Grupos de camundongos BALB/c (n=5) foram inoculados, por sete vezes, com 10 μ g do extrato de cerdas, em volume de 50 μ L, no tecido subcutâneo da região plantar da pata. Como controle, grupos de camundongos BALB/c (n=5) receberam salina. Antes da inoculação do extrato ou salina apirogênica, a espessura da pata esquerda (Es_0) foi determinada utilizando-se um paquímetro (Mitutoyo, Sul American Ltda - sensibilidade 0,01 mm). Leituras subsequentes da espessura (Es_t), após inoculação do extrato ou salina, foram realizadas nos períodos de 30, 60, 120, 180 e 300 minutos, e comparadas com as leituras iniciais. O edema (E) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$E [\%] = [(Es_t - Es_0)/Es_0] \times 100$$

Onde Es_t é a espessura (mm) da pata no tempo “t” após a inoculação do extrato ou salina e Es_0 é a espessura da pata antes da inoculação.

3.7.2 Imunofenotipagem das células do sangue de animais tratados com o extrato das cerdas da pararama

Amostras de sangue periférico (25 μ L/poço), coletadas pelo plexo retro-orbital, com auxílio de pipeta Pasteur, de camundongos após 48 h da injeção de salina ou do extrato das cerdas da pararama, foram incubadas, por 30 minutos no escuro e à temperatura ambiente, com os anticorpos monoclonais conjugados, previamente titulados, em combinações para dupla ou tripla marcação, de acordo com sua conjugação. Após a incubação, foram adicionados 200 μ L/poço de solução de lise das hemácias BD FACS™ *Lysing Solution* (BD Pharmingen, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, sendo as amostras incubadas por 10 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Após o término da incubação, as placas foram centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Os *pellets* celulares foram ressuspensos em tampão de FACS - soro albumina bovina (BSA) a 1% e azida sódica a 0,01% em PBS - (200 μ L/poço), sendo o procedimento de lavagem repetido por duas vezes. Ao término, as amostras foram ressuspensas em 400 μ L de tampão de FACS, submetidas à citometria de fluxo (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA), sendo os dados analisados pelo programa BD Cell Quest™ Pro, versão 6.0. Os resultados foram expressos como Porcentagem e Mediana da Intensidade de Fluorescência (MIF) de células positivas para o(s) marcador(es) em estudo, corrigidos para o controle de isotipo. Quando necessário para a marcação, as células foram permeabilizadas por meio da incubação com PBS contendo 0,2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), por 6 minutos e à temperatura ambiente.

Os seguintes anticorpos, obtidos da BD Biosciences ou eBioscience foram utilizados para a marcação: anti-CD3 PE-Cy5 PE (clone 17A2; IgG2b de rato; diluição 1:400), anti-CD4 FITC (clone GK1.5; IgG2b de rato; diluição 1:400), anti-CD8 PE (clone 53-6.7; IgG2a de rato; diluição 1:200), anti-CD19 FITC (clone 1D3; IgG2a de rato; diluição 1:50), anti-CD25 APC (clone PC61; IgG1 de rato; diluição 1:400), anti-CD28 PE (clone 37.51; IgG2 de hamster; diluição 1:200), anti-CD40 PE (clone 3/23; IgG2a de rato; diluição 1:133), anti-CD44 PE (clone IM7; IgG2b de rato; diluição 1:200), anti-CD80 PE (clone 16-10A1; IgG2 de hamster; diluição 1:100), anti-CD86 PE (clone GL1; IgG2a de rato; diluição 1:133), anti-CD154 PE (clone MR1; IgG3 de hamster; diluição

1:200), anti-MHC II PE (clone M5/114.15.2; IgG2b de rato; diluição 1:133), anti-Foxp3 Alexa Fluor 488 (clone MF23; IgG2b de rato; diluição 1:100), anti-CD11b FITC (clone M1/70; IgG2b de rato; diluição 1:200), anti-CD11c PE (clone HL3; IgG1 de hamster; diluição 1:200), anti-Ly6G PE (clone 1A8; IgG2a de rato; diluição 1:400) e anti-CCR3 purificado (IgG de coelho; diluição 1:100).

3.7.3 Imunofenotipagem das células do linfonodo poplíteo de animais tratados com o extrato das cerdas da pararama

Após 48 h da 1ª, 4ª e 7ª inoculações, grupos de camundongos foram eutanasiados, seus linfonodos poplíteos, da pata traseira esquerda, coletados e macerados com a finalidade de obter populações celulares em suspensão. O número total de células viáveis obtidas, para cada grupo, foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, na presença de azul de Trypan, sendo a concentração ajustada para 1×10^5 células/25 μ L de amostra, em tampão de FACS.

Em seguida, as células foram incubadas com 5% de soro normal de camundongo, por 30 minutos e a 4 °C, para bloqueio dos receptores Fc. Após o bloqueio, as mesmas foram incubadas por 1 hora a 4 °C com os anticorpos monoclonais conjugados, previamente titulados, em combinações para dupla, tripla ou quádrupla marcação, de acordo com sua conjugação. Após o término da incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Os *pellets* celulares foram ressuspensos em tampão de FACS (200 μ L/poço), sendo o procedimento de lavagem repetido por duas vezes. Ao término, as amostras foram ressuspensas em 400 μ L de tampão de FACS acrescido de paraformaldeído 1% e submetidas à citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA), sendo os dados analisados pelo programa Diva, versão 6.1.3. Os resultados foram expressos como Número Absoluto e Mediana da Intensidade de Fluorescência (MIF) das células positivas para o(s) marcador(es) em estudo, corrigidos para o controle de isotipo. Quando necessário para a marcação, as células foram permeabilizadas por meio da incubação com PBS contendo 0,2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), por 6 minutos e à temperatura ambiente.

Os seguintes anticorpos, comprados da BD Biosciences ou eBioscience foram utilizados para a marcação: anti-CD3 PE-Cy5 PE (clone 17A2; IgG2b de rato; diluição 1:400), anti-CD4 FITC

(clone GK1.5; IgG2b de rato; diluição 1:400), anti-CD8 PE (clone 53-6.7; IgG2a de rato; diluição 1:200), anti-CD19 FITC (clone 1D3; IgG2a de rato; diluição 1:50), anti-CD25 APC (clone PC61; IgG1 de rato; diluição 1:400), anti-CD28 PE (clone 37.51; IgG2 de hamster; diluição 1:200), anti-CD40 PE (clone 3/23; IgG2a de rato; diluição 1:133), anti-CD44 PE (clone IM7; IgG2b de rato; diluição 1:200), anti-CD80 PE (clone 16-10A1; IgG2 de hamster; diluição 1:100), anti-CD86 PE (clone GL1; IgG2a de rato; diluição 1:133), anti-CD154 PE (clone MR1; IgG3 de hamster; diluição 1:200), anti-MHC II PE (clone M5/114.15.2; IgG2b de rato; diluição 1:133), anti-Foxp3 Alexa Fluor 488 (clone MF23; IgG2b de rato; diluição 1:100), anti-IL-17R APC (clone PAJ-17R; IgG2a de rato; diluição 1:133) e anti-IL-17A-PE (clone 17B7; IgG2a de rato; diluição 1:100).

3.7.4 Análise histopatológica

Após a eutanásia dos animais, as patas foram removidas e imersas em solução de formaldeído a 4% por 24 horas. Posteriormente à decalcificação, os tecidos foram embebidos em parafina, seccionados e corados com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram analisadas, em microscópio de luz (Leica DM2500; Wetzlar, Alemanha), para a presença de infiltrado inflamatório.

3.7.5 Análise imunohistoquímica

As patas traseiras esquerdas foram removidas e congeladas em moldes embebidos em meio criosolidificante OCT (Tissue-Tek[®] Composto OCT, Sakura) e armazenadas a -80 °C até serem seccionadas. As secções foram feitas com espessura de 5 mm e fixadas por imersão em acetona fria (-20 °C).

Após o bloqueio da ligação inespecífica, pela incubação com tampão de bloqueio “Protein Block Serum-Free” (Dako North America, Carpinteria, Califórnia, EUA), as secções dos tecidos sobre as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em soro fetal bovino (SFB) a 2% em PBS, durante 2 horas a 37 °C, em câmara úmida. Após o bloqueio da atividade da peroxidase endógena (Dako North America, Carpinteria, Califórnia, EUA), a avidina e a biotina

endógenas foram bloqueadas com “Avidin-Biotin Blocking kit” (Biocare Medical, Concord, Califórnia, EUA), e então, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado (1:100) durante 45 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas 2x com PBS, por período de 5 minutos cada vez, e foram incubadas com “Streptavidin-Horseradish Peroxidase” (BD Biosciences) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem das lâminas, a solução substrato 3,3'-diaminobenzidina - DAB (BD Pharmingen, Califórnia, EUA) foi adicionada, e a reação foi deixada por 5 a 15 minutos ou até que a intensidade da cor desejada fosse alcançada. As lâminas foram lavadas em PBS e, finalmente, contracoradas com hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e montadas com glicerol de Kaiser em gelatina (Merck, Darmstadt, DE).

Na análise imunohistoquímica, foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD4 (IgG2a de rato; diluição 1:75), anti-CD8 (IgG2a de rato; diluição 1:75), anti-CD11b (IgG2b de rato; diluição 1:25), anti-CD11c (IgG1 hamster; diluição 1:100), anti-Ly6G (IgG2b de rato; diluição 1:50) e anti-CCR3 (IgG de coelho, diluição 1:100). Os controles isotípicos foram avaliados em paralelo (BD Pharmingen, Califórnia, EUA).

3.7.6 Marcação por imunofluorescência

As mesmas secções das patas traseiras esquerdas, como descrito em 3.7.5, foram utilizadas nas análises de imunofluorescência. Após o bloqueio da ligação inespecífica, pela incubação com tampão de bloqueio “Protein Block Serum-Free” (Dako North America, Carpinteria, CA), durante 30 minutos à temperatura ambiente, as secções dos tecidos sobre as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, diluído em BSA a 1% em PBS, durante 2 horas a 37 °C, em câmara úmida. Depois de 3 etapas de lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário diluído em BSA a 1% em PBS, durante 1 hora à temperatura ambiente no escuro. Após as etapas de lavagem adicionais, as secções foram contracoradas com o reagente “ProLong Gold antifade” contendo 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Invitrogen, Paisley, UK, P36935).

Os anticorpos primários utilizados nos ensaios de imunofluorescência foram os mesmos empregados na análise imunohistoquímica, no entanto, foram utilizados os seguintes anticorpos secundários conjugados a fluorocromo: anti-IgG de rato conjugado com TRITC (Abcam, ab6841, diluição 1:50), anti-IgG de hamster conjugado com FITC (Abcam, ab5739, diluição 1:500) e anti-IgG de coelho conjugado com FITC (Abcam, ab6717, diluição 1:500). Os controles isotípicos foram avaliados em paralelo (BD Pharmingen, Califórnia, EUA).

3.7.7 Quantificação de citocinas nas patas de animais tratados com o extrato das cerdas de P. semirufa

Após 24 horas da 1ª, 4ª e 7ª inoculações, grupos de camundongos foram eutanasiados e suas patas traseiras esquerdas coletadas e homogeneizadas para análise de citocinas.

As patas, imersas em PBS suplementado com “Complete Protease Inhibitor Cocktail Set” (Roche Diagnostics, Mannheim, DE), 1 mL/pata, foram cortadas e congeladas em gelo seco, sendo, em seguida, homogeneizadas utilizando o homogeneizador Polytron PT 10-35 (Kinematica, Luzern, Suíça), conforme descrito por Okumura (2008), com pequenas modificações. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos e a 4 °C, e os sobrenadantes foram novamente centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos e a 4 °C. Os sobrenadantes foram removidos cuidadosamente, como forma de evitar a captura da camada superior de lipídios/detritos adiposo e, imediatamente, congelados a -80 °C até a utilização.

Para a quantificação de citocinas, foram utilizados os “Kits” da BD Biosciences (BD OptEIA™ Set Mouse) e da eBioscience (ELISA Ready-SET-GO!). Para tanto, placas de ELISA (Costar®, Corning Inc., Massachusetts, EUA) foram sensibilizadas, “overnight” e a 4 °C, com 100 µL/poço do anticorpo de captura, específico para cada citocina. Após a sensibilização, as placas foram lavadas por 3 vezes e bloqueadas com PBS contendo 10% de soro fetal bovino, pH 7,0, por 1 hora e à temperatura ambiente. As placas foram, novamente, lavadas e incubadas, por 2 horas a temperatura ambiente ou “overnight” a 4 °C (dependendo do protocolo), com a curva-padrão de cada citocina e com as amostras dos homogeneizados de pata (100 µL/poço).

As placas foram lavadas e incubadas, por 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo de detecção biotinilado (100 µL/poço), previamente incubado, por 15 minutos à temperatura ambiente, com o reagente estreptavidina-HRP, para os protocolos da BD; e com o anticorpo de detecção biotinilado (100 µL/poço), para os protocolos da eBioscience. Para este último, foi realizada uma incubação adicional, de 30 minutos à temperatura ambiente, com Avidina-HRP (100 µL/poço). Após as lavagens, as placas foram incubadas com 100 µL/poço do substrato orto-dihidrocloreto de fenilediamina – OPD (Sigma, Missouri, EUA), diluído em tampão citrato/ fosfato/ H₂O₂ 0,3%, por 30 minutos e a temperatura ambiente, no escuro. A reação foi interrompida, pela adição de H₂SO₄ 4N, e as densidades ópticas determinadas por leitura espectrofotométrica (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia) em λ de 492 nm.

As amostras foram avaliadas para a presença das citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF, IFN-γ (OptEIA ELISA; BD PharMingen, California, EUA), IL-17 e IL-23 (eBioscience, California, EUA) e a concentração de cada citocina foi determinada pela construção da equação da reta da curva-padrão, colocando no eixo-x a concentração conhecida da curva e no eixo-y os valores obtidos de absorbância.

3.7.8 Quantificação de citocinas dos soros de animais tratados com o extrato

Para a quantificação de citocinas, nos soros dos animais tratados com o extrato ou com salina, foram utilizados os “Kits” da BD Biosciences (BD OptEIA™ Set Mouse) e da eBioscience (ELISA Ready-SET-GO!), como descrito em 3.7.7. Os soros, assim como os extratos das patas, foram analisados quanto a presença das citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF, IFN-γ (OptEIA ELISA; BD PharMingen, Califórnia, EUA), IL-17 e IL-23 (eBioscience, Califórnia, EUA).

3.8 Análise estatística

A análise estatística dos resultados, utilizando o software GraphPad Prism, foi realizada usando-se o teste *t* de Student pareado para comparar os valores médios obtidos com o grupo salina (controle negativo) ou veneno referência (controle positivo) e os valores médios do grupo

tratado com o extrato de *Premolis semirufa*, one-way ANOVA (pós-teste de Bonferroni) para comparar mais de dois grupos em relação a uma variável e o two-way ANOVA (pós-teste de Bonferroni) para avaliar as diferenças significativas entre os grupos com mais de uma variável. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de p foram $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização biológica e enzimática do extrato das cerdas da lagarta da *Premolis semirufa*

4.1.1 Análise eletroforética dos extratos

Amostras dos extratos de cerdas da pararama foram preparadas em PBS ou em PBS contendo CHAPS 0,1% e analisadas quanto à composição proteica em gel de SDS-PAGE, em condições redutoras e não redutoras. A Figura 1 mostra que os perfis eletroforéticos dos extratos, determinados nas duas condições experimentais, são similares, mas não idênticos, apresentando componentes com M_r variando entre 20 e 200 kDa. Não foram reveladas diferenças significativas na composição de bandas das amostras de extrato analisadas em condições redutoras e não redutoras, mas pode ser observado, nas duas preparações de extrato, a presença de uma banda proeminente com M_r ao redor de 82 kDa.

Figura 1 - Perfil eletroforético dos extratos

Amostras contendo 10 μ g dos extratos das cerdas de *P. semirufa* foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% que foi, posteriormente, corado pelo método de impregnação pela prata. [A] e [B] amostras em PBS analisadas em condições não redutoras e redutoras, respectivamente; [C] e [D] amostras em PBS-CHAPS nas mesmas condições.

4.1.2 Análise da presença de resíduos de açúcares no extrato das cerdas de *P. semirufa*

Amostras do extrato das cerdas de *P. semirufa* (10 µg) foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS-PAGE e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. A incubação das membranas com a lectina Concanavalina A revelou a presença, no extrato das cerdas da pararama, de vários componentes fortemente reconhecidos pela lectina, principalmente o componente com Mr de 82 kDa (Figura 2 - Linha 1). Quando as membranas foram incubadas com a lectina de *Triticum vulgaris* WGA, houve fraco reconhecimento/interação com os componentes, inclusive com o componente com Mr de 82 kDa (Figura 2 – Linha 2).

Figura 2 - Análise da presença de resíduos de açúcares no extrato das cerdas de *P. semirufa*

Amostras contendo 10 µg do extrato das cerdas da lagarta foram separadas eletroforéticamente em gel de 12% (SDS-PAGE) em condições redutoras. Os componentes presentes no gel foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas com as lectinas Concanavalina A (ConA) ou “Wheat Germ – Lectina de *Triticum vulgaris* (WGA), conjugadas com peroxidase, na diluição de 1:1000, durante 1 hora a temperatura ambiente. As reações foram reveladas pela adição de DAB (20 mg/mL). **[Linha 1]** amostra do extrato incubada com ConA e **[Linha 2]** amostra do extrato incubada com WGA.

4.1.3 Zimografia para análise da presença de gelatinases nos extratos de cerdas da pararama

A classe de proteases com atividade gelatinolítica, presente no extrato de cerdas da pararama, foi determinada incubando-se amostras do extrato com inibidores de metalo- ou serinoproteinases. A Figura 3 mostra que, embora a fenantrolina, inibidor de metaloproteinases, tenha reduzido em cerca de 20% a atividade gelatinolítica do extrato, como determinado pelas análises densitométricas, o uso de PMSF, inibidor de serinoproteinases, inibiu em cerca de 80% tal atividade.

Figura 3 - Análise da inibição da atividade gelatinolítica dos extratos de pararama

Amostras contendo 0,5 µg dos extratos de *P. semirufa* foram incubadas com 10 mM dos inibidores fenantrolina (**Fen**) e **PMSF**, por 30 minutos a 37 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE a 10% acrescido de 1 mg/mL de gelatina, o qual foi, posteriormente, incubado por 12 horas em tampão substrato. As zonas claras indicam atividade proteolítica.

4.1.4 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica do extrato das cerdas da lagarta de *P. semirufa* (1,0 µg) foi também testada utilizando-se substrato de fluorescência apagada. Os ensaios foram feitos em duplicata e o aumento da fluorescência foi monitorado continuamente por 15 minutos sendo a atividade proteolítica, específica dos extratos, expressa como µM de substrato clivado por minuto por micrograma de extrato.

A Figura 4 mostra que o extrato hidrolisou, eficientemente, o peptídeo Abz-FRSSRQ-EDDnp, e que esta atividade foi fortemente inibida pelo inibidor de serinoproteinase PMSF (88%) e parcialmente pelo inibidor de metaloproteinase fenantrolina (50%).

Figura 4 - Atividade proteolítica do extrato das cerdas de *P. semirufa* sobre o substrato Abz-FRSSRQ-EDDnp

Amostras do extrato de *P. semirufa* (1,0 µg), pré-incubadas ou não, por 20 minutos, com 5mM de PMSF ou 5 mM de 1,10-fenantrolina, foram incubadas, por 15 minutos, com o substrato de fluorescência apagada Abz-FRSSRQ-EDDnp (5,0 µM). A temperatura da reação foi mantida a 37 °C em compartimento termo-estabilizado, sob agitação. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média ± desvio-padrão da atividade específica em U/ µg de extrato. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$: diferenças significativas entre as médias dos valores obtidos com o extrato e as médias dos valores obtidos com os inibidores.

4.1.5 Atividade hialuronidásica

Amostras do extrato (8 µg) foram incubadas com 25 µL de substrato (ácido hialurônico 0,5 mg/mL) e tampão acetato de sódio 200 mM, por 30 minutos a 37 °C. A Figura 5 mostra que o extrato apresentou atividade hialuronidásica, entretanto, inferior à apresentada pelo veneno da serpente de *Bothrops jararaca*, utilizado como controle positivo da reação.

Figura 5 - Atividade hialuronidásica do extrato das cerdas de *P. semirufa*

Amostras de 8 µg do extrato da *P. semirufa* e do veneno de *B. jararaca* foram incubadas com o ácido hialurônico. A absorbância foi analisada em espectrofotômetro em λ de 405 nm e a atividade hialuronidásica expressa como UTR (unidade de redução de turbidez)/ mg. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas $\pm$ desvio-padrão. (***) $p < 0,0001$.

4.1.6 Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica do extrato das cerdas da lagarta da *P. semirufa* foi avaliada por método colorimétrico, incubando-se amostras de 4 ou 16 μg do extrato com uma mistura composta por 10 mM de Triton X-100, 5 mM de fosfatidilcolina, 1,5 mM de tampão HEPES, 10 mM de cloreto de cálcio, 0,9% cloreto de sódio e 0,03% azul de bromotimol. Como controle positivo, foi utilizado o veneno de *Micrurus hemprichii* (4 μg). A placa foi analisada em espectrofotômetro após 5 minutos e a atividade enzimática estimada com nmol/min/ μg do extrato da lagarta. A Figura 6 mostra que, nas condições experimentais utilizadas, o extrato não apresentou atividade fosfolipásica.

Figura 6 - Atividade fosfolipásica do extrato das cerdas de *P. semirufa*

Amostras de 4 ou 16 μg do extrato da *P. semirufa* foram incubadas, por 5 minutos e a 37 °C, com 5 mM de fosfatidilcolina. Como controle positivo de atividade fosfolipásica, foi utilizado o veneno da serpente *Micrurus hemprichii* (4 μg). Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como nmol/min/ μg de proteína. (***) $p < 0,0001$.

4.1.7 Determinação da dose letal (DL_{50})

A ação tóxica letal do extrato das cerdas da pararama foi avaliada em camundongos da linhagem BALB/c, pela inoculação, intraperitoneal, de quantidades crescentes do extrato (1,2 mg/kg, 2,3 mg/kg e 6,8 mg/kg). Após 72 horas da inoculação, todos os animais estavam vivos em todas as doses testadas.

4.2 Avaliação da atividade do extrato das cerdas de *P. semirufa* sobre elementos do sistema imune humoral

4.2.1 Atividade sobre a via alternativa do sistema complemento

Amostras de SHN foram incubadas com concentrações crescentes do extrato, 39 $\mu\text{g/mL}$, 78 $\mu\text{g/mL}$, 156 $\mu\text{g/mL}$, 312 $\mu\text{g/mL}$ e 625 $\mu\text{g/mL}$ e a atividade residual do complemento foi determinada em ensaios hemolíticos realizados em condições para avaliar a ativação da via alternativa, utilizando-se eritrócitos de coelho. A análise dos resultados mostra que houve uma significativa redução da atividade hemolítica da via alternativa nas amostras de SHN tratadas com o extrato das cerdas, sendo que a inibição ocorreu de forma dose dependente (Figuras 7A e B).

Figura 7 - Atividade do extrato de *P. semirufa* sobre a Via Alternativa do Complemento

Amostras de 100 μL de soro humano normal (SHN) foram incubadas com 100 μL de tampão PBS ou das amostras do extrato de *P. semirufa* (39 $\mu\text{g/mL}$, 78 $\mu\text{g/mL}$, 156 $\mu\text{g/mL}$, 312 $\mu\text{g/mL}$ e 625 $\mu\text{g/mL}$) a 37 °C por 30 minutos. A atividade residual do complemento, nos soros tratados ou não com o extrato, foi testada em ensaio hemolítico, como descrito em 3.6.1.4. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas $\pm$ desvio-padrão das porcentagens de hemólise e da redução dos valores de AP_{50} . (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,0001$, em **[A]**, quando as porcentagens de hemólise obtidas das amostras de SHN tratadas com o extrato foram comparadas às do soro tratado com PBS e em **[B]**, quando as porcentagens de redução obtidas pelas diferentes concentrações do extrato são comparadas com as obtidas com a menor concentração utilizada (39 $\mu\text{g/mL}$).

4.2.2 Atividade sobre a via das lectinas do sistema complemento

Amostras de SHN foram incubadas, na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina, com 312 µg/mL do extrato e a atividade residual do complemento foi determinada utilizando-se placas sensibilizadas com 100 µg/mL de manose que, em seguida, foram incubadas com anticorpo anti-C4. Como controle positivo, foram utilizadas amostras de soro incubadas com *E. coli* e como negativo, amostras de SHN inativadas por aquecimento. A Figura 8 revela uma significativa redução na deposição de C4 nas placas sensibilizadas com manose, em amostras de SHN tratadas com o extrato (31,3%). Entretanto, tal redução foi significativamente inferior àquela promovida pela incubação do SHN com *E. coli* (70,7%) ou pelo aquecimento do soro (81,5%). A fenantrolina não foi capaz de inibir, significativamente, a ação do extrato sobre a via das lectinas.

Figura 8 - Atividade do extrato de *P. semirufa* sobre a Via das Lectinas do Complemento

Amostras de 50 µL de soro humano normal (SHN) foram incubadas com 50 µL de tampão BVB⁺⁺ ou 50 µL do extrato de *P. semirufa* (312 µg/mL), na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina, a 37 °C por 30 minutos, e em seguida, diluições seriadas foram adicionadas às placas sensibilizadas com 100 µg/mL de manose e incubadas por 1 hora a 37 °C. Após, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo anti-C4 humano (1:1000), por 1 hora a 37 °C. As placas foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase (1:5000). A reação foi revelada por OPD e H₂O₂ e a leitura feita em λ de 492 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas ± desvio-padrão. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,0001$, quando o SHN incubado com tampão foi comparado com os tratamentos e quando os tratamentos foram comparados entre si.

4.2.3 Atividade sobre a via clássica do sistema complemento

Com o objetivo de avaliar se o extrato das cerdas da pararama exerce influência sobre a atividade lítica do complemento, mediada pela Via Clássica, amostras de SHN foram incubadas com duas concentrações do extrato: 312 $\mu\text{g/mL}$ ou 625 $\mu\text{g/mL}$. A atividade residual do complemento foi determinada em ensaio hemolítico, realizado em condições para avaliar a ativação da via clássica, utilizando-se eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpo. A Figura 9 mostra que o extrato, nas concentrações e condições utilizadas, não reduziu significativamente a atividade hemolítica da via clássica do complemento.

Figura 9 - Atividade do extrato de *P. semirufa* sobre a Via Clássica do Complemento

Amostras de 100 μL de soro humano normal (SHN) foram incubadas com 100 μL de tampão PBS ou com 100 μL do extrato de *P. semirufa* (312 $\mu\text{g/mL}$ ou 625 $\mu\text{g/mL}$), a 37 °C por 1 hora. A atividade residual do complemento, nos soros tratados ou não com o extrato, foi testada em ensaio hemolítico, como descrito em 3.6.1.6. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas $\pm$ desvio-padrão das porcentagens de hemólise.

4.2.4 Análise da geração de anafilatoxinas em soro humano tratado com o extrato das cerdas de *P. semirufa*

Com a finalidade de determinar se o extrato das cerdas da lagarta era capaz de induzir a geração de anafilatoxinas, amostras de soro humano normal foram incubadas com o extrato das cerdas, na presença ou ausência de fenantrolina. A quantificação de C3a/C3a desArg, C4a/C4a desArg e C5a/C5a desArg presentes nas amostras, foi realizada com o kit *Human Anaphylatoxin Cytometric Bead Array* (CBA). A Figura 10 mostra que o extrato das cerdas de *P. semirufa* promoveu um aumento significativo na geração de anafilatoxinas C3a/C3a desArg, C4a/C4a desArg e C5a/C5a desArg no soro humano. No entanto, quando fenantrolina foi utilizada na reação, houve aumento na geração de C4a/C4a desArg e redução na de C5a/C5a desArg. O uso de fenantrolina não alterou significativamente a geração de C3a/C3a desArg nas amostras de soro tratadas com o extrato.

Figura 10 - Determinação da geração de anafilatoxinas em SHN tratado com o extrato das cerdas de *P. semirufa*

Amostras de 50 μ L de soro humano normal (**SHN**) foram incubadas com 50 μ L (312 μ g/mL) do extrato das cerdas da lagarta a 37 °C por 30 minutos, na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina (**fen**). A quantificação das anafilatoxinas foi realizada utilizando-se o kit *Human Anaphylatoxin Cytometric Bead Array* (CBA), sendo a aquisição das amostras realizada em citômetro de fluxo. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas $\pm$ desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$, quando o SHN incubado com tampão foi comparado com os tratamentos e quando os tratamentos foram comparados entre si.

4.2.5 Ação do extrato de cerdas sobre os componentes do sistema complemento

A capacidade do extrato de cerdas da pararama de clivar os componentes C3, C4 e C5 foi determinada pela incubação de amostras do extrato de cerdas de *P. semirufa* com os componentes purificados, na presença ou ausência de inibidores de proteases. As reações foram avaliadas por eletroforese. A Figura 11 mostra que o extrato foi capaz de promover a hidrólise da cadeia α dos três componentes e que a presença de PMSF na reação reduziu, significativamente, apenas a clivagem do componente C4. Além disso, na Figura 11A, observa-se que a presença de fenantrolina na incubação promoveu aumento significativo na hidrólise do componente C3, enquanto na Figura 11C, observa-se que PMSF causou tal efeito sobre C5.

Figura 11 - Atividade proteolítica do extrato das cerdas sobre C3, C4 e C5

Amostras de 3 μ g de C3 [A], C4 [B] e C5 [C] foram incubadas, na presença ou ausência dos inibidores fenantrolina (Fen) e PMSF, com 2 ou 3 μ g do extrato, por 1 hora a 37 °C. O perfil de hidrólise foi visualizado por gel de SDS-PAGE. Cadeias do C3: α (110 kDa) e β (75 kDa), do C4: α (97 kDa), β (75 kDa) e γ (33 kDa) e do C5: α (115 kDa) e β (75 kDa).

4.2.6 Cromatografia em coluna de gel filtração do extrato das cerdas de *Premolis semirufa*

Com o objetivo de isolar os componentes com ação sobre o Sistema complemento, amostras do extrato das cerdas de pararama foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300GL. A Figura 12 mostra o perfil cromatográfico de amostras do extrato, tendo sido coletadas 13 frações.

Figura 12 - Cromatografia de exclusão molecular do extrato de cerdas da *Premolis semirufa*

Perfil cromatográfico do extrato fracionado em coluna de exclusão molecular Superdex-200 10/300GL em sistema FPLC, utilizando o tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M, pH 7,4.

As frações foram avaliadas quanto à habilidade de clivar o componente C3 do Sistema Complemento, como descrito em 3.6.2.1.3. Como não foi possível detectar, pela dosagem por BCA, o conteúdo proteico de cada fração, realizou-se a reação de hidrólise utilizando 2 µg de C3 humano, 2 µg do extrato total das cerdas da *Premolis semirufa* (controle positivo) e aproximadamente 10 µL de cada fração. A Figura 13 mostra que, além do extrato das cerdas, somente as frações 7 e 10 foram capazes de promover hidrólise do componente C3.

Figura 13 - Atividade proteolítica das frações do extrato das cerdas sobre o componente C3

Amostras de 2 µg de C3 foram incubadas com 2 µg do extrato ou 10 µL das frações, por 1 hora a 37 °C. O perfil de hidrólise foi visualizado em Gel SDS-PAGE (10%), em condições redutoras, corado pelo método de impregnação pela prata.

Cadeias do C3: α (110 kDa) e β (75 kDa).

4.2.6.1 Análise eletroforética das frações ativas do extrato sobre C3

Como as frações apresentavam-se muito diluídas, 100 µL das duas frações ativas, 7 e 10, foram concentradas, ressuspensas em 30 µL de salina e avaliadas eletroforeticamente. A fração 7 apresentou, além de outras bandas, o componente de aproximadamente 82 kDa (dado não mostrado); por outro lado, a fração 10 apresentou somente o componente de 82 kDa (Figura 14). Sabendo-se que as duas frações apresentaram atividade sobre C3, a fração 10 foi escolhida para realização dos ensaios posteriores. Dessa forma, a partir deste momento, passamos a denominá-la de Ps82.

Figura 14 - Perfil eletroforético da Ps82

Amostras contendo 10 µg do extrato das cerdas de *P. semirufa* e 100 µL da Ps82 foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, em condições redutoras, que foi, posteriormente, corado pelo método de impregnação pela prata. A seta aponta para a fração purificada, de massa relativa de aproximadamente 82 kDa.

