TÂNIA CRISTINA SARAIVA

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA NATTECTINA, TOXINA DO
VENENO DE *Thalassophryne nattereri*, NA RESPOSTA
IMUNE INATA E ESPECÍFICA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dr^a. Mônica Lopes Ferreira

Co-orientadora: Dr^a. Carla Lima

São Paulo
2007

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune inata induzida pela Nattectina, uma lectina tipo C isolada do veneno de *Thalassophryne nattereri*, em um modelo de inflamação murina e subseqüentemente seu papel na ativação das células dendríticas e indução da resposta imune específica. Nossos resultados mostram que a Nattectina induziu uma reação inflamatória na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c caracterizada pelo influxo predominante de neutrófilos em 1 e 6 horas, substituído por macrófagos em 24 horas. Análises do sobrenadante da suspensão celular da cavidade peritoneal mostraram que a Nattectina induziu a liberação de mediadores inflamatórios como LTB₄ e PGE₂ em 6 horas, IL-1 β em 1 e 6 h, IL-6 em 1 h, MCP-1 em 1 e 24 h e KC em 1 h. Além disso, IL-12p70 foi observada no peritônio em 1 e 24 h e IL-10 em 6 e 24 h. Células dendríticas imaturas de origem mieloide (CD11b^{high} CD11c^{high} B220^{low}) foram amadurecidas pela Nattectina com aumento na expressão das moléculas MHC de classe II e das co-estimulatórias CD40, CD80 e CD86 e expressão de metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9, com síntese de IL-10 e IL-12p70. As células dendríticas imaturas apresentaram grande capacidade de captura e apresentação da Nattectina. Como consequência da ativação das células dendríticas, a Nattectina foi capaz de desencadear uma resposta imune adaptativa caracterizada pela ativação preferencial de linfócitos Th1, com síntese de IFN- γ e de IL-10, favorecendo a produção de IgG2a específica. A presença de IL-10 pode ser responsável pela limitação da inflamação patológica induzida pelo veneno de *T. nattereri* e pela manutenção da inflamação crônica não resolvida observada no envenenamento. Finalmente, a Nattectina é um potente candidato antigênico juntamente com as células dendríticas para uso em imunoterapias.

ABSTRACT

Recently, it was identified a C-type lectin in the venom of *Thalassophryne nattereri* fish named Nattectin. In this study, we investigated the innate and acquired immune responses induced by Nattectin and consequently its role in the dendritic cell activation. The toxin was i.p. injected in BALB/c mice for evaluation of cellular recruitment and inflammatory mediators, antibody and cytokine production. Dendritic cells obtained after bone marrow cell culture with GM-CSF for 7d were stimulated with Nattectin for 24h. The expression of surface molecules and MMPs were analyzed by FACS and immunohistochemistry, respectively. Nattectin induced a significant cellular recruitment into peritoneal cavity, mainly neutrophils at 1 and 6h followed by macrophages at 24h. One hour after the Nattectin injection the levels of IL-6, IL-1 β , MCP-1 and KC were detected, however in 6 or 24h only IL-1 β and IL-10 or MCP-1 and IL-12p70 were determined, respectively. Nattectin induced the PGE₂ and LTB₄ synthesis at 6h. After immunization, mice produced elevated levels of anti-nattectin IgG, represented by IgG1 and mainly IgG2a, and splenic cells produced high levels of IL-10 in 24 and 48h and IFN- γ only in 72h. Incubation of immature DC (CD11b⁺ CD11c⁺ B220⁻) with Nattectin resulted in antigen uptake and up-regulation of CD80, CD86, CD40 and MHC class II. The Nattectin also induced DC production of IL-12p70, IL-10, MMP-2 and MMP-9. These results suggest that Nattectin induce the acute phase of inflammatory response as well as the development of Th1 immune response that might be related to its activity in myeloid dendritic cell maturation. In addition, Nattectin is a potent antigenic candidate together with the dendritic cells for use in immunotherapies.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	12
3. Etapas realizadas.....	12
4. Material e Métodos.....	13
4.1. Animais	13
4.2. Coleta e extração do veneno de <i>T. nattereri</i>	13
4.3. Isolamento da Nattectina do veneno de <i>T. nattereri</i>	13
4.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	14
4.5. Espectometria de massa.....	14
4.6. Avaliação do papel da Nattectina na indução da resposta imune inata	15
4.7. Indução da resposta imune específica em camundongos pela Nattectina..	15
4.8. Cultura de células linfóides	16
4.9. Determinação de nitritos/nitratos.....	16
4.10. Dosagem dos níveis de mediadores lipídicos por ELISA	17
4.11. Determinação dos níveis de citocinas e quimlocinas por ELISA.....	17
4.12. Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-Nattectina	18
4.13. Obtenção de células dendríticas de medula óssea.....	19
4.14. Indução da maturação e ativação das células dendríticas imaturas pela Nattectina	20
4.15. Análise por citometria de fluxo	20
4.16. Determinação das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 por imunohistoquímica	21
4.17. Avaliação da apresentação da Nattectina pelas células dendríticas.....	22
4.18. Análise Estatística	22
5. Resultados	23
5.1. Obtenção da toxina Nattectina do veneno de <i>T. nattereri</i>	23
5.2. Indução da resposta imune inata pela Nattectina.....	27
5.2.1. Peritonite induzida pela Nattectina.....	27
5.2.2. Síntese de mediadores inflamatórios induzidos pela Nattectina	29
5.3. Resposta imune induzida pela Nattectina	34
5.3.1. Nattectina induz a produção de anticorpos específicos	34
5.3.2. Nattectina induz a produção de citocinas pelas células esplênicas	34

5.4. Indução da maturação das células dendríticas	37
5.4.1. Fenotipagem das células dendríticas	37
5.4.2. Ativação das células dendríticas induzidas pela Nattectina	40
5.4.3. Produção de IL-10 e IL-12p70 pelas células dendríticas.....	40
5.4.4. Expressão de MMP-2 e MMP-9 nas células dendríticas.....	44
5.5. Apresentação antigênica da Nattectina pelas células dendríticas.....	46
6. Discussão.....	48
7. Resumo dos Resultados	61
8. Conclusão	62
9. Referências bibliográficas	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil cromatográfico da toxina Nattectina do veneno de <i>T. nattereri</i>	24
Figura 2. Perfil eletroforético do veneno de <i>T. nattereri</i> , fração 5 e Nattectina....	25
Figura 3. Confirmação da massa molecular da Nattectina por espectometria MALDI-TOF.....	26
Figura 4. Indução de peritonite pela Nattectina.....	28
Figura 5. Indução de mediadores lipídicos pela Nattectina na cavidade peritoneal	30
Figura 6. Indução de citocinas inflamatórias pela Nattectina na cavidade peritoneal	31
Figura 7. Indução de quimiocinas pela Nattectina na cavidade peritoneal	32
Figura 8. Nattectina induz a produção de IL-10 e IL-12p70 na cavidade peritoneal	33
Figura 9. Níveis plasmáticos de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti - Nattectina	35
Figura 10. Fenotipagem das células dendríticas obtidas da medula óssea	38
Figura 11. Análise do estado de maturação das células dendríticas.....	39
Figura 12. Ativação das células dendríticas pelo veneno de <i>T.nattereri</i>	41
Figura 13. Nattectina induz maturação das células dendríticas	42
Figura 14. Produção de IL-10 e IL-12p70 pelas células dendríticas estimuladas com Nattectina	43
Figura 15. Expressão de MMP-2 e MMP-9 nas células dendríticas ativadas pela Nattectina	45
Figura 16. Indução da apresentação do antígeno pelas células dendríticas	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de citocinas pelas células esplênicas obtidas de camundongos imunizados com Nattectina após a re-estimulação <i>in vitro</i> com a Nattectina	36
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
B220	Molécula de superfície expressa em linfócitos B
BSA	Soro albumina bovino
CCL	Ligante da família de quimiocinas CC
CCR	Receptor da subclasse β (CC)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico
CD11b	Molécula de superfície expressa em macrófagos
CD11c	Molécula de superfície expressa em células dendríticas
CD4	Molécula de superfície expressa em linfócitos T <i>helper</i>
CD8	Molécula de superfície expressa em linfócitos T citotóxicos
CD40	Molécula de superfície co-estimulatória
CD40L	Ligante da molécula de superfície CD40
CD45	Antígeno leucocitário
CD50/ICAM-3	Molécula de adesão intracelular
CD80/B7-1	Molécula de superfície co-estimulatória
CD86/B7-2	Molécula de superfície co-estimulatória
Con A	Concanavalina A
CRD	Região determinante de complementaridade
CXC	Quimiocina da subclasse α
CY	Fluorocromo cianina
DAB	3,3' diaminobenzidina
DC	Célula dendrítica
DC-SIGN	<i>DC-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin</i>
DEC-205	Receptor lectina tipo C expresso nas células dendríticas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>

FACS	Sistema de citometria de fluxo FACSCalibur
Fc γ RII/III/ CD16/32	Receptor tipo II/III para a porção Fc da imunoglobulina IgG
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GM-CSF	Fator estimulatório de crescimento para granulócitos e monócitos
HCL	Ácido clorídrico
HE	Coloração hematoxilina/eosina
HLA-DR	Antígenos leucocitários humanos relacionados à região do gene HLA-D
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
ICAM	Molécula de adesão intracelular
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
KC	Quimiocina murina homóloga a IL-8 em humanos
LFA	Função do leucócito associado ao antígeno
L-NAME	Inibidor da enzima óxido nítrico sintase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MAC-1	Complexo de ataque à membrana
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry</i>
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos
MEM	Aminoácidos não-essenciais
MHC	Moléculas de histocompatibilidade principal
MIP-3 β	Proteína 3 β inibitória de macrófagos
MMP	Metaloproteinases
NO	Óxido Nítrico
NTC	Nattectina
OPD	Ortofenildiaminobenzidina
PBS	Tampão fosfato de sódio

PBS _t	Tampão fosfato de sódio adicionado de Tween
PE	Fluorocromo ficoeritrina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PMSF	Fenilmetilsulfonilflorideo
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro Bovino Fetal
SDS	Sódio dodecil sulfato
TCR	Receptor de antígeno expresso em linfócitos T
TFA	Ácido trifluoroacético
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TIMP	Proteína tecidual inibitória de metaloproteinases
TLCK	<i>N-p-tosyl-lysine-chlormethylketone</i>
TMB	3,3' 5,5' tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TRIS	Hidroximetil aminometano
Vtn	Veneno de <i>Thalassophryne nattereri</i>

1. Introdução

Dentre os animais aquáticos de importância médica no Brasil destaca-se o peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim) pelo número e gravidade dos acidentes que provoca. *T. nattereri* é considerado um peixe peçonhento por apresentar glândulas cutâneas especializadas na produção de veneno conectadas a ductos excretores canaliculados (espinhos) que se localizam nas regiões: dorsal (2) e lateral (2) (FRÓES, 1933a, b, c). *T. nattereri* encontra-se predominantemente ao longo da costa norte e nordeste do Brasil, principalmente em águas salobras, vivendo em locais relativamente rasos. Acidentes provocados pelo *T. nattereri* vêm sendo notificados em Salvador (ALMEIDA et al., 1989), Alagoas (AUTO, 1992; FONSECA et al., 2000), Natal e Pará (HADDAD JR et al., 2003) e Fortaleza (FACÓ et al., 2005). Estes acidentes ocorrem principalmente nas regiões plantar ou palmar das vítimas após a introdução dos espinhos canaliculados na pele com conseqüente ruptura das glândulas. As principais características do quadro clínico em humanos são dor e edema intensos e duradouros desencadeadas imediatamente após o acidente. Em conseqüência pode haver o desenvolvimento de necrose, que em casos graves acomete todo o membro, levando a seqüelas irreversíveis como a hipotrofia muscular e a perda da função (FONSECA et al., 2000).

É preciso mencionar que os acidentes provocados pelo *T. nattereri* afetam banhistas e, na maioria das vezes, pescadores. Vale ressaltar, que a única medida adotada atualmente como tratamento para o envenenamento é a imersão do membro lesado em água quente, tolerável por 30 a 90 minutos. Sabe-se, no entanto que este tratamento reduz parcialmente a dor somente quando o membro está imerso na água quente e não impede o aparecimento de edema ou da necrose. O uso de analgésicos, antiinflamatórios ou de antibióticos não é capaz de reverter o quadro decorrente do envenenamento que evolui independente da utilização dos medicamentos.

Estudos experimentais realizados com o veneno de *T. nattereri* em murinos demonstraram sua diversidade de ação e reproduziram a sintomatologia vista nos acidentes com humanos. Baixas doses de veneno foram suficientes para induzir efeitos locais como nocicepção, edema e necrose, independente da presença das atividades hemorrágica ou fosfolipásica A₂. (LOPES-FERREIRA et al., 1998, 2000, 2001). Através

da análise histopatológica da lesão no coxim plantar e da análise por microscopia intravital observou-se que o veneno induziu uma intensa coagulação intravascular com estase do fluxo sanguíneo e presença de trombos nas vênulas pós capilares e uma vasoconstrição das arteríolas (LOPES-FERREIRA et al., 2001, 2002). A ação na microcirculação pode ser explicada por uma ação indireta de mediadores liberados de plaquetas ou células endoteliais, uma vez que o veneno promove a lise dessas células *in vitro* (LOPES-FERREIRA et al., 2002). Com relação à sua ação inflamatória verificou-se após a injeção no coxim plantar a liberação de importantes citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, acompanhada por um escasso infiltrado celular na lesão. Em contraste, o veneno induziu um intenso influxo de neutrófilos e células mononucleares para a cavidade peritoneal de camundongos. Ademais, o veneno apresenta ação citotóxica sobre as células mononucleares (J774A1) (LIMA et al., 2003). Em 2004, Lopes-Ferreira e colaboradores, analisando os possíveis mecanismos de ação envolvidos nas atividades nociceptiva e edematogênica induzidas pelo veneno verificaram que somente os inibidores de calicreína tecidual (TKI - *phenylacetyl-Phe-Ser-Arg-N-(2,4-dinitrophenyl)-ethylenediamine*) e plasmática (PKSI₅₂₇ - *N-(trans-4-aminomethyl-cyclohexanecarbonyl)-phenylalanine-4-carboxy methylanilide*) reduziram significativamente essas atividades tóxicas. Além disso, através de ensaios de hidrólise incubando o veneno com um peptídeo contendo a seqüência do cininogênio humano verificou-se liberação de calicreína tecidual (Lys-BK), demonstrando assim que o veneno de *T. nattereri* possui ação cininogénica, semelhante a calicreína tecidual, e que os efeitos locais causados pelo veneno podem estar relacionados com o sistema calicreína-cininogênio-cinina (LOPES-FERREIRA et al., 2004).

Foram também realizados trabalhos buscando uma terapia eficiente para o envenenamento causado pelo *T. nattereri* até então inexistente. A imunização de camundongos, coelhos ou cavalos com o veneno induz a produção de altos títulos de anticorpos específicos com ação eficiente na neutralização dos principais sintomas decorrentes do envenenamento (LOPES-FERREIRA et al., 2000; PIRAN-SOARES et al., 2007). Estudos recentes mostram que o veneno de *T. nattereri* é capaz de induzir uma resposta imune específica mista caracterizada pela ativação de ambos os clones de linfócitos Th1 e Th2, com produção acentuada das citocinas IL-5 e IFN- γ . A

imunização provocou também uma síntese acentuada de anticorpos IgE total e IgG1 e IgG2a específicos. De maneira interessante, a imunização dos animais com o veneno provocou uma resposta imune duradoura com a presença de altos níveis de anticorpos IgG antígeno-específico por até seis meses após a imunização (GRUND et al., 2006).

Interessantemente, apesar do envenenamento causado pelo veneno de *T. nattereri* ser caracterizado principalmente por efeitos locais, como dor e edema, trabalhos experimentais mostraram que a injeção subcutânea de altas doses de veneno, em camundongos, induziu efeitos sistêmicos que consistiram de movimentos rotacionais, ereção do pêlo, violentas convulsões seguido de morte dos animais (LOPES-FERREIRA et al., 1998a, b). Mais recentemente foi demonstrado que baixas doses do veneno, a partir de 0.3 µg/ml, altera a fisiologia renal interferindo especialmente nos parâmetros vasculares promovidos por substâncias miotóxicas ou pelo efeito direto do veneno sobre as células renais, conduzindo a liberação de fatores vasoativos que podem aumentar a pressão de perfusão e a resistência vascular renal (FACÓ et al., 2003).

Em conjunto, os trabalhos realizados mostram a complexidade de ação do veneno de *T. nattereri* e apontaram para o estudo de suas toxinas para esclarecer o seu mecanismo de ação e possibilitar melhores formas de terapia. Assim, a obtenção das toxinas do veneno de *T. nattereri* vem sendo realizada através da utilização de técnicas cromatográficas e a caracterização de suas estruturas através da abordagem de química de proteínas (isolamento e seqüenciamento de peptídeos internos e *N*-terminal) e biologia molecular (transcriptoma da glândula venenífera do peixe e expressão dos cDNAs que codificam as toxinas).