4.2.6.2 Atividade gelatinolítica da Ps82

Uma vez que a avaliação do extrato total das cerdas de *Premolis semirufa*, tanto na atividade gelatinolítica, quanto sobre substrato de fluorescência apagada, mostrou forte atividade de serinoproteinase, a classe de protease da Ps82 foi analisada por zimografia. Dessa forma, amostras de 0,5 µg do extrato ou 0,05 µg da Ps82 (estimada pelo método de Micro Lowry) foram incubadas na presença ou ausência de inibidores de metalo- ou serinoproteinases. Como mostrado na Figura 15 linha 6, a atividade gelatinolítica da Ps82 foi completamente inibida pelo inibidor de serinoproteinase (PMSF). Por outro lado, tal atividade não sofreu influência do inibidor de metaloproteinase – fenantrolina (linha 5).

Figura 15 - Análise da atividade gelatinolítica da Ps82

Amostras contendo 0,05 µg da Ps82 (**linha 4**) foram incubadas na presença ou ausência de 10 mM dos inibidores fenantrolina (**linha 5**) ou PMSF (**linha 6**), por 30 minutos a 37 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE a 10% acrescido de 1 mg/mL de gelatina, o qual foi, posteriormente, incubado por 15 horas em tampão substrato. As zonas claras indicam atividade proteolítica. Como controle positivo, utilizaram-se amostras de 0,5 µg do extrato das cerdas de *P. semirufa* (**linha 1**) que foram incubadas na presença ou ausência de 10 mM dos inibidores fenantrolina (**linha 2**) ou PMSF (**linha 3**), por 30 minutos a 37 °C.

4.2.6.3 Atividade da Ps82 sobre a via alternativa do sistema complemento

Amostras de SHN foram tratadas com o extrato (175 µg/mL) (controle) ou com a Ps82 (0,25 µg/mL) e incubadas, a 37 °C por 30 minutos. A atividade residual do complemento foi determinada em ensaios hemolíticos realizados em condições para avaliar a ativação da via alternativa, utilizando-se eritrócitos de coelho. A análise dos resultados mostra que a Ps82, em concentração menor que a do extrato, promoveu maior redução da atividade hemolítica da via alternativa (Figura 16).

Figura 16 - Atividade da Ps82 sobre a Via Alternativa do Complemento

Amostras de soro humano normal (SHN) foram incubadas com tampão PBS ou com a Ps82 (0,25 µg/mL), a 37 °C por 30 minutos. A atividade residual do complemento foi testada em ensaios hemolíticos, como descrito em 3.6.1.4. Como controle, utilizou-se 175 µg/mL do extrato das cerdas de *P. semirufa*. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas ± desvio-padrão das porcentagens de hemólise.

4.2.6.4 Atividade da Ps82 sobre a via das lectinas do sistema complemento

Amostras de SHN foram incubadas, na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina, com a Ps82 (0,5 µg/mL) ou extrato (175 µg/mL) (controle), a 37 °C por 30 minutos, e a atividade residual do complemento foi determinada utilizando-se placas sensibilizadas com manose que, em seguida, foram incubadas com anticorpo anti-C4. A Figura 17 revela que, em concentração menor que a do extrato, a Ps82 foi capaz de promover maior redução na deposição de C4. A utilização da fenantrolina não foi capaz de interferir, significativamente, no efeito da Ps82.

Figura 17 - Atividade da Ps82 sobre a Via das Lectinas do Complemento

Amostras de soro humano normal (SHN) foram incubadas com tampão BVB⁺⁺ ou com a Ps82 (0,5 µg/mL), na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina, a 37 °C por 30 minutos, e em seguida, diluições seriadas foram adicionadas às placas sensibilizadas com 100 µg/mL de manose e incubadas por 1 hora a 37 °C. Após, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo anti-C4 humano (1:500), por 1 hora a 37 °C. As placas foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase (1:5000). A reação foi revelada por OPD e H₂O₂ e a leitura feita em λ de 492 nm. Como controle, utilizou-se 175 µg/mL do extrato das cerdas de *P. semirufa*. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas ± desvio-padrão. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,0001$, quando o SHN incubado com tampão foi comparado com os tratamentos e quando os tratamentos foram comparados entre si.

4.2.6.5 Ação da Ps82 sobre a via clássica do sistema complemento

Amostras de SHN foram tratadas com o extrato (175 µg/mL) (controle) ou com a Ps82 (0,5, 0,37 ou 0,25 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 1 hora. A atividade residual do complemento foi determinada em ensaio hemolítico, realizado em condições para avaliar a ativação da via clássica, utilizando-se eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpo. A Figura 18 mostra que, diferentemente do extrato, a Ps82 foi capaz de interferir com a atividade hemolítica da via clássica do complemento.

Figura 18 - Atividade da Ps82 sobre a Via Clássica do Complemento

Amostras de soro humano normal (SHN) foram incubadas com tampão PBS ou com a Ps82 (0,25 µg/mL, 0,37 µg/mL ou 0,5 µg/mL), a 37 °C por 1 hora. A atividade residual do complemento, nos soros tratados ou não, foi testada em ensaio hemolítico, como descrito em 3.6.1.6. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas ± desvio-padrão das porcentagens de hemólise. Como controle, utilizou-se 175 µg/mL do extrato das cerdas de *P. semirufa*.

4.2.6.6 Via clássica determinada por ELISA

Com a finalidade de entender o efeito da Ps82 sobre a Via Clássica, uma vez que o extrato total não interferiu na atividade hemolítica, as amostras de SHN, incubadas com a Ps82 ou o extrato, foram avaliadas pela deposição do componente C4 em placas sensibilizadas com 2 µg/mL de IgM humana, em condições para desenvolvimento da Via clássica. A Figura 19 revela uma significativa redução na deposição de C4, em amostras de SHN tratadas com a Ps82.

Figura 19 - Atividade da Ps82 sobre a deposição de C4

Amostras de soro humano normal (SHN) foram incubadas com tampão PBS ou com a Ps82 (0,25 µg/mL ou 0,5 µg/mL), a 37 °C por 1 hora. Em seguida, diluições seriadas foram adicionadas às placas sensibilizadas com 2 µg/mL de IgM humana e incubadas por 1 hora a 37 °C. Após, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo anti-C4 humano (1:1000), por 1 hora a 37 °C. As placas foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase (1:5000). A reação foi revelada por OPD e H₂O₂ e a leitura feita em λ de 492 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas ± desvio-padrão. Como controle, utilizou-se 175 µg/mL do extrato das cerdas de *P. semirufa*. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$, quando o SHN incubado com tampão foi comparado com os tratamentos e quando os tratamentos foram comparados entre si.

4.2.6.7 Avaliação da produção de anafilatoxinas em soros humanos tratados com a Ps82

Amostras de SHN foram incubadas, na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina, com 0,25 µg/mL da Ps82 ou 175 µg/mL do extrato das cerdas da *P. semirufa*. A quantificação de C3a/C3a desArg, C4a/C4a desArg e C5a/C5a desArg presentes nas amostras, foi realizada com os kits de Elisa (BD OptEIA™). A Figura 20 mostra que, igualmente ao extrato total, a Ps82 induziu aumento significativo da geração de C3a e C4a no soro humano. No entanto, ao contrário do extrato, a Ps82 não promoveu aumento na geração de C5a. Quando a fenantrolina foi acrescentada à reação, não houve interferência, significativa, na geração das anafilatoxinas.

Figura 20 - Determinação da geração de anafilatoxinas em SHN tratado com a Ps82

Amostras de SHN foram incubadas com a Ps82 (0,3 µg/mL) ou o extrato (175 µg/mL), a 37 °C por 30 minutos, na presença ou ausência de 10 mM de fenantrolina (**Fen**). A quantificação das anafilatoxinas foi realizada utilizando-se os kits de Elisa (BD OptEIA™). Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas ± desvio-padrão. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$, quando o SHN incubado com tampão foi comparado com os tratamentos e quando os tratamentos foram comparados entre si.

4.2.6.8 Análise da atividade da Ps82 sobre C3, C4 e C5

Amostras de 3 µg de C3, C4 e C5 humanos foram incubadas, na presença ou ausência dos inibidores fenantrolina e PMSF, com 0,1 µg de Ps82, por 1 hora a 37 °C. As reações foram avaliadas por eletroforese. A Figura 21 mostra que, assim como o extrato das cerdas da pararama, a Ps82 foi capaz de promover a hidrólise da cadeia α dos componentes C3, C4 e C5. Além disso, a presença de PMSF na reação, mas não de fenantrolina, induziu uma redução significativa da clivagem dos componentes. A cadeia β, novamente, não sofreu interferência pelas incubações.

Figura 21 - Atividade proteolítica da Ps82 sobre C3, C4 e C5

Amostras de 3 µg de C3 [A], C4 [B] e C5 [C] foram incubadas, na presença ou ausência de 10 mM dos inibidores PMSF e fenantrolina (Fen), com 0,1 µg de Ps82, por 1 hora a 37 °C. O perfil de hidrólise foi visualizado por gel de SDS-PAGE. Cadeias do C3: α (110 kDa) e β (75 kDa), do C4: α (97 kDa), β (75 kDa) e γ (33 kDa) e do C5: α (115 kDa) e β (75 kDa).

4.2.6.9 Avaliação da produção de C5a/C5a desArg em amostras de C5 humano tratadas com a Ps82

Amostras de 3 µg de C5 humano foram incubadas, na presença ou ausência de 10 mM de PMSF, com 0,1 µg de Ps82 ou 3,0 µg do extrato das cerdas da *P. semirufa* (controle positivo). A quantificação de C5a/C5a desArg presentes nas amostras, foi realizada com o kit de Elisa (BD OptEIA™). Como demonstrado na Figura 22, tal como o extrato total, a Ps82 também induziu aumento significativo da geração de C5a. Quando PMSF foi acrescentado à reação, houve significativa redução desta clivagem.

Figura 22 – Determinação da geração de C5a pela Ps82

Amostras de 3 µg de C5 foram incubadas, na presença ou ausência de 10 mM de PMSF, com 0,1 µg de Ps82, a 37 °C por 30 minutos. A quantificação da anafilatoxina C5a foi realizada utilizando-se o kit de Elisa (BD OptEIA™). Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média das duplicatas ± desvio-padrão. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$, quando o componente C5 incubado com tampão foi comparado com os tratamentos e quando os tratamentos foram comparados entre si.

4.2.7 Imunogenicidade e caracterização imunoquímica do extrato das cerdas da pararama

4.2.7.1 Determinação dos títulos de anticorpos

A imunogenicidade do extrato das cerdas da *P. semirufa* foi avaliada por ELISA, utilizando-se soros obtidos de camundongos da linhagem H_{III} inoculados com o extrato. Os títulos de anticorpos foram estabelecidos como a maior diluição dos soros experimentais, cujas D.O.s fossem cinco vezes superiores às obtidas para o soro normal na mesma diluição. A Figura 23 mostra a variação dos títulos de anticorpos ao longo das três imunizações, sendo aqueles obtidos após a 2ª e 3ª imunização, significativamente, maiores do que os da 1ª imunização. O maior título foi determinado para soros coletados após 10 dias da segunda imunização, diminuindo, discretamente, até a última sangria.

Figura 23 - Determinação dos títulos de anticorpos antiextrato de *P. semirufa*

Amostras contendo 10 µg/mL dos extratos foram utilizadas para sensibilizar placas de ELISA (100 µL/poço) que foram, posteriormente, incubadas com diluições crescentes dos soros experimentais, obtidos dos animais imunizados ou não, e em seguida, com conjugado específico diluído 1:30.000. A reação foi revelada por OPD e H₂O₂ e a leitura feita em λ de 492 nm. As setas indicam as três imunizações realizadas em camundongos da linhagem H_{III} e os dias das sangrias contadas a partir da primeira imunização. (*) $p < 0,05$ quando comparados aos títulos da primeira imunização.

4.2.7.2 Avaliação do reconhecimento dos soros antiextrato de pararama por *western blot*

Amostras dos extratos obtidas em PBS contendo CHAPS 0,1% foram separadas eletroforéticamente (SDS-PAGE), em condições não redutoras, e os componentes presentes no gel foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose, as quais foram incubadas com os soros, normal ou experimental (*pool* do soro de animais obtidos após sete dias da 3ª imunização), diluídos 1:10.000. A Figura 24 mostra que componentes com Mr superior a 82 kDa foram reconhecidos pelo soro dos animais normais e imunizados, embora com intensidades distintas. Além desses componentes, o soro dos animais imunizados reconheceu, embora fracamente, componentes com Mr inferior a 64 kDa.

Figura 24 - *Western blot*

Amostras contendo 10 µg do extrato das cerdas da lagarta foram separadas eletroforéticamente em gel de 12% (SDS-PAGE) em condições não redutoras. Os componentes presentes no gel foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose que foram incubadas com os soros, normal ou experimental, na diluição de 1:10.000. As membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário específico (1:7.500), marcado com fosfatase alcalina, sendo a reação revelada pela adição de NBT e BCIP. **(A)** Amostra incubada com o soro normal e **(B)** amostra incubada com o soro experimental.

4.2.8 Estabelecimento de modelo experimental para o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na pararamose

4.2.8.1 Quantificação dos isotipos de anticorpos nos soros de animais tratados com o extrato das cerdas de *P. semirufa*

A imunogenicidade do extrato das cerdas de *Premolis semirufa*, bem como as classes e subclasses de anticorpos presentes nos soros, foram avaliadas por Elisa, utilizando os soros de camundongos BALB/c inoculados com 10 µg do extrato ou salina. A Figura 25A mostra que, inoculações repetidas do extrato, mas não de salina, induziram alta resposta de anticorpos IgG. Além disso, foram detectados títulos significativos de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM nos soros dos animais envenenados, mas não nos de camundongos injetados com salina. Os títulos de IgG1, nos soros de animais inoculados com o extrato, foram os mais significativos, sendo que anticorpos IgG3 não foram detectados nessas amostras (Figura 25B).

Figura 25 - Imunogenicidade do extrato das cerdas de *P. semirufa*

(A) Amostras contendo 10 µg/mL dos extratos foram utilizadas para sensibilizar placas de ELISA (100 µL/poço) que foram, posteriormente, incubadas com diluições crescentes dos soros de camundongos inoculados com 10 µg do extrato ou salina, por uma, quatro ou sete vezes, e em seguida, com anti-IgG total conjugado com peroxidase (1:30.000). Os resultados foram expressos como as médias dos valores de absorbância $\pm$ desvio-padrão. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,0001$ quando os valores das absorbâncias, obtidos com as inoculações do extrato ou salina, são comparados aos do soro pré-imune. **(B)** Determinação dos títulos de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM nos soros coletados de camundongos inoculados com extrato ou salina. Os títulos foram estabelecidos como a maior diluição dos soros cujas absorbâncias fossem duas vezes superiores às obtidas para o soro normal na mesma diluição. (***) $p < 0,0001$ quando os títulos obtidos para IgG total são comparados aos dos outros anticorpos.

4.2.8.2 Detecção de anticorpos anti-DNA ou anti-colágeno tipo II

A presença de autoanticorpos IgM e IgG anti-DNA ou anti-Colágeno tipo II, nos soros dos camundongos BALB/c inoculados com o extrato ou salina, foi também avaliada por Elisa. A Figura 26 mostra que anticorpos da classe IgG anti-DNA ou anti-Colágeno tipo II não foram detectados nos soros de camundongos inoculados com o extrato, enquanto altos títulos destes anticorpos foram detectados nos soros de camundongos com doença autoimune, *i.e.*, o Lúpus Eritematoso Sistêmico. Anticorpos da classe IgM, anti-DNA ou anti-Colágeno tipo II, não foram detectados tanto nos camundongos injetados com o extrato das cerdas, quanto nos camundongos com Lúpus Eritematoso Sistêmico (dados não mostrados).

Figura 26 - Análise da presença de autoanticorpos da classe IgG anti-DNA ou anti-Colágeno tipo II

(A) Placas de Elisa foram sensibilizadas com DNA nativo de esperma de salmão (1 $\mu\text{g/poço}$) ou **(B)** colágeno bovino (3 $\mu\text{g/poço}$) e, posteriormente, incubadas com diluições crescentes dos soros de camundongos inoculados, por sete vezes, com 10 μg do extrato ou salina e, em seguida com anti-IgG total conjugado com peroxidase (1:30.000). Os soros dos camundongos com Lúpus Eritematoso Sistêmico foram usados como controle positivo. Os resultados foram expressos como as médias dos valores de absorbância $\pm$ desvio-padrão. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,0001$ quando os valores das absorbâncias, obtidos com as inoculações do extrato ou salina, são comparados aos do soro controle positivo.

4.3 Avaliação da atividade do extrato das cerdas de *P. semirufa* sobre elementos da resposta imune celular

4.3.1 Análise da atividade edematogênica do extrato de cerdas da pararama

A injeção intraplantar do extrato de cerdas da lagarta de *Premolis semirufa* (10,0 µg/pata) causou desconforto aos animais (dor) e induziu aumento significativo, em todas as inoculações, no volume da pata quando comparado àquele causado pela injeção do veículo, ou seja, a salina (Figura 27A e B). O edema, induzido tanto pelo extrato quanto pela salina, foi detectado já aos 5 minutos pós-injeção e teve o seu pico aos 30 minutos. O aumento do volume da pata, para a maioria das inoculações, foi observado até 300 minutos após a injeção do extrato, sendo o incremento induzido pelo veículo resolvido já aos 120 minutos após a injeção. A comparação das respostas edematogênicas, ao longo das sete inoculações do extrato ou da salina, determinada no pico de reação, ou seja, aos 30 minutos é mostrada na Figura 26C. As respostas edematogênicas foram significativas e, sucessivamente, mais intensas após as inoculações do extrato comparadas à salina, e alcançou um pico máximo após a 4ª inoculação.

Figura 27 - Ação edematogênica do extrato de cerdas de *Premolis semirufa*

Amostras do extrato de cerdas da pararama (10 µg em 0,05 mL de salina) foram administradas na região plantar das patas de camundongos. O edema foi determinado, em todas as inoculações, pela medida da espessura das patas nos tempos 0 (antes da injeção), 30, 60, 120, 180 e 300 minutos após administração do extrato [B] ou salina [A]. Em [C], a comparação das respostas edematogênicas após 30 minutos das inoculações da salina ou do extrato, durante as sete injeções. O edema (E) foi calculado pela fórmula: $E [\%] = [(E_s - E_0)/E_0] \times 100$, onde E_s é a espessura (mm) da pata no tempo "t" após a inoculação do extrato ou salina e E_0 é a espessura da pata antes da inoculação. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$: quando os valores das médias dos grupos tratados com tampão são comparados aos valores obtidos para os grupos inoculados com o extrato de *P. semirufa*.

4.3.2 Imunofenotipagem das células do sangue de animais tratados com o extrato da pararama

Ao longo dos três meses de experimento, com inoculações do extrato das cerdas da pararama e de salina a cada 15 dias, foi realizada a imunofenotipagem das células do sangue periférico, 48 horas após a 1ª, 3ª, 5ª e 7ª inoculações, sendo um grupo controle e outro experimental eutanasiado e analisado a cada vez.

Para a realização das análises, a população de interesse foi demarcada em janelas e avaliada com respeito à expressão dos marcadores, da seguinte maneira:

A inoculação do extrato das cerdas de *Premolis semirufa* induziu diminuição na porcentagem de linfócitos TCD4 após a 1ª inoculação e aumento após a 3ª (Figura 28A), enquanto a porcentagem de linfócitos B foi diminuída após a 3ª inoculação e elevada após a 7ª (Figura 28B). Estes resultados sugerem que a ativação das células B sanguíneas pelo extrato ocorreu mais tardiamente que a de linfócitos TCD4. Não houve diferença, entre os grupos tratados e controle, na porcentagem de células TCD8 (dados não mostrados). Além da população de linfócitos, os monócitos e neutrófilos sanguíneos também foram avaliados. O extrato das cerdas de *P. semirufa* interferiu na porcentagem de monócitos CD11b⁺ em todos os períodos analisados, induzindo uma diminuição após a 1ª e 7ª inoculações, e aumento após a 3ª e 5ª (Figura 28C). Não houve diferença na porcentagem de neutrófilos e eosinófilos circulantes, quando comparada ao grupo controle (dados não mostrados).

O estado de ativação dos leucócitos sanguíneos foi avaliado pela expressão das moléculas de ativação em linfócitos TCD4, B e monócitos. A análise da expressão de CD44 em

linfócitos TCD4 do sangue mostrou ativação destes por ação do extrato de *P. semirufa*, como revelado pelo aumento na porcentagem destas células, positivas para CD44, após a 5ª inoculação, quando comparada ao grupo controle (Figura 29A), bem como maior expressão (MIF) desta molécula após a 1ª e 3ª injeções (Figura 29B). Nenhuma diferença foi verificada, entre os grupos tratados e controle, para a expressão de CD28 e CD154 pelos linfócitos TCD4 sanguíneos (dados não mostrados). Os linfócitos B do sangue também foram ativados pelo extrato de *P. semirufa*, com um significativo aumento na porcentagem destas células positivas para CD40, após a 3ª inoculação (Figura 30A), bem como para CD80 e MHC de classe II, após a 1ª (Figura 30B e C). O extrato também ativou a população de monócitos, aumentando a porcentagem de células positivas para CD86, após a 3ª inoculação (Figura 30D), para CD80, após a 5ª (Figura 30E), e para MHC II, após a 1ª (Figura 30F), embora tenha ocorrido diminuição de células CD86⁺ após a 7ª inoculação (Figura 30D). Nenhuma diferença foi observada, nos níveis de expressão (MIF) destas moléculas coestimuladoras, pelos linfócitos B e monócitos do sangue (dados não mostrados).

Figura 28 - Determinação das porcentagens de leucócitos no sangue periférico de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de *Premolis semirufa*

Camundongos BALB/c foram injetados, a cada 15 dias, com 10 µg do extrato das cerdas (■) em 0,05 mL de salina apirogênica ou somente salina (□), no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Após 48 horas de cada inoculação (1^a, 3^a, 5^a e 7^a), todos os camundongos foram eutanasiados e amostras de sangue periférico coletadas e processadas para análise por citometria de fluxo. Porcentagem de **(A)** Linfócitos TCD4, **(B)** Linfócitos B e **(C)** Células CD11b. Todos os gráficos mostram a Média das duplicatas ± desvio-padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$: diferenças significativas entre os valores das médias obtidos com o grupo salina e os valores das médias do grupo *P. semirufa*. Os símbolos indicam diferenças significativas entre as inoculações: 1^a × 3^a (#), 1^a × 7^a (&), 1^a × 5^a (\$), 3^a × 5^a (α), 3^a × 7^a (β) e 5^a × 7^a (γ).

Figura 29 - Determinação das porcentagens de linfócitos TCD4⁺ CD44⁺ e expressão de CD44 no sangue periférico de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de *Premolis semirufa*

Camundongos BALB/c foram injetados, a cada 15 dias, com 10 µg do extrato das cerdas (■) em 0,05 mL de salina apirrogênica ou somente salina (□), no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Após 48 horas de cada inoculação (1ª, 3ª, 5ª e 7ª), todos os camundongos foram eutanasiados e amostras de sangue periférico coletadas e processadas para análise por citometria de fluxo. Porcentagem de **(A)** Linfócitos TCD4⁺ CD44⁺ e **(B)** Mediana da Intensidade de Fluorescência (MIF) da expressão desta molécula. Todos os gráficos mostram a Média das duplicatas ± desvio-padrão. * $p < 0,05$: diferenças significativas entre os valores das médias obtidos com o grupo salina e os valores das médias do grupo *P. semirufa*. Os símbolos indicam diferenças significativas entre as inoculações: 1ª × 3ª (#), 1ª × 7ª (&), 1ª × 5ª (\$), 3ª × 5ª (α), 3ª × 7ª (β) e 5ª × 7ª (γ).

Figura 30 - Determinação das porcentagens de linfócitos B $CD19^+CD40^+$, $CD19^+CD80^+$, $CD19^+MHC\ II^+$ e de monócitos $CD11b^+CD80^+$, $CD11b^+CD86^+$, $CD11b^+MHC\ II^+$ no sangue periférico de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de *Premolis semirufa*

Camundongos BALB/c foram injetados, a cada 15 dias, com 10 μ g do extrato das cerdas (■) em 0,05 mL de salina apirogênica ou somente salina (□), no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Após 48 horas de cada inoculação (1ª, 3ª, 5ª e 7ª), todos os camundongos foram eutanasiados e amostras de sangue periférico coletadas e processadas para análise por citometria de fluxo. Porcentagem de (A) Linfócitos B $CD19^+CD40^+$, (B) Linfócitos B $CD19^+CD80^+$, (C) Linfócitos B $CD19^+MHC\ II^+$, (D) Monócitos $CD11b^+CD86^+$, (E) Monócitos $CD11b^+CD80^+$ e (F) Monócitos $CD11b^+MHC\ II^+$. Todos os gráficos mostram a Média das duplicatas $\pm$ desvio-padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$: diferenças significativas entre os valores das médias obtidos com o grupo salina e os valores das médias do grupo *P. semirufa*. Os símbolos indicam diferenças significativas entre as inoculações: 1ª $\times$ 3ª (#), 1ª $\times$ 7ª (&), 1ª $\times$ 5ª (\$), 3ª $\times$ 5ª (α), 3ª $\times$ 7ª (β) e 5ª $\times$ 7ª (γ).

4.3.3 Imunofenotipagem das células dos linfonodos poplíteos de animais tratados com o extrato da pararama

Com o objetivo de caracterizar a resposta imune ao extrato das cerdas de *P. semirufa*, camundongos BALB/c foram subcutaneamente injetados no coxim plantar da pata traseira esquerda com o extrato das cerdas de *P. semirufa* ou salina estéril (controle), por sete vezes, a intervalos de 15 dias. Após 48 horas da 1ª, 4ª e 7ª inoculações, as células dos linfonodos poplíteos foram obtidas e analisadas por citometria de fluxo.

Nos três períodos analisados, o número total de células dos linfonodos drenantes foi significativamente maior em camundongos inoculados com o extrato, quando comparado aos animais controle (Figura 31A), o que indica a ocorrência de proliferação/migração das células imunes, e que alcançou o maior número após a 4ª inoculação (Figura 31A). Ainda, o número total dos outros leucócitos, não avaliados neste estudo, foi também, significativamente, maior em camundongos inoculados com o extrato após a 4ª e 7ª inoculações (Figura 31E).

Para determinar, neste modelo, quais populações estariam potencialmente envolvidas na resposta imune ao extrato, células dos linfonodos foram marcadas com anticorpos para a detecção de linfócitos T e B por citometria de fluxo. Os números absolutos de linfócitos TCD4, TCD8 e B foram significativamente maiores nos grupos tratados com o extrato quando comparados aos grupos controle, em todos os períodos analisados (Figura 31B a D). Interessantemente, o aumento da população de linfócitos TCD4 foi mais pronunciado do que da população de linfócitos B após a 1ª inoculação, enquanto o número de células B aumentou mais após a 4ª e 7ª inoculações (Figura 31A), indicando que as células T foram mais precocemente ativadas pelo extrato das cerdas de *P. semirufa*, enquanto a proliferação das células B ocorreu mais tardiamente.

Além disso, foi possível observar que, após a 7ª injeção, houve diminuição no número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ em ambos os grupos, quando comparado às 1ª e 4ª inoculações (Figura 31B e C). O mesmo ocorreu com as células B no grupo controle, enquanto no grupo tratado com o extrato, o número de células B, após a 7ª inoculação, foi menor que após a 4ª, entretanto,

permaneceu maior que a 1ª (Figura 31D), corroborando com a proliferação/ativação tardia de células B pelo extrato.

Similarmente ao que foi observado para os linfócitos TCD4 totais (Figura 31B), o número destas células expressando a molécula CD44 foi aumentado, nos três períodos analisados, em camundongos tratados com o extrato, quando comparado ao grupo controle (Figura 32A). Foi também possível verificar um significativo aumento no nível de expressão (MIF) desta molécula após a 4ª e 7ª inoculações nos grupos tratados com o extrato, quando comparados aos grupos controle (Figura 32B). Estes resultados indicam a ativação das células TCD4 pelo extrato das cerdas da pararama. O nível de expressão de CD28 e CD154, pelos linfócitos TCD4, foi também analisado, mas nenhuma diferença foi observada entre os grupos tratados e controle. Além disso, não foi encontrado número significativo de linfócitos TCD4 positivos para o marcador Foxp3 (Treg), em todos os períodos analisados, tanto nos grupos tratados com o extrato quanto nos grupos controle (dados não mostrados).

O estado de ativação das células B foi avaliado pela expressão das moléculas envolvidas com sua função de apresentação de antígenos para os linfócitos TCD4. O número absoluto destas células positivas para CD40 aumentou nos camundongos do grupo tratado com o extrato após a 4ª e 7ª inoculações, comparada ao grupo controle (Figura 33A), enquanto que o número de células B expressando CD80 foi elevado somente após a 4ª injeção (Figura 33B). O número de linfócitos B positivos para CD86 e MHC II aumentou em todos os períodos analisados (Figura 33C e D). Para as quatro moléculas, o maior número de células positivas foi alcançado após a 4ª inoculação do extrato das cerdas (Figura 33A a D), como observado para os linfócitos B totais (Figura 31D). Por outro lado, após a 4ª inoculação, foi possível observar uma diminuição na expressão (MIF) de CD80 e CD86 pelos linfócitos B dos camundongos tratados com o extrato (Figura 33F e G), em contraste à expressão de MHC II, na qual foi aumentada após a 4ª e 7ª inoculações (Figura 33H). Não houve diferença na expressão de CD40 por estas células (Figura 33F). Estes resultados indicam que o extrato das cerdas de *P. semirufa* foi capaz de ativar a função de célula apresentadora de antígenos dos linfócitos B, o qual ocorreu posteriormente à ativação das células TCD4.

Outro aspecto interessante da Pararamose (Periartrite falangeana por pararama) é a sua similaridade com os sinais clínicos observados na artrite reumatoide. Uma vez que a IL-17 é uma importante citocina envolvida com o desenvolvimento da artrite reumatoide, tanto em humanos quanto em modelos animais, sua função na resposta imune ao extrato da pararama foi também analisada. Dessa forma, foi determinado o número de linfócitos TCD4 produtores de IL-17 nos linfonodos poplíteos dos camundongos controle e tratados, bem como o número total de células do linfonodo positivas para esta citocina. Interessantemente, após a 4ª e 7ª inoculações, o número de linfócitos TCD4 IL-17⁺ foi, significativamente, maior nos camundongos tratados com o extrato, quando comparados aos grupos controle (Figura 34A). O mesmo foi observado quando o total de células do linfonodo foi analisado (Figura 34B). Além disso, o número de células positivas para o receptor de IL-17 (IL-17R) foi também aumentado no linfonodo do grupo tratado com o extrato, em todos os períodos analisados (Figura 34C).

Figura 31 - Determinação do número total de leucócitos nos linfonodos poplíteos de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de *Premolis semirufa*

Camundongos BALB/c foram injetados, a cada 15 dias, com 10 μ g do extrato das cerdas em 0,05 mL de salina apirrogênica ou somente salina, no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Após 48 horas de cada inoculação (1ª, 4ª e 7ª), todos os camundongos foram eutanasiados e seus linfonodos poplíteos processados para análise por citometria de fluxo. Em **(A)** número total de células, **(B)** número total de linfócitos TCD4, **(C)** número total de linfócitos TCD8, **(D)** número total de linfócitos B e **(E)** número total dos outros leucócitos não avaliados. Todos os gráficos mostram a Média das duplicatas $\pm$ desvio-padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$: diferenças significativas entre os valores das médias obtidos com o grupo salina e os valores das médias do grupo *P. semirufa*. Os símbolos indicam diferenças significativas entre as inoculações: 1ª $\times$ 4ª (#), 1ª $\times$ 7ª (&) e 4ª $\times$ 7ª (\$).

Figura 32 - Determinação do número total de linfócitos TCD4⁺CD44⁺ e expressão de CD44 nos linfonodos poplíteos de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de *Premolis semirufa*

Camundongos BALB/c foram injetados, a cada 15 dias, com 10 µg do extrato das cerdas (■) em 0,05 mL de salina apirrogênica ou somente salina (□), no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Após 48 horas de cada inoculação (1ª, 4ª e 7ª), todos os camundongos foram eutanasiados e seus linfonodos poplíteos processados para análise por citometria de fluxo. Em **(A)** número total de linfócitos TCD4⁺CD44⁺ e em **(B)** Mediana da Intensidade de fluorescência (MIF) da expressão desta molécula. Todos os gráficos mostram a Média das duplicatas ± desvio-padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$: diferenças significativas entre os valores das médias obtidos com o grupo salina e os valores das médias do grupo *P. semirufa*. Os símbolos indicam diferenças significativas entre as inoculações: 1ª × 4ª (#), 1ª × 7ª (&) e 4ª × 7ª (\$).

Figura 33 - Determinação do número total de linfócitos B $CD19^+CD40^+$, $CD19^+CD80^+$, $CD19^+CD86^+$ e $CD19^+MHC\ II^+$ e expressão destas moléculas co-estimuladoras nos linfonodos poplíteos de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de *Premolis semirufa*

Camundongos BALB/c foram injetados, a cada 15 dias, com 10 μ g do extrato das cerdas (■) em 0,05 mL de salina apirrogênica ou somente salina (□), no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Após 48 horas de cada inoculação (1ª, 4ª e 7ª), todos os camundongos foram eutanasiados e seus linfonodos poplíteos processados para análise por citometria de fluxo. Número total de (A) linfócitos B $CD19^+CD40^+$, (B) linfócitos B $CD19^+CD80^+$, (C) linfócitos B $CD19^+CD86^+$ e (D) linfócitos B $CD19^+MHC\ II^+$. A expressão destas moléculas (MIF) é mostrada nos painéis E a H. Todos os gráficos mostram a Média das duplicatas $\pm$ desvio-padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$: diferenças significativas entre os valores das médias obtidos com o grupo salina e os valores das médias do grupo *P. semirufa*. Os símbolos indicam diferenças significativas entre as inoculações: 1ª $\times$ 4ª (#), 1ª $\times$ 7ª (&) e 4ª $\times$ 7ª (\$).

Figura 34 - Determinação do número total de linfócitos T CD4⁺IL17⁺, células IL17⁺ e células IL17R⁺ nos linfonodos poplíteos de camundongos tratados ou não com o extrato das cerdas de *Premolis semirufa*

Camundongos BALB/c foram injetados, a cada 15 dias, com 10 μ g do extrato das cerdas (■) em 0,05 mL de salina apirrogênica ou somente salina (□), no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Após 48 horas de cada inoculação (1^a, 4^a e 7^a), todos os camundongos foram eutanasiados e seus linfonodos poplíteos processados para análise por citometria de fluxo. Número total de (A) linfócitos T CD4⁺IL17⁺, (B) células IL17⁺ e (D) células IL17R⁺. Todos os gráficos mostram a Média das duplicatas $\pm$ desvio-padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$: diferenças significativas entre os valores das médias obtidos com o grupo salina e os valores das médias do grupo *P. semirufa*. Os símbolos indicam diferenças significativas entre as inoculações: 1^a $\times$ 4^a (#), 1^a $\times$ 7^a (&) e 4^a $\times$ 7^a (\$).

4.3.4 Análise histopatológica

Camundongos BALB/c (n=5) foram inoculados, por sete vezes, com 10 µg do extrato de cerdas ou salina, em volume de 50 µL, no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Após 48 horas de cada uma das inoculações, os camundongos foram eutanasiados, suas patas traseiras e órgãos retirados e processados para análise histológica. As Figuras 35 e 36 mostram que as múltiplas inoculações do extrato das cerdas da *P. semirufa* induziram um acúmulo de células inflamatórias nos tecidos conjuntivo e muscular. O infiltrado era composto por neutrófilos e macrófagos, como observado nos grupos que receberam três, cinco e sete inoculações. Nos grupos controle, que receberam salina, foi também observada a presença de neutrófilos dispersos no tecido conjuntivo, porém, este infiltrado foi menor quando comparado ao dos grupos tratados nas últimas inoculações. Além disso, não foi detectada nenhuma alteração tecidual nos órgãos analisados, ou seja, fígado, pulmão, coração, rins e baço dos animais controles ou envenenados (dados não mostrados).

Figura 35 - Análise histológica das patas de camundongos 48 horas após a inoculação do extrato das cerdas de *P. semirufa*

Camundongos BALB/c foram injetados com 10 μ g do extrato ou salina, no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Este procedimento se repetiu por mais seis vezes, em intervalos de 15 dias. Após 48 horas da primeira, terceira, quinta e sétima inoculações, todos os camundongos foram eutanasiados, suas patas traseiras seccionadas, fixadas e analisadas em cortes de parafina corados com H & E. (A) Tecido conjuntivo da pata injetada com salina por uma vez, (B) aumento da região demarcada em A, (C) tecido conjuntivo da pata injetada com extrato por uma vez, (D) aumento da região demarcada em C, (E) tecido conjuntivo da pata injetada com salina por três vezes, (F) aumento da região demarcada em E, (G) tecido conjuntivo da pata injetada com extrato por três vezes, (H) aumento da região demarcada em G. Painéis A, C, E e G: aumento original de 50x; Painéis B, D, F e H: aumento original de 400x.

Figura 36 - Análise histológica das patas de camundongos 48 horas após a inoculação do extrato das cerdas de *P. semirufa*

Camundongos BALB/c foram injetados com 10 μ g do extrato ou salina, no tecido subcutâneo da região plantar da pata esquerda traseira. Este procedimento se repetiu por mais seis vezes, em intervalos de 15 dias. Após 48 horas da primeira, terceira, quinta e sétima inoculações, todos os camundongos foram eutanasiados, suas patas traseiras seccionadas, fixadas e analisadas em cortes de parafina corados com H & E. **(A)** Tecido conjuntivo da pata injetada com salina por cinco vezes, **(B)** aumento da região demarcada em A, **(C)** tecido conjuntivo da pata injetada com extrato por cinco vezes, **(D)** aumento da região demarcada em C, **(E)** tecido conjuntivo da pata injetada com salina por sete vezes, **(F)** aumento da região demarcada em E, **(G)** tecido conjuntivo da pata injetada com extrato por sete vezes, **(H)** aumento da região demarcada em G. Painéis A, C, E e G: aumento original de 50x; Painéis B, D, F e H: aumento original de 400x.

4.3.5 Análises por imunohistoquímica e imunofluorescência

Com o objetivo de obterem-se melhores informações sobre o fenótipo da resposta imune local das patas dos camundongos, subcutaneamente injetados com o extrato das cerdas de *Premolis semirufa*, analisou-se, por Imunohistoquímica e Imunofluorescência (como forma de complementar o resultado), o perfil das células que infiltraram no sítio da inoculação. Para isto, utilizaram-se anticorpos reativos aos antígenos específicos dos principais tipos celulares que poderiam participar da reação imune local, tais como CD4, CD8, CD11b, CD11c, Ly6G e CCR3. Foi detectada marcação positiva somente para Ly6G e CD11b.

Após a 1ª inoculação, não houve diferença entre as patas dos camundongos injetados com o extrato das cerdas da pararama e do grupo controle, com ausência de marcação positiva para Ly6G (Figura 37A, B e G). Por outro lado, após a 3ª, 5ª e 7ª inoculações do extrato, observamos forte marcação de células positivas para Ly6G (Figura 37E e H, e dados não mostrados), provavelmente concentradas no local de inoculação, abaixo da derme, no tecido conjuntivo, indicando que estas células migraram para o sítio da inoculação; enquanto que para o grupo controle não foi observada uma resposta significativa (Figura 37D e dados não mostrados). O grupo controle positivo, inoculado com Carragenina, também mostrou intensa marcação para Ly6G, ou seja, para a presença de neutrófilos (Figura 37F e I).

Em adição, foi detectado um pronunciado infiltrado de células positivas para CD11b em local próximo à marcação das células Ly6G (Figura 38E e H), ou seja, no sítio da inoculação, indicando a presença de infiltrado inflamatório misto, composto por neutrófilos e macrófagos. Novamente, o grupo inoculado com salina não apresentou infiltrado de células positivas para CD11b (Figura 38A e D) e o grupo controle positivo, inoculado com Carragenina, mostrou intensa marcação para a molécula em questão (Figura 38F e I).

Figura 37 - Inoculação do extrato das cerdas de *P. semirufa* induz o aparecimento de infiltrado de neutrófilos no sítio da inoculação

Camundongos BALB/c foram injetados, por sete vezes e a cada 15 dias, com 10 µg do extrato das cerdas em 0,05 mL de salina apirrogênica ou somente salina, no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Após 48 h da 1ª, 3ª, 5ª e 7ª inoculações, os camundongos foram eutanasiados e suas patas removidas e congeladas para análise por Imunohistoquímica e Imunofluorescência. As fotomicrografias são representativas das patas esquerdas dos camundongos, marcadas com Ly6G, inoculadas por uma (**A e B**) e sete (**D e E**) vezes com: salina ou extrato das cerdas de *P. semirufa*, respectivamente. Em (**C**), o controle negativo, inoculado com o extrato, marcado com o controle isotipo e em (**F**), o controle positivo injetado com Carragenina (200 µg/pata). As fotomicrografias (aumento original de 40×/10× no quadrante superior esquerdo) em **G e H** são as análises de imunofluorescência dos grupos inoculados por uma ou sete vezes, respectivamente, com o extrato de *P. semirufa*, enquanto que em **I**, está a fotomicrografia representativa do grupo inoculado com Carragenina. Os núcleos marcados com DAPI aparecem em azul, enquanto a molécula alvo aparece em vermelho/magenta. Imagens nos painéis **a** são de aumento original de 20× e as imagens nos painéis **b** são de aumento original de 40×.

Figura 38 - Inoculação do extrato das cerdas de *P. semirufa* induz o aparecimento de infiltrado de macrófagos no sítio da inoculação

Camundongos BALB/c foram injetados, por sete vezes e a cada 15 dias, com 10 μ g do extrato das cerdas em 0,05 mL de salina apirrogênica ou somente salina, no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda. Após 48 h da 1ª, 3ª, 5ª e 7ª inoculações, os camundongos foram eutanasiados e suas patas removidas e congeladas para análise por Imunohistoquímica e Imunofluorescência. As fotomicrografias são representativas das patas esquerdas dos camundongos, marcadas com CD11b, inoculadas por uma (**A e B**) e sete (**D e E**) vezes com: salina ou extrato das cerdas de *P. semirufa*, respectivamente. Em (**C**), o controle negativo, inoculado com o extrato, marcado com o controle isotipo e em (**F**), o controle positivo injetado com Carragenina (200 μ g/pata). As fotomicrografias (aumento original de 40 $\times$ /10 $\times$ no quadrante superior esquerdo) em **G e H** são as análises de imunofluorescência dos grupos inoculados por uma ou sete vezes, respectivamente, com o extrato de *P. semirufa*, enquanto que em **I**, está a fotomicrografia representativa do grupo inoculado com Carragenina. Os núcleos marcados com DAPI aparecem em azul, enquanto a molécula alvo aparece em vermelho/magenta. Imagens nos painéis **a** são de aumento original de 20 $\times$ e as imagens nos painéis **b** são de aumento original de 40 $\times$.

4.3.6 Quantificação de citocinas nas patas de animais tratados com o extrato das cerdas de *P. semirufa*

Para avaliar a reação local causada pela inoculação do extrato em camundongos BALB/c, após 24 horas da 1ª, 4ª e 7ª injeções, as patas traseiras dos animais foram coletadas e homogeneizadas para dosagem de citocinas, utilizando os “Kits” da BD Biosciences (BD OptEIA™ Set Mouse) e da eBioscience (ELISA Ready-SET-GO!).

Os resultados mostram que a 1ª inoculação do extrato promoveu elevação nos níveis das citocinas associadas à imunidade inata, tais como TNF- α e IL-6, bem como da citocina associada à proliferação de linfócitos T, a IL-2, diminuindo após a 4ª inoculação (Figura 39A e B). Consistente com o acentuado infiltrado de neutrófilos e macrófagos nas patas dos camundongos (Figuras 37 e 38E e H), o nível da citocina pró-inflamatória IL-6 aumentou após a 7ª inoculação do extrato, quando comparado ao grupo controle (Figura 39A). Interessantemente, a produção de IL-1 permaneceu inalterada pela resposta inflamatória induzida pelo extrato.

Similarmente, a produção de citocinas associadas a Th1, tais como IFN- γ e IL-12, à Th2, como IL-4, e da citocina anti-inflamatória, como IL-10, aumentou após a 1ª inoculação do extrato, quando comparado ao controle, e diminuiu após a 4ª administração. Curiosamente, os níveis das citocinas IL-12 e IL-10 aumentaram após a 7ª injeção do extrato (Figura 39C).

Por sua vez, quando as citocinas associadas a Th17, como IL-17 e IL-23, foram avaliadas, observou-se que os níveis foram, também, significativamente aumentados após a 1ª e 7ª inoculações no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle (Figura 39D).

Figura 39 - Concentração de citocinas das patas de camundongos inoculados com o extrato das cerdas de *P. semirufa*

Camundongos BALB/c foram injetados, a cada 15 dias, com 10 μ g do extrato das cerdas (■) em 0,05 mL de salina apirrogênica ou somente salina (□), no tecido subcutâneo da região plantar da pata esquerda traseira. Após 24 horas da 1ª, 4ª e 7ª inoculações, os camundongos foram eutanasiados e suas patas traseiras coletadas e processadas para análise de citocinas, por ELISA. Em (A) níveis de citocinas associadas à imunidade inata TNF- α , IL-1 e IL-6, em (B) níveis da citocina proliferativa IL-2, em (C) níveis de citocinas associadas a T_H1 como IFN- γ e IL-12, citocinas associadas a T_H2 e anti-inflamatória como IL-4 e IL-10, respectivamente e em (D) níveis de citocinas associadas a T_H17 como IL-17 e IL-23. Patas não inoculadas foram utilizadas como controle basal das citocinas (linha pontilhada). Todos os gráficos mostram a Média das duplicatas $\pm$ desvio-padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$: diferenças significativas entre os valores das médias obtidos com o grupo salina e os valores das médias do grupo *P. semirufa*. Os símbolos indicam diferenças significativas entre as inoculações: 1ª $\times$ 4ª (#), 1ª $\times$ 7ª (&) e 4ª $\times$ 7ª (\$).

4.3.7 Quantificação de citocinas dos soros de animais tratados com o extrato

A presença de citocinas como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23, TNF e IFN- γ , representativas de respostas do tipo Th1, Th2 ou Th17, nos soros de camundongos BALB/c inoculados com 10 μ g do extrato ou salina, foi analisada utilizando os “Kits” da BD Biosciences (BD OptEIA™ Set Mouse) e da eBioscience (ELISA Ready-SET-GO!). Nas condições aqui utilizadas, não foi possível detectar a presença de citocinas nos soros dos animais inoculados por sete vezes com extrato ou salina, no tecido subcutâneo da região plantar da pata traseira esquerda (dados não mostrados).

5 DISCUSSÃO

As lagartas da Ordem Lepidoptera, a segunda maior em diversidade de insetos do planeta, têm, em algumas espécies, corpo cilíndrico ornamentado, dorsolateralmente, pela presença de pelos urticantes e secreções potencialmente perigosas que podem provocar, na maioria das vezes, quadros dermatológicos de curta duração e bom prognóstico (HADDAD JR; CARDOSO, 2003) e, em alguns casos, resultar em óbitos. No entanto, o contato acidental pode provocar reação inflamatória crônica nas articulações interfalangeanas e gerar o quadro de anquilose (DIAS, 1986, 1990; DIAS; AZEVEDO, 1973, 1991).

Mesmo possuindo grande importância em saúde pública, os acidentes com lagartas têm sido subnotificados, dificultando seu dimensionamento e identificação. Dados coletados no ano de 2012, pelo Ministério da Saúde (Sinan), apontam para 3220 notificações (dados parciais) de acidentes por lagartas (BRASIL, 2013).

Embora se constituam, ainda, em tema pouco estudado, as manifestações clínicas e anatômicas da fase crônica do acidente com a *Premolis semirufa* tornam ímpar a patogenia causada por esta lagarta e reforçam a sua importância como doença ocupacional (DIAS, 1986). Assim, a caracterização das atividades biológicas e enzimáticas do extrato das cerdas da lagarta é de fundamental importância, tanto para esclarecer os mecanismos moleculares da ação dos componentes presentes nas cerdas, quanto para encontrar tratamentos mais eficazes para a doença. Com este propósito, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as características tóxicas e imunoquímicas das cerdas da *Premolis semirufa*, bem como suas propriedades pró-inflamatórias e ação sobre o Sistema Complemento.

No presente estudo foram realizados ensaios com o objetivo de encontrar proteases com atividade gelatinolítica e caracterizar a(s) classe(s) de proteases. As gelatinases são capazes de degradar, além de outros constituintes da membrana, o colágeno, também presente nos ossos e na cartilagem articular, podendo regular o seu remodelamento (REYNOLDS, 1996). Estas foram associadas à destruição tecidual em várias condições patológicas, incluindo a artrite reumatoide, e possuem a habilidade de modificar macromoléculas da matriz extracelular (HANEMAAIJER et al., 1997; KONTTINEN et al., 1998; LINDY et al., 1997), além de exercerem

função chave na destruição das estruturas articulares (AHRENS et al., 1996; KOOLWIJK et al., 1995). Níveis elevados de gelatinase de 92 kDa (MMP-9) foram detectados em pacientes com artrite reumatoide e associados à destruição da matriz extracelular da cartilagem articular, incluindo vários tipos de colágeno (HIROSE et al., 1992; YOSHIHARA; YAMADA, 2007).

Ensaios de zimografia, com o extrato preparado em PBS, revelou a presença de atividade gelatinolítica no extrato das cerdas de pararama, sendo esta bastante intensa para o componente de 82 kDa. Adicionalmente, o tratamento do extrato com inibidores revelou que a atividade gelatinolítica era dependente, principalmente, da ação de serinoproteínases, uma vez que o uso de PMSF reduziu a degradação do substrato em cerca de 80% e o uso da fenantrolina em 20%. É possível que enzimas com atividade gelatinolítica e de serinoproteínases, encontradas nos extratos da pararama, possam estar envolvidas no processo de degradação da cartilagem e do espaço articular dos tecidos afetados pelo contato com as cerdas da lagarta, levando ao desenvolvimento de fibrose, como forma de reparo tecidual, causando dor e imobilidade articular, sinais clínicos encontrados nos acidentados.

Utilizando-se substrato peptídico de fluorescência apagada, foi observada elevada atividade enzimática do extrato sobre o peptídeo Abz-FRSSRQ-EDDnp. A ação proteolítica do extrato foi altamente inibida por PMSF e, parcialmente, por fenantrolina. Estes resultados indicam a presença de mais de uma classe de proteases no extrato da *P. semirufa*, porém, com maior participação de serinoproteínases. Além disso, estes resultados estão de acordo com os obtidos nos ensaios de zimografia.

Atividade hialuronidásica está presente em muitos venenos, como os de serpentes, abelhas, aranhas, escorpiões e lagartas. Sua atividade potencializa a toxicidade do veneno promovendo perda da integridade da matriz extracelular de tecidos conjuntivos, ao redor dos vasos sanguíneos, aumentando o influxo sistêmico das toxinas (GIRISH et al., 2002; KEMPARAJU; GIRISH, 2006) e, assim, facilitando a dispersão dos constituintes do veneno.

No extrato das cerdas da *P. semirufa* encontrou-se baixa atividade hialuronidásica, inferior a 15 UTR/mg, quando comparada a do veneno controle, o da serpente *Bothrops jararaca*. Contudo, apesar da baixa atividade, é possível que esta enzima esteja participando na gênese do quadro de imobilidade articular, pois, como descrito, o ácido hialurônico é

particularmente abundante na matriz intercelular da pele, da cartilagem do tecido conjuntivo e fluido sinovial; sua habilidade de se ligar à grande quantidade de água confere especial propriedade viscoelástica, base da sua função estrutural como estabilizador e lubrificante das articulações (LAURENT, 1989; LAURENT; FRASER, 1992). A degradação do ácido hialurônico pode explicar, em parte, as alterações articulares, como perda de cartilagem e estrutura óssea, vistas na pararamose. Além disso, quando o ácido hialurônico está diminuído localmente, o metabolismo e as propriedades bioquímicas da cartilagem modificam-se; há enfraquecimento de funções como viscosidade e barreira molecular, o que torna difícil proteger proteoglicanos, proteínas extracelulares ligadas ao ácido hialurônico, que têm como função bloquear, ativar ou guiar a migração celular através da matriz e impedir a reação inflamatória (XINMIN; JIAN, 2005). É possível, portanto, que o desenvolvimento da intensa reação inflamatória local seja facilitado pelo mecanismo de perda de proteoglicanos.

As fosfolipases A₂ secretadas são importantes para a digestão e imobilização da presa, além de serem responsáveis por alguns distúrbios observados em envenenamentos humanos por abelhas, vespas, aranhas e serpentes (DENNIS, 1994; DENNIS, 1997; FRANÇA et al., 1994; MÁLAQUE et al., 2002; TISCHFIELD, 1997). Nas concentrações e metodologia usadas no presente estudo, o extrato das cerdas da *P. semirufa* não apresentou atividade fosfolipásica.

Os venenos são uma mistura de diferentes componentes com amplas funções efetoras. As proteínas tóxicas dos venenos servem para inúmeras funções adaptativas como, imobilização, paralisação, morte e liquefação da presa, além de intimidação de competidores (KARDONG, 1996). Analisando-se a ação letal de quantidades crescentes do extrato das cerdas de *P. semirufa*, injetadas intraperitonealmente em camundongos (1,2 mg/kg, 2,3 mg/kg e 6,8 mg/kg), observou-se que, diferentemente do que ocorre em animais como serpentes e escorpiões, que utilizam os venenos para facilitar a imobilização e digestão da presa, o extrato não possui ação letal, o que está de acordo com o hábito das lagartas, que se alimentam de folhas e, portanto, seus venenos são usados somente para defesa (SCHMIDT, 1982).

Além das atividades enzimáticas e tóxicas, foi também avaliada a ação do extrato das cerdas de *P. semirufa* sobre o Sistema Complemento. O sistema complemento, apesar de ser um mecanismo de proteção, pode causar dano ao próprio, se não for eficientemente regulado,

e tem sido implicado em um grande número de doenças inflamatórias e imunológicas (SAHU; LAMBRIS, 2000), incluindo a sepse (WARD, 2004), a síndrome do desconforto respiratório agudo (ROBBINS et al., 1987), a artrite reumatoide (LINTON; MORGAN, 1999), a glomerulonefrite (WELCH, 2002), a esclerose múltipla (FFRENCH-CONSTANT, 1994) e a asma (HAWLISCH et al., 2004), entre outras. A inapropriada ou excessiva ativação deste sistema pode levar a destruição tecidual (KIRSCHFINK, 1997). Deposição de componentes do complemento tem sido reportada em tecidos lesionados, como nas articulações afetadas pela artrite reumatoide (RODMAN et al., 1967) e nas lesões intestinais de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn (HALSTENSEN et al., 1989).

Os produtos da ativação do complemento, especialmente as anafilatoxinas, promovem grande número de efeitos biológicos, tais como a quimiotaxia de leucócitos, degranulação de fagócitos, mastócitos e basófilos, contração do músculo liso e aumento da permeabilidade vascular (HUGLI, 1986). Além disso, podem elicitar a síntese e/ou secreção de outros mediadores inflamatórios. C5a pode, por exemplo, amplificar a resposta inflamatória, pela indução da produção de proteína inflamatória de macrófago (MIP)-2, da quimiocina de neutrófilo induzido por citocina (CINC)-1, assim como de MIP-1 α , MIP-1 β , proteína quimioatraente para monócito (MCP-1), TNF, IL-1 e IL-6 (CZERMARK et al., 1999).

Nos experimentos aqui realizados, incubando-se SHN com duas concentrações do extrato das cerdas de *P. semirufa* e, em seguida, analisando-se a atividade residual do complemento sobre eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpo, observou-se que, nas condições e metodologia empregadas, o extrato não interferiu com a atividade da via clássica. Entretanto, nas mesmas concentrações e até em concentrações inferiores de extrato, houve redução, dose-dependente, da atividade lítica do soro sobre eritrócitos de coelho, indicando, dessa forma, que o extrato interfere na via alternativa.

Quando se analisou a ação do extrato na ativação da Via das Lectinas, observou-se, também, inibição, demonstrada pela diminuição da deposição de C4 quando SHN foi incubado com o extrato, apesar de esta redução ser significativamente inferior àquela promovida pela bactéria *E. coli*. Dessa forma, tal resultado sugere uma ativação, embora que pequena, da via das lectinas durante a pré-incubação, consumindo, portanto, o componente C4 do soro e,

consequentemente, reduzindo a sua disponibilidade para ligação à placa. Um possível mecanismo para esta ativação seria a existência de proteínas glicosiladas no extrato, capazes de ligar a MBL e desencadear a cascata de reações da via das lectinas.

Hipótese esta testada pela incubação do extrato das cerdas com as lectinas Concanavalina A e de *Triticum vulgaris*, na qual a ConA se ligou fortemente a vários componentes presentes no extrato, inclusive à banda de Mr de 82 kDa. No entanto, a lectina de *Triticum vulgaris* (WGA) não se ligou tão fortemente aos componentes do extrato. As lectinas são proteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico, o qual se liga reversivelmente a carboidratos específicos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995), enquanto a ConA reconhece α -metil manosídeo e β -glicopiranosídeo, WGA se liga a N-acetil-glicosamina. Dessa forma, este resultado indica a presença de proteínas glicosiladas no extrato das cerdas de *P. semirufa*, podendo, portanto, serem um dos fatores responsáveis pela ativação da Via das Lectinas.

O componente C3 do complemento é central para a ativação das três vias (WALPORT, 2001a, b). Ele está presente na circulação em uma concentração similar a algumas subclasses de IgG (1 a 1,2 mg/mL) (LAMBRIS, 1988) e não só exerce importante função como opsonina, como também é o elemento comum de ligação das vias clássica, alternativa e das lectinas. A deposição de C3 sobre a superfície requer a presença de uma ligação tioéster presente na cadeia alfa (TACK et al., 1980). A clivagem proteolítica da cadeia alfa de C3 gera C3a (9 kDa) (anafilatoxina) e C3b (95 kDa).

Por outro lado, o componente C4 é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 210 kDa e está presente na circulação em concentrações de cerca de 600 μ g/mL. É composto por três subunidades (α , β e γ), com pesos moleculares de 97, 75 e 33 kDa, respectivamente, ligadas entre si por pontes de dissulfeto. Das três vias de ativação do complemento, somente as vias clássica e das lectinas envolvem a participação do componente C4. A clivagem de C4, pelo complexo C1r/C1s ou pelas MASPs, resulta na formação de C4a e de C4b, sendo que este último formará a C3 convertase (LAW; DODDS, 1997).

A análise da clivagem dos componentes C3, C4 e C5 do Complemento pelo extrato das cerdas da lagarta, utilizando inibidores de metaloproteinases (fenantrolina) e de serinoproteinases (PMSF), demonstrou que o extrato foi capaz de promover hidrólise da cadeia

α dos três componentes, possivelmente gerando fragmentos ativos como C3a, C4a e C5a, e também aqueles envolvidos na formação das C3 convertases, C3b e C4b, e consequentemente ativação do Sistema Complemento. Além disso, estes resultados indicam participação de mais de uma classe de protease na clivagem dos componentes, uma vez que houve inibição significativa da hidrólise de C4, quando utilizado PMSF, enquanto que para os outros componentes, a utilização de tais inibidores acentuou tal clivagem, sugerindo, dessa forma, processo de inibição parcial entre as proteases.

Em adição, quando amostras de SHN foram incubadas com o extrato, obteve-se um significativo aumento na geração das anafilatoxinas C3a/C3a desArg, C4a/C4a desArg e C5a/C5a desArg. As anafilatoxinas são potentes mediadores inflamatórios, regulando a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (EMBER et al., 1998), promovendo a explosão respiratória de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (ELSNER et al., 1994a, b), funcionando como quimioatraentes para células inflamatórias (AKSAMIT et al., 1981; EHRENGRUBER et al., 1994; HARTMANN et al., 1997; LETT-BROWN; LEONARD, 1977; NATAF et al., 1999; OTTONELLO et al., 1999), além de regular a regeneração e fibrose tecidual (ADDIS-LIESER; KÖHL; CHIARAMONTE, 2005; HILLEBRANDT et al., 2005; MASTELLOS et al., 2001; STREY et al., 2003). Assim, é possível que estas funções estejam participando do processo inflamatório crônico e granulomatoso, com a presença de fibrose evoluindo para a anquilose óssea, observados na pararamose (DIAS, 1986; DIAS; AZEVEDO, 1973, 1991; DIAS; RODRIGUES, 1997).

Quando fenantrolina foi utilizada na reação, observou-se um significativo aumento na geração de C4a/C4a desArg e redução na de C5a/C5a desArg. Para a anafilatoxina C3a/C3a desArg, a fenantrolina não alterou, significativamente, a sua geração. Assim, tais resultados sugerem que o extrato possua metaloproteinase(s), além de serinoproteinase(s) que estão atuando diretamente sobre o C5, clivando-o e gerando C5a no soro, uma vez que a utilização de fenantrolina foi capaz de reduzir, significativamente a produção de C5a; no entanto, esta redução não foi completa. Já o componente C4 parece ser clivado por serinoproteinase(s) cuja atividade está sob uma regulação parcial de metaloproteinase(s), uma vez que a fenantrolina potencializou a geração de C4a no soro humano tratado com o extrato.

Com o objetivo de isolar a protease envolvida na ativação do sistema complemento, o extrato de cerdas da pararama foi submetido à cromatografia. Assim, foi possível o isolamento de uma fração com Mr de aproximadamente 82 kDa, denominada aqui de Ps82, que apresentou, como o extrato das cerdas, forte atividade gelatinolítica, capacidade de interferir nas Vias alternativa e das lectinas, bem como clivagem dos componentes purificados do complemento, C3, C4 e C5, sendo esta clivagem, inibida pelo PMSF. Além disso, a Ps82 foi capaz de atuar sobre a Via clássica, gerar C3a e C4a, mas não C5a em amostras de SHN. No entanto, a Ps82 foi capaz de promover a clivagem do C5 purificado e geração de C5a, indicando hidrólise funcional deste componente, o que não foi verificado quando se utilizou SHN. Considerando que a quantidade de Ps82 utilizada na reação com SHN foi proporcionalmente inferior à utilizada para clivagem da molécula de C5, é possível que a não geração de C5a no SHN seja devida a quantidade insuficiente da enzima. Além disso, no SHN existem outras moléculas para as quais a Ps82 pode ter maior afinidade/especificidade, o que pode resultar em uma menor disponibilidade da Ps82 para a clivagem de C5.

No ensaio de zimografia utilizando o extrato das cerdas da *P. semirufa* e a fração purificada, foi observado que, além de potencializar a atividade gelatinolítica do extrato, a utilização de fenantrolina na reação promoveu o aparecimento de novas bandas sugerindo a existência de metaloproteinase(s) com papel regulador sobre a atividade das serinoproteinase(s), uma vez que a utilização de PMSF bloqueou completamente a atividade. A amostra de Ps82, que em gel corado por prata, apresentou uma única banda de 82 kDa, apresentou, no ensaio de zimografia, duas bandas com forte atividade gelatinolítica, uma de ~ 82 kDa e outra de menor massa, sendo essas completamente inibidas por PMSF. Tal resultado pode talvez indicar a presença de isoforma na fração purificada.

Com a finalidade de estabelecer a condição para o desenvolvimento da pararamose, grupos de camundongos foram inoculados com o extrato de cerdas no tecido subcutâneo da região plantar da pata. Como controle, grupos de camundongos receberam salina. Inoculações subsequentes foram realizadas a cada 15 dias, e seguiram por um período de três meses. Pretendeu-se, dessa forma, analisar ao longo do tempo, a instalação da pararamose, identificar os elementos do sistema imune envolvidos e a cinética do processo.

A presença de edema após inoculação do extrato ou salina foi mensurada em todas as inoculações e esta foi sempre detectada. Além disso, foi observado que o extrato induziu, na maioria das inoculações, edema bastante intenso, que se manteve por mais de 300 minutos após inoculação. Na pata injetada somente com o veículo, a salina, o edema foi significativamente menor, sendo o incremento induzido pelo veículo resolvido já aos 120 minutos após a injeção. A indução prolongada e aumentada do edema, após a primeira exposição ao extrato, parece ser provavelmente mediada pela ação de componente(s) presente(s) no extrato, sendo esta altamente pró-inflamatória ou indutora de mediadores da inflamação, que seriam liberados ou sintetizados localmente durante o envenenamento, induzindo um aumento da permeabilidade dos microvasos. A resposta induzida 30 minutos após a injeção do extrato foi aumentando gradualmente ao longo das inoculações e alcançou um pico máximo após a terceira inoculação, sendo ela, significativamente, maior que a induzida pela salina. Uma vez que o extrato das cerdas promoveu aumento na geração das anafilatoxinas C3a e C5a e sabendo-se que as anafilatoxinas são potentes mediadores inflamatórios, induzindo o recrutamento das células, é possível que este fenômeno esteja participando do processo edematogênico promovido pelas inoculações do extrato.

Tal hipótese foi reforçada pela análise histológica das patas dos camundongos injetadas com o extrato. Nesta, foi observado que as múltiplas inoculações do extrato induziram um aumento significativo no infiltrado de neutrófilos e macrófagos, e que foi maior do que aquele observado nas patas de animais injetados com salina.