A construção da biblioteca de cDNA da glândula venenífera do *T. nattereri* demonstrou a presença de diversas proteínas agrupadas de acordo com suas funções biológicas como transporte celular (2.9%), homeostasia (4.4%), comunicação celular (7.4%), metabolismo (4.5%), expressão de proteínas (14.0%), estrutura e mobilidade celular (6.3%) e toxinas (18.8%). Aproximadamente 2000 clones foram seqüenciados aleatoriamente e confrontados com seqüências contidas em bancos de dados (NCBI-blastn e blastx) e comparados com o seqüenciamento *N*-terminal e de peptídeos internos de toxinas de 38 e 15 kDa isoladas do veneno por meio de cromatografias.

Foram então detectadas quatro seqüências e feita a identificação teórica da massa molecular (MM) e do ponto isoelétrico (pI) das toxinas. Desta maneira as toxinas foram designadas: Natterina 1 (MM 35.8 kDa e pI 8.18), Natterina 2 (MM 38.1 kDa e pI 8.76), Natterina 3 (MM 35.0 kDa e pI 6.70) e Nattectina (MM 15.0 kDa e pI 9.73). As Natterinas não apresentaram homologia com proteínas encontradas nos bancos de dados enquanto que a Nattectina apresentou homologia com proteínas do tipo lectina C encontradas no salmão (*Salmo salar*) e em venenos das serpentes como *Crotalus atrox*, *Lachesis muta stenophrys*, *Trimeresurus stejnegeri* e *Bothrops pirajai* (MAGALHÃES et al., 2005).

Através da análise dos domínios CRDs e N-terminal da seqüência de aminoácidos da toxina observamos que a Nattectina apresenta homologia também com outras lectinas como a echinoidina, uma lectina mitogênica e quimiotática isolada no veneno do ouriço-do-mar *Toxopneustes pileolus* e a miotoxina TmC4-47.2, isolada no veneno do peixe *Thalassophryne maculosa* (MAGALHÃES et al., 2006).

Diversas lectinas isoladas principalmente de plantas e animais terrestres vêm sendo estudadas quanto as suas características bioquímicas e biológicas, como por exemplo, as lectinas do tipo C BPL e BJcul isoladas a partir dos venenos das serpentes *Bothrops pirajai* e *Bothrops jararacussu*, respectivamente (HAVT et al., 2005; CARVALHO et al., 2001); ou a lectina TEL isolada da semente da planta *Talisia esculenta* (FREIRE et al., 2003). Porém existem poucos estudos sobre lectinas isoladas de animais aquáticos, principalmente de animais vertebrados como os peixes. Trabalhos com lectinas isoladas de bivalves marinhos *Ruditapes philippinarum*, *Pteria penguim*, *Tridacna máxima*, *Pinctada fucata martensii*, *Anadara granosa* e *Tridacna derasa* mostram a importância e a relevância destas proteínas no reconhecimento de moléculas para a defesa contra microorganismos, como bactérias e protozoários, uma vez que estes animais invertebrados não possuem sistema imune humoral (NAGANUMA et al., 2006; BULGAKOV et al., 2003). Ingran e colaboradores (1980) mostraram a participação de lectinas, moléculas tipo lectinas e moléculas biologicamente ativas presentes no muco da pele de peixes na resposta imune inata e adaptativa como a primeira linha de defesa do organismo. Recentemente foi isolada uma lectina tipo C da moréia *Conger myriaster* importante na resposta imune inata,

apresentando função de opsonina e favorecendo a fagocitose de partículas opsonizadas pelos macrófagos (TSUTSUI et al., 2007). Entretanto não existe nenhum trabalho mostrando a importância e a relevância de uma lectina isolada de peixe venenoso na regulação do sistema imunológico. Sendo assim, a Nattetina consistiu o objeto deste estudo.

Lectinas formam um grupo de proteínas ligantes de carboidratos, estruturalmente heterogêneos, que compreendem distintas famílias de proteínas evolutivamente relacionadas. Sua principal característica consiste na capacidade de ligação a moléculas de carboidratos de forma específica e reversível. Esta capacidade foi essencial para a descoberta das inúmeras ações biológicas exercidas por estas proteínas. O termo tipo C refere-se à dependência dessas lectinas pelo íon cálcio para exercer suas atividades e também por apresentarem homologia estrutural com o domínio de reconhecimento para carboidratos do tipo C (DAY, 1994). As lectinas são particularmente interessantes por suas características biológicas, farmacológicas e bioquímicas. Embora sejam descritas principalmente por possuírem atividade hemaglutinante também exercem importante papel nas respostas imune inata e adaptativa (CAMBI e FIGDOR, 2005; TIAN et al., 2005). As lectinas modulam as interações entre as células apresentadoras de antígeno e os linfócitos T, regulam as interações das células entre si e com a matriz extracelular, participam no desenvolvimento e diferenciação de linfócitos, regulam a proliferação e apoptose de células do sistema imune, participam na captação e apresentação de antígeno, medeiam a adesão celular e funcionam como moléculas quimiotáticas para o recrutamento de células inflamatórias. Sendo assim, as lectinas vêm sendo estudadas como ferramentas para o tratamento de diversas doenças inflamatórias crônicas, tumores, doenças auto-imunes e transplante de órgãos, devido seus efeitos pró ou anti-inflamatórios (RUBINSTEIN et al., 2004).

O sistema imune protege o organismo contra a invasão de agentes infecciosos protéicos, químicos e outras substâncias antigênicas. As respostas imunológicas contra invasores se dividem em dois momentos principais, uma resposta inata ou inespecífica, e uma resposta adaptativa ou específica. Na presença dos organismos patogênicos invasores, a imunidade inata é a primeira linha de defesa. A ativação deste sistema,

capaz de vencer estes patógenos, envolve uma resposta antígeno não-específica, sendo constituída principalmente por barreiras físicas e bioquímicas dos epitélios e das mucosas, pelas células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos), pelas células *natural killer* (NK), pelos constituintes protéicos sangüíneos como os componentes do sistema complemento e pelas citocinas como os interferons.

A inflamação é um processo fisiológico composto por alterações morfológicas e bioquímicas, que ocorre ao nível da microcirculação dos tecidos. Durante o processo inflamatório mediadores solúveis, componentes celulares e vasculares trabalham juntos sistematicamente, com o objetivo de conter e eliminar o agente e assim recompor a homeostase do tecido lesado (GALLIN et al., 1988, 1992; PAUL, 1998). Um dos primeiros eventos que ocorre logo após o dano tecidual é a vasodilatação, a qual é provocada pela liberação de mediadores vasoativos, capazes de induzir mudanças na morfologia e integridade das células endoteliais. Como consequência das mudanças morfo-estruturais sofridas pelas células endoteliais e pelas intersticiais, suas membranas plasmáticas são rapidamente remodeladas gerando mediadores lipídicos biologicamente ativos. Os fosfolípides da membrana são clivados pela enzima fosfolipase A₂ gerando o ácido araquidônico, que pode ser metabolizado por duas vias enzimáticas distintas; a da cicloxigenase, gerando as prostaglandinas e as tromboxanas, e da lipoxigenase, gerando leucotrienos. Estes metabólitos, conhecidos como eicosanóides, podem modular a resposta inflamatória através de seus efeitos sobre o endotélio e sobre os leucócitos.

O padrão de recrutamento leucocitário (primeiramente o influxo predominante de neutrófilos, sendo depois substituído pelo recrutamento de células mononucleares) parece ser responsável pela resolução do processo inflamatório, removendo o agente lesivo e restaurando a homeostase tecidual. Neutrófilos são as primeiras células a alcançarem o sítio da lesão e predominam numericamente no período agudo da injúria tecidual. Desenvolvem um papel importante na defesa do organismo, pois podem fagocitar e destruir o agente lesivo. Além disso, podem ser ativados pelas citocinas produzidas pelos macrófagos residentes no tecido e pelas células endoteliais. Uma vez que os monócitos do sangue saem da circulação e entram no local da injúria, diferenciam-se em macrófagos, que são células efetoras finais da reação inflamatória.

Os macrófagos fagocitam as partículas estranhas e as destroem pela síntese de espécies reativas de oxigênio como o óxido nítrico. Seqüencialmente, o macrófago ativado age retirando os *debris* da ferida, induzindo a eliminação do antígeno e a resolução da reação inflamatória. Quando as funções protetoras dos macrófagos são ineficazes ou incompletamente efetivas estas células contribuirão para a persistência da reação inflamatória causando severa perturbação funcional: se fundirão em torno do agente lesivo formando um granuloma e permitirão o desenvolvimento de fibrose pela produção de citocinas que estimulam a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno. Portanto, tanto os neutrófilos como os macrófagos apresentam um papel duplo na resposta inflamatória, seja destruindo o agente lesivo e restaurando as características normais do tecido ou agindo na amplificação da reação levando à degeneração tecidual (BAGGIOLINI et al., 1998; ULBRICH et al., 2003).

IL-1 α , IL-6 e TNF- α são as citocinas pró-inflamatórias que medeiam diversas respostas inflamatórias. São produzidas principalmente por macrófagos ativados e em conjunto induzem aumento na expressão de moléculas de adesão, síntese de proteínas hepáticas, ativação de linfócitos T e B. A citocina TNF- α também induz a síntese de substâncias tóxicas, como o óxido nítrico, pelos leucócitos (BLACKWILL et.al., 1989). O óxido nítrico é formado a partir da L-arginina pela ação de NO-sintases e desempenha um papel importante na função vascular durante o processo inflamatório, assim como as prostaglandinas, por serem potentes vasodilatadores. Além disso, o leucotrieno B₄ e o óxido nítrico regulam o recrutamento de leucócitos através da expressão de moléculas de adesão importantes na interação leucócito-endotélio (FARSKY et al., 2003).

A inflamação fornece sinais fundamentais para a ativação de linfócitos T e conseqüentemente o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. O sistema imunológico adaptativo é ativado se as primeiras linhas de defesa do organismo não conseguem conter os antígenos, a partir daí ocorre à formação de uma resposta produzida por linfócitos. Para isso, muitas células de vários tipos interagem entre si e com o agente invasor. Essas interações bidirecionais otimizam a resposta imune e garantem uma função protetora mais eficiente. As células dendríticas constituem a população de leucócitos capaz de integrar as respostas imune inata e adaptativa (REIS

e SOUSA, 2004). São células apresentadoras de antígeno que exercem diferentes funções dependendo da sua localização, fenotipagem, estado de maturação e imunogenicidade. As células dendríticas apresentam dois estados funcionais distintos: imaturo e maduro sendo estas últimas habilitadas para a ativação da resposta imune específica pela alta expressão de moléculas MHC classe II, CD40, CD80 e CD86 (STEINMAN, 1991; STEINMAN e NUSSENZEWEIG, 2002). Em resposta a uma variedade de estímulos, as células dendríticas residentes em tecidos periféricos sofrem um complexo processo de maturação que envolve a regulação de milhares de genes que controlam as distintas funções como captura do antígeno, apresentação, migração, expressão de moléculas co-estimulatórias e produção de citocinas que polarizam a resposta imune adaptativa e ativação de clones específicos de linfócitos T (MACAGNO et al., 2007).

As células apresentadoras de antígeno (APCs), representadas principalmente por macrófagos (células CD11b⁺) e células dendríticas (CD11c⁺) apresentam o antígeno associado a moléculas de histocompatibilidade (do tipo I ou II) em sua superfície. Isto garante o reconhecimento do antígeno pelo linfócito T CD4⁺ através do seu receptor de antígeno (TCR). A apresentação antigênica pela APC ao receptor do linfócito T cria um estímulo e garante a sua ativação; quando o linfócito T é ativado, inicia-se o processo de proliferação e diferenciação em célula efetora Th1 ou Th2. Vários estudos sugerem que os níveis de moléculas co-estimulatórias expressas nas células dendríticas e as citocinas presentes no micro-ambiente durante a ativação da célula T são importantes para a sua ativação (FEILI-HARIRI et al., 2005).

É sabido que células T auxiliares podem ser divididas em diferentes subpopulações de acordo com o perfil de citocinas produzidas (MOSMANN et al., 1989; REINER, 2007). Linfócitos do tipo Th1 produzem IL-2 e IFN- γ e linfócitos do tipo Th2 sintetizam IL-4, IL-5 e IL-10. IL-17, importante citocina reguladora de processos crônicos e doenças autoimunes, é produzida pelo mais recente clone de linfócito T identificado, Th17 (HUNTER, 2007). As citocinas produzidas pelas respectivas populações de linfócitos Th1 ou Th2 auxiliam na definição do padrão isotípico a ser secretado pelo linfócito B (COFFMANN et al., 1988, 1996) como também são

reguladores negativos da diferenciação das outras sub-populações (WEAVER et al., 2007).

As células dendríticas murinas podem ser divididas em distintos subtipos com base no fenótipo e na função. As células dendríticas murinas plasmocitoídes expressam as moléculas CD11c, B220 (CD45R) e Thy1.2 (CD90), enquanto o subtipo mielóide é caracterizado pela expressão de CD11c e CD11b. A molécula CD8á é um marcador utilizado para isolar células dendríticas linfóides (BJÖRCK et al., 2001; WU e LIU, 2007).

As células dendríticas expressam em sua membrana diversos receptores da resposta imune inata, como os receptores especializados em reconhecimento de padrões antigênicos (*specialized pattern-recognition receptors* - PRRs) como os Toll-like receptors, Nod-like receptors; lectinas tipo C que reconhecem modelos moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns - PAMPs) (AKIRA et al., 2006) e receptores para citocinas inflamatórias que são produzidas em grande quantidade no início da infecção e podem atuar de modo autócrino ou parácrino na maturação das células dendríticas. A expressão e a função destes receptores variam significativamente entre os subtipos das células dendríticas murinas e humanas (MACAGNO et al., 2007).

As células dendríticas imaturas localizadas nos tecidos periféricos são caracterizadas pela alta capacidade em capturar antígenos, altos níveis de moléculas MHC classe II intracelular e baixos níveis de moléculas co-estimulatórias. Estímulos como patógenos ou mediadores inflamatórios causam a maturação destas células dendríticas e a sua migração para os linfonodos. Durante a maturação, a atividade fagocítica é reduzida, as moléculas de classe II são translocadas dos compartimentos intracelulares para a superfície celular, e os níveis das moléculas co-estimulatórias são aumentadas (DARO et al., 2000).

A capacidade da célula dendrítica madura de induzir uma resposta imune específica está intimamente relacionada com a expressão de moléculas co-estimulatórias CD40, CD80, CD86, MHC de classe II e moléculas de adesão LFA-3 e ICAM-1 necessárias para ativação dos linfócitos T virgens (STEINMAN et al., 2002). As moléculas CD80 e CD86 são membros da família B7 que se ligam às moléculas CD28 ou CTL4 expressas na superfície das células T (SALOMON et al., 2001), enquanto a

molécula CD40 está expressa em células dendríticas e linfócitos B interage com o ligante CD40L expresso principalmente em linfócitos T ativados (GRUNIG et al., 2004). A interação das moléculas co-estimulatórias e o reconhecimento do peptídeo associado ao complexo MHC classe II pelo TCR são fundamentais para a ativação das células T e conseqüentemente para o desenvolvimento da resposta imune específica eficaz.

A sinalização da molécula CD40, além de ser crucial para a estimulação de linfócitos T específicos, regula de maneira recíproca a migração e a produção de citocinas de células dendríticas humanas, onde uma fraca sinalização é suficiente para induzir a expressão de CCR7, enquanto a secreção de citocinas requer um intenso e persistente sinal da molécula CD40 (LUTZ et al., 2004).

Vários estudos mostram como diferentes estímulos podem modular conjuntamente a produção de citocinas pelas células dendríticas. Um exemplo desta regulação combinatória é a síntese de IL-12p70, uma citocina que promove a diferenciação de linfócitos Th1. A célula dendrítica é a principal fonte de IL-12p70, porém é necessária a cooperação de outros sinais como a citocina IFN- γ que aumenta a expressão de receptores *Toll-like*, os PAMPs que promovem um *cross-linking* entre os TLRs e a molécula CD40L que amplificam a produção de IL-12p70. Entretanto, os mecanismos pelo quais estes diferentes sinais colaboram na indução na produção de IL-12p70 ainda não estão esclarecidos (MACAGNO et al., 2007).

A capacidade de migração das células dendríticas é crucial para a apresentação antigênica e envolve a participação de diversas moléculas como quimiocinas, moléculas de adesão e proteases importantes na degradação de componentes da matriz extracelular como colágeno e glicoproteínas. Para a progressão celular pela membrana basal e pela matriz extracelular intersticial é necessária uma série coordenada de etapas que incluem a adesão/liberação e a degradação focal da matriz (BIANCHI et al., 1997; BASBAUM et al., 1996, LAUFFENBURGER et al., 1996). As quimiocinas compreendem uma grande família de 30 pequenas proteínas que participam no recrutamento de leucócitos, na angiogênese e hematopoiese. Estudos mostram que a quimiocina MIP-3 α apresenta papel importante durante a migração de células dendríticas pelos vasos sanguíneos até os linfonodos (DIEU et al., 1998). Durante a maturação as células dendríticas diminuem a expressão de CXCR1, CCR1, CCR2 e

CCR5 e aumentam a expressão dos receptores CXCR4, CCR4 e CCR7 (YANAGIHARA et al., 1998; DIEU-NOSJEAN et al., 1999; SOZZANI et al., 2000). Esta troca de receptores de quimiocinas permite seu direcionamento até a zona de linfócitos T virgens dos órgãos linfóides secundários.

As metaloproteinases são endopeptidases dependentes de Ca^{2+} ou Zn^{2+} que degradam componentes da matriz extracelular, medeiam o deslocamento das células através da membrana basal e podem também modular a inflamação através da ativação proteolítica ou inativação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. As metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 (gelatinase A e B, respectivamente) estão envolvidas na degradação de colágeno do tipo IV, o maior componente constituinte da matriz extracelular (VERMAELEN et al., 2003). As células dendríticas maduras expressam as metaloproteinases MMP-1, 2, 3 e 9 assim como seus inibidores TIMP-1 e 2, importantes no processo de migração do tecido periférico para os linfonodos (KOUWENHOVEN et al., 2002; CHABOT et al., 2006).

Em vista destes fatos o objetivo deste trabalho é o estudo do papel da lectina tipo C Nattectina, isolada do veneno do peixe peçonhento *T. nattereri* no desencadeamento das respostas imune inata e adaptativa e principalmente sobre a maturação de células dendríticas.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune inata induzida pela Nattectina, lectina tipo C isolada do veneno do peixe *T. nattereri*, usando um modelo murino experimental de inflamação, e subsequente seu papel na ativação das células dendríticas e indução da resposta imune adaptativa.

3. Etapas realizadas

1. Purificação e caracterização da toxina Nattectina;
2. Avaliação da resposta inflamatória induzida pela Nattectina na cavidade peritoneal murina mediante análise dos seguintes parâmetros:
 - Influxo celular total e diferencial;
 - Níveis dos mediadores lipídicos (PGE₂ e LTB₄) e óxido nítrico;
 - Níveis das citocinas inflamatórias (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-10 e IL-12p70) e quimiocinas (KC e MCP-1).
3. Verificação do padrão de resposta imune específica induzida pela Nattectina mediante análise dos seguintes parâmetros:
 - Níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , IL-10, IL-12p70 produzidas pelas células esplênicas re-estimuladas *in vitro*;
 - Níveis dos anticorpos séricos da classe IgG e das subclasses IgG2a e IgG1.
4. Avaliação do efeito da Nattectina sobre as células dendríticas responsáveis pela interação entre a resposta imune inata e adaptativa mediante os seguintes parâmetros:
 - Expressão de moléculas co-estimulatórias e de histocompatibilidade principal (MHC classe II);
 - Níveis de citocinas IL-10 e IL-12p70;
 - Presença de metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9;
 - Apresentação antigênica.

4. Material e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, machos ou fêmeas, pesando entre 18 e 22 g fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as leis da Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biológicas (nº 083) e da Comissão Brasileira de experimentação animal.

4.2. Coleta e extração do veneno de *T. nattereri*

Para extração do veneno, os peixes foram coletados na Lagoa Mundaú, em Alagoas, em diferentes períodos do ano. A extração do veneno foi realizada comprimindo-se a base dos espinhos, de modo a pressionar a glândula, forçando a expulsão do veneno (LOPES-FERREIRA et al., 1998). Logo após a extração, o veneno foi centrifugado e mantido à -20° C. Posteriormente, a concentração de proteínas do veneno de *T. nattereri* foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976) usando como padrão soro albumina bovina (Sigma - Chemical Company; ST. Louis, MO, USA).

4.3. Isolamento da Nattectina do veneno de *T. nattereri*

A Nattectina foi isolada utilizando-se um sistema de cromatografia de fase-reversa HPLC (Äkta - Amersham Biosciences, Suécia) e protocolo padronizado por nosso laboratório. Para este ensaio foi utilizado um *pool* de veneno coletado em diferentes meses do ano. Imediatamente antes da cromatografia, 10 mg (200 µL) de veneno foram diluídos em 800 µL de tampão A (H₂O 0,1% TFA - ácido trifluoroacético) e centrifugado a 14.000 g por 5 minutos. Esta solução foi aplicada a um sistema de cromatografia líquida de proteína (HPLC - Amersham Biosciences) em uma coluna de extração de fase sólida C₁₈ (Shim-pack PREP-ODS – Shimadzu) equilibrada com

tampão A. As proteínas retidas na coluna foram eluídas com um gradiente linear de tampão B (90 % acetonitrila 10% H₂O 0.1% TFA) de 10% a 80% em 60 minutos sob fluxo constante de 5 mL/min. O pico obtido na C₁₈ correspondente a Nattectina foi recromatografado em uma coluna C₈ (Beta Basic-8 – Thermo). O gradiente inicial a ser utilizado foi de 15% a 70% de solvente B por 50 minutos, sob fluxo constante de 1mL/min. Os perfis das eluições foram determinados pela medida de absorbância a 220 nm e apresentados em um cromatograma. A pureza do material foi determinada por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF em um sistema Ettan MALDI-TOF/Pro (Amersham Biosciences), usando á-CHCA como matriz e por coloração de prata de gel SDS-PAGE a 12% como descrito por Laemmli (1970). O material foi liofilizado, ressuspensão em água e estocado à -20° C até o momento do uso.

4.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

O veneno, a fração 5 e a nattectina foram submetidos a eletroforese SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida, na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio), como descrito por Laemmli (1970). Alíquotas contendo 10 µg foram diluídas em um mesmo volume de tampão de amostra (tampão TRIS/HCl 125 mM pH 6.8, contendo 2.5% (p/v) de SDS, 20% de glicerol, PMSF 1 mM, TLCK 1 mM, EDTA 4 mM e 0.05% de azul de bromofenol), e fervidas durante 5 minutos. As amostras foram aplicadas no gel de resolução 12% (p/v) e submetidas a uma corrida eletroforética sob corrente constante de 20 mA, com duração de 2 horas. Após o término da corrida, o gel foi corado com solução de prata. Os padrões de massa molecular utilizados foram â-galactosidase 116.0 kDa, Albumina 66.0 kDa, Ovalbumina 45.0 kDa, Lactato desidrogenase 35.0 kDa, Endonuclease de restrição Bsp98I 25. kDa, â-lactoglobulina 18.0 kDa e lisozima 14.4 kDa.

4.5. Espectrometria de massa

A análise das massas moleculares das frações obtidas por HPLC foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF, em um sistema Ettan MALDI-TOF/Pro (Amersham Biosciences). As amostras em solução foram misturadas na proporção de

1:1, com uma solução supersaturada de matriz para proteínas (ácido sinápico), depositadas sob placa de metal (0.4 a 0.8 μ L) e deixadas para secar em temperatura ambiente. Foi utilizado o modo automático de controle do equipamento e aquisição de dados que foram analisados por um *software*.

4.6. Avaliação do papel da Nattectina na indução da resposta imune inata

Para avaliar o papel da Nattectina na indução da resposta imune inata, utilizamos o protocolo descrito por Lima e colaboradores (2003), onde camundongos foram injetados por via intraperitoneal com 0.1, 1.0 ou 10 μ g da toxina Nattectina diluídas em 500 μ L de salina estéril. O grupo-controle foi injetado somente com salina estéril. Em diferentes períodos de tempo (1, 6 e 24 horas) após a administração da toxina, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal lavada com 6 mL de tampão PBS + 0.1% EDTA para obtenção da suspensão celular. O material coletado foi centrifugado a 1500 rpm a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e congelado à -20°C para dosagem de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios, enquanto o botão celular foi ressuscitado em PBS + 0.1% BSA para análise celular. A contagem de leucócitos totais foi efetuada em câmara de Neubauer após diluição de 1:10 em solução Turk (0.2% azul de cristal de violeta em 30% de ácido acético). Para a contagem diferencial, uma alíquota contendo 100 μ L da suspensão celular foi colocada em lâminas que foram submetidas à centrifugação em centrífuga Citospin. As lâminas foram coradas com Hema-3 e examinadas ao microscópio óptico para a contagem de 300 células em campos aleatoriamente selecionados que foram diferenciadas em neutrófilos e macrófagos, de acordo com os aspectos morfológicos como descrito em Cook e colaboradores (2003).

4.7. Indução da resposta imune específica em camundongos pela Nattectina

Camundongos foram imunizados nos dias 0 e 7 pela injeção intraperitoneal de 10 μ g de Nattectina adsorvida em 1.6 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ em um volume final de 500 μ L de salina estéril por animal, como descrito por Grund e colaboradores (2006). O grupo controle foi imunizado somente com $\text{Al}(\text{OH})_3$. Nos dias 0 e 14, os animais foram

sangrados pelo plexo oftálmico. O sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 10 °C para obtenção do plasma que foi estocado a 4 °C, para determinação de anticorpos. No 14º dia os animais foram sacrificados para retirada do baço e obtenção da suspensão celular.

4.8. Cultura de células linfóides

O perfil de citocinas induzido pela Nattectina foi determinado de acordo com a técnica descrita em Grund e colaboradores (2006). No 14º dia após a primeira imunização com Nattectina os animais foram sacrificados e os baços retirados, cortados e macerados no homogeneizador para a obtenção das células esplênicas. O homogenato celular foi centrifugado a 1.200 rpm durante 6 minutos à temperatura de 4°C. Em seguida, as hemácias foram lisadas com tampão salina 3.5%. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura RPMI 42401-018 (Gibco - Invitrogen, Co., CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado – SFB, 2 mM de L-glutamina, 0.1% 2-mercaptoetanol, 0.1 mM de aminoácidos não-essenciais, 1 mM de piruvato de sódio e 0.1% de penicilina/estreptomicina. A suspensão celular foi mantida no gelo por 10 minutos para a retirada dos grumos. A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o corante azul de Trypan. As células esplênicas (12×10^6 células/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços, re-estimuladas com 10 µg de Nattectina e mantidas a 37º C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24, 48 e 72 horas da incubação, as placas foram centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos a 4º C. Os sobrenadantes foram coletados e estocados a – 20º C para posterior dosagem de citocinas.

4.9. Determinação de nitritos/nitratos

A produção de óxido nítrico foi determinada pela quantificação dos níveis de nitrato no sobrenadante da suspensão celular obtida da cavidade peritoneal. Para tanto, foi empregada a técnica utilizada por Ding e colaboradores (1988). Foram adicionadas alíquotas de 50 µL das amostras e 100 µL das diluições da curva padrão em placas de 96 poços (Costar). Em seguida foram adicionados 50 µL de reagente de Griess

contendo na proporção 1:1 da solução A (1% sulfanilamida em 2.5% H_3PO_4) e solução B (1% N-1 Naphtyl–ethilenodiamine em 2.5% H_3PO_4). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da reação foi realizada a 550 nm em espectrofotômetro Victor 3 (Multilabel Counter, PerkinElmer). Os resultados foram expressos em μmoles com base na curva-padrão obtida com nitrato de sódio.

4.10. Dosagem dos níveis de mediadores lipídicos por ELISA

Leucotrieno B_4 e prostaglandina E_2 foram mensurados no sobrenadante celular obtido da cavidade peritoneal 6 horas após a injeção com a Nattectina utilizando Kits de ELISA de competição (Cayman Chemical, USA) de acordo com Junqueira et al., (2007). Foram adicionados em placa de 96 poços (Costar), previamente sensibilizada com os anticorpos monoclonais anti LTB_4 e PGE_2 , 50 μL das amostras e das curvas-padrões (500 pg/mL e 1000 pg/mL, respectivamente) com os mediadores conjugados com acetilcolinesterase. Em seguida, foram adicionados 50 μL do segundo anticorpo anti-IgG. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C . Após ciclo de lavagens com tampão de lavagem fosfato salina 0.05% Tween (PBST) foram adicionados 200 μL do reagente de cor para revelação. As placas foram mantidas sobre agitação por 90 minutos no escuro a temperatura ambiente. A leitura da reação foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro Victor 3 (Multilabel Counter, PerkinElmer). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com os mediadores inflamatórios recombinantes. O limite de detecção para os mediadores leucotrieno B_4 e prostaglandina E_2 foi de 3.9 pg/mL. Os resultados foram expressos como a média aritmética acrescida do desvio padrão.

4.11. Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas por ELISA

Para dosagem de citocinas e quimiocinas, placas de 96 poços (Costar) foram sensibilizadas com 100 μL de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina e quimiocina de acordo com Junqueira et al., (2007): anti-IL-1 α , anti-IL-6, anti-KC, anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-2 e anti-IFN- γ diluídos em tampão carbonato 0.1 M pH 9.6 e anti-TNF- α , anti-IL-12p70, anti-IL-10 e anti-MCP-1 diluídos em tampão fosfato de sódio 0.2

M pH 6.5. As placas foram incubadas por 18 horas a 4° C. Após lavagem com tampão fosfato salina 0.05% Tween (PBST) as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de PBS Tween 5% gelatina à 37°C por 3 horas. Após novo ciclo de lavagens, 100 µL das amostras ou dos padrões das citocinas e quimiocinas recombinantes foram adicionados e então as placas foram incubadas por mais 18 horas a 4°C. Após lavagem, 100 µL dos respectivos anticorpos biotinilados específicos de detecção para cada citocina e quimiocina (IL-1 α , IL-6, TNF- α , KC, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70 e IFN- γ) foram acrescentados por mais 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem das placas, 100 µL de estreptoatvidina-peroxidase foram adicionados por mais 1 hora à temperatura ambiente. Para a quimiocina MCP-1 foi adicionado o anticorpo de detecção marcado com peroxidase e após a incubação de 1 hora a temperatura ambiente a placa foi revelada. As reações foram reveladas pela adição de 100 µL de soluções 3.3' 5.5' tetrametilbenzidina (TMB) e H₂O₂ 1:2 e interrompidas pela adição de 50 µL de ácido cítrico 0.2 M por poço. A leitura da reação foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro Victor 3 (Multilabel Counter, PerkinElmer). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas e quimiocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-1 α , IL-6, TNF- α , MCP-1 e IL-5 foi de 7.8 pg/mL , para KC, IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-12p70 de 15.6 pg/mL e para IL-2 de 3.9 pg/mL. Os resultados foram expressos como a média aritmética acrescida do desvio padrão.

4.12. Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-NatTECTINA

A resposta humoral induzida pela NatTECTINA foi avaliada por ELISA, como descrito por Theakston colaboradores (1977). As placas de 96 poços foram sensibilizadas com 1 µg/mL de NatTECTINA diluída em 100 µL tampão carbonato pH 9.6 e incubadas por 18 horas a 4° C em câmara úmida. Após ciclo de lavagens com tampão fosfato salina 0.05% Tween (PBST) foram adicionados 200 µL/poço de solução bloqueadora (PBST 1% BSA) e as placas foram incubadas por 3 horas a 37° C. Após novo ciclo de lavagens, 100 µL do soro a ser testado em diluições seriadas no tampão de incubação (PBST 0.1% BSA) foram adicionados. Após 1 hora de incubação, os segundos anticorpos anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo conjugados com

peroxidase (1/500, 1/2000 e 1/2000, respectivamente) foram adicionados por 1 hora a 37° C. Ao final a reação foi revelada pela adição de 100 µL da mistura cromógena ortofenildiaminobenzidina (OPD) mais substrato da enzima (H₂O₂) e interrompida pela adição de 50 µL de ácido cítrico 0.2 M. A intensidade da reação foi determinada por leitura da absorbância em espectrofotômetro Victor 3 (Multilabel Counter, PerkinElmer) a 492 nm. Os resultados foram expressos como a média das diferentes diluições das amostras acrescida do desvio-padrão.

4.13. Obtenção de células dendríticas de medula óssea

Células dendríticas imaturas foram isoladas da medula óssea de camundongos virgens da linhagem BALB/c como descrito por Lutz e colaboradores (1999). Os fêmures foram removidos e as medulas ósseas foram lavadas com 2 mL de PBS estéril utilizando-se uma seringa (24 ¾ G) para desprender as células das trabéculas ósseas. As hemácias e os grumos foram retirados por decantação no gelo por 10 minutos. Em seguida, uma alíquota celular foi diluída em solução de 0.01% Trypan Blue (1:20) para contagem. As células foram cultivadas na concentração de 0.2×10^6 /mL em placas de petri de cultura (100 mm de diâmetro) com 8 mL de meio RPMI 42401-018 (Gibco - Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado – SFB, 1% de L-glutamina, 0.05 µg/ml asparagina e vitaminas, 0.1% 2-mercaptoetanol, 1% aminoácidos não-essenciais, 1% piruvato de sódio, 0.1% de penicilina/estreptomicina e 20 ng/ml de GM-CSF obtido de células J558L transfectadas com o gene murino de GM-CSF. No terceiro dia 8 mL de meio suplementado + 20 ng/ml de GM-CSF foram adicionados nas placas. Nos dias 6 e 8, metade do volume do sobrenadante celular foi coletado, centrifugado e desprezado. O botão celular foi ressuscitado em 8 mL de meio suplementado + 20 ng/ml de GM-CSF e devolvido para as placas originais. No décimo dia, as células aderentes e as células suspensas no sobrenadante foram coletadas, lavadas e centrifugadas a 1200 rpm, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular ressuscitado em 1 mL de meio RPMI 42401-018 suplementado para análise fenotípica das células por citometria de fluxo. Estas células imaturas foram utilizadas para os diversos experimentos posteriores. Aproximadamente 95% das células foram positivas para a expressão de CD11c.