A injeção subcutânea do extrato das cerdas de *P. semirufa* causou um significativo aumento no número total de células e no número absoluto de linfócitos TCD4, TCD8 e B, presentes no *pool* de linfonodos poplíteos, obtidos dos grupos de camundongos inoculados com o extrato após 48 h da 1ª, 4ª e 7ª inoculações. Este maior número de células no grupo tratado com o extrato pode ser devido à migração e proliferação celular induzido por componentes presentes no extrato. O aumento do número absoluto de linfócitos B foi mais pronunciado que o aumento do número absoluto das outras populações de células após a 4ª e 7ª inoculações, podendo, possivelmente, indicar uma ativação e proliferação inicial de linfócitos T, sendo substituída por um posterior aumento na proliferação e ativação de células B.

Quando o perfil de ativação dos linfócitos T e B total foi avaliado, observou-se que houve, no grupo tratado com o extrato, nos três períodos analisados, um aumento no número total de linfócitos TCD4 expressando a molécula CD44. Foi também possível verificar, neste grupo, um significativo aumento no nível de expressão desta molécula após a 4ª e 7ª inoculações.

CD44, uma molécula de adesão expressa nos tecidos hematopoiético e não hematopoiético, tem sido reconhecida como um marcador de células de memória (PURÉ; CUFF, 2001) e como um importante receptor para o recrutamento de células T ativadas, por meio da interação com componentes da matriz extracelular (ARUFFO et al., 1990; JALKANEN; JALKANEN, 1992; WEBER, 1996) e com o ácido hialurônico, sendo este, induzido sobre as células endoteliais da microvasculatura ativada (BONDER, 2006).

Assim, o aumento no número de linfócitos T expressando CD44, bem como o aumento de sua expressão, indica ativação de linfócitos T pelos componentes presentes no extrato, bem como geração de células de memória, contribuindo assim, para a cronicidade da pararamose, e também para uma potente migração destas células em direção ao foco inflamatório. Sabendo-se que o ácido hialurônico é encontrado em alta quantidade no fluído articular, em pacientes com artrite reumatoide e na artrite inflamatória induzida em animais (LAURENT; FRASER, 1992), é possível que o aumento no número de células expressando CD44 indique interação destas células com os componentes presentes nas articulações.

Entre as moléculas co-estimuladoras expressas sobre a superfície das células B, CD40 é extremamente importante para auxiliar na ativação, proliferação, diferenciação, sobrevivência e geração de células de memória (MIGA et al., 2000; NERON et al., 2006). Além do mais, CD80 e CD86 exercem importante função no fornecimento da coestimulação para os linfócitos T, levando à sua proliferação, produção de citocinas, tais como a IL-2, e desenvolvimento das funções efectoras (CARRENO; COLLINS, 2002; MICHEL et al., 2001).

Em nossos experimentos foi observado, nos camundongos tratados com o extrato, um aumento no número absoluto de células B positivas para CD40 e CD80, após a 4ª e 7ª inoculações, enquanto o número destas células expressando CD86 e MHC II aumentou em todos os períodos analisados. Com base nestas observações, é possível sugerir uma retenção, no

linfonodo, de linfócitos B ativados e em proliferação, com subsequente diferenciação de células T e produção de imunoglobulinas. Além disso, houve um maior aumento no número de linfócitos B expressando a molécula CD86, quando comparado ao número de células expressando a molécula CD80, o qual pode indicar maior transferência de sinais essenciais para a expansão de células B, uma vez que foi demonstrado que CD86 proporciona sinais de expansão para as células B, enquanto CD80 transfere sinais de inibição (SUVAS et al., 2002).

A análise dos linfócitos TCD4, que expressam a molécula IL-17, mostrou que houve um aumento no número destes após a 4ª e 7ª inoculações do extrato, quando comparado ao grupo controle; entretanto, foi observada, no grupo tratado com o extrato, uma clara redução em seu número após a 7ª inoculação.

A IL-17 é uma potente citocina pró-inflamatória, produzida pelas células T (Th17) (KOLLS; LINDEN, 2004) e outros tipos celulares tais como células T $\gamma\delta$, células NK (natural killer), células NKT, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastócitos e células indutoras do tecido linfoide (CUA; TATO, 2010). Recentemente, foi demonstrado que os linfócitos Th17 estão associados a doenças autoimune em humanos e camundongos, tais como artrite reumatoide, esclerose múltipla e doença inflamatória óssea (FUJINO et al., 2003; NAKAE et al., 2003; TZARTOS et al., 2008). Assim, é possível que os linfócitos TCD4 tenham se diferenciados em linfócitos Th17, proliferado e migrado em direção ao foco inflamatório, como sugerido pela sua redução após a 7ª inoculação. O mesmo aumento ocorreu quando as células totais do linfonodo foram analisadas para esta molécula, indicando que outros tipos celulares também produziram esta potente citocina pró-inflamatória durante a progressão da doença.

O número de células positivas para o receptor da IL-17 (IL-17R) foi também aumentado, em todos os períodos analisados, nos linfonodos dos camundongos tratados com o extrato. O receptor para a IL-17 é expresso em muitos tipos celulares e a interação deste com a IL-17 resulta na expressão de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e fator estimulador de colônia (GAFFEN et al., 2006). Estas citocinas e quimiocinas induzem recrutamento de neutrófilos e outras células mieloides, característica comum a muitas doenças infecciosas (MCKENZIE; KASTELEIN; CUA, 2006). É possível que o aumento no número de células, expressando este receptor, contribua para a gênese da pararamose, uma vez que esta é altamente inflamatória.

A emigração de leucócitos circulantes para os tecidos e migração em direção a um foco de injúria é característica da resposta inflamatória. O extravasamento de leucócitos da corrente sanguínea é controlado pela expressão, na superfície celular, de moléculas de adesão, tanto nas células circulantes quanto no endotélio vascular. A análise do efeito do extrato das cerdas de *P. semirufa* sobre os leucócitos circulantes sugere, de maneira geral, que células como os linfócitos e as APCs, ativadas no órgão linfoide pelos componentes presentes no extrato, foram capazes de migrar em direção ao foco inflamatório, ou seja, a pata.

Após a 3ª, 5ª e 7ª inoculações do extrato foi observado, por métodos imunohistoquímico e de imunofluorescência, uma alta concentração de neutrófilos, possivelmente na região de inoculação do extrato, abaixo da derme, no tecido conjuntivo. Os neutrófilos são essenciais para o sistema imune inato, exercendo função chave na eliminação de patógenos invasores e promovendo o remodelamento tecidual. Por outro lado, eles podem também induzir uma persistente resposta inflamatória e lesão tecidual, o qual pode ser prejudicial ao hospedeiro (DAVEY et al., 2011; PILLAY et al., 2012; ZHANG et al., 2009). Assim, nossos resultados indicam que os componentes presentes no extrato originaram um processo inflamatório local e que estas células, os neutrófilos, migraram em direção ao foco inflamatório com o propósito de controlar, ou eliminar, os agentes causativos e promover o remodelamento tecidual. Isto é consistente com os resultados obtidos na análise histológica, na qual foi observada a presença de neutrófilos nos tecidos das patas dos camundongos injetados com o extrato.

Além do influxo de neutrófilos, o extrato de pararama induziu, após a 3ª, 5ª e 7ª inoculações, o recrutamento de monócitos para o sítio de inflamação, como demonstrado pela marcação positiva para CD11b, também conhecido, quando unido ao CD18, como receptor 3 do complemento (CR3). No sítio inflamatório, os macrófagos poderiam manter a resposta inflamatória com a produção de citocinas, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6 (KIENER et al., 1995), as quais protegem os monócitos da apoptose (MANGAN; WELCH; WAHL, 1991). Desse modo, os monócitos, recrutados para o sítio inflamatório, estariam recebendo estímulos para sobrevivência, por meio da ativação.

A ausência de linfócitos nas patas em nosso modelo animal pode ser devida ao tempo de avaliação, ou seja, 48 h após cada inoculação, não havendo tempo suficiente para o processo de

ativação e migração destas células em direção ao foco inflamatório.

A reação local, após 24 horas da 1ª inoculação do extrato, resultou em aumento nos níveis de todas as citocinas analisadas, como de citocinas associadas à imunidade inata (TNF- α , IL-1 e IL-6), à proliferação de linfócitos T (IL-2), à resposta Th1 (IFN- γ e IL-12), à resposta Th2 (IL-4), anti-inflamatória (IL-10) e também de citocinas associadas à resposta Th17 (IL-17 e IL-23). Por outro lado, a reação local causada pelo extrato, após 24 horas da 7ª inoculação, resultou em aumento significativo das citocinas IL-6, IL-12, IL-10, IL-17 e IL-23. Este resultado sugere que os componentes presentes no extrato têm um potencial pró-inflamatório, e estão induzindo ativação e diferenciação das células.

As células Th17 exercem importante função na gênese de muitas doenças, incluindo doenças inflamatórias, autoimunes e câncer (BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007; MIYAHARA et al., 2008; TESMER et al., 2008). Uma variedade de citocinas, tais como IL-23, fator transformador de crescimento beta (TGF- β), IL-1, IL-6, IL-17, IL-22 e IL-21 têm sido relacionadas às células Th17. Aggarwal et al. (2003) observaram que a IL-23 murina, a qual atua sobre as células T de memória, promove aumento da secreção de IL-17. Em adição aos seus efeitos sobre as células Th17, a IL-23 tem efeito potente sobre as células do sistema imune inato, induzindo a produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α , pelos monócitos e macrófagos (PUCCETTI; BELLADONNA; GROHMANN, 2002).

Vários estudos têm sugerido que o balanço entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias determina o resultado da infecção ou inflamação. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que suprime a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF- α (GLOCKER et al., 2011). Assim, a análise da concentração de citocinas produzidas após a 1ª e 7ª inoculações mostra que, embora esteja ocorrendo intensa reação inflamatória resultando em ativação dos linfócitos, há a produção de citocina anti-inflamatória, como a IL-10, como forma de conter a resposta imune.

Surpreendentemente, na 4ª inoculação do extrato, houve diminuição nos níveis de todas as citocinas analisadas, sendo possível que tal diminuição esteja associada com a retenção de células ativadas no linfonodo drenante, como observado pelo maior número de células ativadas, neste período. Este fenômeno precisará ser futuramente investigado. Por outro lado, a ausência

destas citocinas avaliadas nos soros dos animais sugere que o processo inflamatório, induzido pelo extrato das cerdas de *Premolis semirufa*, ocorre somente no local da injeção, o que mostra que a pararamose não é decorrente de um processo inflamatório sistêmico, como a artrite reumatoide.

A análise da imunogenicidade do extrato das cerdas de *P. semirufa* revelou que inoculações repetidas do extrato, na ausência de adjuvante, induziram uma intensa resposta imune, como demonstrado pelos altos títulos de anticorpos. Além disso, foi demonstrado que os soros dos animais injetados com o extrato apresentaram títulos maiores de IgG1, quando comparados aos das outras subclasses de IgG, sugerindo a predominância de resposta do tipo Th2, sendo esta subclasse de anticorpo induzida principalmente pela presença de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. No entanto, um fator que deve ser considerado neste modelo experimental de pararamose é a predisposição genética de camundongos BALB/c para respostas do tipo Th2 (MOSMANN et al., 1986).

Em camundongos geneticamente selecionados para o fenótipo de alta resposta de anticorpos (SANT'ANNA et al., 1982), a avaliação da imunogenicidade revelou que, a partir da segunda imunização, os animais desenvolveram títulos de anticorpos relativamente altos, momento no qual se inicia a maturação da afinidade e mudança de classe dos anticorpos. Os títulos se mantiveram altos, mesmo após longo período da segunda dose de imunização, sugerindo que o extrato estimule uma boa memória imunológica.

Adicionalmente, a análise da especificidade dos soros, por *Western blot*, revelou que o soro imune reconheceu alguns poucos componentes com Mr abaixo de 70 kDa. No entanto, verificou-se que o *pool* de soros de animais não imunizados, foi capaz de reconhecer, mesmo na diluição de 1:10.000, componentes com Mr acima de 82 kDa, assim como o dos animais imunizados. Tal fato indica a existência de componentes antigenicamente relacionados, nas cerdas da pararama, a aqueles presentes em microorganismos e/ou proteínas aos quais os camundongos tenham sido previamente expostos. Assim, os anticorpos com reatividade cruzada, existentes no soro dos camundongos não imunizados, e talvez presentes também em humanos, poderiam interagir com os componentes do extrato das cerdas da pararama e formar imunocomplexos. Imunocomplexos iniciam o processo inflamatório pela sua ligação aos

receptores FcγR dos macrófagos, com subsequente produção de citocinas inflamatórias, infiltração neutrofílica, e dano tecidual (ELLSWORTH et al., 2008). Ainda, o depósito de imunocomplexos na parede de pequenos vasos pode promover a ativação de complemento e o recrutamento de células inflamatórias, causando, eventualmente, dano tecidual e necrose (MATHES; GILLIAM, 2007). Na artrite reumatoide humana (CHOY; PANAYI, 2001) e em modelos experimentais de artrite (LUROSS; WILLIAMS, 2001; KANNAN; ORTMANN; KIMPEL, 2005), os imunocomplexos foram associados à produção de citocinas pró-inflamatórias, pela interação com o receptor FcγR (RAVETCH, 2002; SCHMIDT; GESSNER, 2005). Dessa forma, a formação de imunocomplexos, entre os anticorpos pré-existentes e as proteínas presentes no extrato da lagarta, possa talvez contribuir para o desencadeamento do processo inflamatório granulomatoso em pacientes acometidos pela pararamose.

A doença causada pelo contato com o extrato das cerdas de *Premolis semirufa* compartilha muitas características com as encontradas na artrite reumatoide, doença sistêmica e crônica, caracterizada por grave inflamação sinovial e destruição da cartilagem e/ou óssea (GRASSI et al., 1998). Autoanticorpos, tais como anti-colágeno tipo II ou anti-DNA, são encontrados na maioria dos pacientes (NANDAKUMAR; HOLMDAHL, 2006). A análise da presença de anticorpos, anti-DNA ou anti-colágeno tipo II, demonstrou ausência destes nos soros de camundongos inoculados com o extrato. Tal ausência indica que os mecanismos causadores da doença, após múltiplos contatos com as cerdas de *Premolis semirufa*, diferem daqueles observados em sinovites crônicas, tais como a artrite reumatoide.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho demonstram a existência, no extrato das cerdas da lagarta de *Premolis semirufa*, de uma mistura de diferentes enzimas que podem, talvez em conjunto, atuar na geração e desenvolvimento das manifestações clínicas da doença. Além disso, sugerem a presença de componentes no extrato capazes de ativar o sistema complemento, gerando anafilatoxinas. Os dados ainda demonstram que, em modelo murino, o extrato das cerdas induz mudanças no fenótipo de ativação dos linfócitos T e das células apresentadoras de antígeno, o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o sítio da inoculação e produção de citocinas pró-inflamatórias. Estas alterações podem explicar a intensa e prolongada resposta inflamatória que caracteriza esta desordem, uma vez que o extrato das cerdas induz ativação de linfócitos B e alta produção de anticorpos, na ausência de adjuvante. A análise da reatividade dos anticorpos, presentes em soros de camundongos não imunizados, revela reatividade cruzada com antígenos do extrato das cerdas da lagarta, o que pode também contribuir na gênese das reações inflamatórias da pararamose.

É possível que, a grande produção de anticorpos, o qual propicia a formação de imunocomplexos e todos os efeitos deletérios decorrentes da sua deposição, a presença de componentes ativados do complemento, bem como o recrutamento de células inflamatórias, sejam alguns dos elementos responsáveis para o estabelecimento da pararamose. O esquema abaixo sumariza os resultados obtidos no presente estudo.

Figura 40 – Esquema ilustrativo das atividades encontradas no extrato das cerdas de *Premolis semirufa*

REFERÊNCIAS*

ADDIS-LIESER, E.; KÖHL, J.; CHIARAMONTE, M. G. Opposing regulatory roles of complement factor 5 in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **J. Immunol.**, v. 175, p. 1894–1902, 2005.

AGGARWAL, S.; GHILARDI, N.; XIE, M. H.; DE SAUVAGE, F. J.; GURNEY, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 3, p. 1910-1914, 2003.

AHEARN, J. M.; FISCHER, M. B.; CROIX, D.; GOERG, S.; MA, M.; XIA, J.; ZHOU, X.; HOWARD, R. G.; ROTHSTEIN, T. L.; CARROLL, M. C. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. **Immunity**, v. 4, n. 3, p. 251–262, 1996.

AHRENS, D.; KOCH, A. E.; POPE, R. M.; STEIN-PICARELLA, M.; NIEDBALA, M. J. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96- kDa gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 39, p. 1576–1587, 1996.

AKSAMIT, R. R.; FALK, W.; LEONARD, E. J. Chemotaxis by mouse macrophage cell lines. **J. Immunol.**, v. 126, p. 2194–2199, 1981.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F. S. C.; CORREA, F. I.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ANTUNES, E. et al. Effects of different protocol doses of low power galliumaluminum- arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 74, n. 2/3, p. 101-107, 2004.

ALEXANDER, J. O. **Arthropods and human skin**. Berlin: Springer Verlag-Heidelberg, 1984.

AMES, R. S.; TORNETTA, M. A.; FOLEY, J. J.; HUGLI, T. E.; SARAU, H. M. Evidence that the receptor for C4a is distinct from the C3a receptor. **Immunopharmacology**, v. 38, n. 1/2, p. 87-92, 1997.

ARAÚJO, M. C.; MELO, R. L.; CESARI, M. H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; CARMONA, A. K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8519–8525, 2000.

AREND, W. P.; DAYER, J. M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 38, n. 2, p. 151-160, 1995.

ARUFFO, A.; STAMENKOVIC, I.; MELNICK, M.; UNDERHILL, C. B.; SEED, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1303–1313, 1990.

*De acordo com:

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

AUFFRAY, C.; FOGG, D.; GARFA, M.; ELAIN, G.; JOIN-LAMBERT, O.; KAYAL, S.; SARNACKI, S.; CUMANO, A.; LAUVAU, G.; GEISSMANN, F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science**, v. 317, n. 5838, p. 666–670, 2007.

BADOVINAC, V. P.; HARTY, J. T. Programming, demarcating, and manipulating CD8⁺ T-cell memory. **Immunol. Rev.**, v. 211, p. 67–80, 2006.

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

BANKS, B. E. C.; SHIPOLINI, R. A. Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. In: Piek, T. (Ed.). **Venoms of the Hymenoptera**. Florida: Academic Press, 1986. p. 330–403.

BARNES, R. D.; RUPPERT, E. E. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Editora Roca, 1996.

BARRINGTON, R. A.; SCHNEIDER, T. J.; PITCHER, L. A.; MEMPEL, T. R.; MA, M.; BARTENEVA, N. S.; CARROLL, M. C. Uncoupling CD21 and CD19 of the B-cell coreceptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 106, n. 34, p. 14490-14495, 2009.

BARRINGTON, R.; ZHANG, M.; FISCHER, M.; CARROLL, M. C. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunol. Rev.**, v. 180, p. 5-15, 2001.

BARTH, R. Estudos histológicos nas células glandulares dos insetos peçonhentos. I- Os órgãos urticantes da lagarta de *Automeris incis*a Walker (Lepidoptera-Hemileucidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 52, n. 1, p. 93-123, 1954a.

BARTH, R. Estudos histológicos nas células glandulares dos insetos peçonhentos. II- Os órgãos urticantes da lagarta de *Megalopyge albicollis superba* Edwards (Lepidoptera-Megalopygidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 52, n. 1, p. 125-139, 1954b.

BARTH, R.; JUNQUEIRA, J. L. Estudos histológicos nas células glandulares dos insetos peçonhentos. III - Sobre as áreas glandulares da lagarta de *Sibine nesea* (Stoll-Cramer, 1781) (Lepidoptera, Eucleidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 52, n. 3/4, p. 497-516, 1954.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 4, p. 345-350, 2007.

BICKERSTAFF, M. C.; BOTTO, M.; HUTCHINSON, W. L.; HERBERT, J.; TENNENT, G. A.; BYBEE, A.; MITCHELL, D. A.; COOK, H. T.; BUTLER, P. J.; WALPORT, M. J.; PEPYS, M. B. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. **Nat. Med.**, v. 5, p. 694–697, 1999.

BILO, B. M.; RUEFF, F.; MOSBECH, H.; BONIFAZI, F.; OUDE-ELBERINK, J. N. G. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. **Allergy**, v. 60, p. 1339–1349, 2005.

BIRO, A.; ROVO, Z.; PAPP, D.; CERVENAK, L.; VARGA, L.; FUST, G.; THIELENS, N. M.; ARLAUD, G. J.; PROHASZKA, Z. Studies on the interactions between C-reactive protein and complement proteins. **Immunology**, v. 121, p. 40–50, 2007.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325–372, 1994.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 345–368, 1995.

BOACKLE, S. A.; HOLERS, V. M.; CHEN, X.; SZAKONYI, G.; KARP, D. R.; WAKELAND, E. K.; MOREL, L. Cr2, a candidate gene in the murine Sle1c lupus susceptibility locus, encodes a dysfunctional protein. **Immunity**, v. 15, p. 775–785, 2001.

BONDER, C. S.; CLARK, S. R.; NORMAN, M. U.; JOHNSON, P.; KUBES, P. Use of CD44 by CD4+ Th1 and Th2 lymphocytes to roll and adhere. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4798–4806, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidente por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 1992. 58 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. rev. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2001. 120 p.

BROWN, E. J. Complement receptors and phagocytosis. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 3, p. 76–82, 1991.

CAPORALE, L. H.; TIPPETT, P. S.; ERICKSON, B. W.; HUGLI, T. E. The active site of C3a anaphylatoxin. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 10758–10763, 1980.

CARDOSO, A. E. C.; HADDAD JR, V. Accidents caused by lepidopterans (moth larvae and adult): study on the epidemiological, clinical and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 6, p. 571–578, 2005.

CARDOSO, J. L. C. Acidentes por Lepidópteros - II Lepidopterismo. III Erucismo. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 236–238.

CARRENO, B. M.; COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors, new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 29-53, 2002.

CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Curitiba: Editora da Universidade do Paraná, 1991. 228 p.

CARROLL, M. C. The role of complement and complement receptors in the induction and regulation of immunity. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 545-568, 1998.

CARROLL, M. C. The role of complement in B cell activation and tolerance. **Adv. Immunol.**, v. 74, p. 61-88, 2000.

CARTER, R.; FEARON, D. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. **Science**, v. 256, n. 5053, p. 105-107, 1992.

CASTELLINO, F.; GERMAIN, R. N. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 519-540, 2006.

CASTELLINO, F.; HUANG, A. Y.; ALTAN-BONNET, G.; STOLL, S.; SCHEINECKER, C.; GERMAIN, R. N. Chemokines enhance immunity by guiding naïve CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell dendritic cell interaction. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 890-895, 2006.

CHABAUD, M.; DURAND, J. M.; BUCHS, N.; FOSSIEZ, F.; PAGE, G.; FRAPPART, L.; MIOSSEC, P. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. **Arthritis Rheum.**, v. 42, n. 5, p. 963-970, 1999.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspective. **Cell. Signal.**, v. 15, p. 637-665, 2003.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J. M. C. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 96, p. 15155-15160, 1999.

CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 907-916, 2001.

COSTA, R. M. Acidentes por lagartas venenosas. In: BARRAVIERA, B. (Ed.). **Venenos animais, uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. p. 327-338.

COSTA, R. M. **Artropatia da pararamose: epidemiologia, clínica e modelos experimentais**. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1991.

COSTA, R. M. Pararamose. In: CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H.; FRANÇA, F. O. S.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 233-236.

COSTA, R. M. Pararamose: uma reumatose ocupacional. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 21, p. 132-136, 1981.

COSTA, R. M.; ATRA, E.; FERRAZ, M. B.; SILVA, N. P.; SOUZA, J. M.; ALVES JR, J.; COSTA, M. L. C. "Pararamose": an occupational arthritis caused by lepidoptera (*Premolis semirufa*). An epidemiological study. **Revista Paulista de Medicina**, v. 111, p. 462-465, 1993.

COSTA, R. M.; SILVA, N. P.; LESER, P.G.; ANDRADE, L. E. C.; GABRIEL JR, A.; ATRA, E. Activity of bristles from an Amazonian lepidoptera, "*Premolis semirufa*", on the human complement system. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 35, n. 3, p. 143-146, 1995a.

COSTA, R. M.; SILVA, N. P.; TEVES, D. C.; COSTA, M. L.; FERRAZ, M. B.; ATRA, E. Experimental arthritis induced by bristles from a "Lepidoptera", "*Premolis semirufa*": histopathological study in rats. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 35, n. 2, p. 61-64, 1995b.

COSTA, R. M.; SOUZA, J. M.; COSTA, M. L. C. Pararamose: reumatismo exótico do seringueiro da Amazônia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 18, p. 201, 1978.

CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nat. Ver. Immunol.**, v. 10, n. 7, p. 479-489, 2010.

CZERMARK, B. J.; SARMA, V.; BLESS, N. M.; SCHMAL, H.; FRIEDL, H. P.; WARD, P. A. In vitro and in vivo dependency of chemokine generation on C5a and TNF-alpha. **J. Immunol.**, v. 162, n. 4, p. 2321-2325, 1999.

DAHL, M. R.; THIEL, S.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T.; WILLIS, A. C.; CHRISTENSEN, T.; VORUP-JENSEN, T.; JENSENIUS, J. C. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. **Immunity**, v. 15, n. 1, p. 127-135, 2001.

DALMASSO, A. P. Complement in the pathophysiology and diagnosis of human diseases. **CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 24, p. 123-183, 1986.

DAVEY, M. S.; TAMASSIA, N.; ROSSATO, M.; BAZZONI, F.; CALZETTI, F.; BRUDEREK, K.; SIRONI, M.; ZIMMER, L.; BOTTAZZI, B.; MANTOVANI, A.; BRANDAU, S.; MOSER, B.; EBERL, M.; CASSATELLA, M. A. Failure to detect production of IL-10 by activated human neutrophils. **Nat. Immunol.**, v. 12, n. 11, p. 1017-1018, 2011.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

- DENNIS, E. A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, n. 1, p. 1–2, 1997.
- DIAS, L. B. Acidentes por Pararama: Pararamose. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1990. p. 238-241.
- DIAS, L. B. Pararama. **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, v. 2, p. 799-809, 1986.
- DIAS, L. B.; AZEVEDO, M. C. Pararama, a disease caused by moth larvae: experimental findings. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 7, n. 3, p. 9-14, 1973.
- DIAS, L. B.; AZEVEDO, M. C. Pararama: doença dos seringais. In: VERONESI, R. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 988-989.
- DIAS, L. B.; RODRIGUES, M. G. Pararamose. In: DE LEÃO, R. N. Q. (Coord.). **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. Belém: Cejup; UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997. 886 p.
- DISCIPIO, R. G.; DAFFERN, P. J.; JAGELS, M. A.; BROIDE, D. H.; SRIRAMARAO, P. A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. **J. Immunol.**, v. 162, p. 1127–1136, 1999.
- DOLEY, R.; MUKHERJEE, A. K. Purification and characterization of an anticoagulant phospholipase A₂ from Indian monocled cobra (*Naja kaouthia*) venom. **Toxicon**, v. 41, p. 81–91, 2003.
- DOMMETT, R. M.; KLEIN, N.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin in innate immunity, past, present and future. **Tissue Antigens**, v. 68, p. 193–209, 2006.
- DRUCE, H. Biologia Centrali-Americana. **Insecta Lepidoptera Heterocera**. London, v. 3 p. 74, 1881-1900.
- DUNCAN, A. R.; WINTER, G. The binding site for C1q on IgG. **Nature**, v. 332, p. 738-740, 1988.
- DUNCAN, R. C.; WIJEYEWICKREMA, L. C.; PIKE, R. N. The initiating proteases of the complement system: controlling the cleavage. **Biochimie**, v. 90, p. 387–395, 2008.
- EHRENGRUBER, M. U.; GEISER, T.; DERANLEAU, D. A. Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. **FEBS Lett.**, v. 346, p. 181–184, 1994.

el LATI, S. G.; DAHINDEN, C. A.; CHURCH, M. K. Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 102, p. 803–806, 1994.

ELLSWORTH, J. L.; MAURER, M.; HARDER, B.; HAMACHER, N.; LANTRY, M.; LEWIS, K. B.; RENE, S.; BYRNES-BLAKE, K.; UNDERWOOD, S.; WAGGIE, K. S.; VISICH, J.; LEWIS, K. E. Targeting immune complex-mediated hypersensitivity with recombinant soluble human FcγRIIA (CD64A). **J. Immunol.**, v. 180, n. 1, p. 580-589, 2008.

ELSNER, J.; OPPERMAN, M.; CZECH, W.; DOBOS, G.; SCHOPF, E.; NORGAEUER, J.; KAPP, A. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p. 518–522, 1994a.

ELSNER, J.; OPPERMAN, M.; CZECH, W.; KAPP, A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. **Blood**, v. 83, p. 3324–3331, 1994b.

EMBER, J. A.; HUGLI, T. E. Complement factors and their receptors. **Immunopharmacology**, v. 38, n. 1/2, p. 3-15, 1997.

EMBER, J. A.; JAGELS, M. A.; HUGLI, T. E. Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. In: VOLANAKIS, J. E.; FRANK, M. M. (Ed.). **The human complement system in health and disease**. New York: Marcel Dekker Inc., 1998. p. 241–284.

EMBER, J. A.; SANDERSON, S. D.; HUGLI, T. E.; MORGAN, E. L. Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylatoxin. **Am. J. Pathol.**, v. 144, p. 393–403, 1994.

EVANS, H. G.; SUDDASON, T.; JACKSON, I.; TAAMS, L. S.; LORD, G. M. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor activated monocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 104, n. 43, p. 17034–17039, 2007.

FEARON, D. T. Activation of the alternative complement pathway. **CRC Crit. Rev. Immunol.**, v. 1, p. 1-32, 1979.

FEARON, D. T.; AUSTEN, K. F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. **J. Exp. Med.**, v. 142, p. 856-863, 1975.

FEARON, D. T.; CARROLL, M. C. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 393-422, 2000.

FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v. 272, p. 50–54, 1996.

FERNANDEZ, H. N.; HUGLI T. E. Primary structural analysis of the polypeptide portion of human C5a anaphylatoxin. Polypeptide sequence determination and assignment of the oligosaccharide attachment site in C5a. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 19, p. 6955-6964, 1978.

FERNANDEZ, H. N.; HUGLI, T. E. Partial characterization of human C5a anaphylatoxin. I. Chemical description of the carbohydrate and polypeptide portions of human C5a. **J. Immunol.**, v. 117, p. 1688-1694, 1976.

FFRENCH-CONSTANT, C. Pathogenesis of multiple sclerosis. **Lancet**, v. 343, p. 271- 75, 1994.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3rd ed. London: Cambridge University Press, 1971. 333 p.

FISCHER, W. H.; HUGLI, T. E. Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonalimmuneresponse. **J. Immunol.**, v. 159, p. 4279-4286, 1997.

FISCHER, W. H.; JAGELS, M. A.; HUGLI, T. E. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a (desArg). **J. Immunol.**, v. 162, p. 453-459, 1999.

FLEMING, S. D.; SHEA-DONOHUE, T.; GUTHRIDGE, J. M.; KULIK, L.; WALDSCHMIDT, T. J.; GIPSON, M. G.; TSOKOS, G. C.; HOLERS, V. M. Mice deficient in complement receptors 1 and 2 lack a tissue injury-inducing subset of the natural antibody repertoire. **J. Immunol.**, v. 169, p. 2126-2133, 2002.

FONSECA, F. **Animais peçonhentos**. São Paulo: Instituto Butantan, 1949. 376 p.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969-985, 2005.

FRANÇA, F. O. S.; BENVENUTI, L. A.; FAN, H. W.; DOS SANTOS, D. R.; HAIN, S. H.; PICCHIMARTINS, F. R.; CARDOSO, J. L. C.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Severe and fatal mass attacks by 'killer' bees (Africanized honey bees-*Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinopathological studies with measurement of serum venom concentrations. **Q. J. Med.**, v. 87, n. 5, p. 269-282, 1994.

FRITZ, J. H.; FERRERO, R. L.; PHILPOTT, D. J.; GIRARDIN, S. E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nat. Immunol.**, v. 7, n. 12, p. 1250-1257, 2006.

FUJINO, S.; ANDOH, A.; BAMBA, S.; OGAWA, A.; HATA, K.; ARAKI, Y.; BAMBA, T.; FUJIYAMA, Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 65-70, 2003.

- FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 5, p. 346-353, 2002.
- FULY, A.; MIRANDA, A.; ZINGALI, R.; GUIMARÃES, J., Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from Lachesis muta snake venom. **J. Biochem. Pharm.**, v. 63, p. 1589-1597, 2002.
- GAFFEN, S. L.; KRAMER, J. M.; YU, J. J.; SHEN, F. The IL-17 cytokine family. **Vitam. Horm.**, v. 74, p. 255-282, 2006.
- GAL, P.; BARNA, L.; KOCSIS, A.; ZAVODSZKY, P. Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences. **Immunobiology**, v. 212, p. 267-277, 2007.
- GAL, P.; HARMAT, V.; KOCSIS, A.; BIAN, T.; BARNA, L.; AMBRUS, G.; VEGH, B.; BALCZER, J.; SIM, R. B.; NARAY-SZABO, G.; ZÁVODSZKY, P. A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 33435-33444, 2005.
- GASQUE, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. **Mol. Immunol.**, v. 41, p. 1089-1098, 2004.
- GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71-82, 2003.
- GEWURZ, H.; ZHANG, X. H.; LINT, T. F. Structure and function of the pentraxins. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 7, p. 54-64, 1996.
- GIRISH, K. S.; JAGADEESHA, D. K.; RAJEEV, K. B.; KEMPARAJU, K. Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. **Mol. Cell Biochem.**, v. 240, n. 1/2, p. 105-110, 2002.
- GLOCKER, E.O.; KOTLARZ, D.; KLEIN, C.; SHAH, N.; GRIMBACHER, B. IL-10 and IL-10 844 receptor defects in humans. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1246, p. 102-107, 2011.
- GORSKI, J. P.; HUGLI, T. E.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, n. 10, p. 5299-5302, 1979.
- GRASSI, W.; de ANGELIS, R.; LAMANNA, G.; CERVINI, C. The clinical features of rheumatoid arthritis. **Eur. J. Radiol.**, v. 27, p. S18-24, 1998. Suppl. 1.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; DÍAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 33, p. 19-29, 1995a.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; NÚÑEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Exp. Mol. Pathol.**, v. 62, p. 28-41, 1995b.

HADDAD JR, V.; CARDOSO, J. L. C. Erucismo e Lepidopterismo. In: CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H.; FRANÇA, F. O. S.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD Jr, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 220-223.

HAJELA, K.; KOJIMA, M.; AMBRUS, G.; WONG, N. K. H.; MOFFATT, B. E.; FERLUGA, J.; HAJELA, S.; GAL, P.; SIM, R. The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). **Immunobiology**, v. 205, p. 467-475, 2002.

HALSTENSEN, T. S.; MOLLNES, T. E.; FAUSA, O.; BRANTZÆG, P. Deposits of terminal complement complex (TCC) in muscularis mucosae and submucosal vessels in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. **Gut**, v. 30, n. 3, p. 361-366, 1989.

HAMPSON, G. **Catalogue of the Lepidoptera phalaenae in the British Museum**. London, v. 3, p. 26-27, 1901.

HANEMAAIJER, R.; SORSA, T.; KONTTINEN, Y. T.; DING, Y.; SUTINEN, M.; VISSER, H.; VAN HINSBERGH, V. W.; HELAAKOSKI, T.; KAINULAINEN, T.; RÖNKÄ, H.; TSCHESCHE, H.; SALO, T. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by TNF- α and doxycycline. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 50, p. 31504-31509, 1997.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P.; SCHONBECK, U.; YAN, Z. Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circ. Res.**, v. 91, n. 4, p. 281-291, 2002.

HARMAT, V.; GAL, P.; KARDOS, J.; SZILAGYI, K.; AMBRUS, G.; VEGH, B.; NARAY-SZABO, G.; ZAVODSZKY, P. The structure of MBL-associated serine protease-2 reveals that identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 342, p. 1533-1546, 2004.

HARTMANN, K.; HENZ, B. M.; KRUGER-KRASAGAKES, S.; KÖHL, J.; BURGER, R.; GUHL, S.; HAASE, I.; LIPPERT, U.; ZUBERBIER, T. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. **Blood**, v. 89, p. 2863-2870, 1997.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake venom hemorrhagins. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 29, p. 1-19, 1999.

HAWLISCH, H.; WILLS-KARP, M.; KARP, C. L.; KOHL, J. The anaphylatoxins bridge innate and adaptive immune responses in allergic asthma. **Mol. Immunol.**, v. 41, p. 123-131, 2004.

HEPPNER, J. B. Faunal regions and the diversity of Lepidoptera. **Tropical Lepidoptera**, Gainesville, v. 2, n. 1, p. 1-85, 1991.

HILLEBRANDT, S.; WASMUTH, H. E.; WEISKIRCHEN, R.; HELLERBRAND, C.; KEPPELER, H.; WERTH, A.; SCHIRIN-SOKHAN, R.; WILKENS, G.; GEIER, A.; LORENZEN, J.; KÖHL, J.; GRESSNER, A. M.; MATERN, S.; LAMMERT, F. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. **Nat. Genet.**, v. 37, p. 835-843, 2005.

HIROSE, T.; REIFE, R. A.; SMITH JR, G. N.; STEVENS, R. M.; MAINARDI, C. L.; HASTY, K. A. Characterization of type V collagenase (gelatinase) in synovial fluid of patients with inflammatory arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 19, n. 4, p. 593-599, 1992.

HOLERS, V. M. The complement system as a therapeutic target in autoimmunity. **Clin. Immunol.**, v. 107, n. 140-151, 2003.

HUBER-LANG, M.; SARMA, J. V.; ZETOUNE, F. S.; RITTIRSCH, D.; NEFF, T. A.; MCGUIRE, S. R.; LAMBRIS, J. D.; WARNER, R. L.; FLIERL, M. A.; HOESEL, L. M.; GEBHARD, F.; YOUNGER, J. G.; DROUIN, S. M.; WETSEL, R. A.; WARD, P. A. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. **Nat. Med.**, v. 12, n. 682-687, 2006.

HUGLI, T. E. Biochemistry and biology of anaphylatoxins. **Complement**, v. 3, n. 3, p. 111-127, 1986.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat. Immunol.**, v. 5, n. 10, p. 987-995, 2004.

JALKANEN, S.; JALKANEN, M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. **J. Cell Biol.**, v. 116, n. 3, p. 817-825, 1992.

JANEWAY JR, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197-216, 2002.

KACANI, L.; BANKI, Z.; ZWIRNER, J.; SCHENNACH, H.; BAJTAY, Z.; ERDEI, A.; STOIBER, H.; DIERICH, M. P. C5a and C5a(desArg) enhance the susceptibility of monocyte-derived macrophages to HIV infection. **J. Immunol.**, v. 166, p. 3410-3415, 2001.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. G. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 853-862, 1998.

KANNAN, K.; ORTMANN, R. A.; KIMPEL, D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. **Pathophysiology**, v. 12, p. 167-181, 2005.

- KARDONG, K.V. Snake toxins and venom: an evolutionary perspective. **Herpetologica**, v. 52, p. 36-46, 1996.
- KAROOUZAKIS, E.; NEIDHART, M.; GAY, R. E.; GAY, S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. **Immunol. Lett.**, v. 106, n. 1, p. 8-13, 2006.
- KAWAMOTO, S.; YALCINDAG, A.; LAOUINI, D.; BRODEUR, S.; BRYCE, P.; LU, B.; HUMBLE, A. A.; OETTGEN, H.; GERARD, C.; GEHA, R. S. The anaphylatoxin C3a downregulates the Th2 response to epicutaneously introduced antigen. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 399-407, 2004.
- KAYA, Z.; AFANASYEVA, M.; WANG, Y.; DOHMEN, K. M.; SCHLICHTING, J.; TRETTER, T.; FAIRWEATHER, D.; HOLERS, V. M.; ROSE, N. R. Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 739-745, 2001.
- KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochem. Funct.**, v. 24, n. 1, p. 7-12, 2006.
- KEMPER, C.; HOURCADE, D. E. Properdin: new roles in pattern recognition and target clearance. **Mol. Immunol.**, v. 45, n.16, p. 4048-4056, 2008.
- KIENER, P. A.; MORAN-DAVIS, P.; RANKIN, B. M.; WAHL, A. F.; ARUFFO, A.; HOLLENBAUGH, D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 155, n. 10, p. 4917-4925, 1995.
- KIMURA, Y.; MIWA, T.; ZHOU, L.; SONG, W. C. Activator-specific requirement of properdin in the initiation and amplification of the alternative pathway complement. **Blood**, v. 111, p. 732-740, 2008.
- KING, T. P.; LU, G.; GONZALEZ, M.; QIAN, N. F.; SOLDATOVA, L. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. **J. Allergy Clin. Immun.**, v. 98, p. 588-600, 1996.
- KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.**, v. 397, p. 377-387, 2006.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, v. 28, p. 1387-1422, 1990.

KIRSCHFINK, M. Controlling the complement system in inflammation. **Immunopharmacology**, v. 38, n. 1/2, p. 51-62, 1997.

KLEINER, D. E.; STETLER-STEVENSON, W. G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Anal. Biochem.**, v. 218, n. 2, p. 325-329, 1994.

KOHL, J. Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. **Mol. Immunol.**, v. 38, p. 175-187, 2001.

KOLLS, J. K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467-476, 2004.

KONTTINEN, Y. T.; CEPONIS, A.; TAKAGI, M.; AINOLA, M.; SORSA, T.; SUTINEN, M.; SALO, T.; MA, J.; SANTAVIRTA, S.; SEIKI, M. New collagenolytic enzymes/cascade identified at the pannus-hard tissue junction in rheumatoid arthritis: destruction from above. **Matrix Biology**, v. 17, p. 585-601, 1998.

KOOLWIJK, P.; MILTENBURG, M. M.; ERCK, M. G. M.; OUDSHOORN, M.; NIEDEBALA, M. J.; BREEDVELD, F. C.; HINSBERGH, V. W. M. Activated gelatinase-B (MMP-9) and urokinase-type plasminogen activator in synovial fluids of patients with arthritis. Correlation with clinical and experimental variables of inflammation. **J. Rheumatol.**, v. 22, p. 385-393, 1995.

KREIL, G. Hyaluronidases – a group of neglected enzymes. **Protein Sci.**, v. 4, p. 1666-1669, 1995.

KRETZSCHMAR, T.; JEROMIN, A.; GIETZ, C.; BAUTSCH, W.; KLOS, A.; KÖHL, J.; RECHKEMMER, G.; BITTER SUERMANN, D. Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 558-561, 1993.

KRUTZIK, S. R. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 11, n. 6, p. 653-660, 2005.

LACHMANN, P. J.; HUGHES-JONES, N. C. Initiation of complement activation. **Springer Semin. Immunopathol.**, v. 7, p. 143-162, 1984.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBRIS, J. D. The multifunctional role of C3, the third component of complement. **Immunol. Today**, v. 9, p. 387-393, 1988.

LAURENT, T. C. The biology of hyaluronan. In: _____. **Ciba Foundation Symp.** New York: John Wiley Sons, 1989. v. 143. p. 1-198.

LAURENT, T. C.; FRASER, J. R. Hyaluronan. **FASEB J.**, v. 6, n. 7, p. 2397-2404, 1992.

LAW, S. K.; DODDS, A. W. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. **Protein Sci.**, v. 6, n. 2, p. 263-274, 1997.

LEE, D. K.; GEORGE, S. R.; CHENG, R.; NGUYEN, T.; LIU, Y.; BROWN, M.; LYNCH, K. R.; O'DOWD, B. F. Identification of four novel human G protein-coupled receptors expressed in the brain. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 86, n. 1/2, p. 13-22, 2001.

LEON, B.; LOPEZ-BRAVO, M.; ARDAVIN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519-531, 2007.

LETT-BROWN, M. A.; LEONARD, E. J. Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxis to C5a. **J. Immunol.**, v. 118, n. 3, p. 815-818, 1977.

LEVY, Y.; GEORGE, J.; YONA, E.; SCHOENFELD, Y. Partial lipodystrophy, mesangiocapillary glomerulonephritis. **Immunol. Res.**, v. 18, n. 1, p. 55-60, 1998.

LIENENKLAUS, S.; AMES, R. S.; TORNETTA, M. A.; SARAU, H. M.; FOLEY, J. J.; CRASS, T.; SOHNS, B.; RAFFETSEDER, U.; GROVE, M.; HÖLZER, A.; KLOS, A.; KÖHL, J.; BAUTSCH, W. Human anaphylatoxin C4a is a potent agonist of the guinea pig but not the human C3a receptor. **J. Immunol.**, v. 161, n. 5, p. 2089-2093, 1998.

LINDY, O.; KONTTINEN, Y. T.; SORSA, T.; DING, Y.; SANTAVIRTA, S.; CEPONIS, A.; LÓPEZ-OTÍN, C. Matrix metalloproteinases-13 (collagenase-3) in human rheumatoid synovium. **Arthritis Rheum.**, v. 40, n. 8, p. 1391-1399, 1997.

LINTON, S. M.; MORGAN, B. P. Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis. **Mol. Immunol.**, v. 36, n. 13/14, p. 905-914, 1999.

LIPSKY, P. E. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 9, p. 764-766, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUH, J.; TEH, C.; KISHORE, U.; REID, K. B. M. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1572, n. 2/3, p. 387-400, 2002.

LUROSS, J. A.; WILLIAMS, N. A. The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. **Immunology**, v. 103, n. 4, p. 407-416, 2001.

MACATONIA, S. E.; HOSKEN, N. A.; LITTON, M.; VIEIRA, P.; HSIEH, C. S.; CULPEPPER, J. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; MURPHY, K. M.; O'GARRA, A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. **J. Immunol.**, v. 154, n. 10, p. 5071-5079, 1995.

MÁLAQUE, C. M. S.; CASTRO-VALÊNCIA, J. E.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 44, n. 3, p. 139-143, 2002.

MANGAN, D. F.; WELCH, G. R.; WAHL, S. M. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α and IL-1 β prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. **J. Immunol.**, v. 146, n. 5, p. 1541-1546, 1991.

MARCEAU, F.; LUNDBERG, C.; HUGLI, T. E. Effects of the anaphylatoxins on circulation. **Immunopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 67-84, 1987.

MARENGO, E. B.; de MORAES, L. V.; MELO, R. L.; BALAN, A.; FERNANDES, B. L.; TAMBOURGI, D. V.; RIZZO, L. V.; SANT'ANNA, O. A. A *Mycobacterium leprae* Hsp65 mutant as a candidate for mitigating lupus aggravation in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24093, 2011.

MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **Am. J. Pathol.**, v. 171, n. 3, p. 715-727, 2007.

MARKLAND JR, F. S. Snake venoms. **Drugs**, v. 3, p. 1-10, 1997.

MARKOVIC-HOUSLEY, Z.; MIGLIERINI, G.; SOLDATOVA, L.; RIZKALLAH, P. J.; MULLER, U. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. **Structure**, v. 8, n. 10, p. 1025-1035, 2000.

MASON, D. The role of B cells in the programming of T cells for IL-4 synthesis. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 3, p. 717-719, 1996.

MASTELLOS, D.; MORIKIS, D.; ISAACS, S. N.; HOLLAND, M. C.; STREY, C. W.; LAMBRIS, J. D. Complement: structure, functions, evolution, and viral molecular mimicry. **Immunol. Res.**, v. 27, n. 2/3, p. 367-386, 2003.

MASTELLOS, D.; PAPADIMITRIOU, J. C.; FRANCHINI, S.; TSONIS, P. A.; LAMBRIS, J. D. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. **J. Immunol.**, v. 166, n. 4, p. 2479-2486, 2001.

MATHES, E. F.; GILLIAM, A. E. A four-year-old boy with fever, rash, and arthritis. **Semin. Cutan. Med. Surg.**, v. 26, n. 3, p. 179-187, 2007.

MATOS, E.; AZEVEDO, C. Alguns aspectos ultra – estruturais do pêlo glandular da larva de pararama (*Premolis semirufa*) (Lepidoptera, Arctiidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 51, n. 2, p. 341-347, 1991.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; FUJITA, T. Cutting edge: Complement- activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. **J. Immunol.**, v. 164, n. 5, p. 2281-2284, 2000.

MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. **Immunobiology**, v. 194, n. 4/5, p. 443-448, 1995.

MATSUSHITA, M.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C.; TERA, I.; FUJITA, T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. **J. Immunol.**, v. 165, p. 2637-2642, 2000.

MCKENZIE, B. S.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. **Trends Immunol.**, v. 27, n. 1, p. 17-23, 2006.

MEDICUS, R. G.; GOTZE, O.; MULLER-EBERHARD, H. J. Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. **J. Exp. Med.**, v. 144, n. 4, p. 1076-1093, 1976.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255-258, 2001.

MICHEL, F.; ATTAL-BONNEFOY, G.; MANGINO, G.; MISE-OMATA, S.; ACUTO, O. CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. **Immunity**, v. 15, n. 6, p. 935-945, 2001.

MIGA, A.; MASTERS, S.; GONZALEZ, M.; NOELLE, R. J. The role of CD40-CD154 interactions in the regulation of cell mediated immunity. **Immunol. Invest.**, v. 29, n. 2, p. 111-114, 2000.

MITRAKUL, C. Effect of five Thai snake venoms on coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation, Southeast Asian. **J. Tropic. Med. Public Health**, v. 10, p. 266-275, 1979.

MIYAHARA, Y.; ODUNSI, K.; CHEN, W.; PENG, G.; MATSUZAKI, J.; WANG, R. F. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 40, p. 15505-15510, 2008.

MOFFITT, M. C.; FRANK, M. M. Complement resistance in microbes. **Springer Semin. Immunopathol.**, v. 15, n. 4, p. 327-344, 1994.

- MOLINA, H.; HOLERS, V. M.; LI, B.; FUNG, Y.; MARIATHASAN, S.; GOELLNER, J.; STRAUSS-SCHOENBERGER, J.; KARR, R. W.; CHAPLIN, D. D. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, n. 8, p. 3357-3361, 1996.
- MOLLER-KRISTENSEN, M.; THIEL, S.; SJOHOLM, A.; MASTUSHITA, M.; JENSENIUS, J. C. Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. **Int. Immunol.**, v. 19, n. 2, p. 141-149, 2007.
- MOLLNES, T. E.; BREKKE, O. L.; FUNG, M.; FURE, H.; CHRISTIANSEN, D.; BERGSETH, G.; VIDEM, V.; LAPPEGARD, K. T.; KOHL, J.; LAMBRIS, J. D. Essential role of the C5a receptor in *E. coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudinbased human whole blood model of inflammation. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1869-1877, 2002.
- MOLLNES, T. E.; SONG, W. C.; LAMBRIS, J. D. Complement in inflammatory tissue damage and disease. **Trends Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 61-64, 2002.
- MORAES, R. H. P. Lepidópteros de importância médica. In: CARDOSO, J. L. C., WEN, F. H., FRANÇA, F. O. S., MALAQUE, C. M. S., HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 211-219.
- MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal. Biochem.**, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. A.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.
- MOURA DA SILVA, A. M.; LAING, G. D.; PAINE, M. J. I.; DENNISON, J. M. T. J.; POLITI, V.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. G. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 9, p. 2000-2005, 1996.
- MUELLER-ORTIZ, S. L.; DROUIN, S. M.; WETSEL, R. A. The alternative activation pathway and complement component C3 are critical for a protective immune response against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 5, p. 2899-2906, 2004.
- MÜLLER-EBERHARD, H. J. Molecular organization and function of the complement system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 321-347, 1988.
- MUMMERT, M. E. Immunologic roles of hyaluronan. **Immunol. Res.**, v. 31, n. 3, p. 189-206, 2005.

NAKAE, S.; NAMBU, A.; SUDO, K.; IWAKURA, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. **J. Immunol.**, v. 171, n. 11, p. 6173-6177, 2003.

NANDAKUMAR, K. S.; HOLMDAHL, R. Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. **Arthritis Res. Ther.**, v. 8, n. 6, p. 223, 2006.

NATAF, S.; DAVOUST, N.; AMES, R. S.; BARNUM, S. R. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. **J. Immunol.**, v. 162, n. 7, p. 4018-4023, 1999.

NERON, S.; SUCK, G.; MA, X. Z.; SAKAC, D.; ROY, A.; KATSMAN, Y.; DUSSAULT, N.; RACINE, C.; BRANCH, D. R. B cell proliferation following CD40 stimulation results in the expression and activation of Src protein tyrosine kinase. **Int. Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 375-387, 2006.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**, v. 224, n. 4647, p. 350-357, 1984.

NEURATH, H. Proteolytic enzymes, past and present. **Fed. Proc.**, v. 44, n. 14, p. 2907-2913, 1985.

OKUMURA, A.; SAITO, T.; OTANI, I.; KOJIMA, K.; YAMADA, Y.; ISHIDA -OKAWARA, A.; NAKAZATO, K.; ASANO, M.; KANAYAMA, K.; IWAKURA, Y.; SUZUKI, K.; YAMAGOE, S. Suppressive role of leukocyte cell derived chemotaxin 2 in mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 58, n. 2, p. 413-421, 2008.

OTTONELLO, L.; CORCIONE, A.; TORTOLINA, G.; AIROLDI, I.; ALBESIANO, E.; FAVRE, A.; D'AGOSTINO, R.; MALAVASI, F.; PISTOIA, V.; DALLEGRI, F. rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues. **J. Immunol.**, v. 162, n. 11, p. 6510-6517, 1999.

OUYANG, C.; TENG, C. M. Fibrinogenolytic enzymes of Trimeresurus venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 420, n. 2, p. 298-308, 1976.

PAÏDASSI, H.; TACNET-DELORME, P.; GARLATTI, V.; DARNAULT, C.; GHEBREHIWET, B.; GABORIAUD, C.; ARLAUD, G. J.; FRACHET, P. C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand bridging molecule in apoptotic cell recognition. **J. Immunol.**, v. 180, n. 4, p. 2329-2338, 2008.

PALFRAMAN, R. T.; JUNG, S.; CHENG, G.; WENINGER, W.; LUO, Y.; DORF, M.; LITTMAN, D. R.; ROLLINS, B. J.; ZWEERINK, H.; ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 9, p. 1361-1373, 2001.

PANGBURN, M. K.; MULLER-EBERHARD, H. J. The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. **Biochem. J.**, v. 235, n. 3, p. 723-730, 1986.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Sci.**, v. 4, n. 3, p. 337-360, 1995.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

PICKERING, M. C.; BOTTO, M.; TAYLOR, P. R.; LACHMANN, P. J.; WALPORT, M. J. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. **Adv. Immunol.**, v. 76, p. 227-324, 2000.

PILLAY, J.; KAMP, V. M.; VAN HOFFEN, E.; VISSER, T.; TAK, T.; LAMMERS, J. W., et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. **J. Clin. Invest.**, v. 122, n. 1, p. 327-336, 2012.

PRICE III, J. A. A colorimetric assay for measuring phospholipase A₂ degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 70, n. 3, p. 441-444, 2007.

PRODEUS, A. P.; GOERG, S.; SHEN, L. M.; POZDNYAKOVA, O. O.; CHU, L.; ALICOT, E. M.; GOODNOW, C. C.; CARROLL, M. C. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. **Immunity**, v. 9, n. 5, p. 721-731, 1998.

PUC CETTI, P.; BELLADONNA, M. L.; GROHMANN, U. Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 22, n. 5/6, p. 373-390, 2002.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; WARRELL, D. A.; DESAKORN, V.; MCMICHAEL, A. J.; WHITE, N. J.; BUNNAG, D. The hyaluronidase activities of some southeast asian snake venoms. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 629-637, 1988.

PURÉ, E.; CUFF, C. AA crucial role for CD44 in inflammation. **Trends Mol. Med.**, v. 7, n. 5, p. 213-221, 2001.

RAVETCH, J. V. A full complement of receptors in immune complex diseases. **J. Clin. Invest.**, v. 110, n. 12, p. 1759-1761, 2002.

RAZA, K.; SCHEEL-TOELLNER, D.; LEE, C. Y.; PILLING, D.; CURNOW, S. J.; FALCIANI, F.; TREVINO, V.; KUMAR, K.; ASSI, L. K.; LORD, J. M.; GORDON, C.; BUCKLEY, C. D.; SALMON, M. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. **Arthritis Res. Ther.**, v. 8, n. 4, p. R120, 2006.

- REID, K. B. M. Activation and control of the complement system. **Essays Biochem.**, v. 22, p. 27-68, 1986.
- REINER, S. L.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate. **Science**, v. 317, n. 5838, p. 622-625, 2007.
- REYNOLDS, J. J. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. **Oral Dis.**, v. 2, n. 1, p. 70-76, 1996.
- RIBEIRO, J. M. C.; CHARLAB, R.; ROWTON, E. D.; CUPP, E. W. *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. **J. Med. Entomol.**, v. 37, n. 5, p. 743-747, 2000.
- RICHARDS, O. W.; DAVIES, R. G. **IMMS' general textbook of entomology**. 10th ed. London: Chapman & Hall, 1997. 1354 p.
- RICKERT, R.; RAJEWSKY, K.; ROES, J. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. **Nature**, v. 376, n. 6538, p. 352-355, 1995.
- ROBBINS, R. A.; RUSS, W. D.; RASMUSSEN, J. K.; CLAYTON, M. M. Activation of the complement system in the adult respiratory distress syndrome. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 135, n. 3, p. 651-658, 1987.
- RODMAN, W. S.; WILLIAMS, R. C. JR.; BILKA, P. J.; MULLER-EBERHARD, H. J. Immunofluorescent localization of the third and fourth components of complement in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 69, n. 1, p. 141-150, 1967.
- RODRIGUES, M. G. Efeitos danosos da lagarta "Pararama" (*Premolis semirufa*) a seringueiros no Estado do Pará. **Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará**, Belém, v. 8, p. 1-31, 1976.
- ROOS, A.; BOUWMAN, L. H.; VAN GIJLSWIJK-JANSSEN, D. J.; FABER-KROL, M. C.; STAHL, G. L.; DAHA, M. R. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. **J. Immunol.**, v. 167, n. 5, p. 2861-2868, 2001.
- ROSSI, V.; CSEH, S.; BALLY, I.; THIELENS, N. M.; JENSENIUS, J. C.; ARLAUD, G. J. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 44, p. 40880-40887, 2001.
- RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 79, n. 4, p. 245-254, 1998.

SAHU, A.; LAMBRIS, J. D. Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics. **Immunopharmacology**, v. 49, n. 1/2, p. 133-148, 2000.

SANT'ANNA, O. A.; FERREIRA, V. C.; REIS, M. H.; GENNARI, M.; IBANEZ, O. M.; ESTEVES, M. B.; MOUTON, D.; BIOZZI, G. Genetic parameters of the polygenic regulation of antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of salmonella. **J. Immunogenet.**, v. 9, n. 3, p. 191-205, 1982.

SCHAAPHERDER, A. F.; GOOSZEN, H. G.; TE BULTE, M. T.; DAHA, M. R. Human complement activation via the alternative pathway on porcine endothelium initiated by IgA antibodies. **Transplantation**, v. 60, n. 3, p. 287-291, 1995.

SCHMIDT, J. O. Biochemistry of insect venoms. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 27, p. 339-368, 1982.

SCHMIDT, R. E.; GESSNER, J. E. Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. **Immunol. Lett.**, v. 100, n. 1, p. 56-67, 2005.

SCHOLZ, W.; MCCLURG, M. R.; CARDENAS, G. J.; SMITH, M.; NOONAN, D. J.; HUGLI, T. E.; MORGAN, E. L. C5a-mediated release of interleukin 6 by human monocytes. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 57, n. 2, p. 297-307, 1990.

SCIESZKA, J. F.; MAGGIORA, L. L.; WRIGHT, S. D.; CHO, M. J. Role of complements C3 and C5 in the phagocytosis of liposomes by human neutrophils. **Pharm. Res.**, v. 8, n. 1, p. 65-69, 1991.

SCOBLE, M. J. **The Lepidoptera: form function and diversity**. New York: Oxford University Press, 1995. 404 p.

SEIBERT, C. S.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; SANTORO, M. L.; MACKESSY, S. P.; SOARES TORQUATO, R. J.; LEBRUN, I.; TANAKA, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. Purification of a phospholipase A₂ from *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 342, n. 4, p. 1027-1033, 2006.

SERBINA, N. V.; PAMER, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. **Nat. Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 311-317, 2006.

SERRANO, S. M.; REICHL, A. P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A.; SANTORO, M. L.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; ASSAKURA, M. T. A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 367, n. 1, p. 26-32, 1999.

SILLS, E. M. Errors in diagnosis of juvenile rheumatoid arthritis. **Johns Hopkins Med. J.**, v. 133, n. 2, p. 88-95, 1973.

SIM, R. B.; REID, K. B. C1: molecular interactions with activating systems. **Immunol. Today**, v. 12, n. 9, p. 307-311, 1991.

SKOK, J.; POUDRIER, J.; GRAY, D. Dendritic cell-derived IL-12 promotes B cell induction of Th2 differentiation: a feedback regulation of Th1 development. **J. Immunol.**, v. 163, n. 8, p. 4284-4291, 1999.

SMITH, L. C.; CLOW, L. A.; TERWILLIGER, D. P. The ancestral complement system in sea urchins. **Immunol. Rev.**, v. 180, p. 16-34, 2001.

SORURI, A.; RIGGERT, J.; SCHLOTT, T.; KIAFARD, Z.; DETTMER, C.; ZWIRNER, J. Anaphylatoxin C5a induces monocyte recruitment and differentiation into dendritic cells by TNF-alpha and prostaglandin E2-dependent mechanisms. **J. Immunol.**, v. 171, n. 5, p. 2631-2636, 2003.

SPITZER, D.; MITCHELL, L. M.; ATKINSON, J. P.; HOURCADE, D. E. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. **J. Immunol.**, v. 179, n. 4, p. 2600-2608, 2007.

St SWIERZKO, A.; CEDZYNSKI, M.; DOMZALSKA-POPADIUK, I.; MACDONALD, S. L.; BORKOWSKA-KLOS, M.; ATKINSON, A. P.; SZALA, A.; JOPEK, A.; JENSENIUS, J. C.; KAWAKAMI, M.; SZCZAPA, J.; MATSUSHITA, M.; SZEMRAJ, J.; TURNER, M. L.; KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) in a large cohort of neonates and its clinical associations. **Mol. Immunol.**, v. 46, n. 8/9, p. 1696-1701, 2009.

STEEL, D. M.; WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunol. Today**, v. 15, n. 2, p. 81-88, 1996.

STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. **Nature**, v. 449, n. 7161, p. 419-426, 2007.

STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, n. 1, p. 351-358, 2002.

STERN, R.; JEDRZEJAS, M. J. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. **Chem. Rev.**, v. 106, n. 3, p. 818-839, 2006.

STOVER, C. M.; LUCKETT, J. C.; ECHTENACHER, B.; DUPONT, A.; FIGGITT, S. E.; BROWN, J.; MANNEL, D. N.; SCHWAEBLE, W. J. Properdin plays a protective role in polymicrobial septic peritonitis. **J. Immunol.**, v. 180, n. 5, p. 3313-3318, 2008.

STREY, C. W.; MARKIEWSKI, M.; MASTELLOS, D.; TUDORAN, R.; SPRUCE, L. A.; GREENBAUM, L. E.; LAMBRIS, J. D. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 6, p. 913-923, 2003.

SUNDRUD, M. S.; RAO, A. New twists of T cell fate: control of T cell activation and tolerance by TGF-beta and NFAT. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, n. 3, p. 287-293, 2007.

SUVAS, S.; SINGH, V.; SAHDEV, S.; VOHRA, H.; AGREWALA, J. N. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 10, p. 7766-7775, 2002.

TACK, B. F.; HARRISON, R. A.; JANATOVA, J.; THOMAS, M. L.; PRAHL, J. W. Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 77, n. 10, p. 5764-5768, 1980.

TAKAFUJI, S.; TADOKORO, K.; ITO, K. Effects of interleukin (IL)-3 and IL-5 on human eosinophil degranulation induced by complement components C3a and C5a. **Allergy**, v. 51, n. 8, p. 563-568, 1996.

TAKAHASHI, M.; IWAKI, D.; KANNO, K.; ISHIDA, Y.; XIONG, J.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; MIURA, S.; ISHII, N.; SUGAMURA, K.; FUJITA, T. Mannose-binding lectin (MBL)- associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. **J. Immunol.**, v. 180, n. 9, p. 6132-6138, 2008.

TAKAHASHI, M.; MORI, S.; SHIGETA, S.; FUJITA, T. Role of MBL-associated serine protease (MASP) on activation of the lectin complement pathway. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 598, p. 93-104, 2007.

TEMPERO, R. M.; HOLLINGSWORTH, M. A.; BURDICK, M. D.; FINCH, A. M.; TAYLOR, S. M.; VOGEN, S. M.; MORGAN, E. L.; SANDERSON, S. D. Molecular adjuvant effects of a conformationally biased agonist of human C5a anaphylatoxin. **J. Immunol.**, v. 158, n. 3, p. 1377-1382, 1997.