4.14. Indução da maturação e ativação das células dendríticas imaturas pela *Nattectina*

Células dendríticas imaturas (1×10^6 células/mL) obtidas conforme o protocolo acima descrito foram cultivadas com 0.2 µg/mL de veneno de *T. nattereri* ou diferentes concentrações de *Nattectina* (0.1, 1 e 10 µg/mL) em meio RPMI 1640 suplementado. Após 24 horas, as células foram coletadas, lavadas com PBS e centrifugadas a 1200 rpm 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e estocado a – 20°C para posteriores dosagens de IL-10 e IL-12p70 e o botão celular foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI 42401-018 suplementado. As células foram contadas em 0.01% Trypan Blue (1:20) para análise da viabilidade e 1×10^6 células/mL foram marcadas com anticorpos recombinantes conjugados a fluoresceína ou ficoeritrina para análise por citometria de fluxo.

4.15. Análise por citometria de fluxo

Para analisar o subtipo de célula dendrítica obtido e o estado de maturação ou ativação por citometria de fluxo, 100 µL da suspensão celular contendo 1×10^6 células/mL foram lavadas com PBS, centrifugadas 1200 rpm 4°C por 10 minutos, ressuspensionadas em 1 mL de meio RPMI 42401-018 suplementado e incubadas com 2 µL do anticorpo anti FcγRII/III (rat anti-mouse IgG2b k CD16/CD32, 553140) por 30 minutos a 4°C, para evitar ligações inespecíficas. Em seguida as células foram lavadas com 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante celular foi desprezado e as células foram ressuspensionadas em meio de cultura e incubadas com os seguintes anticorpos recombinantes (BD-Pharmingen, Oxford, UK): isotipos controle rat IgG2b PE e FITC, rat IgG2a PE e PE-Cy5, Hamster IgG1 λ2 FITC e Hamster IgG2 PE; rat IgG2b k anti-mouse CD4 FITC (557307), rat IgG2a k anti-mouse CD8a PE (553032), rat IgG2a k anti-mouse B220 PE-Cy5 (553091), rat IgG2b k anti-mouse CD11b PE (557397), hamster IgG1 λ2 anti-mouse CD11c FITC (557400), rat IgG2b k anti-mouse IA/IE PE (557000), rat IgG2a k anti-mouse CD40 PE (553791), hamster IgG2 k anti-mouse CD80 PE (553769), rat IgG2a k anti-mouse CD86 PE (553692) por 20 minutos à 4°C no escuro. Em seguida, foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640. Em seguida, as

células foram lavadas com PBS contendo 0.1% de NaN_3 , centrifugadas e ressuspensas em formaldeído 1% e mantidas a 4° C até o momento da aquisição dos dados (10.000 eventos) no FACSCalibur de 3 cores (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). Os dados foram analisados usando o programa Cellquest (BD-Pharmingen). As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) seguido de marcação específica e as células mortas e grumadas foram dispensadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas para cada molécula avaliada. Os dados mostrados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.16. Determinação das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 por imunohistoquímica

Células dendríticas imaturas (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em lâminas de 8 poços (BD-Pharmingen) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 por 24 horas. Após a aderência das células, o sobrenadante foi desprezado e as células foram estimuladas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de Nattectina de acordo com protocolos já estabelecidos (GALIS et al., 1995; KOUWENHOVEN et al., 2002; GALANT et al., 2004). As células controle foram cultivadas apenas na presença de meio RPMI 42401-018. Após a incubação de 1 dia, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com PBS (2 x de 1 minuto) e fixadas com formaldeído a 3% por 1 hora a temperatura ambiente. Após ciclo de lavagens com PBS (3 x de 5 minutos) foram adicionados 100 μL de 3% H_2O_2 em PBS para bloqueio das peroxidases endógenas. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS (3 x de 5 minutos) e incubadas com 100 μL de 0.1% tripsina 0.1% CaCl_2 , por 10 minutos, seguido da adição 100 μL de 0.1% tripsina HCl 4 M por 15 minutos a temperatura ambiente. A reação foi neutralizada pela adição de PBS 0.1% Tween 0.05% BSA, por 10 minutos de incubação a temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS (3 x de 5 minutos) e incubadas com tampão de permeabilização (3% Triton X-100 em NH_4Cl 50 mM) por 5 minutos. Após novo ciclo de lavagens, as células foram incubadas por 1 hora com os anticorpos monoclonais (BD- Pharmingen) goat IgG anti-mouse MMP-2 (AF1488, R&D Systems) e goat IgG anti-mouse MMP-9 (AF909, R&D Systems)

previamente diluídos em PBS 0.1% BSA a temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (3 x de 5 minutos) e incubadas com o segundo anticorpo anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase diluído em PBS 0.1% BSA por 1 hora a temperatura ambiente, também em câmara úmida. A reação foi revelada usando o cromógeno 3'.3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma) associado com o substrato da enzima H_2O_2 por 5 minutos no escuro. As células foram contra-coradas com hematoxilina-eosina (HE) e visualizadas ao microscópio óptico (Axio Imager A1, Carl Zeiss, Alemanha).

4.17. Avaliação da apresentação da Nattectina pelas células dendríticas

Células dendríticas imaturas obtidas após o cultivo de 10 dias com GM-CSF (1×10^6 células/mL) foram incubadas com 30 μ g de Nattectina conjugada previamente com FITC (EZ-label FITC Protein labeling KIT, Pierce, USA) por 2 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 de acordo com Schnyder-Candrian e colaboradores (2006). Células dendríticas imaturas cultivadas apenas com meio e com Nattectina-FITC a 4°C foram consideradas controles negativo. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS + 1% BSA estéril e frio, fixadas em formaldeído a 1% e a intensidade de fluorescência média foi analisadas usando um citômetro de fluxo FACS-Calibur e Software de CellQuest (BD-Pharmingen).

4.18. Análise Estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas através da análise de variância (One-Way ANOVA) seguida dos testes Mann-Whitney para as células e Tukey para as citocinas, quimiocina e mediadores inflamatórios. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. O programa SPSS (Release 8.0, Standard Version, 1997) foi empregado.

5. Resultados

5.1. Obtenção da toxina Nattectina do veneno de *T. nattereri*

Para obtenção da Nattectina, inicialmente amostras contendo 10 mg de veneno de *T. nattereri* foram aplicadas em coluna preparativa C₁₈ fase reversa equilibrada em tampão H₂O 0.1% TFA (tampão A) e eluídas com gradiente de 10 a 80 % de acetonitrila de acordo com metodologia padronizada por nosso laboratório. O resultado do fracionamento encontra-se na Figura 1A: foram identificadas 7 frações, denominadas de 1 a 7, que foram submetidas ao sistema MALDI-TOF para análise das massas moleculares e determinação de pureza. Com base no trabalho de Magalhães e colaboradores (2006) que mostra que a Nattectina apresenta uma massa molecular de 15 kDa e ponto isoelétrico em torno de 9.73 determinamos que a toxina estava contida na fração 5.

Para isolar a Nattectina, a fração 5 foi aplicada em coluna analítica C₈, fase reversa (Figura 1B), equilibrada no mesmo tampão A. O material retido na coluna foi eluído com um gradiente de 15 a 70% de acetonitrila e a fração de interesse foi quantificada pela medida da absorbância a 280 nm. Posteriormente, a pureza da fração obtida após as duas cromatografias seqüenciais foi confirmada pelo aparecimento de banda única em torno de 15 KDa no gel corado com prata de poliacrilamida a 12% na presença de SDS (SDS-PAGE, Figura 2) e irrefutavelmente pela determinação da massa de 15.064,472 Da no espectrometro de massa (Figura 3).

Figura 1 - Perfil cromatográfico da toxina Nattectina do veneno de *T. nattereri*. Amostras de 10 mg do veneno de *T. nattereri* diluída em tampão A (H₂O 0.1% TFA) foram aplicadas na coluna preparativa C₁₈ fase reversa e eluídas com gradiente de tampão B (90% acetonitrila 10% H₂O 0.1% TFA) de 10 a 80% sob fluxo de 5,0 mL/min (A). O pico 5 foi recromatografado em uma coluna analítica C₈ de fase reversa e as proteínas foram eluídas em gradiente de tampão B de 15 a 70% sob fluxo de 1mL/min (B). A fração obtida na segunda cromatografia corresponde à Nattectina.

Figura 2 - Perfil eletroforético do veneno de *T. nattereri*, fração 5 e Nattectina. As amostras foram aplicadas (10 µg) no gel de poliacrilamida de resolução 12% que foi corado com solução de prata. Os números à esquerda correspondem aos marcadores da massa molecular. VTn: veneno de *Thalassophryne nattereri*; F5: pico 5 obtido na coluna preparativa C₁₈; Nat: Nattectina obtida na coluna analítica C₈.

Figura 3 - Confirmação da massa molecular da Nattectina por espectrometria MALDI-TOF. A fração obtida da coluna analítica C₈ foi misturada em solução supersaturada de matriz para proteínas (ácido sinápico) na proporção 1: 1 e submetida em um sistema MALDI-TOF para análise da massa molecular e determinação de pureza. A Nattectina apresenta massa molecular de aproximadamente 15.064,472 Da.

5.2. Indução da resposta imune inata pela Nattectina

O perfil da resposta inflamatória desencadeada pela toxina Nattectina foi avaliado através da indução de peritonite em camundongos. Para tanto, camundongos BALB/c foram injetados pela via intraperitoneal com 10 µg de Nattectina diluída em 500 µL de salina estéril. Após diferentes períodos de tempo (1, 6 e 24 horas) os animais foram sacrificados para obtenção do líquido da cavidade peritoneal. Foram realizadas análises do influxo leucocitário para a cavidade peritoneal e determinado os níveis dos mediadores lipídicos (LTB₄, PGE₂), óxido nítrico (NO), citocinas (IL-1 α , IL-6 e TNF- α , IL-10 e IL-12p70) e quimiocinas (MCP-1 e KC) no sobrenadante da suspensão celular.

5.2.1. Peritonite induzida pela Nattectina

Nossos resultados mostram que a Nattectina foi capaz de induzir um intenso e progressivo recrutamento leucocitário para a cavidade peritoneal dos animais, em relação ao controle, nos diferentes tempos analisados (Figura 4). Após 1 hora da injeção da toxina o influxo celular foi caracterizado pelo recrutamento de neutrófilos que permaneceu significativamente elevado até 6 horas, alcançando níveis basais em 24 horas (Figura 4A e 4B). Nestes dois períodos de tempo iniciais não observamos influxo de macrófagos. Porém, observamos que a Nattectina induziu um intenso recrutamento de macrófagos para a cavidade peritoneal dos animais em 24 horas, quando comparado com o grupo controle (Figura 4C).

Figura 4 - Indução de peritonite pela Nattectina. Camundongos BALB/c foram injetados i.p. com 10 μ g de Nattectina em 500 μ L de salina estéril. Animais injetados somente com salina estéril foram considerados controle. Após diferentes períodos, 1 (A), 6 (B) e 24 (C) horas os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal lavada para obtenção da suspensão celular onde foi realizado a contagem total e diferencial das células. Os resultados são representados como a média $\pm$ desvio-padrão de $n = 06$ animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo-controle.

5.2.2. Síntese de mediadores inflamatórios induzidos pela Nattectina

A peritonite é uma reação inflamatória aguda caracterizada por um influxo leucocitário acompanhado da produção e liberação de diversos mediadores inflamatórios. Podemos observar nas Figuras 5 que a Nattectina induziu na cavidade peritoneal em 6 horas a liberação de ambos os mediadores lipídicos LTB₄ e PGE₂.

Além disso, a Nattectina induziu a liberação de elevados níveis de IL-1 α (Figura 6A) em 1 e 6 horas após a injeção e de IL-6 (Figura 6B) apenas no período de 1 hora.

Interessantemente, podemos observar que a Nattectina induziu a síntese da quimiocina MCP-1, quimiotática para macrófagos, em 1 e 24 horas após a sua injeção (Figura 7A), enquanto a quimiocina KC, responsável pelo recrutamento de neutrófilos, foi detectada em altos níveis somente no período de 1 hora após a injeção (Figura 7D). Por outro lado, a Nattectina não induziu a síntese de TNF- α ou de óxido nítrico em nenhum tempo analisado (dado não mostrado).

Considerando que a Nattectina induziu um influxo leucocitário com recrutamento inicial de neutrófilos sendo substituído tardiamente por macrófagos, e que estas últimas são as principais células produtoras das citocinas IL-10 e IL-12p70 avaliamos a presença destas citocinas no sobrenadante da suspensão celular dos animais injetados com a Nattectina. Na Figura 8A observamos a presença de níveis elevados de IL-10 nos períodos de 6 e 24 horas, enquanto que a síntese de IL-12p70 (Figura 8B) foi detectada apenas em 1 e principalmente 24 horas após a injeção, quando comparada com o controle.

Figura 5 - Indução de mediadores lipídicos pela Nattectina na cavidade peritoneal. Concentrações de LTB₄ (A) e PGE₂ (B) foram mensuradas no sobrenadante da suspensão celular 6 horas após a injeção de 10 µg da Nattectina ou salina por ELISA. A leitura das absorbâncias das amostras foi realizada a 450 nm e as concentrações quantificadas a partir das curvas-padrão. O limite de detecção foi de 3.9 pg/mL para LTB₄ e PGE₂. Cada barra representa a média ± desvio-padrão de n = 06 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo-controle

Figura 6 - Indução de citocinas inflamatórias pela Nattectina na cavidade peritoneal. Camundongos BALB/c foram injetados i.p com 10 µg de Nattectina em 500 µL de salina estéril. Animais do grupo controle foram injetados apenas com salina estéril. Após diferentes períodos de tempo (1, 6, ou 24 horas) os níveis das citocinas, IL-1 α (A) e IL-6 (B) foram determinadas no sobrenadante da suspensão celular da cavidade peritoneal por ELISA. O limite de detecção para IL-1 α e IL-6 foi de 7.8 pg/mL. Cada barra representa a média $\pm$ desvio-padrão de n = 06 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo-controle.

Figura 7 - Indução de quimiocinas pela Nattectina na cavidade peritoneal. Camundongos BALB/c foram injetados i.p com 10 μ g de Nattectina em 500 μ L de salina estéril. Animais do grupo controle foram injetados apenas com salina estéril. Após diferentes períodos de tempo (1, 6, ou 24 horas) os níveis das quimiocinas KC (A) e MCP-1 (B) foram determinadas no sobrenadante da suspensão celular da cavidade peritoneal por ELISA. O limite de detecção para MCP-1 foi de 7.8 pg/mL e de 15.6 pg/mL para KC. Cada barra representa a média $\pm$ desvio-padrão de n = 06 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo-controle.

Figura 8 - Nattectina induz a produção de IL-10 e IL-12p70 na cavidade peritoneal. Camundongos Balb/c foram injetados i.p. com 10 µg de Nattectina em 500 µL de salina estéril. O controle representa animais injetados apenas com salina estéril. Após diferentes períodos de tempo (1, 6, e 24 h) os níveis das citocinas IL-10 (A) e IL-12p70 (B) foram determinados no sobrenadante da suspensão celular da cavidade peritoneal por ELISA. O limite de detecção foi de 15.6 pg/mL. Cada barra representa a média ± desvio-padrão de n = 06 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo-controle.

5.3. Resposta imune induzida pela Nattectina

A resposta imune desencadeada pela Nattectina foi avaliada pela produção dos anticorpos antígenos-específicos IgG, IgG2a e IgG1 e pela síntese das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70 e IFN- γ que caracterizam a ativação de clones de linfócitos Th1 ou Th2. Para tanto, camundongos BALB/c foram injetados pela via intraperitoneal com 10 μ g de Nattectina adsorvidas em 1.6 mg de Al(OH)₃ nos dias 0 e 7. Após 14 dias os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma e as células esplênicas foram re-estimuladas *in vitro* com 10 μ g de Nattectina para detecção da produção de citocinas.

5.3.1 Nattectina induz a produção de anticorpos específicos

De acordo com os nossos resultados, observamos que a Nattectina induziu uma intensa resposta imune humoral secundária, caracterizada por altos níveis de anticorpos IgG anti-Nattectina (Figura 9A), sendo estes do subtipo IgG1 e principalmente IgG2a (Figuras 9B e 9C).

5.3.2. Nattectina induz a produção de citocinas pelas células esplênicas

Na Tabela 1 observamos que as células esplênicas obtidas de animais imunizados com a Nattectina produziram altos níveis da citocina IL-10 em 24 e 48 horas após a re-estimulação *in vitro* com a toxina. Ademais, a presença de IFN- γ no sobrenadante da cultura das células re-estimuladas com Nattectina foi detectada somente em 72 horas. Interessantemente, a re-estimulação específica não induziu a síntese de IL-2, IL-4, IL-5 ou IL-12p70 pelas células esplênicas nos tempos analisados (dados não mostrados).

Figura 9 - Níveis plasmáticos de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-Nattectina. Camundongos BALB/c foram imunizados nos dias 0 e 7 com 10 μ g de Nattectina adsorvidas em 1.6 mg de $Al(OH)_3$ e no 14º dia foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma. Animais imunizados somente com $Al(OH)_3$ foram considerados controle. Os anticorpos foram avaliados pela técnica de ELISA. Os pontos representam a média $\pm$ desvio-padrão de n = 06 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo-controle.

TABELA 1. Produção de citocinas pelas células esplênicas obtidas de camundongos imunizados com Nattectina após a re-estimulação *in vitro* com a Nattectina

		24 h	48 h	72 h
IL-10 (pg/mL)	Controle	n.d.	n.d.	n.d.
	Nattectina	548 ± 2,74*	73 ± 0,26*	n.d.
IFN- γ (pg/mL)	Controle	n.d.	n.d.	1790 ± 15,22
	Nattectina	n.d.	n.d.	3500 ± 32,25*

Camundongos BALB/c foram imunizados com 10 μ g de Nattectina adsorvidas em 1.6 mg de Al(OH)₃ e sacrificados 14 dias após a imunização para a remoção dos baços e obtenção da suspensão celular. As citocinas foram avaliadas no sobrenadante celular da cultura de células esplênicas nos períodos 24, 48 e 72 horas após a re-estimulação com 10 μ g de Nattectina por ELISA. O limite inferior de detecção foi de 15.62 pg/mL. Os resultados são representados como a média ± desvio-padrão das amostras (n = 06 animais/grupo). Os dados mostrados são representativos de dois experimentos independentes. * $p < 0.05$ em relação ao controle.

5.4. Indução da maturação das células dendríticas

Células dendríticas de medula óssea de fêmures de camundongos obtidas a partir do protocolo padronizado por Lutz e colaboradores (1999) foram utilizadas para os experimentos de ativação com a Nattectina. Para tanto, avaliamos por citometria de fluxo a expressão nas células dendríticas das moléculas MHC classe II e das moléculas co-estimulatórias CD40, CD80 e CD86. Em seguida avaliamos por ELISA a indução da síntese das citocinas IL-10 e IL-12p70 pela Nattectina, e finalmente por imunohistoquímica a presença das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9.

5.4.1. Fenotipagem das células dendríticas

Na Figura 10 observamos que 94% e 71% das células obtidas da medula óssea cultivadas por 10 dias na presença do fator de crescimento GM-CSF expressaram as moléculas CD11b e CD11c na superfície celular, respectivamente. Além disso, podemos afirmar que na população obtida não havia a presença de linfócitos T auxiliares, citotóxicos ou de linfócitos B, devido ao baixo número de células expressando as moléculas CD4 (0.32%), CD8 (1.41%) ou B220 (0.25%), respectivamente. Na população de células totais obtida, 2.35% expressaram a molécula co-estimulatória CD40, 31.3% a molécula CD86 e 79.8% a molécula CD80.

Entretanto, as células dendríticas CD11c positivas apresentaram baixa expressão das moléculas co-estimulatórias CD40 (3.76%), CD80 (13.56%), CD86 (8.55%) e uma expressão moderada de moléculas MHC classe II (49.9%). Raras células CD11c+ expressaram o marcador B220 (1.51%) (Figura 11). Sendo assim, estas células apresentaram um fenótipo típico de células dendríticas imaturas de origem mielóide (CD11b^{high} CD11c^{high} B220^{low} MHCII^{high} CD40^{low} CD80^{low} CD86^{low}).

Figura 10 - Fenotipagem das células dendríticas obtidas da medula óssea. Células da medula óssea de fêmures de camundongos BALB/c foram cultivadas na presença de GM-CSF (20 ng/mL) por 10 dias para a obtenção de células dendríticas imaturas. Estas células ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para diferentes populações celulares (CD11b, CD11c, B220, CD4 e CD8) e moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) conjugados aos fluorocromos FITC, PE ou CY e mantidas a 4°C por um período de até 2 horas para a aquisição dos dados (10.000 eventos) em FACSCalibur de 3 cores (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). Os dados foram analisados usando o programa Cellquest (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) e depois quanto à fluorescência. Os números representam a porcentagem de células positivas para a expressão da molécula. Os dados mostrados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 11 - Análise do estado de maturação das células dendríticas. Células dendríticas derivadas da medula óssea CD11c positivas ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram caracterizadas quanto à expressão das moléculas B220, MHC classe II, CD80, CD86 e CD40 pela marcação com anticorpos monoclonais específicos e mantidas a 4° C por um período de até 2 horas para a aquisição dos dados (10.000 eventos) em FACSCalibur de 3 cores (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). Os dados foram analisados usando o programa Cellquest (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) e depois pela dupla marcação. Os números representam a porcentagem de células positivas para a expressão da molécula. Os dados mostrados são representativos de dois experimentos independentes.

5.4.2. Ativação das células dendríticas induzida pela Nattectina

Após obtenção e caracterização das células dendríticas imaturas avaliamos o efeito do veneno de *T. nattereri* e principalmente da Nattectina na ativação e maturação destas células. Na figura 12 observamos que apenas 0.2 µg/mL de veneno foram suficientes para induzir um aumento no número de células que expressaram as moléculas co-estimulatórias CD40 (12,27%), CD80 (47,91%) e CD86 (18,20%). Interessantemente, quando as células dendríticas imaturas foram estimuladas com Nattectina, nas concentrações de 0.1, 1 e 10 µg/mL, por 24 horas, observamos um aumento no número de células positivas para as moléculas CD40, CD80 e CD86 (Figura 13), principalmente com a concentração de 10 µg/mL. Entretanto, a concentração de 1 µg/mL de Nattectina se mostrou a menos eficiente quando comparadas com o veneno e as outras concentrações da toxina utilizadas. Tanto o veneno como as diferentes concentrações de Nattectina não induziram um aumento na expressão da molécula MHC classe II quando comparado com as células sem estímulo, porém foram capazes de manter semelhantes níveis de expressão desta molécula (Figuras 12 e 13).

5.4.3. Produção de IL-10 e IL-12p70 pelas células dendríticas

Células dendríticas quando ativadas produzem citocinas tais como IL-2, IL-10 e IL-12p70 (EDWARDS et al., 2002). Dessa maneira, avaliamos no sobrenadante da cultura celular, os níveis das citocinas IL-12p70 e IL-10 induzidos pelas diferentes concentrações da Nattectina. Podemos observar, Figura 14 que a Nattectina além de induzir um aumento na expressão dos marcadores de maturação também induziu, sem diferença entre as diferentes concentrações (0.1, 1 e 10 µg/mL), a síntese de altos níveis de IL-12p70 e IL-10, 24 horas após a estimulação.

(A) Sem estímulo **(B) Veneno 0.2 µg/mL**

Figura 12 - Ativação das células dendríticas pelo veneno de *T. nattereri*. Células dendríticas imaturas (1×10^6 /mL) foram estimuladas com 0.2 µg/mL de veneno (B) ou não (A) por 24 horas e em seguida marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD11c-FITC, anti-MHC classe II-PE, anti-CD80-PE, anti-CD86-PE e anti-CD40-PE e mantidas a 4° C por um período de até 2 horas para a aquisição dos dados (10.000 eventos) em FACSCalibur de 3 cores (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). Os dados foram analisados usando o programa Cellquest (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) e depois pela dupla marcação. Os números representam a porcentagem de células positivas para a expressão da molécula. Os dados mostrados são representativos de dois experimentos independentes.

(A) Sem estímulo **(B) Nattectina 0.1 µg/mL** **(C) Nattectina 1.0 µg/mL** **(D) Nattectina 10 µg/mL**

Figura 13 - Nattectina induz maturação das células dendríticas. Células dendríticas (1×10^6 /mL) foram estimuladas ou não com diferentes concentrações de Nattectina por 24 horas e em seguida marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD11c-FITC, anti-MHC classe II-PE, anti-CD80-PE, anti-CD86-PE e anti-CD40-PE e mantidas a 4° C por um período de até 2 horas para a aquisição dos dados (10.000 eventos) em FACSCalibur de 3 cores (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). Os dados foram analisados usando o programa Cellquest (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) e depois pela dupla marcação. Os números representam a porcentagem de células positivas para a expressão da molécula. Os dados mostrados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 14 - Produção de IL-12p70 e IL-10 pelas células dendríticas estimuladas com Nattectina. Células dendríticas imaturas ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram estimuladas com as concentrações de 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de Nattectina por 24 horas. Os níveis das citocinas IL-12p70 (A) e IL-10 (B) foram determinados no sobrenadante da cultura celular por ELISA. O limite de detecção foi de 15,6 pg/mL. Os resultados representam as médias $\pm$ desvios-padrão das amostras de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ em relação ao grupo-controle.

5.4.4. Expressão de MMP-2 e MMP-9 nas células dendríticas

A migração das células dendríticas dos tecidos periféricos para os linfonodos, através da matriz extracelular, é coordenada por quimiocinas, moléculas de adesão, citocinas e principalmente por metaloproteinases de matriz. As células dendríticas imaturas estimuladas com 10 µg/mL de Nattectina, por 24 horas, apresentaram uma grande expressão das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9, quando comparadas com as células sem estímulo (Figura 15). Além disso, podemos observar que houve um aumento da expressão de MMP-9, tanto no núcleo, quanto no citoplasma (Figura 15D), e que a MMP-2 estava presente apenas no citoplasma das células dendríticas (Figura 15B).

Figura 15 - Expressão de MMP-2 e MMP-9 nas células dendríticas ativadas pela Nattectina. Células dendríticas imaturas ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram estimuladas com $10 \mu\text{g/mL}$ de Nattectina por 24 horas. A expressão das metaloproteinases MMP-2 (B) e MMP-9 (D) foi analisada por imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais específicos para as MMPs (R&D Systems). As fotografias foram capturadas e analisadas usando um microscópio de fluorescência (Axio Imager A1, Carl Zeiss, Alemanha).

5.5. Apresentação antigênica da Nattectina pelas células dendríticas

A expressão aumentada de moléculas MHC classe II e co-estimulatórias assim como a produção de IL-12p70 por células dendríticas amadurecidas por diversos estímulos está correlacionada com a habilidade destas células em apresentar o antígeno e ativar os linfócitos T, sendo consideradas então imunogênicas (REIS e SOUSA, 2006). Finalmente, verificamos uma grande habilidade (98%) das células dendríticas imaturas de apresentarem o antígeno, Nattectina conjugada ao fluorocromo FITC, em relação às células dendríticas controle (Figura 16).

Figura 16 - Indução da apresentação do antígeno pelas células dendríticas. Células dendríticas imaturas obtidas após o cultivo de 10 dias com GM-CSF ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubadas com $30 \mu\text{g}$ de Nattectina conjugada previamente com FITC (EZ-label FITC Protein labeling KIT, Pierce, USA) por 2 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Células dendríticas imaturas cultivadas apenas com meio ou com Nattectina-FITC a 4°C foram consideradas controles negativo. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1% BSA estéril e frio, fixadas em formaldeído a 1% e a intensidade média de fluorescência foi

analisadas usando um citômetro de fluxo FACS-Calibur e Software de CellQuest (Becton Dickinson).

6. Discussão

O peixe *Thalassophryne nattereri* conhecido popularmente como niquim está distribuído principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (FACÓ et al., 2005) e provoca inúmeros acidentes que ocorrem através do contato, principalmente, das regiões plantar ou palmar das vítimas (banhistas e pescadores) com o aparelho inoculador do veneno, representado por quatro espinhos pontiagudos e canaliculados conectados a glândulas produtoras de veneno. Os sintomas decorrentes do envenenamento (dor, eritema e edema) e as seqüelas deixadas pelo acidente (necrose de difícil cicatrização) acrescidos da inexistência de um tratamento que reverta tais efeitos patológicos geram um sério problema sócio-econômico.

O seu veneno ou suas toxinas vêm sendo amplamente estudados quanto a diferentes aspectos como: os efeitos tóxicos causados nas vítimas humanas (FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000) e em modelos experimentais (LOPES-FERREIRA et al., 1998, 2001, 2002; FACÓ et al., 2003), os aspectos bioquímicos e farmacológicos (LIMA et al., 2003; LOPES-FERREIRA et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2005, 2006), a capacidade de indução de anticorpos neutralizantes para os principais efeitos tóxicos em camundongos e os mecanismos imunológicos envolvidos nesta resposta (LOPES-FERREIRA et al., 2000; GRUND et al., 2006; PIRAN-SOARES et al., 2007). Assim, o estudo deste veneno tornou-se importante para o entendimento do processo de lesão e regeneração tecidual visto no envenenamento como para o entendimento da relação entre as diferentes classes de toxinas contidas nele e os mecanismos de ação. Diante do exposto, avaliamos neste trabalho o efeito da toxina Nattectina, lectina isolada do veneno de *T. nattereri*, na indução da resposta imune inata em um modelo murino de inflamação e subseqüentemente seu efeito na ativação das células dendríticas e na indução da resposta imune adaptativa.

Inicialmente, a toxina foi obtida por fracionamento do veneno de *T. nattereri* em cromatografia de fase reversa C₁₈ (FPLC) que possibilitou a separação de 7 frações.

Através da análise por eletroforese e espectrometria de massa (MALDI-TOF) foi determinado que a fração 5 representava a toxina de interesse, porém havia a presença de outras toxinas majoritárias do veneno nesta fração. Sendo assim, a fração foi submetida a uma segunda cromatografia de fase reversa C₈ que possibilitou a obtenção da Nattectina pura, confirmado por espectrometria de massa e eletroforese de gel.

De acordo com o recente trabalho de Magalhães e colaboradores (2006), a Nattectina, cujo pI é 9.73 MM e massa molecular de 15 kDa, apresenta homologia com lectinas tipo C. A Nattectina representa 0.8% das toxinas presentes no veneno de *T. nattereri* e apresenta afinidade por galactose, semelhante as galectinas. Dependendo da seqüência de aminoácidos presentes no domínio CRD, as lectinas tipo C têm afinidade para manose, galactose ou estruturas de fucose (CAMBI e FIGDOR, 2005). Recentes estudos mostram que as galectinas, uma família de lectinas animais que apresentam afinidade por oligossacarídeos contendo â-galactose desempenham diferentes funções nas respostas imune inata e adaptativa, reconhecendo padrões de carboidratos presentes em microorganismos e modulando os processos das respostas inflamatórias agudas (RUBINSTEIN et al., 2004).

A inflamação é um processo complexo e envolve a ativação seqüencial de diversas vias de sinalização que conduzem à produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios importantes para o extravasamento de células imunes, responsáveis pela resolução do processo inflamatório e manutenção da hemostasia tecidual. No envenenamento pelo peixe *T. nattereri*, sinais cardinais da inflamação estão presentes como dor, edema, eritema, rubor e tumor. Além disso, foi demonstrado que o veneno de *T. nattereri* induz uma resposta inflamatória na pata de camundongos com liberação e ativação de citocinas pró-inflamatórias, porém com escasso infiltrado leucocitário (LIMA et al., 2003) e uma deficiente regeneração tecidual (LOPES-FERREIRA et al., 2001). Neste contexto, observamos pelos nossos resultados que de maneira semelhante à ação do veneno no peritônio, a Nattectina induziu uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal murina com grande influxo leucocitário, caracterizado pelo recrutamento de neutrófilos nos períodos mais recentes (1 e 6 horas após a injeção) e de macrófagos mais tardiamente em 24 horas. O que mostra que a escassez de células na pata de camundongos induzida pelo veneno pode estar relacionada à ação de

outras toxinas presentes no veneno como, por exemplo, as toxinas majoritárias Natterinas com ação cininogenásica e não à ação da Nattectina que foi capaz de induzir recrutamento celular.

O extravasamento de células imunes do sangue periférico através do endotélio vascular para a matriz extracelular dos tecidos é um evento comum em manifestações inflamatórias (CID, 1996). A infiltração tecidual por leucócitos necessita de interações dinâmicas, finamente reguladas entre leucócitos, células endoteliais e um complexo de receptores na superfície da matriz extracelular (SPRINGER, 1994; BUTCHER et al., 1996). As moléculas de adesão celular são glicoproteínas expressas na superfície celular que medeiam o contato entre células ou entre células e a matriz extracelular. As moléculas de adesão estão divididas em quatro superfamílias, dependendo de características moleculares comuns: integrinas, selectinas, superfamília das imunoglobulinas e caderinas. A expressão e a função destas moléculas são reguladas por diversos mediadores pró-inflamatórios (KAPLANSKI et al., 2003) e da combinação particular das diferentes moléculas de adesão, do tipo de citocinas, quimiocinas e mediadores sintetizados no sítio da inflamação resulta a migração de um ou outro tipo de célula.

O processo de extravasamento leucocitário ocorre inicialmente a partir da vasodilatação de vênulas pós-capilares e mudanças no fluxo sanguíneo (desaceleração), resultando na marginação dos leucócitos ao longo do endotélio vascular, processo este mediado por selectinas e seus ligantes, ricos em carboidratos. À medida que o leucócito rola, as L-selectinas se desprendem e suas integrinas são ativadas por pelo menos uma de uma variedade de quimiocinas e citocinas quimiotáticas associadas à superfície endotelial. Quando ocorre a ativação do leucócito sobrevém a parada do rolamento com firme adesão ao endotélio, evento este resultante da ligação de integrinas $\beta 1$ e $\beta 2$ expressas nos leucócitos com vários membros da superfamília das imunoglobulinas expressas no endotélio (ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1). Após a firme fixação ocorre o achatamento da célula, reduzindo a exposição às forças decorrentes do fluxo sanguíneo vascular, aumentando-se desta forma a área de contato com a superfície endotelial vascular. Finalmente o leucócito migra entre as células

endoteliais da região apical para a superfície basolateral (diapedese) em direção ao espaço extravascular.