TESMER, L. A.; LUNDY, S. K.; SARKAR, S.; FOX, D. A. Th17 cells in human disease. **Immunol. Rev.**, v. 223, p. 87-113, 2008.

THIEL, S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. **Mol. Immunol.**, v. 44, n. 16, p. 3875-3888, 2007.

THIEL, S.; PETERSEN, S. V.; VORUP-JENSEN, T.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T.; STOVER, C. M.; SCHWAEBLE, W. J.; JENSENIUS, J. C. Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with

C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MAP19. **J. Immunol.**, v. 165, n. 2, p. 878-887, 2000.

THIEL, S.; VORUP-JENSEN, T.; STOVER, C. M.; SCHWAEBLE, W.; LAURSEN, S. B.; POULSEN, K. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 506-510, 1997.

THURMAN, J. M.; HOLERS, V. M. The central role of the alternative complement pathway in human disease. **J. Immunol.**, v. 176, n. 3, p. 1305-1310, 2006.

TISCHFIELD, J. A. A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 28, p. 17247-17250, 1997.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TOYAMA, M. H.; OLIVEIRA, D. G.; BERIAM, L. O. S.; NOVELLO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA₂ isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 1033-1038, 2003.

TZARTOS, J. S.; FRIESE, M. A.; CRANER, M. J.; PALACE, J.; NEWCOMBE, J.; ESIRI, M. M.; FUGGER, L. Interleukin- 17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **Am. J. Pathol.**, v. 172, n. 1, p. 146-155, 2008.

ULRICH, J. T.; CIEPLAK, W.; PACZKOWSKI, N. J.; TAYLOR, S. M.; SANDERSON, S.D. Induction of an antigen-specific CTL response by a conformationally biased agonist of human C5a anaphylatoxin as a molecular adjuvant. **J. Immunol.**, v. 164, n. 10, p. 5492-5498, 2000.

VIANNA, C. H.; AZEVEDO, M. C. Pararama, doença dos seringais. **I Congresso da Sociedade Médico – Cirúrgica do Pará**, Belém, 1967.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 14, p. 1058-1066, 2001a.

WALPORT, M. J. Complement. Second of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 15, p. 1140-1144, 2001b.

WARD, P. A. The dark side of C5a in sepsis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 2, p. 133-142, 2004.

WATALA, J.; KOWALCZYK, J. Hemolytic potency and phospholipase activity of some bee and wasp venoms. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 97, n. 1, p. 187-194, 1990.

WEBER, G. F.; ASHKAR, S.; GLIMCHER, M. J.; CANTOR, H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). **Science**, v. 271, n. 5248, p. 509-512, 1996.

WEISSMANN, G. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. **J. Clin. Rheumatol.**, v. 10, p. S26-31, 2004. Suplemento 3.

WELCH, T. R. Complement in glomerulonephritis. **Nat. Genet.**, v. 31, n. 4, p. 333-334, 2002.

WONG, N. K.; KOJIMA, M.; DOBO, J.; AMBRUS, G.; SIM, R. B. Activities of the MBL-associated serine proteases (MASPs) and their regulation by natural inhibitors. **Mol. Immunol.**, v. 36, n. 13/14, p. 853-861, 1999.

WU, X.; JIANG, N.; DEPPONG, C.; SINGH, J.; DOLECKI, G.; MAO, D.; MOREL, L.; MOLINA, H. D. A role for the Cr2 gene in modifying autoantibody production in systemic lupus erythematosus. **J. Immunol.**, v. 169, n. 3, p. 1587-1592, 2002.

XINMIN, Y.; JIAN, H. Treatment of temporomandibular joint osteoarthritis with viscosupplementation and arthrocentesis on rabbit model. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 100, n. 3, p. e35-8, 2005.

YAMAKAWA, S. A.; NOZAKI, M.; HOKAWA, Z. Fractionation of sakishimahabu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-formin activities of the fractins. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K.; SAWAY, Q. Y. (Ed.). **Animal, plant and microbial toxins**. New York, Plenum, 1976. v. 1. p. 97-109.

YAMAMOTO, C.; TSURU, D.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M.; HATTORI, S.; KIM, S. Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 111-117, 2002.

YOSHIHARA, Y.; YAMADA, H. Matrix metalloproteinases and cartilage matrix degradation in rheumatoid arthritis. **Clin. Calcium**, v. 17, n. 4, p. 500-508, 2007.

ZHANG, X.; MAJLESSI, L.; DERIAUD, E.; LECLERC, C.; LO-MAN, R. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 761-771, 2009.

APÊNDICES - Artigos de Periódicos

APÊNDICE A- VILLAS-BOAS, I. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; PIDDE-QUEIROZ, G.; ASSAF, S. L.; PORTARO, F. C.; SANT'ANNA, O. A.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. *Premolis semirufa* (Walker, 1856) envenomation, disease affecting rubber tappers of the Amazon: searching for caterpillar-bristles toxic components. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 6, n. 2, p. e1531, 2012.

APÊNDICE B- VILLAS-BOAS, I. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; SANT'ANNA, O. A.; TAMBOURGI, D. V. Toxic components of *Premolis semirufa* caterpillar bristles activate a potent cellular immune response. Em submissão.

Premolis semirufa (Walker, 1856) Envenomation, Disease Affecting Rubber Tappers of the Amazon: Searching for Caterpillar-Bristles Toxic Components

Isadora Maria Villas-Boas¹, Rute Maria Gonçalves-de-Andrade¹, Giselle Pidde-Queiroz¹, Suely Lucia Muro Rais Assaf², Fernanda C. V. Portaro¹, Osvaldo A. Sant'Anna¹, Carmen W. van den Berg³, Denise V. Tambourgi^{1*}

1 Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Genetics Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Department of Pharmacology, Oncology and Radiology, School of Medicine, Cardiff University, Cardiff, United Kingdom

Abstract

Background: The caterpillar of the moth *Premolis semirufa* (Lepidoptera: Arctiidae), commonly named *Pararama*, is endemic of the Amazon basin. Accidental contact with these caterpillar bristles causes local symptoms such as intense heat, pain, edema and itching which last for three to seven days; however, after multiples contacts, it may induce joint-space narrowing and bone alteration, as well as degeneration of the articular cartilage and immobilization of the affected joints. Specific treatment for this disease does not exist, but corticosteroids are frequently administered. Despite of the public health hazard of *Premolis semirufa* caterpillar poisoning, little is known about the nature of the toxic components involved in the induction of the pathology.

Methodology/Principal Findings: Here we have investigated the biological and immunochemical characteristics of the caterpillar's bristles components. Analysis of the bristles extract in *in vitro* assays revealed the presence of proteolytic and hyaluronidase activities but no phospholipase A₂ activity. *In vivo*, it was observed that the bristles extract is not lethal but can induce an intense inflammatory process, characterized by the presence of neutrophils in the paw tissues of injected mice. Furthermore, the bristles components stimulated an intense and specific antibody response but autoantibodies such as anti-DNA or anti-collagen type II were not detected.

Conclusion: The results suggest that *Premolis semirufa* caterpillar bristles secretion contains a mixture of different enzymes that may act together in the generation and development of the clinical manifestations of the *Pararama* envenomation. Moreover, the high immunogenicity of the caterpillar bristles components, as shown by the generation of high antibody titers, may also contribute to the induction and establishment of the inflammatory disease.

Citation: Villas-Boas IM, Gonçalves-de-Andrade RM, Pidde-Queiroz G, Assaf SLMR, Portaro FCV, et al. (2012) *Premolis semirufa* (Walker, 1856) Envenomation, Disease Affecting Rubber Tappers of the Amazon: Searching for Caterpillar-Bristles Toxic Components. PLoS Negl Trop Dis 6(2): e1531. doi:10.1371/journal.pntd.0001531

Editor: Kosta Y. Mumcuoglu, Hebrew University-Hadassah Medical School, Israel

Received: October 25, 2011; **Accepted:** December 24, 2011; **Published:** February 28, 2012

Copyright: © 2012 Villas-Boas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The study was funded by FAPESP, CNPq, and INCTTOX. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: dvtambourgi@butantan.gov.br

Introduction

Moths and butterflies are insects of the Lepidoptera order, of which the young stage is called larva. The larval form of some families of moths containing urticating hairs is known as caterpillar.

Although caterpillar venoms have not been analyzed as much as the venoms from snakes, spiders and scorpions, there are many reports on the characterization of bristles extracts from a variety of species. Coagulation disorders have been reported after contact with the Saturniidae caterpillars from *Lononia* genus. Since 1989, accidents involving *Lononia obliqua* species were reported in South of Brazil, Argentine, Paraguay and Uruguay [1,2]. The physical contact with this caterpillar induces a toxic secretion from bristle, which promotes local and systemic symptoms in the victim

between 6 to 72 hours after contact, such as burning sensation, intense hematuria, disseminated intravascular coagulation-like reactions (severe depletion of the coagulation factors) and secondary fibrinolysis [2]. Serious clinical complications, such as acute renal failure and intracranial hemorrhage may also occur [1,3].

The Brazilian caterpillar of *Premolis semirufa* usually called as *Pararama*, belongs to the Arctiidae family. The genus *Premolis* contains four species: *P. semirufa*, recorded in the Amazon region in Brazil, French Guiana, Ecuador, Peru and Panama; *P. excavata* found in Panama; *P. rhyssa* in Peru and *P. amaryllis* in French Guiana.

Premolis semirufa feeds of *Hevea brasiliensis*, the rubber tree found in the Amazon forest (Figure 1). The tappers, when collecting the latex, can stick their fingers in the trunk of the rubber trees to

Author Summary

Pararama, the popular name of the larval form of the moth *Premolis semirufa* inhabits rubber plantations in the Amazon region and the accidental contact of the skin with the caterpillar's bristles or cocoons results in immediate and intense heat, pain, edema, and itching. In many cases a chronic inflammatory reaction with immobilization of the joints occurs. The current study has evaluated the biological and immunochemical characteristics of the Pararama caterpillar bristles extract. Electrophoretic analysis showed the presence of several components, including a very intense 82 kDa band. This latter component was endowed with intense gelatinolytic activity, as observed in zymography assays. Further analysis revealed that the extract also contained hyaluronidase activity but is devoid of phospholipase A₂ activity. *In vivo* assays, using mice, showed that the extract was not lethal, but caused significant edema and induced intense infiltration of inflammatory cells to the envenomation site. The extract also induced high specific antibody titers, but no autoantibodies were detected. The data obtained, so far, demonstrate the existence of a mixture of different enzymes in the bristles of *Premolis semirufa* caterpillar, which can act together in the generation and development of the clinical manifestations of the Pararama envenomation.

facilitate the harvest and, at that time, may come into contact with the Pararama.

Known as “Pararama associated phalangeal peri-arthritis” and due to its importance as an occupational disease, predominantly in the rubber tree areas of Pará, Brazil, this caterpillar envenomation was inserted into the “Manual of diagnosis and treatment of envenomations”, released by the Brazilian Ministry of Health in 1992 [4]. The contact with the bristles, in most cases, causes instantly an intense itching, followed by symptoms of the acute inflammation such as pain, heat and redness, which lasts up to seven days, after the first accident [5–11]. Chronic symptoms, which frequently occur in individuals after multiple accidents, are characterized by synovial membrane thickening, with joint deformities and chronic synovitis (mono or oligoarticular), symptoms similar as those found in rheumatoid arthritis.

So far, there is no effective treatment for the accidents with Pararama, since neither the toxic components of the bristles of the caterpillar nor the mode of action of the venom are known. However, systemic corticosteroids treatment has been used, in the belief that this would prevent the onset or attenuate the chronic disease [7,12,13]. In case of infection, due to the scratching and unhygienic conditions, the disease may progress to pyogenic arthritis [11].

Despite being a serious problem in occupational medicine and a social problem affecting the Brazilian Amazon region, since the rubber tappers can no longer return to their activities, which are the source of their livelihood, studies on the pathogenesis of Pararama are scarce. Thus, the aim of the present study was to analyze the biological and immunochemical characteristics of *Premolis semirufa* caterpillar's bristles crude extract.

Materials and Methods

Chemicals and reagents

Triton X-100, Tween-20, Hepes, bovine serum albumin (BSA), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), ortho-phenylenediamine (OPD), phosphatidylcholine, bromothymol blue, gelatin, Coomassie

Brilliant Blue R-250, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1,10-phenanthroline, hyaluronic acid, anti-mouse IgG horseradish labelled with peroxidase (IgG-HRPO), native salmon sperm DNA and collagen from bovine tracheal cartilage were purchased from Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Anti-mouse IgM, -IgG1, -IgG2a HRPO-conjugate and anti-mouse IgG2b, IgG3 biotin-conjugate were purchased from BD Bioscience (California, USA). Anti-mouse IgG labelled with alkaline phosphatase (IgG-AP), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) were from Promega Corp. (Wisconsin, USA). Brij-35 P was purchased from Fluka – BioChemika (Werdenberg, Switzerland). Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) substrates were synthesized and purified according to Araújo *et al.* [14].

Caterpillar bristles extract

Caterpillars from *Premolis semirufa* were collected in the city of São Francisco do Pará, Pará, Brazil, and maintained at the Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, SP, Brazil. The bristles extract was prepared after exposing the caterpillars to 4°C for few minutes; the bristles were cut off with scissors at their insertion in the tegument, avoiding any tegument incision and, then, suspended in cold phosphate-buffered saline - PBS (8.1 mM sodium phosphate, 1.5 mM potassium phosphate, 137 mM sodium chloride and 2.7 mM potassium chloride, pH 7.2). This suspension was macerated with the aid of a glass stick, homogenized and centrifuged at 560×g for 20 min at 4°C. The supernatant was collected and its protein content was determined by using the BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, MA, USA). Supernatant aliquots were stored at -80°C until use. Venoms from *Micrurus hemprichii* and *Bothrops jararaca* snakes, which were used as positive controls in the assays for determination of PLA₂ and hyaluronidase activities, respectively, were supplied by Herpetology Laboratory from Butantan Institute, SP, Brazil. The authorization to access the venoms of *Premolis semirufa* caterpillar, *Bothrops jararaca* and *Micrurus hemprichii* snakes were provided by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources - IBAMA - a Brazilian Ministry of the Environment's enforcement agency (permission no. 01/2009).

Ethics statement

BALB/c strain male mice aged 2 months and weighing 18–22 g were obtained from Central Animal Breeding from Butantan Institute, SP, Brazil. All the procedures involving animals were in accordance with the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian Society of Animal Science and the National Brazilian Legislation no. 11.794/08. Protocols were approved by Institutional Animal Care and Use Committee (protocol approval number 413/07).

Electrophoresis

The caterpillar bristles extract (10 µg of protein) was solubilized in sample buffer, using non-reducing and reducing conditions, and separated on 12% SDS-PAGE gel [15]. Molecular weight markers were included in all runs. Gels were stained with silver [16].

Phospholipase A₂ activity

The Phospholipase A₂ activity of *Premolis semirufa*'s bristles extract was determined as described by Price III [17], with some modifications. Samples of the extract (4 µg or 16 µg of protein), 20 µL HCl (positive control), or 20 µL PBS (negative control) were mixed in 96-well microtitre plates. 180 µL of an assay mixture containing 10 mM Triton X-100, 5 mM phosphatidylcholine, 1.5 mM HEPES, 10 mM calcium chloride, 0.9% sodium chloride

Figure 1. *Premolis semirufa* caterpillar. Pararama in the trunk of *Hevea brasiliensis* in São Francisco do Pará, Pará, Brazil. Photo by Rosana de Fátima Shoji.

doi:10.1371/journal.pntd.0001531.g001

and 0.03% (wt./vol.) bromothymol blue dye in water, at pH 7.5 and 37°C, were added. The plate was analyzed at λ 620 nm in a spectrophotometer (Multiskan EX, Labsystems, Finland) after 5 min of incubation and the linearity of the reaction was verified by linear regression (MSExcel 2007). All enzymatic assays were performed in duplicate and expressed as specific activity (nmol/min/ μ g). As positive control for PLA₂ activity, venom of the snake *Micrurus hemprichii* (4.0 μ g) was used.

Hyaluronidase activity

Hyaluronidase activity was measured as described by Pukrittayakamee [18], with slight modifications. In a microtitre plate, *Premolis semirufa*'s bristles extract (8.0 μ g of protein) were mixed with 25 μ L of the hyaluronic acid (0.5 mg/mL) and acetate buffer (0.2 M sodium acetate-acetic acid, pH 6.0, containing 0.15 M NaCl), in a final volume of 100 μ L, and incubated for 30 min at 37°C. After incubation, 200 μ L of CTAB 2.5% in NaOH 2% was added to the samples. The absorbances were measured at λ 405 nm in a spectrophotometer (Multiskan EX, Labsystems, Finland) against a blank containing hyaluronic acid, acetate buffer and 250 μ L of CTAB. All assays were performed in duplicate. Results were expressed in units of turbidity reduction (UTR) per mg of extract. *Bothrops jararaca* snake venom (8.0 μ g) was used as positive control.

Proteolytic activity

Zymography. Samples of the extract (0.5 μ g of protein) were incubated, at 37°C for 30 min, in the presence or absence of 10 mM

1,10-phenanthroline or PMSF, metallo- and serineproteases inhibitors, respectively, solubilized in non-reducing sample buffer and separated on 10% SDS-PAGE gels containing 1 mg/mL gelatin. The gels were washed for 30 min at room temperature in 2.5% Triton X-100, and incubated for 12 h at 37°C in zymography buffer (50 mM Tris-HCl, 200 mM sodium chloride, 10 mM calcium chloride, 0.05% Brij-35 P; pH 8.3). Following incubation, the gels were stained with 0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250. The gelatinolytic activity was detected as unstained bands and densitometry analysis of zymography gels was performed using the Kodak Molecular Imaging Software.

Fluorimetric test. The enzymatic activity of the caterpillar bristles extract was determined using the fluorescence resonance energy transfer (FRET) substrate peptide Abz-FRSSRQ-EDDnp. Samples of the extract (1 μ g of protein) were mixed with 5 μ M of FRET substrate, in cold phosphate-buffered saline (PBS). The relative inhibition was determined in parallel using in the assays 5 mM PMSF or 5 mM 1,10-phenanthroline, inhibitors of serine- and metalloproteases, respectively. The stock solutions and the work concentration of the synthetic inhibitors used in the characterization of the venoms proteolytic activity were made as described [19].

The reactions were monitored by measuring hydrolysis in a fluorescence spectrophotometer (Victor 3TM, Perkin-Elmer, MA, USA) using 96-well microtitre plates (λ_{em} = 420 nm and λ_{ex} = 320 nm) at 37°C, as described by Araújo *et al.* [14]. Control samples were prepared in the presence of an equal volume of ethanol, used

in inhibitors stock solutions. All assays were performed in duplicate and the specific proteolytic activity was expressed as units of free fluorescence of cleaved substrate *per min per µg* of extract (UF/min/µg).

Determination of the median lethal dose (LD₅₀)

Lethality was assessed by intraperitoneal injection of increasing amounts of bristles extract in 200 µL of PBS into male BALB/c strain of mice. Four animals were used for each dose and the LD₅₀ was calculated by probit analysis of death occurring within 72 h after extract injection [20].

Evaluation of the edema

The possible edematogenic activity of the caterpillar bristles extract was evaluated by BALB/c mice intraplantar injection of 50 µL of sterile PBS containing 10 µg (protein) of the extract into the left hind footpad. As control group, mice received 50 µL of sterile PBS into the left hind footpad. The animals were injected, seven times, at intervals of two weeks. Before extract or PBS inoculations, the thickness of each left footpad (Th₀) was determined using a caliper measurement (Mitutoyo, Sul American Ltda.). Subsequent readings of the thickness (Th_t) after extract or PBS injections were carried out at 30, 60, 120 and 180 min, and compared to the initial readings. The edema (E) was calculated as follows: $E [\%] = [(Th_t - Th_0) / Th_0] \times 100$. Where Th_t is the thickness (mm) of the footpad at time “t” after the injection of the extract or PBS. Th₀ is the thickness (mm) of the footpad before the injection of the extract or PBS.

Histopathological analysis

BALB/c mice, injected as described above, were euthanized 24 h after the 7th extract inoculation, their hind limbs removed and processed for histological analysis. The paws were immersed in 10% neutral buffered formaldehyde solution for 24 h. After decalcification, the tissues were embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The H&E preparations were microscopically observed and examined for the presence of inflammatory cell infiltration. As control, paws injected with an equal volume of PBS, were collected, processed and analyzed as described above. All tissue sections were examined under a light microscope (Leica DM2500; Wetzlar, Germany).

Anti-bristles extract mouse serum

The antiserum against *Premolis semirufa*'s bristles extract was obtained from mice inoculated with 10 µg (protein) of the extract or PBS, into the left hind footpad, seven times at two weekly intervals, without adjuvant. Bleeding was carried out, by retro-orbital plexus with a Pasteur pipette, 48 h after the injection. The blood was allowed to clot at room temperature for 15 min and then was left at 4°C for 6 h. After centrifugation at 560×g for 15 min at 4°C, the serum was collected and immediately frozen at −20°C until use.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Detection of antibodies against bristles extract components. ELISA plates (Costar®, Corning Inc., USA) were coated with 100 µL of the caterpillar bristles extract (10 µg protein/mL; overnight at 4°C). Plates were blocked with 5% BSA in PBS and incubated with dilutions of the anti-caterpillar bristles extract or normal sera obtained from BALB/c mice. After 1 h of incubation at 37°C, plates were washed with PBS/0.05% Tween 20 and incubated with the specific anti-mouse IgG, -IgM, -IgG1 or

-IgG2a HRP-conjugate or with anti-mouse IgG2b, -IgG3 biotin-conjugate for 1 h at 37°C. For biotin conjugated antibodies, an additional step of incubation with HRP-conjugated streptavidin for 30 min at room temperature was carried out. Plates were washed and the reactions developed with OPD substrate, according to the manufacturers conditions (Sigma). The absorbances were recorded in a spectrophotometer (Multiskan EX, Labsystems, Finland) at λ 492 nm. The titer was established as the highest antiserum dilution, which produced an absorbance twice greater than that determined for the normal serum, and expressed as log₂.

For the detection of anti-DNA or anti-Collagen type II antibodies. The presence of anti-DNA or anti-collagen type II IgM and IgG antibodies in sera obtained from mice inoculated or not with the caterpillar bristles extract were also determined by ELISA. Briefly, Immulon 2-HB 96-well flat bottom microtiter plate (Thermo Scientific, NY, USA) were coated with native salmon sperm DNA (1 µg/well), diluted in 50 µL of 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 or with collagen from bovine tracheal cartilage (3 µg/well), diluted in 100 µL of PBS, and incubated overnight at 4°C. Plates were blocked with 5% BSA in PBS at 37°C for 2 h and dilutions of the sera were added and incubated for 2 h at room temperature. Sera from [NZBxNZW]F₁ mice with systemic lupus erythematosus autoimmune disease were obtained as described [21] and used as positive control for the presence of autoantibodies. Plates were washed with PBS/0.05% Tween 20 and incubated with the specific anti-IgG or anti-IgM HRP-conjugates for 1 h at room temperature. Plates were washed and the reactions developed with OPD substrate, according to the manufacturers conditions (Sigma). The absorbances were recorded in a spectrophotometer (Multiskan EX, Labsystems, Finland) at λ 492 nm.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by Students't-test using GraphPad Prism software. Differences were considered statistically significant when *P* values were *P*<0.05, *P*<0.01 and *P*<0.0001.

Results

Electrophoretic characterization of the *Premolis semirufa*'s bristles extract

Extract samples collected from *Pararama* bristles were prepared in PBS and analyzed for protein composition using SDS-PAGE, under reducing and non-reducing conditions. Figure 2 shows that the electrophoretic profiles of the extract, analyzed under both conditions, were similar, showing components with *M_r*s between 20 and 200 kDa and the presence of an intense band with *M_r* around 82 kDa.

Toxic activities of the *Premolis semirufa*'s bristles extract

In order to assess *Premolis semirufa*'s bristles extract toxicity, the extract was tested using a variety of functional biochemical assays, to identify if it contained activities frequently found in animal venoms. The lethal toxicity of the bristles extract was determined in groups of BALB/c mice, after intraperitoneal injection of increasing protein concentrations of the extracts (1.2 mg/kg, 2.3 mg/kg and 6.8 mg/kg) and no death was observed after 72 hours of the inoculation (data not shown). Moreover, in this condition, no manifestation of discomfort was observed in any of the envenomated animals.

The phospholipase A₂ (PLA₂) activity of *P. semirufa* caterpillar bristles extract was assessed by a colorimetric method after incubating samples of 4 or 16 µg of the extract with phosphati-

Figure 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of *Premolis semirufa*'s bristles extract. Samples (10 μ g of protein) of the extract were analyzed by SDS-PAGE gel (12%) under non-reducing [A] and reducing conditions [B] and silver staining.
doi:10.1371/journal.pntd.0001531.g002

dylcholine, the substrate of the PLA₂. Figure 3A shows that the venom of the caterpillar showed no PLA₂ activity, while the *Micrurus* snake venom (4 μ g), used as positive control, presented a high lipase activity on phosphatidylcholine.

The hyaluronidase activity of the caterpillar bristles was measured incubating samples of the extract (8 μ g of protein) with hyaluronic acid, the substrate of the reaction. As positive control of the reaction, it was used the venom from *Bothrops jararaca* snake. Figure 3B shows that the bristles extract present significant hyaluronidase activity.

The proteolytic activity of the bristles extract (1 μ g) was tested using the fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide Abz-FRSSRQ-EDDnp as substrate. Figure 3C shows that the extract efficiently hydrolyzed the FRET peptide, and that this activity was strongly inhibited by the serine protease inhibitor PMSF (88%) and partially by the metalloprotease inhibitor phenanthroline (50%).

Figure 3D shows that a 82 kDa component, the Mr corresponding the intense protein band observed after silver staining (Figure 2), has a high gelatinolytic activity, as measured by zymography (Fig. 3 - line 1). This activity was significantly inhibited by PMSF (Fig. 3 - line 3), a serineprotease inhibitor, and poorly blocked by phenanthroline (Fig. 3 - line 2), a metalloprotease inhibitor.

Edema inducing activity

BALB/c mice were injected seven times, at intervals of two weeks, with 10 μ g of the extract proteins into the foot pad of the left hind leg. Controls animals were injected with PBS. The intraplantar injection of *Premolis semirufa* caterpillar bristles extract, caused discomfort to the animals (pain) and a significant increase in the paw volume, as compared to that induced by injection of the vehicle, i.e., PBS (Figure 4A and B). The edema induced by both, extract and PBS, was detected as early as 5 min post-injection and peaked at 30 min. The increase in paw volume was observed until 300 min after injection of the extract, while the increase induced by PBS was resolved 120 min after injection. The comparison of the edematogenic responses, along the seven inoculations of the extract or PBS, determined at the peak of the reaction, i.e., at 30 min is shown in Figure 4C. The edematogenic responses were significant and successively more intense after the inoculations of the extract compared to PBS and reached a maximum after the 4th injection.

Histopathological analysis

BALB/c mice, injected as described above, were euthanized 24 h after the 7th extract or PBS inoculations, their hind limbs removed and processed for histological analysis. Figure 5B shows that the bristles extract injection resulted in the establishment of a pronounced inflammatory reaction, characterized by the presence of mixed inflammatory cellular infiltrate distributed throughout the tissue. Furthermore, the connective tissue was increased, partially occupying areas where, in normal tissues, structures such as sweat glands and fat tissue were found (Figures 5A and C), and initiating a fibrotic process (Figure 5D).

Immunogenicity of the Pararama bristles extract antiserum

The immunogenicity of *Premolis semirufa* caterpillar bristles extract was assessed by ELISA, using sera obtained from BALB/c mice subcutaneously inoculated with 10 μ g of the extract proteins or PBS. Figure 6A shows that the repeated inoculations of the extract, but not of PBS, induced a high IgG antibody response. In addition, analysis of antibody classes and subclasses revealed that the sera obtained from animal injected with the extract presented higher IgG1, IgG2a, IgG2b and IgM titers as compared to the sera collected from PBS injected mice. IgG1 sera titers, determined for envenomated animals, were higher than the others antibodies isotype/subclasses and no IgG3 antibodies could be detected in these samples (Figure 6B).

Detection of the anti-DNA and anti-Collagen type II autoantibodies

The presence of anti-DNA or anti-Collagen type II IgM and IgG autoantibodies in sera from BALB/c mice inoculated with extract or PBS, was evaluated by ELISA. Anti-DNA or anti-Collagen type II IgG antibodies were not detected in sera from bristles extract inoculated animals, while high titers of these antibodies were detected in the serum of mice with systemic lupus erythematosus (SLE) autoimmune disease. Anti-DNA and anti-Collagen type II IgM antibodies were not detected in bristles extract injected or SLE mice (data not shown).

Discussion

We have investigated activities of the bristles extract of Pararama, a caterpillar responsible for the occupational disease 'Pararama associated phalangeal peri-arthritis'. Until now nothing was known about the composition of its venom.

Figure 3. Toxic activities of the *Premolis semirufa*'s bristles extract. [A] PLA₂ activity: samples of the total extract proteins (4 μg or 16 μg) were incubated, for 5 min at 37°C, with 5 mM phosphatidylcholine. As positive control for PLA₂ activity, total venom proteins of the snake *Micrurus hemprichii* (4.0 μg) was used. Results are representative for three separate experiments and expressed as nanomoles acid per minute per μg of venom. *** $P < 0.0001$. [B] Hyaluronidase activity: samples of the extract proteins (8.0 μg) were incubated with the hyaluronic acid (0.5 mg/mL) at 37°C for 30 min. As positive control, venom proteins of *Bothrops jararaca* (8.0 μg) was used. The absorbance was measured in a spectrophotometer at λ 405 nm and the hyaluronidase activity expressed as reduction percentage of the turbidity (UTR). Results are representative for three separate experiments and expressed as specific activity (UTR/mg) ± SD. *** $P < 0.0001$. [C] Proteolytic activity determined by using Abz-FRSSRQ-EDDnp as substrate: samples of the bristles extract proteins (1 μg), pre-incubated or not for 20 min with 5 mM PMSF or 5 mM 1,10-phenanthroline, were incubated with the FRET substrate (5.0 μM). All enzymatic assays were performed in duplicate and the results expressed as specific activity (U/mg) ± SD. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$: significant differences between the mean values obtained with the extract and the mean values obtained with the inhibitors. [D] Proteolytic activity analyzed by zymography: samples (0.5 μg of protein) of the extract were incubated in the absence (line 1) or presence of 10 mM 1,10-phenanthroline (line 2) or PMSF (line 3), inhibitors of metallo- and serine- proteases, respectively, submitted to electrophoresis and subsequently incubated, at 37°C for 12 h, in 50 mM Tris-HCl, pH 8.3. Following incubation, the gel was stained with 0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250 and the gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a dark background. doi:10.1371/journal.pntd.0001531.g003

In this paper we present, for the first time, some of the biochemical and biological properties of *Premolis semirufa*'s bristles extract. Electrophoretic analysis of the extract showed that it contained a great diversity of proteins, with Mr ranging from 20 to 200 kDa, with a major protein band of 82 kDa, contributing to over 90% of the protein content. No significant difference in the protein profile was observed in the extracts submitted to reducing or non-reducing conditions.

We subjected the venom to a variety of functional biochemical assays, to identify if it contained activities frequently found in animal venoms. Hyaluronidase activity is present in many animals venoms and its activity potentiates the toxicity of the venom, promoting loss of extracellular matrix integrity of soft connective tissues, surrounding the blood vessels, increasing the systemic influx of toxins and, thus, facilitating the dispersion of the toxic components [22]. *Premolis semirufa*'s bristles extract showed significant hyaluronidase activity, suggesting that this enzyme

may participate in the genesis of the joint immobility, since hyaluronic acid is an abundant component of the intercellular matrix of the skin, cartilage and synovial fluid, playing an important role as stabilizer and lubricant of the joints [23]. The hyaluronic acid degradation may explain, in part, the changes in the joint and loss of the cartilage and bone structure, seen in the paramyia induced disease.