Macrófagos residentes nos tecidos iniciam o processo inflamatório pela secreção de citocinas pró-inflamatórias ou “de alerta” (IL-1, TNF- α e IL-6) que desencadeiam uma série de reações humorais e celulares, tanto no sítio da inflamação quanto à distância. A ativação das células do estroma (como fibroblastos e células endoteliais) pelas citocinas IL-1 e TNF- α provoca a secreção de quimiocinas, principalmente IL-8 ou KC em camundongos e MCP-1 que são quimiotáticas para neutrófilos e células mononucleares, respectivamente (CAMPBELL e BUTCHER, 2000; HANADA e YOSHIMURA, 2002). Conhecer o perfil das citocinas liberadas durante o envenenamento pode nos levar a uma modulação da resposta inflamatória. Em nosso modelo murino de peritonite observamos que a Nattectina induziu, além do recrutamento celular, a liberação de diversos mediadores inflamatórios como LTB₄, PGE₂, IL-1 β , IL-6, MCP-1, KC, IL-10 e IL-12p70, sem, no entanto induzir a produção de TNF- α ou óxido nítrico.

A IL-1 é uma potente citocina pró-inflamatória (SMITH et al., 2000) capaz de induzir múltiplas cascatas de sinalização que desencadeiam mecanismos de defesa para o organismo ou paradoxalmente contribuem para a injúria tecidual (O’NEILL e DINARELLO, 2000). IL-1 estimula a expressão de genes da resposta aguda como *c-fos* e *c-jun* bem como múltiplas citocinas e fatores inflamatórios que dirigem a degradação da matrix extracelular (GOLDRING, 2003) na artrite reumatóide, fibrose pulmonar e doenças periodontais (DAYER e BRESNIHAN, 2002; JINDAL e AGARWAL, 2005; LOOS et al., 2005). Após a ligação de IL-1 ao seu receptor, proteínas são recrutadas ao complexo intracelular (WESCHE et al., 1997) incluindo as quinases associadas ao receptor IRAK1 e IRAK2 (IL-1R-associated kinases), TOLLIP (*Toll-interacting protein*) e a proteína adaptadora MYD88 (*myeloid differentiation primary response gene*) (BURNS et al., 1998, 2000). IRAK é rapidamente fosforilada e se associa à TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) (BURNS et al., 2000); esta associação é necessária para a ativação subsequente do fator nuclear κ B (NF- κ B). Assim, a ligação de IL-1 ao receptor de IL-1R pode ativar múltiplos eventos sinalizadores que levam em última instância à expressão de genes mediadores da inflamação e frequentemente da destruição tecidual

(QWARNSTROM et al., 1991; PALSSON et al., 2000; MATTHEWS e O'NEILL, 1999; LUO e MCCULLOCH, 1997; ZHU et al., 1998; MARALDI et al., 1999; BERGMAN et al., 2003).

A IL-6 é considerada uma citocina multifuncional envolvida na regulação de uma variedade de respostas celulares, incluindo sua atuação juntamente com GM-CSF sobre a produção de monócitos na medula óssea (JANSEN et al., 1992). IL-6 pode agir inibindo a produção de TNF- α , enquanto o TNF- α induz a síntese de IL-6. Trabalhos mostraram que o tratamento com IL-6 de animais imunizados com BCG e desafiados com LPS reduz os níveis séricos de TNF- α . Além disso, a inibição da produção de TNF- α pela IL-6 foi também demonstrada em cultura de monócitos humanos. A ação inibitória da IL-6 sobre a produção de TNF- α pode representar uma forma de controle da amplificação da resposta inflamatória, uma vez que TNF- α e IL-1 são potentes indutores da síntese de IL-6 (ADERKA et al., 1989). Estes achados corroboram nossos resultados que mostram a indução da produção de IL-1 β e IL-6 pela Nattectina e ausência de produção de TNF- α , indicando que a Nattectina induziu um processo inflamatório regulável por uma alça de controle negativo. Ademais a Nattectina gerou também nos períodos mais tardios da peritonite a produção da citocina IL-10 que pode ter exercido sua atividade anti-inflamatória, controlando a amplificação da resposta. IL-10 foi primeiramente identificada como uma citocina produzida por clones Th2 capaz de inibir a síntese de IFN- γ por clones Th1 (MOSMANN et al., 1991). Outros trabalhos em humanos relatam que esta citocina também pode ser produzida por clones Th1 (YSSEL et al., 1992; DEL PRETE et al., 1993). Ela é considerada um desativador de macrófagos: tem a capacidade de inibir a síntese das moléculas B7-1 e B7-2, diminuindo a sua expressão na superfície de macrófagos e também de inibir a capacidade fagocítica e apresentação antigênica (LANG et al., 2002).

É interessante assinalar que a produção de IL-12p70 induzida pela Nattectina neste modelo de peritonite, provavelmente também pelos macrófagos, pode ter sido um sinalizador para a produção de IL-10, como demonstrado por Gerosa e colaboradores (1996).

A citocina IL-6, além de apresentar propriedades pró-inflamatórias, devido à sua capacidade de controlar o recrutamento pela indução de aumento na expressão de

ICAM-1 nas células endoteliais e redução nos níveis de L-selectina nos leucócitos polimorfonucleares circulantes (SUWA et al., 2002), ativação e apoptose de leucócitos, principalmente neutrófilos, atua também na regulação da troca da resposta imune inata para a resposta adaptativa (JONES et al., 2005). O que nos faz sugerir que esta citocina e os outros mediadores inflamatórios produzidos em resposta a Nattectina estejam envolvidos com o desencadeamento da resposta imune adaptativa observada.

Como consequência das mudanças morfo-estruturais sofridas pelas células endoteliais e pelas intersticiais, suas membranas plasmáticas são rapidamente remodeladas e geram mediadores lipídicos biologicamente ativos (GALLIN et al., 1992; PAUL, 1998). Os fosfolipídios de membrana são clivados por duas vias enzimáticas distintas: a da cicloxigenase, gerando as prostaglandinas (PGD) e as tromboxanas (TBX), e a da lipoxigenase, gerando os leucotrienos (LCT) e as lipoxinas. Os eicosanoides participam na modulação da motilidade e adesão celular, aumentam a permeabilidade vascular e medeiam diversos processos na inflamação (NATHOO et al., 2004). Recentes estudos mostram que o tratamento de monócitos humanos com PGE_2 afeta a expressão de receptores para quimiocinas e modula a responsividade destas células à ação quimiotática, diminuindo a expressão do receptor para MIP-1 α e MIP-1 β (CCR5), porém não interferindo na expressão dos receptores CCR2 ou CXCR4, importantes na quimiotaxia de monócitos em resposta as quimiocinas MCP-1 e RANTES (PANZER et al., 2004).

O LTB_4 é produzido principalmente neutrófilos, macrófagos e mastócitos e medeiam diversas respostas que incluem a secreção de enzimas lisossomais, ativação da enzima NADPH oxidase, formação de óxido nítrico, fagocitose, quimiotaxia de neutrófilos (TODA et al., 2002). Trabalhos mostram que o LTB_4 induz aumento na expressão de LFA-1, MAC-1 e integrina α_2 nos leucócitos e ICAM-1 (CD54) na superfície das células endoteliais (SEO et al., 2001). Recentes dados também indicam que LTB_4 é um forte quimioatrator para linfócitos T, criando uma ligação funcional entre a resposta inata e a adaptativa (GOODARZI et al., 2003; OTT et al., 2003; TAGER et al., 2003).

Sendo assim, podemos sugerir que a PGE_2 e o LTB_4 produzidos em resposta a ação da Nattectina agiram em sinergia com as quimiocinas MCP-1 ou KC para o

recrutamento dos monócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais, respectivamente.

Vale ressaltar que a Nattectina não induziu a síntese de óxido nítrico (NO), apesar de ter induzido altos níveis de LTB₄, um importante mediador na síntese de óxido nítrico (LEHTONEN et al., 2007). NO é uma molécula gasosa sinalizadora que regula várias funções fisiológicas e patológicas no pulmão e no organismo em geral (VALLANCE et al., 2002; RICCIARDOLO, 2003). É sintetizado em pequenas quantidades pela enzima constitutiva *nitric oxide synthases* (cNOS) em condições fisiológicas. Na inflamação, a enzima *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) induz a produção de maiores quantidades de NO por longos períodos (ALDERTON et al., 2001; KORHNEN et al., 2005). Lopes-Ferreira e colaboradores (2004) demonstraram que o pré-tratamento com o inibidor de óxido nítrico, o L-NAME, não alterou as atividades edematogênica e nociceptiva induzidas pelo veneno de *T. natterei*, excluindo assim, o papel do óxido nítrico como mediador do processo inflamatório. Além disso, podemos correlacionar a ausência do óxido nítrico na resposta inflamatória induzida pela Nattectina com a síntese ineficiente de TNF- α visto ser conhecido o seu papel na indução da síntese por leucócitos de substâncias associadas ao dano tecidual, como o óxido nítrico (BALKWILL et al., 1989).

Podemos sugerir que a Nattectina é capaz de induzir a produção de mediadores solúveis importantes como LTB₄, PGE₂, IL-1 β e IL-6 que em conjunto geram uma expressão aumentada de moléculas de adesão nos leucócitos e no endotélio, como também induzem a síntese de moléculas quimioatratoras como MCP-1 e KC necessárias para a transmigração de neutrófilos e macrófagos para o local da lesão. As quimiocinas, após ligação aos receptores heptatransmembranosos acoplados à proteína G, regulam a ativação seletiva e o recrutamento de leucócitos durante o processo inflamatório. Uma característica interessante deste grupo de moléculas é sua promiscuidade de ligação: uma quimiocina pode se ligar a diferentes tipos de receptores e um receptor ligar diferentes tipos de quimiocinas (MOSER et al., 2004). A quimiocina KC (CXCL8), homóloga a IL-8 humana, atua predominantemente sobre os polimorfonucleares que expressam em sua superfície os receptores CXCR1 e CXCR2, enquanto que os monócitos expressam os receptores CCR1, CCR2, CCR3 e CCR5

para a quimiocina MCP-1 (CCL2) (BAGGIOLINI et al., 1998; ROSSI e ZLOTNIK, 2000). Sendo assim, podemos associar o recrutamento celular com a liberação de quimiocinas induzidos pela Nattectina, na cavidade peritoneal murina. A síntese de KC, 1 hora após a injeção direcionou o recrutamento de neutrófilos, em 1 e 6 horas, para o local da lesão e a quimiocina MCP-1 liberada em 1 e 24 horas foi a responsável pelo recrutamento de macrófagos. Além disso, os altos níveis de MCP-1 observados 1 hora após a injeção da Nattectina foram produzidos não só pelos neutrófilos recrutados pela Nattectina, como também pelos macrófagos residentes, células endoteliais e fibroblastos. Henderson e colaboradores (2003) demonstraram que estas células peritoneais residentes expressam MCP-1 independente do recrutamento neutrofílico no local da inflamação.

É interessante mencionar o trabalho de Rubinstein e colaboradores (2004) que mostra a ação da galectina-3 de, também uma lectina com ação inflamatória em um modelo de peritonite. Camundongos deficientes de galectina-3 injetados intraperitonealmente com tioglicolato deixam de exibir recrutamento de granulócitos na cavidade peritoneal. Isto, porque a galectina-3, assim como a Nattectina, promove a quimiotaxia de neutrófilos e a produção de citocinas pelos macrófagos importantes na resposta inflamatória. Além disso, a galectina-3 induz a adesão de neutrófilos ao componente laminina da matriz extracelular, diretamente atuando como ponte entre a célula e a proteína ou indiretamente, ativando os neutrófilos e induzindo um aumento nas moléculas de adesão, como L-selectina e síntese de IL-8 (KUWABARA et al., 1996).

Por outro lado, a galectina-1, apresenta atividade anti-inflamatória, reduzindo o infiltrado de neutrófilos induzido pela fosfolipase A₂ do veneno de abelha, tanto na região perivascular quanto no interstício da pata de camundongos. *In vitro*, o tratamento com a galectina-1 reduziu a síntese de PGE₂ e ácido araquidônico pelos macrófagos peritoneais ativados por LPS (RABINOVICH et al., 2000).

Sendo assim, podemos afirmar que a Nattectina se comporta de maneira semelhante as lectinas endógenas (por exemplo, galectina-3) pró-inflamatórias importantes na produção de mediadores inflamatórios, na ativação e adesão celular, quimiotaxia e migração transendotelial.

A inflamação compreende a resposta imune inata que é a primeira linha de defesa do organismo e interfere no desencadeamento e estabelecimento da resposta imune específica, pois fornece sinais fundamentais para a ativação de linfócitos. A resposta imune, desencadeada a partir da ativação do linfócito T pode ser de dois tipos: a) resposta imune humoral, mediada por anticorpos produzidos por linfócitos B antígeno-específicos; e b) resposta imune celular, caracterizada por linfócitos T efetores e produção de citocinas. As sub-populações de linfócitos T são definidas de acordo com o padrão de citocinas que produzem (MOSMANN et al., 1989; REINER, 2007). Linfócitos do tipo Th1 produzem IL-2 e IFN- γ e linfócitos do tipo Th2 sintetizam IL-4, IL-5 e IL-13. IL-17 importante citocina reguladora de processos crônicos e doenças autoimunes é produzida pelo mais recente clone de linfócito T identificado, Th17 (HUNTER, 2007). As citocinas produzidas pelas respectivas populações de linfócitos Th1 ou Th2 auxiliam na definição do padrão isotípico a ser secretado pelo linfócito B (COFFMANN et al., 1996, 1988), atuando também como reguladores negativos da diferenciação das outras sub-populações (WEAVER et al., 2007).

Nossos resultados mostram que a Nattectina induziu uma resposta imune específica preferencialmente Th1, caracterizada pela síntese de IFN- γ e IL-10 e anticorpos IgG2a. Recentemente Grund e colaboradores (2006) demonstraram em camundongos imunizados com o veneno de *T. nattereri* a indução de ativação de ambos os clones de linfócitos Th1 e Th2 com síntese de IL-5 e IFN- γ e altos níveis de IgG1 específico e IgE total. O que sugere que a diferenciação de linfócitos Th1 produtores de IFN- γ pelo veneno é dependente da ação da Nattectina. Já a produção de IL-10 induzida pela Nattectina pelas células esplênicas, além de IFN- γ , sugere também a ativação de resposta reguladora capaz impedir a amplificação da resposta imune lesiva.

Dados recentes mostram que embora diferentes tipos celulares como fagócitos, células dendríticas convencionais, linfócitos T e B e células *Natural Killer* possam produzir IL-10 (MOORE et al., 2001) durante processos inflamatórios ou infecciosos, linfócitos Th1 antígeno-específicos CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ (os quais também produzem IFN- γ) também produzem IL-10, mais que linfócitos Th2, T reg ou células inflamatórias. A presença de IL-10 é responsável pela limitação da inflamação patológica na infecção

pelo parasita *Toxoplasma gondii* e pela manutenção da infecção crônica não resolvida induzida pelo parasita *Leishmania major* (JANKOVIC et al., 2007; ANDERSON et al., 2007).

Vale ressaltar que a ausência de produção de IL-12p70 pelas células esplênicas em resposta a *Natsectina* pode ser devido à ação inibidora de IL-10, produzida em 24 e 48 horas após a re-estimulação. Podemos sugerir que a produção de IL-10 induzida pela *Natsectina* inibiu a síntese de IL-12p70 pelas células esplênicas e que outras citocinas como IL-23 e IL-27 podem estar envolvidas na síntese de IFN- γ pelos clones de linfócitos Th1 (TRINCHIERI et al., 2003), e ainda que em nosso modelo existe a ativação de clones de linfócitos Th1 produtores de ambas as citocinas IL-10 e IFN- γ , independentemente da ação da IL-12p70. A IL-23, assim como a IL-27 são membros da família da interleucina-12 e foram originalmente descritas por induzir aumento na produção de IFN- γ pelas células Th1 de memória. Embora menos eficaz que a IL-12 na produção de IFN- γ pelas células T virgens, a IL-23 é importante na geração de células T CD4⁺ do subtipo Th17 e na indução da proliferação de células T de memória (REINHARDT et al., 2006; KASTELEIN et al., 2007).

As células dendríticas constituem a população de leucócitos capaz de integrar as respostas imunes inata e específica (REIS e SOUSA, 2004). Elas apresentam dois estados funcionais distintos, imaturo e maduro sendo estas últimas habilitadas para a ativação da resposta imune específica pela alta expressão de moléculas MHC classe II, CD40, CD80 e CD86 (STEINMAN, 1991; STEINMAN e NUSSENZWEIG, 2002). A partir do protocolo de Lutz e colaboradores (1999) obtivemos células dendríticas imaturas de origem mieloide (CD11b^{high} CD11c^{high} B220^{low} MHCII^{high} CD40^{low} CD80^{low} CD86^{low}) as quais foram amadurecidas pela *Natsectina*. Nossos resultados mostram um aumento de expressão das moléculas co-estimulatórias CD40, CD80 e CD86, produção de IL-12p70 e IL-10, presença de MMP-2 e MMP-9 localizados no núcleo e principalmente no citoplasma, além de grande capacidade de captura e apresentação antigênica. A correlação entre a expressão de marcadores de maturação e o estado funcional das células dendríticas tem sido amplamente aceita para células geradas *in vitro* a partir de precursores mielóides (MELLMAN et al., 1998; BANCHEREAU e STEINMAN, 1998).