Zymography analysis showed that the 82 kDa component found in the caterpillar bristles extract possesses gelatinolytic activity. Gelatinases are capable of degrading types IV, V, VII and XI collagens, present in bone and articular cartilage, and may regulate their remodeling [24]. Using specific inhibitors for metallo- and serine- proteases we identified the gelatinase as a serine protease. The bristles extract also demonstrated high proteolytic activity towards the FRET peptide Abz-FRSSRQ-EDDnp. The use of PMSF showed that serineproteases were largely responsible for this while using the metalloproteases

Figure 4. Edematogenic action of *Premolis semirufa*'s bristles extract. Edema was induced by intraplantar administration of 0.05 ml of sterile PBS [A] or samples of 10 µg of protein of the caterpillar bristles extract [B] into the left hind footpad. Paw edema was determined, by measuring paw thickness using a caliper at 0, 30, 60, 120 and 180 min after administration of extract or buffer. [C] Comparison of the edematogenic responses, after 30 min of PBS or extract injections, during the seven inoculations. Results were calculated by the formula: $E(\%) = [(Th_t - Th_0)/Th_0] \times 100$; where Th_t is the thickness (mm) of the rear left footpad at "t" time after the injection of the extract or PBS, Th_0 is the thickness (mm) of the rear left footpad before the injection of the extract or PBS. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$: significant differences between the mean values of buffer group and the mean values of *P. semirufa* group. doi:10.1371/journal.pntd.0001531.g004

inhibitor phenanthroline demonstrated that metalloproteases were involved as well. Venom serineproteinases have a highly diverse pharmacological potential, including actions on proteins of the coagulation cascade, activation of factor V, activation of protein C, fibrinogenolysis, activation of the plasminogen and induction of platelet aggregation [25]. Thus, it is possible to propose that serineproteinases, with gelatinolytic activity and other proteolytic activities, may be involved in the process of cartilage and joint degradation produced by contact with the bristles of *Pararama* [26]. Metalloproteinases, abundant molecules in snake venoms, are responsible for the development of local tissue injury and the occurrence of bleeding [27], being able to degrade important components of the matrix, such as laminin and type IV collagen [28]. Thus, the presence of different classes of proteases in the *Pararama* bristles extract may contribute to the tissue injury seen in the caterpillar human accidents.

In many animal venoms, Phospholipase A_2 (PLA $_2$) is important for digestion and immobilization of the prey, as well as responsible for some pathologies observed in humans stung/bitten by bees, wasps, spiders and snakes [29–31]. Phospholipase A_2 activity has also been described in crude bristles extract of the *Euproctis* (Lymantriidae) caterpillar [32] and more recently in bristles crude extract of *Lonomia obliqua* (Saturniidae) [33]. However, *Premolis semirufa*'s bristles extract did not show phospholipase A_2 activity.

The present study also aimed to evaluate the toxicity of the bristles extract using a murine model and, under the experimental

conditions used, no discomfort or death was observed. On the other hand, the intraplantar injection of the bristle extract, as used in histopathological/edema studies, caused a strong discomfort to the animals, suggesting that they were feeling pain. Further studies will be conducted in order to analyze the possible hyperalgesic properties of the *pararama* venom. Toxic venom proteins serve in a number of adaptive functions such as immobilizing, paralyzing, killing, liquefying prey and deterring competitors. Other proteins may act synergistically by enhancing the activity or spreading of toxins. In contrast to animals such as snakes and scorpions, which use venoms to immobilize prey and to facilitate its digestion, caterpillars feed on leaves; their venoms are used solely for defense [34] and, therefore, has not to be necessarily lethal.

The first intraplantar injection of *Premolis semirufa*'s bristles extract produced a swelling which was detected after 5 min, peaked at 30 min and disappeared within 300 min after injection, while the response to PBS disappeared within 120 min. The prolonged and increased induction of the edema upon 1st exposure was likely to be mediated by the action of the venom, being pro-inflammatory itself or by inducing inflammatory mediators, locally released or synthesized in the course of the envenomation, all of which would increase the permeability of the microvessels. The response induced 30 min after extract injection, gradually increased over the inoculations and reached a maximum after 4 injections. This response was significantly higher than the response to PBS. In addition, the multiple extract injections in mice

Figure 5. Analysis of the inflammatory process induced by *Premolis semirufa*'s bristles extract. Mice were injected with samples of 10 μ g of protein of bristles extract or with PBS, seven times, at intervals of two weeks and 24 h after the last injection, the whole paws were harvested from euthanized animals, sectioned and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Panels correspond to paws sections from mouse injected with PBS [A, A1, A2] and *Premolis semirufa*'s bristles extract [B, B1]. Epithelial (ep), connective (co), fat tissue [Panel A: rectangle A1] and sweat glands [Panel A: rectangle A2]. Note that the fat tissue and sweat glands were replaced by connective tissue in the bristles extract injected paws [panels B and B1]. In controls, all structures remained preserved and there was no inflammatory process in the paws sections from mouse injected with PBS [Panels: A, A1 (zoom in the rectangle A1 from panel A) and A2 (zoom in the rectangle A2 from panel A)]. In bristles extract injected paws a marked inflammatory cell infiltration, consisting of neutrophils was observed (Panel B1: thin arrows), while the amount of fat tissue and sweat glands was reduced [Panels: B and B1 (zoom in the rectangle B1 from panel B)]. Panels A and B: original magnification $\times 100$; Panels A1, A2 and B1: original magnification $\times 1000$. doi:10.1371/journal.pntd.0001531.g005

footpads induced a pronounced inflammatory reaction, characterized by the presence of mixed inflammatory infiltrate, with increase of the conjunctive tissue and beginning of the fibrosis process. In a previous study using a rat model, Costa and collaborators [8] have shown that inflammation was induced by the injection of saline extract of pararama bristles, with the presence of a large number of inflammatory cells around the site of injury.

Investigation on the *P. semirufa*'s bristles extract immunogenicity revealed that the repeated inoculations of the extract, in the absence of adjuvants, induced a strong immune response, with high antibody titers. Moreover, data showed that the sera obtained from animal injected with the extract presented higher IgG1 titers than other IgG subclasses, indicating the predominance of a Th2 immune response, since this particular antibody subclass is mainly

induced by the presence of Th2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 [35].

The disease caused by the contact with the *Premolis semirufa*'s bristles shares many features with those found in patients with rheumatoid arthritis (RA), a systemic and chronic illness, characterized by severe synovial inflammation and cartilage and/or bone destruction [36]. Autoantibodies, such as anti-collagen type II and anti-DNA, are found in the vast majority of patients [37]. Analysis of the presence of anti-DNA or anti-collagen type II antibodies revealed that these autoantibodies were not present in the sera obtained from mice inoculated with the *Premolis semirufa*'s bristles extract.

Together, these data show the existence, in the *Premolis semirufa*'s bristles extract, of a mixture of different enzymes that may be acting together in the generation and development of clinical

Figure 6. Immunogenicity of Pararama bristles extract. [A] ELISA plates were coated with 1.0 µg of extract proteins/well and incubated with different dilutions of the sera obtained from BALB/c mice inoculated with the extract or PBS, one, four or seven times, followed by anti-mouse IgG-HRPO-conjugated (1:30,000). The results were expressed as the mean of absorbance value $\pm$ SD. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$: significant differences between the sera obtained after extract or PBS inoculations and pre-immune serum. [B] Determination of IgG1, IgG2a, IgG2b and IgM antibody titers of sera collected from mice inoculated with extract, by ELISA. The titers were established as the highest antiserum dilution which produces an absorbance twice greater than that determined for the normal serum and expressed as $\log_2$. *** $P < 0.0001$: significant differences between the titers obtained for IgG1 and the other antibodies. doi:10.1371/journal.pntd.0001531.g006

disease manifestations. Moreover, this study demonstrates the production of high antibody titers in mice inoculated with the extract, which may also contribute to genesis of inflammatory reactions observed in the envenomation. The absence of autoantibodies indicate that the molecular mechanisms causing disease after multiple contact with the *Premolis semirufa*'s bristles differ from that observed in chronic synovitis, such as the rheumatoid arthritis. The bristles toxic action, high antibody response with the formation of immune complexes and complement activation may also play a role in the establishment of the disease. These aspects will be further investigated in future studies.

References

- Kelen EMA, Picarelli ZP, Duarte AC (1995) Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemileucinae). *J Toxicol Rev* 14: 283–308.
- Zannin M, Lourenço DM, Motta G, Dalla-Costa LR, Grando M, et al. (2003) Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar. *Thromb Haemost* 89: 355–364.
- Duarte CA, Caovilla J, Lorini I, Lorini D, Mantorani G, et al. (1990) Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. *J Bras Nefrol* 12: 184–187.
- Ministério da Saúde (1992) Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Fundação Nacional da Saúde. Brasília. 58 p.
- Costa RM (1981) Pararamose: uma reumatose ocupacional. *Revista Brasileira de Reumatologia* 21: 132–136.
- Dias LB (1990) Acidentes por Pararama: pararamose. In: Schvartsman S, ed. Plantas venenosas e animais peçonhentos. São Paulo: Sarvier. pp 238–241.
- Dias LB, Azevedo MC (1991) Pararama: Doença dos Seringais. In: Veronesi R, ed. Doenças infecciosas e parasitárias. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp 988–989.
- Costa RM, Silva NP, Teves DC, Costa ML, Ferraz MB, et al. (1995) Experimental arthritis induced by bristles from a "Lepidoptera", "*Premolis semirufa*": histopathological study in rats. *Revista Brasileira de Reumatologia* 35(2): 61–64.
- Costa RM, Silva NP, Leser PG, Andrade LEC, Gabriel JR A, et al. (1995) Activity of bristles from an Amazonian Lepidoptera, "*Premolis semirufa*", on the human complement system. *Revista Brasileira de Reumatologia* 35(3): 143–146.
- Dias LB, Rodrigues MG (1997) Pararamose. In: De Leão NQ, coordinator. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: CEJUP; UEPa: Instituto Evandro Chagas. 886 p.
- Costa RM (2003) Pararamose. In: Cardoso JLC, Wen FH, França FOS, Malaque CMS, Haddad Jr. V, eds. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. pp 233–236.
- Dias LB (1986) Pararama. In: Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública. pp 799–809.
- Cardoso AEC, Haddad-Júnior V (2005) Acidentes por lepidópteros (larvas e adultos de mariposas): estudos dos aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 80(6): 571–578.
- Araújo MC, Melo RL, Cesari MH, Juliano MA, Juliano L, et al. (2000) Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* 39(29): 8519–25.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–5.
- Morrissey JH (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117(2): 307–10.
- Price III JA (2007) A colorimetric assay for measuring phospholipase A₂ degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. *J Biochem Biophys Methods* 70(3): 441–4.
- Pukrittayakamee S, Warrell DA, Desakorn V, McMichael AJ, White NJ, et al. (1988) The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon* 26(7): 629–37.
- Beynon RJ, Bond JS (2001) Editors. Proteolytic enzymes: a practical approach. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.
- Finney PJ (1971) Probit Analysis. third ed. Cambridge: Cambridge University Press. 333 p.
- Marengo EB, de Moraes LV, Melo RL, Balan A, Fernandes BL, et al. (2011) A *Mycobacterium leprae* Hsp65 mutant as a candidate for mitigating lupus aggravation in mice. *PLoS One* 6(9): e24093.
- Girish KS, Jagadeesha DK, Rajeev KB, Kemparaju K (2002) Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. *Mol Cell Biochem* 240(1–2): 105–110.
- Laurent TC, Fraser JRE (1992) Hyaluronan. *FASEB J* 6(7): 2397–404.
- Reynolds JJ (1996) Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Diseases* 2: 70–76.
- Serrano SMT, Maroun RC (2005) Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45(8): 1115–32.
- Costa RM, Atra E, Ferraz MB, Silva NP, Souza JM, et al. (1993) "Pararamose": an occupational arthritis caused by lepidoptera (*Premolis semirufa*). An epidemiological study. *Revista Paulista de Medicina* 111: 462–465.
- Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C (2005) Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45(8): 997–1011.
- Baramova EN, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW (1990) Identification of the cleavage sites by a hemorrhagic metalloproteinase in type IV collagen. *Matrix* 10: 91–97.
- Dennis EA (1994) Diversity of group types, regulation, function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 269: 13057–13060.
- França FOS, Benvenuti LA, Fan HW, Dos Santos DR, Hain SH, et al. (1994) Severe and fatal mass attacks by 'killer' bees (Africanized honey bees-Apis mellifera scutellata) in Brazil: clinopathological studies with measurement of serum venom concentrations. *Q J Med* 87(5): 269–282.
- Dennis EA (1997) The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 22(1): 1–2.
- De Jong MC, Kawamoto F, Bleumink E, Kloosterhuis AJ, Meijer GT (1982) A comparative study of the venom of Euproctis caterpillars. *Toxicon* 20: 477–485.
- Seibert CS, Tanaka-Azevedo AM, Santoro ML, Mackessy SP, Soares Torquato RJ, et al. (2006) Purification of a phospholipase A₂ from *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract. *Biochem Biophys Res Commun* 342(4): 1027–33.
- Schmidt JO (1982) Biochemistry of insect venoms. *Annu Rev Entomol* 27: 339–68.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MA, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136(7): 2348–57.
- Grassi W, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C (1998) The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol* 27(Suppl 1): S18–S24.
- Nandakumar KS, Holmdahl R (2006) Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthritis Res Ther* 8: 223.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Luiz Juliano Neto (Biophysics Department, UNIFESP, São Paulo, Brazil) for kindly providing the FRET substrate.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IMVB RMGdA FCVP OAS DVT. Performed the experiments: IMVB RMGdA GPQ OAS. Analyzed the data: IMVB SLMRA FCVP OAS CWvdb DVT. Contributed reagents/materials/analysis tools: RMGdA FCVP OAS DVT. Wrote the paper: IMVB RMGdA CWvdb DVT.

Toxic components of *Premolis semirufa* caterpillar bristles activate a potent cellular immune response

Isadora Maria Villas-Boas, Rute Maria Gonçalves-de-Andrade, Carla Cristina Squaiella-Baptistão, Osvaldo Augusto Sant'Anna, Denise V. Tambourgi*

Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil;

*Address correspondence to Denise V. Tambourgi, Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, Av. Prof. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel 55-11-2627-9727; Fax: -55-11-2627-9727.

E-mail: dvtambourgi@butantan.gov.br

Keywords: *Premolis semirufa*, caterpillar, envenomation, bristles toxic components, inflammation, antibodies, cytokines

Abstract

Background: The Brazilian moth *Premolis semirufa* (Walker, 1856), usually called pararama, is a parasite of the rubber *Hevea* genus. Contact with the bristles causes symptoms of acute inflammation. A chronic inflammatory reaction frequently occurs in individuals after multiple contacts, and this reaction is characterised by articular synovial membrane thickening with joint deformities, common characteristics of chronic synovitis. Extract from the bristles has been shown to induce an intense inflammatory response in a murine model, and this reaction was characterised by the presence of neutrophils in the paw tissues of injected mice and a strong, specific antibody response. There is not yet an effective treatment for incidents involving contact with pararama.

Methodology/Principal Findings: In this study, we evaluated the phenotype of the immunological response and cytokine production in BALB/c mice subcutaneously injected in the footpad with *P. semirufa* bristle extract or sterile saline (control) seven times at 15-day intervals. An analysis of cells from the draining lymph node by flow cytometry showed that the absolute numbers of TCD4, TCD8 and B lymphocytes, as well as the activation states of these cells, were higher in the extract-treated group. Furthermore, immunohistochemistry and immunofluorescence showed a mixed inflammatory infiltrate composed of neutrophils and macrophages at the inoculation site. In addition, an analysis of paw cytokines showed elevated levels of IL-6, IL-12, IL-10, IL-17 and IL-23 after the 7th inoculation.

Conclusion: In conclusion, these data provide evidence of pro-inflammatory changes in the phenotypes of immune cells and cytokine production in animals subjected to injections with an extract from *Premolis semirufa* bristles, which may explain the intense and prolonged inflammatory response that characterises this disorder.

Author Summary

The Brazilian caterpillar *Premolis semirufa* (Lepidoptera: Arctiidae), which inhabits rubber plantations in the Amazon region, causes a chronic inflammatory reaction with consequent immobilisation of the joints after multiple contacts, in contrast to the clinical manifestations presented by other caterpillar stings. A specific treatment for this disease does not exist, although corticosteroids are frequently administered. The current study was carried out to evaluate the immune response induced by pararama venom components in a murine model. An analysis of the immune response in the footpad and lymph node showed the presence of a large number of neutrophils and macrophages in the paw tissues of the envenomated mice as well as the proliferation/migration and activation of T and B lymphocytes. Moreover, local evaluations demonstrated elevated levels of pro-inflammatory cytokines. These data show, for the first time, that the potent immune response induced by the toxic components of pararama venom may play an important role in the establishment of the disease.

Introduction

The Brazilian moth *Premolis semirufa* (Walker, 1856), usually called pararama in its larval stage, belongs to the Arctiidae family and inhabits rubber plantations in the Amazon region, feeding off the rubber tree *Hevea brasiliensis*. Contact with its bristles generally causes an instant intense itching followed by symptoms of acute inflammation, such as pain, heat and redness, that last up to seven days after the first incident [1,2]. Chronic symptoms, which frequently occur in individuals after multiple contacts are characterised by synovial membrane thickening, with joint deformities and chronic synovitis (mono- or oligoarticular) that may progress to joint immobility [3].

The disease caused by contact with the bristles of *Premolis semirufa* shares many features with the symptoms of inflammatory joint disease, unlike the clinical manifestations presented by the venom of other caterpillars, such as the erythema, kidney and liver damage caused by *Dirphia* sp. (Saturniidae) [4,5]; allergic reactions induced by contact with *Euproctis chrysorrhea* (Lymantriidae) [6]; and homeostatic abnormalities such as blood coagulation and fibrinolysis, as well as bleeding through the mucous and even brain (which may lead to death), caused by contact with *Lonomia* sp. (Saturniidae) [7, 8]. The most common form of inflammatory joint disease is rheumatoid arthritis (RA), a chronic, systemic inflammatory disorder that causes inflammation in the synovium [9, 10].

In this disease, CD4⁺ T cells, B cells and macrophages infiltrate the synovium, where they are activated and contribute to local destruction. Additionally, neutrophils accumulate in the synovial fluid, where they engulf immune complexes and release proteolytic enzymes. Furthermore, a broad array of macrophage and fibroblast cytokines, including interleukin (IL)-1, IL-6, IL-15, IL-18, tumour-necrosis factor (TNF)- α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), various chemokines, and many others, are produced by the rheumatoid synovium. These molecules perpetuate inflammation, as do proteases that contribute to cartilage destruction [11]. Small but physiologically relevant amounts of IFN- γ and IL-17 cytokines are expressed in RA, which may contribute to immune responses, fibroblast activation and bone destruction [12].

Despite its presentation of some inflammatory joint features, the disease caused by contact with *Premolis semirufa* does not seem to be a systemic autoimmune disorder because it does not induce the generation of autoantibodies, such as anti-DNA or anti-collagen type II, as shown in our previous study [13]. Moreover, we have demonstrated that *Premolis semirufa* caterpillar bristles' crude extract presents strong proteolytic activity. We observed that the bristles' extract can induce an intense inflammatory process, characterised by the presence of neutrophils in the paw tissues of injected mice and a strong, specific antibody response [13].

To better understand the role of the elements of the immune system in the development of the disease induced by the *Premolis semirufa* caterpillar, this study aimed to evaluate the phenotype of the immunological response induced by repeated injections of the caterpillar bristle extract in a murine model.

The results of this study demonstrate that the extract can induce the activation of TCD4 and B lymphocytes; a mixed inflammatory infiltrate composed of neutrophils and macrophages at the inoculation site; and elevated levels of IL-6, IL-12, IL-10, IL-17 and IL-23 after the last inoculation.

Materials and Methods

Extract of Caterpillar Bristles

Caterpillars from *Premolis semirufa* were collected in the city of São Francisco do Pará, Pará, Brazil, and maintained at the Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, SP, Brazil.

The bristle extract was prepared after incubating the caterpillars at 4°C for a few minutes; the bristles were cut off with scissors at the point of insertion in the tegument, avoiding any tegument incision, and then suspended in cold phosphate-buffered saline (PBS) (8.1 mM sodium phosphate, 1.5 mM potassium phosphate, 137 mM sodium chloride and 2.7 mM potassium chloride, pH 7.2). This suspension was macerated with a glass stick, homogenised and centrifuged at $560 \times g$ for 20 min at 4°C. The supernatant was collected, and its protein content was determined using the BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Supernatant aliquots were stored at -80°C until use. Authorisation to access the venom of the *Premolis semirufa* caterpillar was provided by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA), an enforcement agency of the Brazilian Ministry of the Environment (permission no. 01/2009).

The concentration of lipopolysaccharides (LPS) in the samples of *Premolis semirufa* bristle extract was evaluated by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test in the Section of Microbiological Control of the Butantan Institute (Service of Quality Control - Bioindustrial Division), with the PYROGENT™ Plus Gel Clot LAL Assays kit (Lonza, Walkersville, MD, USA), according to the manufacturer's specifications. The concentration of endotoxin, calculated using a standard curve of LPS from *E. coli* (2.5 to 0.125 EU/mL), showed values below the limit of detection, *i.e.*, 0.125 EU/mL; thus, all of the effects observed in our experimental model resulted from the components present in the extract.

Mice

BALB/c strain male mice, aged 2 months and weighing 18–22 g, were obtained from Central Animal Breeding from the Butantan Institute, SP, Brazil. All experimental procedures involving animals were in accordance with the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian Society of Animal Science and the National Brazilian Legislation no.11.794/08. Protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (protocol approval number 413/07).

Treatment of mice with *Premolis semirufa* Bristle Extract

BALB/c mice were injected with 50 µL of pyrogen-free saline containing 10 µg (protein) of the extract in the left hind footpad. The control group mice received 50 µL of pyrogen-free saline in the left hind footpad. The animals were injected seven times at intervals of two

weeks. Forty-eight hours after the 1st, 3rd, 5th and 7th extract inoculations, groups of mice were euthanised, their blood was collected for cytokine and flow cytometry analysis, and the left hind footpads were removed and frozen for immunohistochemistry and immunofluorescence analyses. Additional groups of mice were injected with saline or extract as described above, and 48 h after the 1st, 4th and 7th extract inoculations, the animals were euthanised, and their left popliteal lymph nodes were collected and processed for flow cytometry analysis. Concomitant groups of mice were euthanised 24 h after the 1st, 4th and 7th extract inoculations, and their hind footpads were collected and homogenised for cytokine analysis.

As a positive control for the inflammatory reaction in the immunohistochemistry and immunofluorescence analyses, BALB/c mice were subcutaneously injected with 50 µL of pyrogen-free saline containing 200 µg of Carrageenan (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA) into the hind footpad. Carrageenan is a polysaccharide widely used to induce an acute inflammatory reaction in animals because it causes the release of several inflammatory mediators such as histamine and prostaglandins [14].

Antibodies and Flow Cytometry

Flow cytometric analysis was performed on blood samples (25 µL/well) incubated with previously titrated antibodies for 30 min at room temperature (RT). Erythrocytes were lysed using BD FACSTTM *Lysing Solution* (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Samples were resuspended in 400 µL of FACS buffer (1% BSA and 0.01% sodium azide in PBS) and analysed by flow cytometry (FACSCalibur - Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

The left hind paw popliteal lymph nodes were macerated to obtain cell populations in suspension. The total number of viable cells obtained from each group was determined by counting in a Neubauer chamber in the presence of Trypan blue, and the concentrations were adjusted to 1×10^5 cells/25 µL of sample in FACS buffer. The cells were incubated for 30 min at 4°C with 5% mouse serum to prevent non-specific binding via the Fc receptor. After removal of the blocking solution, the cells were incubated with previously titrated antibodies for 1 h at 4°C. Following cell staining, the samples were fixed with 1% buffered paraformaldehyde (400 µL) prior to analysis by flow cytometry (FACSCanto II - Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

The following antibodies were used for cell surface staining and *were* purchased from BD Pharmingen (San Jose, CA, USA) anti-mouse CD3 PE-Cy5 or PE (clone 17A2; IgG2b rat; diluted 1:400), anti-mouse CD4 FITC (clone GK1.5; IgG2b rat; diluted 1:400) or anti-mouse CD4 PerCP (clone RM4-5; IgG2a rat; diluted 1:400), anti-mouse CD8 PE (clone 53-6.7; IgG2a rat; diluted 1:200), anti-mouse CD19 FITC (clone 1D3; IgG2a rat; diluted 1:50), anti-mouse CD25 APC (clone PC61; IgG1 rat; diluted 1:400), anti-mouse CD28 PE (clone 37.51; IgG2 hamster; diluted 1:200), anti-mouse CD40 PE (clone 3/23; IgG2a rat; diluted 1:133), anti-mouse CD44 PE (clone IM7; IgG2b rat; diluted 1:200), anti-mouse CD80 PE (clone 16-10A1; IgG2 hamster; diluted 1:100), anti-mouse CD86 PE (clone GL1; IgG2a rat; diluted 1:133), anti-mouse CD154 PE (clone MR1; IgG3 hamster; diluted 1:200), anti-mouse MHC II PE (clone M5/114.15.2; IgG2b rat; diluted 1:133) and anti-mouse IL-17R APC (clone PAJ-17R; IgG2a rat; diluted 1:133). Isotype-matched, non-specific controls were assayed in parallel (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA).

Intracellular staining was performed to detect IL-17 and Foxp3. After surface staining, the fixed cells were permeabilised by incubation in 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS for 6 min at RT, followed by staining with anti-IL-17A-PE (clone 17B7; IgG2a rat; diluted 1:100) or anti-mouse Foxp3 Alexa Fluor 488 (clone MF23; IgG2b rat; diluted 1:100).

The results of the flow cytometry were expressed as the absolute number and median fluorescence intensity (MFI) of cells positive for the molecules under study.

Immunohistochemistry

The left hind footpads were removed and frozen in base moulds filled with frozen tissue matrix O.C.T. (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura) and stored at -80°C until sectioning. The sections were cut to a 5 µm thickness and fixed by immersion in cold acetone (-20°C).

After the samples were incubated with blocking buffer Protein Block Serum-Free (Dako North America, Carpinteria, CA, USA) to block non-specific binding, the tissue sections on the slides were incubated with purified primary antibody diluted in 2% foetal bovine serum (FBS) in PBS for 2 h at 37°C in a humidified chamber. Following blocking, endogenous peroxidase activity (Dako North America, Carpinteria, CA, USA), endogenous avidin and biotin were blocked with the Avidin-Biotin Blocking kit (Biocare Medical, Concord, CA,

USA), and then the slides were incubated with the biotinylated secondary antibody, diluted 1:100, in PBS for 45 min at RT. The slides were rinsed 2x in PBS, 5 min each time, and incubated with Streptavidin-Horseradish Peroxidase (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) for 30 min at RT. After the slides were rinsed 2x in PBS, for 5 min per rinse, 3, 3'-diaminobenzidine, DAB substrate solution (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) was added, and the reaction was followed for 5 to 15 min or until the desired colour intensity was reached. The slides were washed in PBS for 5 min, and then they were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma–Aldrich, Missouri, USA) and mounted in Kaiser's glycerol gelatine (Merck, Darmstadt, HE, DE).

In the immunohistochemical analysis, the following antibodies were used to characterise the local immune response: CD4 (IgG2a rat; diluted 1:75), CD8 (IgG2a rat; diluted 1:75), CD11b (IgG2b rat; diluted 1:25), CD11c (IgG1 hamster; diluted 1:100), Ly6G (IgG2b rat; diluted 1:50) and CCR3 (IgG rabbit; diluted 1:100). Isotype-matched, non-specific controls were assayed in parallel (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA).

Immunofluorescence Staining

The same sections of the left hind footpad described above were used in the immunofluorescence analyses. After blocking non-specific binding by incubating with the blocking buffer Protein Block Serum-Free (Dako North America, Carpinteria, CA, USA) for 30 min at RT, the tissue sections on the slides were incubated with the purified primary antibody diluted in 1% BSA in PBS for 2 h at 37°C in a humidified chamber. After 3 washing steps in PBS, the slides were incubated with the secondary antibody diluted in 1% BSA in PBS for 1 h at RT in the dark. After additional washing steps, the sections were counterstained with ProLong Gold antifade reagent with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Eugene, OR, USA).

The primary antibodies used in the immunofluorescence assays were the same as those in the immunohistochemical analysis; however, the following fluorochrome-conjugated secondary antibodies were used: TRITC-conjugated goat anti-Rat IgG (dilution 1:50), FITC-conjugated goat anti-Armenian Hamster IgG (dilution 1:500) and FITC-conjugated goat anti-Rabbit IgG (dilution 1:500) purchased from Abcam (Cambridge, UK). Isotype-matched, non-specific controls were assayed in parallel (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA).

Mouse Serum Cytokines

Serum samples were obtained from mice inoculated with the extract in the left hind footpad seven times at fortnightly intervals. Bleeding was performed by retro-orbital plexus with a Pasteur pipette 48 h after the injection. As a negative control, animals were injected with saline. The blood was allowed to clot at room temperature for 15 min and then kept at 4°C for 6 h. After centrifugation at $560 \times g$ for 15 min at 4°C, the sera samples were collected and immediately frozen at -80°C until use. The sera were then assayed for murine IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ (OptEIA ELISA; BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), IL-17 and IL-23 (eBioscience, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Measurement of Paw Cytokine Concentrations

Twenty-four hours after the 1st, 4th and 7th extract inoculation, groups of mice were euthanised, and their hind footpads were collected and homogenised for cytokine analysis. The hind footpads, immersed in ice-cold phosphate buffered saline (PBS) supplemented with the Complete Protease Inhibitor Cocktail Set (Roche Diagnostics, Mannheim, DE), 1 mL/paw, were cut off, frozen in dry ice, and subsequently homogenised using a PT 10-35 Polytron homogeniser (Kinematica, Luzern, SWZ), as described by Okumura (2008) [15], with slight modifications. After homogenisation, the samples were centrifuged at 4°C for $2,195 \times g$ for 15 min; then, the supernatants were re-centrifuged at 4°C at maximum speed, $15,142 \times g$, for 15 min. The supernatants were carefully removed to avoid collecting the top layer of lipids/adipose debris. The supernatants were immediately frozen and then assayed for murine IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ (OptEIA ELISA; BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), IL-17 and IL-23 (eBioscience, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analyses

Student's t-test was used to compare mean values obtained with the saline group and the mean values of the *P. semirufa* group, and two-way ANOVAs with Bonferroni post-tests were used to evaluate significant differences between the inoculations. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Differences were considered statistically significant when *p* values were $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$.

Results

T and B Lymphocytes are activated by *Premolis semirufa* Bristle Extract

To characterise the immune response to *P. semirufa*, BALB/c mice were subcutaneously injected in the footpad with *P. semirufa* bristle extract or sterile saline (control) seven times at intervals of 15 days. Forty-eight hours after the 1st, 4th and 7th injections, cells from the popliteal lymph nodes were obtained and counted in Trypan Blue to determine the viability and the absolute number of cells (cell number/lymph node). At the three time points analysed, the total number of cells from the draining lymph node was significantly higher in mice injected with the extract than in the control animals (Figure 1A), demonstrating the proliferation/migration of immune cells, which reached the highest number after the 4th injection (Figure 1A).

To determine which cell populations were involved in the immune response to *P. semirufa* in this model, lymph node cells were stained with fluorochrome-conjugated mAbs for the detection of T and B lymphocytes by flow cytometry. The absolute number of TCD4, TCD8 and B lymphocytes was significantly higher in the extract-treated group than in the control group in all of the periods analysed (Figure 1B to D). The number of other leukocytes was also increased after the 4th and 7th injections (Figure 1E). Interestingly, the increase in the TCD4 population was more pronounced than that of the B population after the 1st injection, while the number of B cells increased more after the 4th and 7th injections (Figure 1A); thus, the T cells were activated earlier by the *P. semirufa* bristle extract, while the proliferation of B cells occurred later.

In addition, we observed that there was a decrease in the number of TCD4 and TCD8 lymphocytes in both groups after the 7th injection (Figure 1B and C). This also occurred with the B cells in the control group, although the number of B cells after the 7th injection was lower than after the 4th injection but higher than after the 1st injection in the extract-treated group (Figure 1D), corroborating the late proliferation/activation of B cells by the *P. semirufa* bristle extract.

To further demonstrate the activation of T and B lymphocytes by the extract, these cells' expression of activation molecules was analysed by flow cytometry. Similar to the observation for total TCD4 lymphocytes (Figure 1B), the number of these cells expressing

CD44 increased in treated mice compared to the control group at the three points tested (Figure 2A). We also verified a significant increase in the expression level (MFI) of this molecule after the 4th and 7th injections in the extract-treated group compared to the control (Figure 2B). These results indicate the activation of TCD4 cells by the *P. semirufa* bristle extract.

The levels of expression of CD28 and CD154 by TCD4 lymphocytes were also analysed, but no differences were observed between the treated and control groups. Additionally, no TCD4 lymphocytes positive for Foxp3 (Treg) were found in any period analysed (data not shown).

The activation state of the B cells was evaluated by the expression of molecules involved in their antigen-presenting function to TCD4 lymphocytes. The absolute number of these cells positive for CD40 was higher in extract-treated mice after the 4th and 7th injections than in the control group (Figure 3A), while the number of B cells expressing CD80 was elevated only after the 4th injection (Figure 3B). The number of B lymphocytes positive for CD86 and MHC II increased in all of the periods analysed (Figure 3C and D). For the combination of the four molecules, the highest number of positive cells was attained after the 4th injection with the bristle extract (Figure 3A to D), as observed for total B lymphocytes (Figure 1D). However, a decrease in the expression (MFI) of CD80 and CD86 by B lymphocytes was also observed in mice treated with the extract after the 4th injection (Figure 3F and G), in contrast to the expression of MHC II, which rose after the 4th and 7th inoculations (Figure 3H). There was no difference in the CD40 expression by these cells (Figure 3E). These results indicate that the *P. semirufa* bristle extract was able to stimulate the antigen-presenting function of B lymphocytes, which occurred later than the activation of TCD4 cells.

Another interesting aspect of Pararamose (Pararama-associated phalangeal periartthritis) is its similarity to the clinical signs observed in rheumatoid arthritis. Because IL-17 is an important cytokine involved in the development of rheumatoid arthritis in both humans and the mouse model [16, 17, 18], its role in the immune response to the *P. semirufa* bristle extract was also examined. IL-17 is generally produced by TCD4 lymphocytes, but other cells, such as $\gamma\delta$ T-cells, NK cells (natural killer cells), NK T cells, macrophages, DCs (dendritic cells), neutrophils, mast cells and lymph tissue inducer cells, can also produce this cytokine [19]. In the present work, we determined the number of IL-17-producing TCD4 lymphocytes in the popliteal lymph nodes of control and treated mice, as well as the number of total lymph node

cells positive for this cytokine. Interestingly, after the 4th and 7th injections, the number of IL-17⁺ TCD4 lymphocytes was significantly higher in the extract-treated mice than in the control group (Figure 4A). Total lymph node cell analysis led to a similar observation (Figure 4B). Additionally, the number of cells positive for the IL-17 receptor (IL-17R) also increased in the lymph node of the extract-treated group in all of the periods analysed (Figure 4C). These results suggest that IL-17 could be involved in the immune response to *P. semirufa* bristle extract.

Effect of the *Premolis semirufa* Bristle Extract on Circulating Leukocytes

To determine the effects of the *P. semirufa* bristle extract on circulating leukocytes, blood cells from the control and treated mice were collected 48 hours after the 1st, 3rd, 5th and 7th injections and analysed by flow cytometry. The extract decreased the percentage of TCD4 lymphocytes after the 1st injection and increased it after the 3rd injection (Figure 5 A), while the percentage of B lymphocytes was reduced after the 3rd injection and elevated after the 7th injection (Figure 5 B). These results suggest that the activation of blood B cells by the extract occurred later than the activation of blood TCD4 lymphocytes. There was no difference in the percentage of TCD8 cells between the treated and control groups (data not shown). In addition to the lymphocyte populations, blood monocytes and neutrophils were also evaluated. The *P. semirufa* bristle extract interfered with the percentage of monocytes at all of the time points analysed, decreasing this percentage after the 1st and 7th injections, but increasing it after the 3rd and 5th injections (Figure 5 C). There was no difference in the percentage of circulating neutrophils between the treated and control groups (data not shown).

The activation status of blood leukocytes was analysed by the activation molecules expressed by TCD4 lymphocytes, B lymphocytes and monocytes. The analysis of CD44 expression by blood TCD4 cells showed that they were activated by the *P. semirufa* bristle extract because an increase in the percentage of these cells positive for CD44 after the 5th injection, compared to the control group, was observed (Figure 6 A), as well as higher expression (MFI) of this molecule after the 1st and 3rd injections (Figure 6 B). No differences were observed in the expression of CD28 and CD154 by blood TCD4 lymphocytes between the treated and control groups (data not shown). Blood B lymphocytes were also activated by the *P. semirufa* bristle extract, showing a significant increase in the percentage of these cells positive for CD40 after the 3rd injection (Figure 7 A), as well as for CD80 and MHC II after the 1st injection (Figure 7

B and C). The extract also activated the monocyte population, increasing the percentage of these cells positive for CD86 after the 3rd injection (Figure 7 D), for CD80 after the 5th injection (Figure 7 E) and for MHC II after the 1st injection (Figure 7 F), although the number of CD86⁺ cells decreased after the 7th injection (Figure 7 D). No differences were observed in the expression levels (MFI) of these co-stimulatory molecules by blood B lymphocytes and monocytes (data not shown).

Local Immune Response Induced by *Premolis semirufa* Bristle Extract

To gain more insight into the phenotype of the local immune response in the left hind footpad of BALB/c mice that were subcutaneously injected with the *P. semirufa* bristle extract, we used immunohistochemistry and immunofluorescence to analyse the profiles of the cells that infiltrated the site of inoculation. We used antibodies against the major cell types that could participate in the local immune reaction: CD4, CD8, CD11b, CD11c, Ly6G and CCR3. Only Ly6G and CD11b staining was detected in the hind footpads.

After the 1st injection, there were no differences between hind footpads of mice injected with the *P. semirufa* bristle extract and the control group, and there was no staining for Ly6G (Figure 8A, B and G). In contrast, after the 3rd, 5th and 7th injections of the extract, we strongly detected cells positive for Ly6G (Figure 8E and H and data not shown), and these were most likely concentrated in the exact location of the injection, below the dermis in the connective tissue. This finding indicates that these cells migrated to the inoculation site, whereas the control group did not present a significant response (Figure 8D and data not shown). The positive control group (inoculated with carrageenan) also showed intense staining for Ly6G, indicative of the presence of neutrophils (Figure 8F and I).

There was also a pronounced infiltration of positive CD11b cells in a location close to the marking Ly6G cells (Figure 9E and H), *i.e.*, at the inoculation site, indicating a mixed inflammatory infiltrate composed of neutrophils and macrophages. Again, the group inoculated with saline showed no infiltration of CD11b positive cells (Figure 9A and D).

Cytokine Profile in the Serum from Mice Inoculated with *P. semirufa* Bristle Extract

We have previously demonstrated that sera obtained from animals injected with the extract presented higher IgG1 titres than those of other IgG subclasses, suggesting the predominance

of a Th2 immune response [13]. Therefore, we sought to determine whether the injection of *Premolis semirufa* bristle extract could elicit that response.

For this assay, serum samples were obtained 48 h after the 1st, 3rd, 5th and 7th extract inoculations into the hind footpad of mice and were assayed for IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-17 and IL-23. Under the conditions and methodologies used, it was not possible to detect the presence of these cytokines in the sera from the inoculated animals, suggesting that *Premolis semirufa* bristle extract causes a local immune reaction rather than a systemic one (data not shown).

Local Cytokine Profiles in the Paws from Mice Treated with *P. semirufa* Bristle Extract

To evaluate the local reaction caused by inoculation with the extract, hind footpads were collected and homogenised for cytokine analysis 24 h after the 1st, 4th and 7th inoculations.

Cytokine analysis of the paws showed elevated levels of the innate immunity associated cytokines, such as TNF- α and IL-6, as well as T lymphocyte proliferation associated cytokines, such as IL-2, after the 1st injection of the extract, decreasing after the 4th inoculation (Figure 10A and B). Consistent with marked neutrophil and macrophage infiltration in the mouse paws (Figures 8 and 9E and H), the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6 increased after the 7th injection of the extract, relative to the controls (Figure 10A). Interestingly, the production of IL-1 remained unaltered by the extract-induced inflammatory response.

Similarly, the production of Th1-associated cytokines such as IFN- γ and IL-12, Th2-associated cytokines such as IL-4, and anti-inflammatory cytokines such as IL-10 increased after the 1st inoculation with the extract (relative to the controls) and decreased after the 4th administration of the extract. Curiously, IL-12 and IL-10 levels increased upon the 7th injection of the extract (Figure 10C).

The levels of Th17-associated cytokines, such as IL-17 and IL-23, also markedly increased after the 1st and 7th inoculations with the extract (compared to the control samples) (Figure 10D).

Discussion

Pararamose, a disease caused by skin contact with the bristles of *Premolis semirufa*, does not yet have a reliable animal model in which to evaluate the manifestations of the disease. With the aim of finding experimentally amenable tools for investigation of this medically important disease and reproducing its manifestation, we have developed a mouse model of pararamose. We injected 10 µg (protein) of the extract into the subcutaneous tissue of the hind footpad at intervals of two weeks in an attempt to simulate accidental human contact and to better analyse the possible chronic inflammatory reaction and immune responses at the cellular and humoral levels.

Subcutaneous injection of the *Premolis semirufa* bristle extract caused a significant increase in the total number of cells and of the absolute number of TCD4, TCD8 and B lymphocytes present in the pool of popliteal lymph nodes obtained from groups of inoculated mice 48 hours after the 1st, 4th and 7th inoculations. This high number of cells in the treated group may have been due to migration and cellular proliferation induced by the components present in the extract. The fact that the increase in the absolute number of B lymphocytes was more pronounced than the increase in the absolute number of other cell populations after the 4th and 7th injections may indicate an initial activation and proliferation of T lymphocytes being replaced by a later increase in the proliferation and activation of B cells.

When the profile of T and B lymphocyte activation in the total extract was evaluated, there was an increase in the number of TCD4 lymphocytes expressing the CD44 molecule in the three periods analysed. We also observed a significant increase in the expression levels (MFI) of this molecule after the 4th and 7th injections in the experimental group.

CD44, an adhesion molecule expressed on hematopoietic and nonhematopoietic tissues, has been previously recognised as an important receptor for the recruitment of activated T cells, and it acts through interactions with components of the extracellular matrix [20, 21, 22] and hyaluronic acid (HA) [23, 24]. Thus, the increased number of T lymphocytes expressing CD44 and the increased expression levels in the cell indicate that T lymphocytes were activated by components of the extract. Memory cells were also generated, contributing to the chronic nature of pararamose, and we observed a significant migration of these cells into the inflammatory focus. Because hyaluronic acid is found in high quantities in joint fluid, in patients with rheumatoid arthritis (RA) and in inflammatory arthritis in animals [25], it is

possible that the increased number of cells expressing CD44 indicates an interaction of these cells with components present in joints.

Among the co-stimulatory molecules expressed on the surface of B cells, CD40 is extremely important and assists in the activation, proliferation, differentiation, survival and generation of memory B cells [26, 27]. Furthermore, CD80 and CD86 play a major role in providing co-stimulation to T cells, leading to their proliferation, the production of cytokines such as IL-2, and the development of effector functions [28, 29].

In our experiments, we observed an increase in the absolute number of B cells testing positive for CD40 and CD80 in extract-treated mice after the 4th and 7th injections, while the number of B cells expressing CD86 and MHC II increased in all of the periods analysed. These findings suggest that activated and proliferating B lymphocytes may be retained in the lymph node, with subsequent differentiation of T cells and immunoglobulin production. Moreover, there was a greater increase in the number of B lymphocytes expressing the CD86 molecule compared to the number of these cells expressing the CD80 molecule, which may indicate an increased delivery of signals essential for the expansion of B cells, as it has been demonstrated that CD86 delivers expansion signals for B cells while CD80 delivers inhibition signals [30].

Analysis of TCD4 lymphocytes that express the molecule IL-17 showed that there was an increase in the number of these lymphocytes after the 4th and 7th inoculations with the extract; however, a clear reduction in their number after the 7th inoculation was also observed.

IL-17 is a potent pro-inflammatory cytokine produced by T cells (Th17) [31] and other cell types such as $\gamma\delta$ T-cells, NK cells (natural killer cells), NK T cells, macrophages, DCs (dendritic cells), neutrophils, mast cells and lymph tissue inducer cells [19]. Recently, it was demonstrated that Th17 lymphocytes are associated with autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bone disease, in humans and mice [32, 33, 34]. Thus, it is possible that TCD4 lymphocytes had differentiated in Th17 lymphocytes, proliferated and migrated into the inflammatory focus, as suggested by their reduction after the 7th inoculation. The same increase was observed when total lymph node cells were assayed for this molecule, indicating that other cell types also produced this potent pro-inflammatory cytokine during disease progression.

Ultimately, the number of cells positive for the IL-17 receptor (IL-17R) was also elevated in the lymph nodes of the extract-treated mice in all of the periods analysed. The receptor for IL-17 is expressed in many cell types, in which it induces the expression of chemokines, pro-inflammatory cytokines and colony-stimulating factor [35]. These cytokines and chemokines induce the recruitment of neutrophils and other myeloid cells, and this induction is characteristic of many infectious diseases [36]. Due to its highly inflammatory nature, the increase in the number of cells expressing this receptor may contribute to the genesis of pararamose.

The analysis of the effects of the *P. semirufa* bristle extract on circulating leukocytes suggests that, in general, the cells activated in the lymphoid organ were potentially able to migrate toward the inflammatory focus, *i.e.*, the footpad.

After the 3rd, 5th and 7th injections, we used immunohistochemical and immunofluorescence methods to detect a high concentration of neutrophils in the connective tissue below the dermis, possibly in the region of inoculation. Neutrophils are an essential part of the innate immune system, and they play a key role in the elimination of invading pathogens and the promotion of tissue healing. However, they can also promote persistent inflammatory responses and tissue injury, which can be damaging to the host [37, 38, 39]. Thus, our results indicate that the components present in the extract promoted a local inflammatory response, and these cells migrated into the inflammatory focus with the purpose of controlling or eliminating the causative factors and promoting tissue healing. This finding is consistent with the results obtained in the histological analysis [13], in which we observed the presence of neutrophils in the paw tissues of injected mice.

In addition to the influx of neutrophils, *Premolis semirufa* bristle extract induced the recruitment of macrophages to the site of inflammation after the 3rd, 5th and 7th injections, as demonstrated by the CD11b-positive staining. At the inflammatory site, macrophages can maintain the inflammatory response by producing cytokines, such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, that protect monocytes from apoptosis [40], and monocytes recruited to the site of inflammation receive signals that activate and protect them.

The absence of lymphocytes in the hind footpads of the mice may be because the sampling time (48 hours after each inoculation) was too soon after the stimulus to observe the activation and migration of these cells into the inflammatory focus.

The local reaction 24 h after the 1st inoculation resulted in increased levels in all of the cytokines analysed, including innate immunity associated cytokines (TNF- α , IL-1 and IL-6), T lymphocyte proliferation-associated cytokine (IL-2), Th1-associated cytokines (IFN- γ and IL-12), Th2-associated cytokines (IL-4), anti-inflammatory cytokines (IL-10) and Th17-associated cytokines (IL-17 and IL-23). In contrast, the local reaction observed 24 h after the 7th inoculation resulted in a significant increase in the levels of cytokines IL-6, IL-12, IL-10, IL-17 and IL-23. This finding suggests that the components present in the extract have pro-inflammatory potential and induce the activation and differentiation of these cells.

Th17 cells play important roles in the pathogenesis of many diseases, including inflammatory diseases, autoimmune diseases, and cancers [41, 42, 43]. A range of cytokines, such as IL-23, transforming growth factor-beta (TGF- β), IL-1, IL-6, IL-17, IL-22 and IL-21, have been shown to be related to Th17 cells. Aggarwal et al. [44] found that murine IL-23, which acts on memory T cells, results in elevated IL-17 secretion. In addition to its effects on Th17 cells, IL-23 also has potent effects on cells of the innate immune system, and it induces the production of inflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6 and TNF- α by monocytes and macrophages [45].

Increasing amounts of data suggest that the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines determines the outcome of infection or inflammation. Anti-inflammatory cytokines can resolve disease, such as when pathogens have been eliminated by the systemic inflammatory processes. IL-10 is a well-known anti-inflammatory cytokine that suppresses the synthesis of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6 and TNF- α [46]. Thus, the analysis of the concentrations of cytokines produced after the 1st and 7th inoculations showed that although an intense inflammatory reaction resulting in activation of lymphocytes was occurring, the production of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, also occurred to contain the immune response.

After the 4th inoculation with the extract, there was a surprising decrease in the levels of all of the locally produced cytokines, producing levels on pararama group as compared with those of the control group. It is possible that the decreased levels of cytokines were associated with the retention of activated cells in the draining lymph node because there was also a higher number of activated cells present in the lymph nodes after the 4th inoculation. This phenomenon requires further investigation.

In conclusion, these data provide evidence of pro-inflammatory changes in the immune phenotype of antigen-presenting cells, lymphocytes, and cytokine production in animals subjected to injections of *Premolis semirufa* bristle extract. These alterations may explain the intense and prolonged inflammatory response that characterises pararamose, as the *Premolis semirufa* bristle extract induces B cell activation and subsequent high antibody production in the absence of adjuvant [13]. This is the first study using an animal model to analyse the inflammatory and immunological mechanisms involved in Pararamose. Moreover, this study has significant social implications. It seems clear that multiple inflammatory stimuli result in continuous and cumulative expression of acquired immune responses, leading to other physiological impairments that can irreversibly affect and disable individuals, as observed in the human population that has come in contact with these caterpillars.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. Cinthya Kimori Okamoto for help in collecting the popliteal lymph nodes from mice and Dr. Danielle Paixão Cavalcante for assistance with the immunohistochemical and immunofluorescence experiments.

References

1. Dias LB, Rodrigues MG (1997) Pararamose. In: De Leão NQ, coordinator. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: CEJUP; UEPA: Instituto Evandro Chagas. p. 886.
2. Costa RM (2003) Pararamose. In: Cardoso JLC, Wen FH, França FOS, Malaque CMS, Haddad Jr V. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. p. 233-236.
3. Costa RM, Atra E, Ferraz MB, Silva NP, Souza JM, et al. (1993) “Pararamose”: an occupational arthritis caused by lepidoptera (*Premolis semirufa*). An epidemiological study. Revista Paulista de Medicina 111: 462-465.
4. Castaman TA, Lunardelli A, Santos RCV, Assis M, Moresco RN, et al. (2001) Estudos hematológicos e bioquímicos em *Rattus norvegicus* (Wistar) submetidos à ação do veneno de *Dirphia* sp. Revista da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas 33(3): 143-7.

5. Couppie P, Marty C, Sainte-Marie D, Pradinaud R (1998) Poisonous caterpillars in French Guyana. *Ann Dermatol Venereol* 125(8): 489–91.
6. Werno J, Lamy M (1991) Urticating hairs of "brown-tail" moth (*Euproctis chrysorrhoea* L.) (Lepidoptera): preliminary studies in urban and laboratory. *C R Acad Sci III* 312(9):455-9.
7. Zannin M, Lourenco DM, Motta G, Dalla Costa LR, Grando M, et al. (2003) Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, southern Brazil. *Thrombosis and Haemostasis* 89(2), 355–364.
8. Duarte AC, Crusius PS, Pires CA, Schilling MA, Fan HW (1996) Intracerebral haemorrhage after contact with *Lonomia* caterpillars. *Lancet* 348(9033):1033.
9. Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S (2006) Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett* 106:8–13.
10. Toes REM, Huizinga TWJ (2009) Autoimmune response in the rheumatoid synovium. *PLoS Med* 6(1):e9.
11. Bartok B, Firestein GS (2010) Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233: 233–255.
12. Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P (1998) Enhancing effect of IL-17 on IL-1 induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 161, 409–414.
13. Villas-Boas IM, Gonçalves-de-Andrade RM, Pidade-Queiroz G, Assaf SL, Portaro FC, Sant'Anna OA, van den Berg CW, Tambourgi DV (2012) *Premolis semirufa* (Walker, 1856) envenomation, disease affecting rubber tappers of the Amazon: searching for caterpillar-bristles toxic components. *PLoS Negl Trop Dis* 6(2):e1531.
14. Albertini R, Aimbire FSC, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, et al. (2004) Effects of different protocol doses of low power galliumaluminum- arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *J Photochem Photobiol B* 74(2-3): 101–7.

15. Okumura A, Saito T, Otani I, Kojima K, Yamada Y, et al. (2008) Suppressive role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 58(2):413-21.
16. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, KsiezopolskaPietrzak K, Klimczak E, et al. (2000) High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A sensitive mechanism. *J Immunol* 164:2832–2838.
17. Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, et al. (2001) IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen induced arthritis. *J Immunol* 167:1004–1013.
18. Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM II, Pope RM (2008) TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10(4):R93.
19. Cua DJ, Tato CM (2010) Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10, 479–489.
20. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61:1303–1313.
21. Jalkanen S, Jalkanen M (1992) Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116:817– 825.
22. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H (1996) Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271:509–512.
23. DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH (1997) Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278:672– 675.
24. Bonder CS, Clark SR, Norman MU, Johnson P, Kubes P (2006) Use of CD44 by CD4⁺ Th1 and Th2 lymphocytes to roll and adhere. *Blood* 107:4798 – 4806.
25. Laurent TC, Fraser JRE (1992) Hyaluronan. *FASEB J* 6(7): 2397-404.
26. Miga A, Masters S, Gonzalez M, Noelle RJ (2000) The role of CD40-CD154 interactions in the regulation of cell mediated immunity. *Immunol Invest* 29: 111-114.

27. Néron S, Suck G, Ma XZ, Sakac D, Roy A, et al. (2006) B cell proliferation following CD40 stimulation results in the expression and activation of Src protein tyrosine kinase. *Int Immunol* 18(2): 375-387.
28. Michel F, Attal-Bonnefoy G, Mangino G, Mise-Omata S, Acuto O (2001) CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity* 15(6): 935-945.
29. Carreno BM, Collins M (2002) The B7 family of ligands and its receptors, new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20, 29-53.
30. Suvas S, Singh V, Sahdev S, Vohra H, Agrewala JN (2002) Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem* 277(10):7766-75.
31. Kolls JK, Lindén A (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21(4):467-76.
32. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, et al. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52(1):65-70.
33. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171(11):6173-7.
34. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, et al. (2008) Interleukin- 17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172(1):146-55.
35. Gaffen SL, Kramer JM, Yu JJ, Shen F (2006) The IL-17 cytokine family. *Vitam Horm* 74: 255-282.
36. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ (2006) Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 27(1):17-23.
37. Zhang X, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R (2009) Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* 31:761–71.

38. Davey MS, Tamassia N, Rossato M, Bazzoni F, Calzetti F, et al. (2011) Failure to detect production of IL-10 by activated human neutrophils. *Nat Immunol* 12:1017-8; author reply 1018–20.
39. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, et al. (2012) A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* 122:327–36.
40. Mangan DF, Welch GR, Wahl SM (1991) Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α and IL-1 β prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 146:1541– 1546.
41. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2007) TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8, 345-350.
42. Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, Peng G, Matsuzaki J, et al. (2008) Generation and regulation of human CD4⁺ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 15505-15510.
43. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA (2008) Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 223, 87-113.
44. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278, 1910-1914.
45. Puccetti P, Belladonna ML, Grohmann U (2002) Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Crit Rev Immunol* 22, 373-390.
46. Glocker EO, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B (2011) IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann N Y Acad Sci* 1246:102–107.

Figure Legends

Figure 1. Determination of the total number of leukocytes from *P. semirufa* bristle extract-treated group. BALB/c mice were injected with 50 µL of pyrogen-free saline with or without 10 µg (protein) of the extract in the left hind footpad. The animals were injected seven times, at intervals of two weeks. Forty-eight hours after the 1st, 4th and 7th extract inoculations, the popliteal lymph nodes of the left hind paw were collected and processed for flow cytometry analysis. (A) Total number of cells, (B) Total number of TCD4 lymphocytes, (C) Total number of TCD8 lymphocytes, (D) Total number of B lymphocytes and (E) Total number of other leukocytes. All graphs show mean values $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$: significant differences between the mean values obtained with the saline group and the mean values of the *P. semirufa* group. The symbols indicate significant differences between the inoculations: 1st $\times$ 4th (#), 1st $\times$ 7th (&) and 4th $\times$ 7th (\$).

Figure 2. Total number of CD3⁺CD4⁺CD44⁺ T cells and CD44 expression from *P. semirufa* group. BALB/c mice were injected with 50 µL of pyrogen-free saline (□) with or without 10 µg (protein) of the extract (■) into the left hind footpad. The animals were injected seven times, at intervals of two weeks. Forty-eight hours after the 1st, 4th and 7th extract inoculations, the popliteal lymph nodes of the left hind paw were collected and processed for flow cytometry analysis. (A) Total number of CD3⁺CD4⁺CD44⁺ T lymphocytes and (B) Median Fluorescence Intensity (MFI) of the expression of this molecule. All graphs show mean values $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$: significant differences between the mean values obtained with the saline group and the mean values of the *P. semirufa* group. The symbols indicate significant differences between the inoculations: 1st $\times$ 4th (#), 1st $\times$ 7th (&) and 4th $\times$ 7th (\$).

Figure 3. Total number of CD40⁺, CD80⁺, CD86⁺ and MHC II⁺ B cells and their expression from *P. semirufa* group. BALB/c mice were injected with 50 µL of pyrogen-free saline (□) with or without 10 µg (protein) of the extract (■) in the left hind footpad. The animals were injected seven times, at intervals of two weeks. Forty-eight hours after the 1st, 4th and 7th extract inoculations, the popliteal lymph nodes of the left hind paw were collected and processed for flow cytometry analysis. Total number of (A) CD19⁺CD40⁺ B lymphocytes, (B) CD19⁺CD80⁺ B lymphocytes, (C) CD19⁺CD86⁺ B lymphocytes and (D) CD19⁺MHC II⁺ B lymphocytes. Expression of these molecules (MFI) is shown in panels E to

H. All graphs show mean values $\pm$ SD. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.0001$: significant differences between the mean values obtained with the saline group and the mean values of the *P. semirufa* group. The symbols indicate significant differences between the inoculations: 1st $\times$ 4th (#), 1st $\times$ 7th (&) and 4th $\times$ 7th (\$).

Figure 4. Total number of CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ T lymphocytes, IL-17⁺ cells and IL-17R⁺ cells from *P. semirufa* group. BALB/c mice were injected with 50 μ L of pyrogen-free saline (□) with or without 10 μ g (protein) of the extract (■) in the left hind footpad. The animals were injected seven times, at intervals of two weeks. Forty-eight hours after the 1st, 4th and 7th extract inoculations, the popliteal lymph nodes of the left hind paw were collected and processed for flow cytometry analysis. Total number of (A) CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ T lymphocytes, (B) IL-17⁺ cells and (C) IL-17R⁺ cells. All graphs show mean values $\pm$ SD. * $p<0.05$ and *** $p<0.0001$: significant differences between the mean values obtained with the saline group and the mean values of the *P. semirufa* group. The symbols indicate significant differences between the inoculations: 1st $\times$ 4th (#), 1st $\times$ 7th (&) and 4th $\times$ 7th (\$).

Figure 5. Percentage of leukocytes in the peripheral blood from *P. semirufa* group. BALB/c mice were injected with 50 μ L of pyrogen-free saline (□) with or without 10 μ g (protein) of the extract (■) in the left hind footpad. The animals were injected seven times, at intervals of two weeks. Forty-eight hours after the 1st, 3rd, 5th and 7th extract inoculations, the peripheral blood was collected and processed for flow cytometry analysis. Percentage of (A) CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes, (B) CD19⁺ B lymphocytes and (C) CD11b⁺ cells. All graphs show mean values $\pm$ SD. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.0001$: significant differences between the mean values obtained with the saline group and the mean values of the *P. semirufa* group. The symbols indicate significant differences between the inoculations: 1st $\times$ 3rd (#), 1st $\times$ 7th (&), 1st $\times$ 5th (\$), 3rd $\times$ 5th (α), 3rd $\times$ 7th (β) and 5th $\times$ 7th (γ).

Figure 6. Percentage of CD3⁺CD4⁺CD44⁺ T cells and CD44 expression in the peripheral blood from *P. semirufa* group. BALB/c mice were injected with 50 μ L of pyrogen-free saline (□) with or without 10 μ g (protein) of the extract (■) in the left hind footpad. The animals were injected seven times, at intervals of two weeks. Forty-eight hours after the 1st, 3rd, 5th and 7th extract inoculations, the peripheral blood was collected and processed for flow cytometry analysis. (A) Percentage of CD3⁺CD4⁺CD44⁺ T lymphocytes and (B) Median Fluorescence Intensity (MFI) of the expression of this molecule. All graphs show mean values

± SD. * $p < 0.05$: significant differences between the mean values obtained with the saline group and the mean values of the *P. semirufa* group. The symbols indicate significant differences between the inoculations: 1st × 3th (#), 1st × 7th (&), 1st × 5th (\$), 3th × 5th (α), 3th × 7th (β) and 5th × 7th (γ).

Figure 7. Percentage of CD40⁺, CD80⁺, MHC II⁺ B cells and CD80⁺, CD86⁺, MHC II⁺ monocytes from *P. semirufa* group BALB/c mice were injected with 50 µL of pyrogen-free saline (□) with or without 10 µg (protein) of the extract (■) in the left hind footpad. The animals were injected seven times, at intervals of two weeks. Forty-eight hours after the 1st, 3rd, 5th and 7th extract inoculations, the peripheral blood was collected and processed for flow cytometry analysis. Percentages of (A) CD19⁺CD40⁺ B lymphocytes, (B) CD19⁺CD80⁺ B lymphocytes, (C) CD19⁺MHC II⁺ B lymphocytes, (D) CD11b⁺CD86⁺ monocytes, (E) CD11b⁺CD80⁺ monocytes and (F) CD11b⁺MHC II⁺ monocytes. All graphs show mean values ± SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$: significant differences between the mean values obtained with the saline group and the mean values of the *P. semirufa* group. The symbols indicate significant differences between the inoculations: 1st × 3th (#), 1st × 7th (&), 1st × 5th (\$), 3th × 5th (α), 3th × 7th (β) and 5th × 7th (γ).

Figure 8. Injection of the *P. semirufa* bristle extract induces neutrophil infiltration at the inoculation site. BALB/c mice were injected with 50 µL of pyrogen-free saline with or without 10 µg (protein) of the extract in the left hind footpad. The animals were injected seven times, at intervals of two weeks. Forty-eight hours after the 1st, 3rd, 5th and 7th extract inoculation, the left hind footpads were removed and frozen for immunohistochemistry and immunofluorescence analyses. Representative photomicrographs of left hind footpads stained with Ly6G, injected once (A and B) or seven times (D and E) with saline and *P. semirufa* bristle extract, respectively. (C) Negative control, injected with extract, marked with matched isotype and (F) positive control injected with Carrageenan (200 µg/ paw). Positive immunostaining is indicated by a red-brown colour. Images in panel a are at 20× magnification, and images in panel b are at 40× magnification. Photomicrograph (40× magnification/10× magnification in the left upper quadrant) panels G and H show immunofluorescence analysis of groups inoculated one and seven times, respectively, with *P. semirufa* bristle extract, while panel I shows the group inoculated with Carrageenan. DAPI-labelled nuclei appear blue, while the TRITC-labelled target molecules appear red/magenta.

Figure 9. Injection of the *P. semirufa* bristle extract induces the infiltration of macrophages to the inoculation site. BALB/c mice were injected with 50 µL of pyrogen-free saline with or without 10 µg (protein) of the extract in the left hind footpad. The animals were injected seven times, at intervals of two weeks. Forty-eight hours after the 1st, 3rd, 5th and 7th extract inoculations, the left hind footpads were removed and frozen for immunohistochemistry and immunofluorescence analysis. Representative photomicrographs of left hind footpads stained with CD11b, injected one (A and B) or seven (D and E) times with saline and *P. semirufa* bristle extract, respectively. (C) Negative control, injected with extract, marked with matched isotype and (F) positive control injected with Carrageenan (200 µg/ paw). Positive immunostaining is indicated by the red-brown colour. Images in panel a are at 20× magnification, and images in panel b are at 40× magnification. Photomicrograph (40× magnification/10× magnification in the left upper quadrant) panels G and H show the immunofluorescence analysis of groups inoculated one and seven times, respectively, with *P. semirufa* bristle extract, while panel I shows the group inoculated with Carrageenan. The DAPI-labelled nuclei appear blue, while the TRITC-labelled target molecules appear red/magenta.

Figure 10. Concentration of paw cytokines from mice injected with *Premolis semirufa* bristle extract. BALB/c mice were injected with 50 µL of pyrogen-free saline (□) with or without 10 µg (protein) of the extract (■) in the left hind footpad. The animals were injected seven times, at intervals of two weeks. Twenty-four hours after the 1st, 4th and 7th extract inoculations, the hind footpads were collected and processed for cytokine analysis by ELISA. (A) Levels of innate immunity associated cytokines TNF-α, IL-1 and IL-6, (B) levels of the pro-proliferative cytokine IL-2, (C) levels of T_H1-associated cytokines IFN-γ and IL-12, T_H2-associated and anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10, respectively and (D) levels of T_H17-associated cytokines IL-17 and IL-23. Un-inoculated paws were used as a control for basal cytokine levels (dotted line). All graphs show mean values ± SD. **p*<0.05, ** *p*<0.01 and ****p*<0.001: significant differences between the mean values obtained with the saline group and the mean values of the *P. semirufa* group. The symbols indicate significant differences between the inoculations: 1st × 4th (#), 1st × 7th (&) and 4th × 7th (\$).

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Figure 8

Figure 9

Figure 10