Durante o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, a eficiente ativação de linfócitos T necessita um conjunto de sinais como: (1) a ligação do receptor do antígeno (TCR) do linfócito às moléculas de MHC complexadas ao antígeno, (2) a interação das moléculas CD80 e CD86 ou CD40 expressas na APC com a molécula CD28 ou CD40L expressas nos linfócitos T, respectivamente (DE BOER et al., 1993; BACHMANN et al., 1997; DIEHL et al., 2000; O'SULLIVAN e THOMAS, 2003) e a ação de citocinas como IL-12 produzidas pelas células dendríticas que podem promover a diferenciação para resposta Th1 ou citotóxica (TRINCHIERI, 2003) ou receptores *Notch* para Th2 (AMSEN, 2004; TU et al., 2005).

A migração das células dendríticas está intimamente relacionada com o seu processo de maturação. A sinalização via CD40 além de amplificar a produção de citocinas pelas células dendríticas humanas regula a migração destas células pela expressão aumentada do receptor CCR7, que tem como ligante as quimiocinas CCL19 e CCL21 (MACAGNO et al., 2007). Estudos mostram que a PGE₂ induz a expressão de CCR7 em células dendríticas derivadas de macrófagos e ativadas com citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), enquanto que o LTB₄ regula a expressão e a síntese da quimiocina CCL19 (SCANDELLA et al., 2002, ROBBIANI et al., 2000). Estes dados reforçam a idéia de que ambos os mediadores lipídicos produzidos em resposta à Nattectina podem ter colaborado também com a regulação da produção de fatores necessários para a migração destas células para os órgão linfóides secundários. Além de moléculas de adesão como CD11a (LFA-1), CD11c, *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, -2, e -3, como também LFA-3 e CD44, citocinas e quimiocinas (CCL5), as células dendríticas utilizam metaloproteinases de matriz como MMP-2 e MMP-9 para se locomoverem por entre os diferentes compartimentos.

As células dendríticas imaturas e maduras, derivadas de monócitos, são capazes de produzir, expressar e secretar as metaloproteinases de matriz MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9 funcionalmente ativas, assim como os inibidores TIMP-1 e TIMP-2, que estão intimamente relacionadas com a capacidade migratória destas células (KOUWENHOVEN et al., 2002). Entretanto, outros trabalhos mostram que somente a MMP-9, mas não a MMP-2, está expressa nas células dendríticas imaturas e maduras, nas formas pró e ativa, respectivamente (CHABOT et al., 2006). Além disso, a deleção

do *gene* da MMP-9 afeta a transmigração das células dendríticas pulmonares no lúmen das vias aéreas, sem, no entanto alterar a migração para os linfonodos torácicos (VERMAELEN et al., 2003). Existem inúmeros fatores que regulam a produção das metaloproteinases de matriz e dos seus inibidores. Estudos recentes mostraram que a quimiocina CCL5 regula a liberação e expressão da MMP-9 nas células dendríticas, porém não apresenta nenhum efeito na expressão da MMP-2 (CHABOT et al., 2006).

Estudos mostram ainda que células dendríticas imaturas expressam heparanase tanto no núcleo quanto no citoplasma (BENHAMRON et al., 2006). Durante o processo de maturação e ativação das células dendríticas a heparanase é translocada do núcleo para o citoplasma e para as extensões próximas na membrana, o que é consistente com o seu papel na transmigração destas células até os linfonodos. Estes dados estão de acordo com os nossos achados que mostram que a Nattectina induz a expressão de MMP-2 e MMP-9 no núcleo e estrategicamente localizadas no citoplasma das células dendríticas amadurecidas, favorecendo assim a clivagem dos componentes da matriz extracelular e a migração por ela.

Recentes avanços no estudo das proteínas ligantes de carboidratos na modulação das respostas inflamatórias e imunes têm motivado a produção sintética de lectinas como candidatas para futuras gerações de drogas. Recentemente Ivory e colaboradores (2007) demonstraram que a Gal-lectina, uma lectina isolada da *Entamoeba histolytica* também apresenta capacidade de ativar células dendríticas para produzirem IL-12p70, desencadeando resposta imune Th1 com produção de IFN- γ . Estes autores denominam a Gal-lectina como um potente candidato antigênico útil no desenvolvimento de vacinas contra a *E. histolytica*. Já os trabalhos com a galectina-9 em células dendríticas humanas demonstraram que esta lectina induz a síntese de IL-12p70 pelas células dendríticas e conseqüentemente ativação de linfócitos Th1 com produção de IFN- γ e IL-10 (DAI et al., 2005). Assim estes autores sugerem que células dendríticas tratadas com esta lectina podem ser usadas em terapias imunes anti-tumor. No nosso caso, a Nattectina além de se mostrar como um potente antígeno indutor de ativação de células dendríticas *in vitro* e de resposta imune Th1 com produção de IFN- γ *in vivo* induziu em ambos os sistemas a produção da citocina IL-10, o que mostra a

capacidade desta lectina em particular de controlar o processo inflamatório e conseqüentemente o desencadeamento da resposta adaptativa.

Neste trabalho, mostramos que a Nattectina, lectina isolada do veneno de *T. nattereri* apresenta efeitos inflamatórios, desencadeia a diferenciação de linfócitos Th1 com produção de IFN- γ e IgG2a como também induz a síntese da citocina IL-10 importante para controlar a amplificação da resposta imune e os efeitos danosos do envenenamento. Além disso, a Nattectina induz a ativação das células dendríticas. Em conclusão a Nattectina é um potente candidato antigênico juntamente com as células dendríticas para uso em imunoterapias.

7. Resumo dos Resultados

- § A Nattectina (lectina tipo C, 15 kDa) isolada pelos procedimentos padronizados por nosso laboratório foi capaz de induzir uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal murina, caracterizada pelo influxo celular de neutrófilos e posteriormente de macrófagos;
- § A peritonite induzida pela Nattectina foi acompanhada da liberação de mediadores inflamatórios como LTB₄, PGE₂, IL-1 β , IL-6, MCP-1, KC, IL-10 e IL-12p70, sem, no entanto induzir a produção de TNF- α ou óxido nítrico;
- § A imunização com a Nattectina, adsorvida em adjuvante, induziu a produção de anticorpos IgG específicos, dos subtipos IgG1 e principalmente IgG2a e a síntese de IFN- γ e IL-10 pelas células esplênicas re-estimuladas;
- § Células dendríticas imaturas de origem mieloíde (CD11b^{high} CD11c^{high} B220^{low}) foram amadurecidas pela Nattectina com aumento na expressão das moléculas MHC de classe II e das co-estimulatórias CD40, CD80 e CD86;
- § A maturação das células dendríticas pela Nattectina induziu a produção de IL-12p70 e IL-10 e a expressão de MMP-2 e MMP-9 localizados no núcleo e principalmente no citoplasma;
- § Células dendríticas imaturas apresentaram grande capacidade de captura e apresentação da Nattectina.

8. Conclusão

Estes resultados em conjunto mostram que a Nattectina induziu uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal murina, caracterizada inicialmente pelo recrutamento de neutrófilos, seguido pelo influxo de macrófagos, com liberação de mediadores inflamatórios importantes para o desencadeamento da resposta imune adaptativa. A Nattectina induziu a maturação e ativação das células dendríticas com aumento na expressão das moléculas co-estimulatórias e das metaloproteinases de matriz com intensa síntese de IL-12p70 e IL-10. Como consequência da ativação das células dendríticas, a Nattectina foi capaz de desencadear uma resposta imune adaptativa caracterizada pela ativação preferencial de linfócitos Th1, com síntese de IFN- γ e de IL-10, favorecendo a produção de IgG2a específica. A presença de IL-10 pode ser responsável pela limitação da inflamação patológica induzida pelo veneno de *T. nattereri* e pela manutenção da inflamação crônica não resolvida observada. Finalmente, a Nattectina é um potente candidato antigênico juntamente com as células dendríticas para uso em imunoterapias no envenenamento.

9. Referências bibliográficas

ADERKA, D.; LE, J. M.; VILCEK, J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J. Immunol.*, v. 143(11), p. 3517-3523, 1989.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.*, v. 124, p. 783–801, 2006.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, v. 357, p. 593-615, 2001.

ALMEIDA, V. G.; ROCHA, C. M. Registro de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. *Rev. Soc. Bras. Toxicol.*, v.2, p. 49-51, 1989.

AMSEN, D.; BLANDER, J. M.; LEE, G. R.; TANIGAKI, K.; HONJO, T.; FLAVELL, R. A. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigenpresenting cells. *Cell.*, v. 117, p. 515-526, 2004.

ANDERSON, C. F.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. J.; SACKS, D. CD4+CD25 Foxp3 Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, v. 204, p. 285-297, 2007.

AUTO, H. F. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim): considerações em torno de 32 casos. *Rev. Esc. Cienc. Med. Alagoas*, v. 5, p. 35-36, 1992.

BACHMANN, M. F.; MCKALL-FAIENZA, K.; SCHMITS, R.; BOUCHARD, D.; BEACH, J.; SPEISER, D. E.; MAK, T. W.; OHASHI, P. S. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: Adhesion *versus* costimulation. *Immunity.*, v.7, p. 549-557, 1997.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, v. 392, p. 565-568, 1998.

BALKWILL, R. F.; BURKE, F. The cytokine network. *Immunol. Today*, v.10, p. 299-304, 1989.

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

BASBAUM, C. B.; WERB, Z. Focalized proteolysis: Spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v. 8 (5), p. 731-738, 1996.

BENHAMRON, S.; NECHUSHTAN, H.; VERBOVETSKI, I.; KRISPIN, A.; ABBOUD-JARROUS, G.; ZCHARIA, E.; EDOVITSKY, E.; NAHARI, E.; PERETZ, T.; VLODAVSKY, I.; MEVORACH, D. Translocation of active heparanase to cell surface regulates degradation of extracellular matrix heparin sulfate upon transmigration of mature monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, v. 176, p. 6417-6424, 2006

BERGMAN, M. R.; CHENG, S.; HONBO, N.; PIACENTINI, L.; KARLINER, J. S.; LOVETT, D. H. A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers. *Biochem. J.*, v. 369, p. 485-496, 2003.

BIANCHI, E.; BENDER, JR.; BLASI, F.; PARDI, R. Through and beyond the way: Late steps in leukocyte transendothelial migration. *Immunol. Today.*, v. 18, p.586-591, 1997.

BJÖRCK, P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood*, v. 98, p. 3520-3526, 2001.

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

BULGAKOV, A. A.; PARK, K.; CHOI, K. C.; LIM, H. K.; CHO, M. Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 16, p. 487-499, 2003.

BURNS, K.; MARTINON, F.; ESSLINGER, C.; PAHL, H.; SCHNEIDER, P.; BODMER, J. L.; DI MARCO, F.; FRENCH, L.; TSCHOPP, J. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 12203-12209, 1998.

BURNS, K.; CLATWORTHY, J.; MARTIN, L.; MARTINON, F.; PLUMPTON, C.; MASCHERA, B.; LEWIS, A.; RAY, K.; TSCHOPP, J.; VOLPE, F. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nature Cell. Biol.*; v. 2, p. 346–351, 2000.

BUTCHER, E. C.; PICKER, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.*, v. 272, p. 60-66, 1996.

CAMBI, A.; FIGDOR, C.G. Levels of complexity in pathogen recognition by C-type lectins. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 17(4), p. 345-351, 2005.

CAMPBELL, J. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines in tissue-specific and micro environment specific lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 12, p. 336-341, 2000.

CARVALHO, D.D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. *Toxicon*, v. 39(10), p. 1471-1476, 2001.

CHABOT, V.; REVERDIAU, P.; IOCHMANN, S.; RICO, A.; SÉNÉCAL, D.; GOUPILLE, C.; SIZARET, P. Y.; SENSEBÉ, L. CCL-5-enhance human immature dendritic cell migration through the basement membrane in vitro depends on matrix metalloproteinase-9. *J. Leukocyte Biol.*, v. 79, p. 767-778, 2006.

CID, M. C. New developments in the pathogenesis of systemic vasculitis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v. 8, p. 1-11, 1996

COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B. W.; LEBMAN, D. A.; HIRAFI, D. D.; CHRISTIANSEN, J. A.; SHRADER, B.; CHERWISKI, H. M.; SALVELKOUL, H. F.; FINKELMAN, F. D.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.*, v. 102, p. 5-28, 1988.

COFFMAN, R. L.; LEBMAN, D. A.; ROTHMAN, P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv. Immunol.*, v. 54, p. 229-270, 1996.

COOK, A.D.; BRAINE, E. L.; HAMILTON, J. A. The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response. *J. Immunol.*, v. 171(9), p. 4816-4823, 2003.

DAI, S. Y.; NAKAGAWA, R.; ITOH, A.; MURAKAMI, H.; KASHIO, Y.; ABE, H.; KATOH, S.; KONTANI, K.; KIHARA, M.; ZHANG, S. L.; HATA, T.; NAKAMURA, T.; YAMAUCHI, A.; HIRASHIMA M. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, v. 175(5), p. 2974-2981, 2005.

DARO, E.; PULENDRAN, B.; BRASEL, K.; TEEPE, M.; PETTIT, D.; LYNCH, D. H.; VREMEC, D.; ROBB, L.; SHORTMAN, K.; MCKENNA, H. J.; MALISZEWSKI, C. R.; MARASKOVSKY, E. Polyethylene Glycol-Modified GM-CSF expands CD11b high CD11c high but not CD11b low CD11 high murine dendritic cells in vivo: a comparative analyses with Flt3 ligand. *J. Immunol.*, v. 165, p. 49-58, 2000.

DAY, A. J. The C-type carbohydrate recognition domain (CDR) superfamily. *Bioc. Soc. Trans.*, v. 22, p. 83-88, 1994.

DAYER, J. M.; BRESNIHAN, B. Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, v. 46, p.574-578, 2002.

DE BOER, M.; KASRAN, A.; KWEKKEBOOM, J.; WALTER, H.; VANDENBERGHE, P.; O'SULLIVAN, B.; THOMAS, R. CD40 and dendritic cell function. *Crit. Rev. Immunol.*, v.23 ,p. 83-107, 2003.

DEL PRETE, G.; DE-CARLI, M.; ALMERIGOGNA, F.; GIUDIZI, M. G.; BIOGIOTTI, R.; ROMAGNANI, S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.*, v. 150, p. 353-360, 1993.

DIEHL, L.; DEN BOER, A. T.; VAN DER VOORT, E. I.; MELIEF, C. J.; OFFRINGA, R.;TOES, R. E. The role of CD40 in peripheral T cell tolerance and immunity. *J. Mol. Med.*, v. 78, p. 363-371, 2000.

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

DIEU-NOSJEAN, M. C.; VICARI, A.; LEBECQUE, S.; CAUX, C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J. Leukoc. Biol.*, v. 66, p. 252–262, 1999.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.*, v. 141(7), p. 2407-2412, 1988.

EDWARDS, A. D.; MANICKASINGHAM, S. P.; SPÖRRI, R.; DIEBOLD, S. S.; SCHULZ, O.; SHER, A.; KAISHO, T.; AKIRA, S.; REIS & SOUSA, C. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J. Immunol.*, v. 169(7), p. 3652-3660, 2002.

FACÓ, P. E.; HAVT, A.; BARBOSA, P. S.; NOBRE, A. C.; BEZERRA, G. P.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; LOPES-FERREIRA, M.; MONTEIRO, H. S. Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney. *Toxicon*, v. 42(5), p. 509-514, 2003.

FACÓ, P. E.; BARBOSA, P. S.; BEZERRA, G. P.; MARTINS, A. M.; GUIMARÃES, J. A.; LOPES-FERREIRA, M.; MONTEIRO, H. S. Epidemiology of the injuries caused by *Thalassophryne nattereri* (niquim) in Ceara State (1992). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, p. 479-482, 2005.

FARSKY, S. H.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; PROTO, S. Z.; FERREIRA JR, J. M.; MELLO, S. B. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. *Inflamm. Res.*, v. 53(9), p. 442-452, 2003.

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

FONSECA, L. A.; LOPES-FERREIRA, M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). *Anais Bras. Dermat.*, v. 75, p. 435-443, 2000.

FREIRE, M. G.; DE SOUZA, I. A.; SILVA, A. C.; MACEDO, M. L.; LIMA, M. S.; TAMASHIRO, W. M.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. *Toxicon*, v. 42(3), p. 275-280, 2003.

FRÓES, H. P. Peixes toxíforos do Brasil. *Bahia Médica*, v. 4, p. 69-75, 1933a.
 FRÓES, H. P. Studies on venomous fishes of tropical countries. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 36, p. 134-135, 1933b.

FRÓES, H. P. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (*Thalassophrynidae*). *Bahia Médica*, v. 4, p. 225-227, 1933c.

GALANT, C.; BERLIÈRE, M.; DUBOIS, D.; VEROUGSTRAETE, J. C.; CHARLES, A.; LEMOINE, P.; KOKORINE, I.; EECKHOUT, Y.; COURTOY, P. J.; MARBAIX, E. Focal expression and final activity of matrix metalloproteinases may explain irregular dysfunctional endometrial bleeding. *Am. J. Pathol.*, v. 165(1), p. 83-94, 2004.

GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. S. Overview In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, eds J. I. Gallin, I. M., 1988.

GALLIN, J. I.; LETO, T. L.; ROTROSEN, D.; KWONG, C. H.; MALECH, H. L. Delineation of the phagocyte NADPH oxidase through studies of chronic granulomatous diseases of childhood. *Curr Opin Immunol.*, v. 4(1), p. 53-56, 1992.

GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Raven Press, New York, 1992.

GALIS, Z. S.; SUKHOVA, G. K.; KRANZHÖFER, R.; CLARK, S.; LIBBY, P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92(2), p. 402-406, 1995.

GEROSA, F.; PAGANIN, C.; PERITT, D.; PAIOLA, F.; SCUPOLI, M. T.; ASTE-AMEZAGA, M.; FRANK, I.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J. Exp. Med.*, v. 183, p. 2559-2569, 1996.

GOLDRING, S. R. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 42, p. 11-16, 2003.

GOODARZI, K.; GOODARZI, M.; TAGER, A. M.; LUSTER, A. D.; VON ANDRIAN, U. H. Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat. Immunol.*, v. 4, p. 965-973, 2003.

GRUND, L. Z.; SOUZA, V. M. O.; MAURO-FAQUIM, E. L.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Experimental immunization with *Thalassophryne nattereri* fish venom: Striking IL-5 production and impaired of B220+ cells. *Toxicon*, v. 48, p. 499-508, 2006.

GRUNIG, G.; BANZ, A.; MALEFYT, R. W. Molecular regulation of Th2 immunity by dendritic cells. *Pharmacol. & Therapeutics*, v. 106, p. 75-96, 2004.

HADDAD JR. V.; PARDAL, P. P. O.; CARDOSO, J. L.; MARTINS, I. A. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): Repor of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Serjipe State). *Rev. Inst. Med. Trop Sao Paulo*, v. 45(4), p. 221-223, 2003.

HANADA T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation, *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.13, p. 413-421, 2002.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; DO NASCIMENTO, N. R.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C.; MARTINS, A. M.; BARBOSA, P. S.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 37(1), p. 130-141, 2005.

HENDERSON, R. B.; HOBBS, J. A.; MATHIES, M.; HOGG, N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood*, v. 102(1), p. 328-335, 2003.

HUNTER C. A. Act1-ivating IL-17 inflammation. *Nat. Immunol.*, v. 8(3), p. 232-234, 2007.

INGRAM, G. A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection. *J. Fish Biol.*, v. 16, p. 23–60, 1980.

IVORY, C. P.; CHADEE, K. Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.*, v. 37(2), p. 385-394, 2007

JANKOVIC, D.; KULLBERG, M. C.; FENG, C. G.; GOLDSZMID, R. S.; COLLAZO, C. M.; WILSON, M.; WYNN T. A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A.; SHER, A. Conventional T-

bet+Foxp3 Th1 cells are the major source of hostprotective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.*, v. 204, p. 273–283. 2007.

JANSEN, J. H.; KLUIN-NELEMANS, J. C.; VAN DAMME, J.; WIENTJENS, G. J.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E. Interleukin 6 is a permissive factor for monocytic colony formation by human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.*; v. 175, p. 1151-1154, 1992.

JINDAL, S. K.; AGARWAL, R. Autoimmunity and interstitial lung disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, v.11, p. 438-446, 2005.

JONES, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.*, v. 175(6), p. 3463-3468, 2005.

JUNQUEIRA, M. E.; GRUND, L. Z.; ORII, N. M.; SARAIVA, T. C.; DE MAGALHAES LOPES, C. A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Analysis of the inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathorops spixii*) venoms. *Toxicon*, v. 49(7), p. 909-919, 2007.

KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO, J. F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunology*, v. 24, p. 25-29, 2003.

KASTELEIN, R. A.; HUNTER, C. A.; CUA, D. J. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*; v.25, p. 221-42, 2007.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug Targets-Inflamm. Allergy*, v. 4, p.471-479, 2005.

KOUWENHOVEN, M.; OZENCI, V.; TJERNLUND, A.; PASHENKOV, M.; HOMMAN, M.; PRESS, R.; LINK, H. Monocyte-derived dendritic cells express and secrete matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitors and are imbalanced in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunology*, v. 126, p. 161-171, 2002.

KUWABARA I.; LIU, F. T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J. Immunol.*, v. 15, p. 3939-3944, 1996.

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

LANG, R.; PATEL, D.; MORRIS, J. J.; RUTSCHMAN, R. L.; MURRAY, P. J.. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J. Immunol.*, v. 169, p. 2253-2263, 2002.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell.*, v. 84, p. 359-369, 1996.

LEHTONEN, H.; OKSA, P.; LEHTIMAKI, L.; SEPPONEN, A.; NIEMINEN, R.; KANKAANRANTA, H.; SAARELAINEN, S.; JARVENPAA, R.; UTTI, J.; MOILANEN E. Increased alveolar nitric oxide concentration and high levels of leukotriene B(4) and 8-isoprostane in exhaled breath condensate in patients with asbestosis. *Thorax*, v. 62(7), p.602-607, 2007.

LIMA, C.; CLISSA, P. B.; PIRAN-SOARES, A. A.; TANJONI, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LOPES-FERREIRA, M. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon*, v. 42, p. 499-507, 2003.

LOOS, B. G. ; JOHN, R. P.; LAINE, M. L. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J. Clin. Periodontol.*, v. 32, p.159–179, 2005.

LOPES-FERREIRA, M.; BÁRBARO, K. C.; CARDOSO, D. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*, v. 36, p. 405-410, 1998a.

LOPES-FERREIRA, M.; EMIM, J. A. S.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; CEZARI, M. H. S.; JULIANO, L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA I. Characterization of the nociceptive and edematogenic activities of the *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Toxicon*, v. 36, p. 1304, 1998b.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I.; TAKEHARA, H. A. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. *Toxicon*, v. 38, p. 1149-1156, 2000.

LOPES-FERREIRA, M.; NÚÑEZ, J.; RUCAVADO, A.; FARSKY, S. H. P.; LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. *Int. J. Exp. Pathol.* v. 82, p. 55-64, 2001.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIRAN-SOARES, A. A.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; FARSKY, S. H. P. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. *Toxicon*, v. 40, p. 1141-1147, 2002.

LOPES-FERREIRA, M.; EMIM J. A. ; OLIVEIRA V.; PUZER, L.; CEZARI, M. H.; ARAUJO, M. S.; JULIANO, L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem. Pharmacology*, v. 68, p. 2151-2157, 2004.

LUFT, T.; MARASKOVSKY, E.; SCHNURR, M.; KNEBEL, K.; KIRSCH, M.; GORNER, M.; SKODA, R.; HO, A. D.; NAWROTH, P.; BIERHAUS, A. Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells. *Blood*, v. 104(4), p. 1066-1074, 2004.

LUO, L.; CRUZ, T.; MCCULLOCH, C. Interleukin 1-induced calcium signalling in chondrocytes requires focal adhesions. *Biochem. J.*, v. 324, p. 653-658, 1997.

LUTZ, M. B.; KUKUTSCH, N.; OGILVIE, A. L.; ROSSNER, S.; KOCH, F.; ROMANI, N.; SCHULER, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods*, v. 223(1), p. 77-92, 1999.

MACAGNO, A.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol.*, v. 28(5), p. 227-233, 2007.

MAGALHÃES, G. S.; LOPES-FERREIRA, M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; SPENCER, P. J.; ARAÚJO, M. S.; PORTARO, F. C. V.; MA, L.; VALENTE, R. H.; JULIANO, L.; FOX, J. W.; HO, P. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochimie*, v. 87, p. 687-699, 2005.

MAGALHÃES, G. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. M. J.; LOPES-FERREIRA, M.; LORENZINI, D. M.; HO, P. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Transcriptome analyses of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. *Biochimie*, v. 88, p. 693-699, 2006.

MARALDI, N. M.; MARMIROLI, S.; RIZZOLI, R.; MAZZOTTI, G.; MANZOLI, F. A. Phosphatidylinositol 3-kinase translocation to the nucleus is an early event in the interleukin-1 signalling mechanism in human osteosarcoma Saos-2 cells. *Adv. Enzyme Regul.*, v. 39, p. 33-49, 1999.

MATTHEWS, J. S.; O'NEILL, L. A. Distinct roles for p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases in the induction of IL-2 by IL-1. *Cytokine*, v.11, p. 643–655, 1999.

MELLMAN, I.; TURLEY, S. J.; STEINMAN, R. M. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol.*, v. 8, p.231-237, 1998.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 19, p. 683-765, 2001.

MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A.; LOETSCHER, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.*, v. 25(2), p. 75-84, 2004.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokines secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol*, v.46, p.111-147, 1989.

MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL-10 in cross-regulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol. Today*, v. 12, p. 49-53, 1991.

NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; KAMIYA, H.; MURAMOTO, K. Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*. *Mol. Divers.*, v. 10(4), p. 607-618, 2006.

NATHOO, N.; BARNETT, G. H.; GOLUBIE, M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. *J. Clin. Pathol.*, v. 57, p. 6-13, 2004.

O'NEILL, L. A.; DINARELLO, C. A. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol. Today.*, v. 21, p. 206–209, 2000.

O'SULLIVAN, B.; THOMAS, R. Recent advances on the role of CD40 and dendritic cells in immunity and tolerance. *Curr. Opin. Hematol.*, v. 10(4), p. 272-278, 2003.

OTT, V. L.; CAMBIER, J. C.; KAPPLER, J.; MARRACK, P.; SWANSON, B. J. Mast cell-dependent migration of effector CD8⁺ T cells through production of leukotriene B₄. *Nat. Immunol.*, v. 4, p. 974–981. 2003.

PALSSON, E. M.; POPOFF, M.; THELESTAM, M.; O'NEILL, L. A. Divergent roles for Ras and Rap in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase by interleukin-1. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 7818–7825, 2000.

PANZER, U.; UGUCCIONI, M. Prostaglandin E₂ modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. *Eur. J. Immunol.*, v. 34(12), p. 3682-3689, 2004.

PAUL, W.E. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven, New York, 1998.

PIRAN-SOARES, A. A.; KOMEAGAE, E. N.; SOUZA, V. M.; FONSECA, L.A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Neutralizing antibodies obtained in a persistent immune response are effective against deleterious effects induced by the *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Toxicon*, v. 49(7), p. 920-930, 2007.

QWARNSTROM, E. E.; MACFARLANE, S. A.; PAGE, R. C.; DOWER, S. K. Interleukin 1 α induces rapid phosphorylation and redistribution of talin: a possible mechanism for modulation of fibroblast focal adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 1232-1236, 1991.

RABINOVICH, G. A.; SOTOMAYOR, E. C.; RIERA, C. M.; BIANCO, I.; CORREA, S. G. Evidence of a role for galectin-1 acute inflammation. *Eur. J. Immunol.*, v. 30, p. 1331-1339, 2000.

REINER, S. L. Development in Motion: Helper T Cells at Work. *Cell.*, v. 129, p. 33-36, 2007.

REINHARDT, R. L.; HONG, S.; KANG, S. J.; WANG, Z. E.; LOCKSLEY, R. M. Visualization of IL-12/23p40 in vivo reveals immunostimulatory dendritic cell migrants that promote Th1 differentiation. *J. Immunol.*; v. 177(3), p. 1618-1627, 2006.

REIS e SOUSA, C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, v.16(1), p. 21-25, 2004.

REIS e SOUSA, C. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 6(6), p. 476-483, 2006.

RICCIARDOLO, F. L. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*, v. 58, p. 175–182, 2003.

ROBBIANI, D. F.; FINCH, R. A.; JAGER, D.; MULLER, W. A.; SARTORELLI, A. C.; RANDOLPH, G. J. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell*, v. 103(5), p. 757-768, 2000.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 18, p. 217-242, 2000.

RUBINSTEIN, N.; ILARREGUI, J. M.; TOSCANO, M. A.; RABINOVICH, G. A. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens*, v. 64(1), p. 1-12, 2004.

SALOMON, B.; BLUESTONE, J. A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 19, p. 225-252, 2001.

SCANDELLA, E.; MEN, Y.; GILLESSEN, S.; FORSTER, R.; GROETTRUP, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, v. 100(4), p. 1354-1361, 2002.

SCHNYDER-CANDRIAN, S.; TOGBE, D.; COUILLIN, I.; MERCIER, I.; BROMBACHER, F.; QUESNIAUX, V.; FOSSIEZ, F.; RYFFEL, B.; SCHNYDER, B. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *Exp. Med.*, v. 203(12), p. 2715-2725, 2006.

SEO, S. M.; SMITH, W. Effects of IL-8 and LTB₄ on the adhesive kinetics of LFA 1 and Mac 1 on human neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 281- p. 1508-1578, 2001.

SMITH, D. E.; RENSHAW, B. R.; KETCHUM, R. R.; KUBIN, M.; GARKA, K. E.; SIMS, J. E. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p.1169–1175, 2000.

SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A. Chemokines and dendritic cell traffic. *J. Clin. Immunol.*, v. 20, p.151-160, 2000.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, v. 76, p. 301-314, 1994

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.*, v.9, p. 271-296, 1991.

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

SUWA, T.; HOGG, J. C.; QUINTLAN, K. B.; VAN, E. S. F. The effect of interleukin 6 on L-selectin levels on polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 283, p. 879-884, 2002.

TAGER, A. M.; BROMLEY, S. K.; MEDOFF, B. D.; ISLAM, S. A.; BERCURY, S. D.; FRIEDRICH, E. B.; CARAFONE, A. D.; GERSZTEN, R. E.; LUSTER, A. D. Leukotriene B₄ receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat. Immunol.*, v.4(10), p. 982-990, 2003.

THEAKSTON, R. D. G.; LLOYD-JONES, M. J.; REID, H. A. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and anti-venom antibody. *Lancet.*, v. 2, p. 639-641, 1977.

TIAN, W.; NUNEZ, R.; CHENG, S.; DING, Y.; TUMANG, J.; LYDDANE, C.; ROMAN, C.; LIOU, H. C. C-type lectin OCILRP2/Clr-g and its ligand NKRP1f costimulate T cell proliferation and IL-2 production. *Cell. Immunol.*, v. 234(1), p. 39-53, 2005.

TODA, A.; YOKOMIZO, T.; SHIMIZU, T. Leukotriene B₄ receptors. Prostaglandins Other Lipid. Mediant., v. 69, p. 409-422, 2002.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat. Rev. Immunol., v. 3(2), p. 133-146, 2003.

TSUTSUI, S.; IWAMOTO, K.; NAKAMURA, O.; WATANABE, T. Yeast-binding C-type lectin with opsonic activity from conger eel (*Conger myriaster*) skin mucus. Mol. Immunol., v. 44(5), p. 691-702, 2007.

TU, L.; FANG, T. C.; ARTIS, D.; SHESTOVA, O.; PROSS, S. E.; MAILLARD, I.; PEAR WS. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. J. Exp. Med., v., 202, p. 1037-1042, 2005.

ULBRICH, H.; ERIKSSON, E. E.; LINDBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. Trends Pharmacol. Sci., v. 24, p. 640-647, 2003.

VALLANCE, P.; LEIPER, J. Blocking NO synthesis: how, where and why? Nature Reviews Drug Discovery, v. 1, p. 939-950, 2002;

VERMAELEN, K. Y.; CATALDO, D.; TOURNOY, K.; MAES, T.; DHULST, A.; LOUIS. R.; FOIDART, J. M.; NOEL, A.; PAUWELS, R. Matrix Metalloproteinase-9-mediated dendritic cell recruitment into the airways is a critical step in a mouse model of asthma. J. Immunol., v. 171, p. 1016-1022, 2003.

ZHU, P.; XIONG, W.; RODGERS, G.; QWARNSTROM, E. E. Regulation of interleukin 1 signalling through integrin binding and actin reorganization: disparate effects on NF- κ B and stress kinase pathways. Biochem. J., v.330, p. 975–981,1998.

YANAGIHARA, S.; KOMURA, E.; NAGAFUME, J.; WATARAI, H.; YAMAGUCHI, Y. EB11/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. J. Immunol, v.161, p. 3096.3102, 1998.

YSSEL, H.; DE WAAL-MALEFITY, R.; RONCAROLO, M. G.; ABRAMS, J. S.; LAHESMAA, R.; SPITZ, H.; DE VRIES, J. E. IL-10 is produced by subsets of human CD4⁺ T cell clones and peripheral blood cells. J. Immunol., v. 149, p. 2378-2384, 1992.

WEAVER, C. T.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 25, p. 821-852, 2007.

WESCHE, H.; KORHERR, C.; KRACHT, M.; FALK, W.; RESCH, K.; MARTIN, M. U. The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 7727–7731, 1997.

WU, L.; LIU, Y. J. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*, v. 26(6), p. 741-750, 2007.