

**AMANDA PEREIRA DE FREITAS**

**“EFEITO DA CROTOXINA E SUA SUBUNIDADE CB  
ISOLADAS DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*  
SOBRE AS CÉLULAS DENDRÍTICAS: MODULAÇÃO DA  
ATIVÇÃO DAS CÉLULAS T *IN VITRO* E *IN VIVO*”**

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

São Paulo  
2018

**AMANDA PEREIRA DE FREITAS**

**“EFEITO DA CROTOXINA E SUA SUBUNIDADE CB ISOLADAS  
DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* SOBRE AS  
CÉLULAS DENDRÍTICAS: MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS  
CÉLULAS T *IN VITRO E IN VIVO*”**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo  
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pereira de Freitas, Amanda  
/ Amanda Pereira de Freitas; orientadora  
Eliana Faquim de Lima Mauro. -- São Paulo, 2018.  
165 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Crotalus durissus terrificus. 2. Células  
dendríticas. 3. Toxinas ofídicas. 4. Linfócitos. 5.  
Imunomodulação. I. Faquim de Lima Mauro, Eliana ,  
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato (a): Amanda Pereira de Freitas

Título da Tese: Efeito da crotoxina e sua subunidade CB isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre as células dendríticas: modulação da ativação das células T *in vivo e in vitro*.

Orientadora: Prof. Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**

(    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505  
ceuaib@butantan.gov.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da crotoxina e sua subunidade CB isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre as células dendríticas: modulação da ativação das células T *in vivo* e *in vitro*", protocolo n° 1311/14, sob a responsabilidade de Eliana Faquim de Lima Mauro e Amanda Pereira de Freitas - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 17/9/2014.

This is to certify that the proposal "Effect of crotoxin and its CB subunit isolated subunits from *Crotalus durissus terrificus* on dendritic cells: modulation of T cell activation *in vivo* and *in vitro*", protocol n° 1311/14, under the responsibility of Eliana Faquim de Lima Mauro and Amanda Pereira de Freitas - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 9/17/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	N° de animais/espécie
09/2014 - 08/2018 Laboratório de Imunopatologia	486 Camundongos Balb/c 20-22g (M); 74 Camundongo C57BL/6 20-22g (M); 42 Camundongos FoxP3DTRGFP 22g (M) - Procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas- Departamento Imunologia

São Paulo, 22 de setembro de 2014

  
Dra. Wânia H. K. Cabrera  
Coordenadora da CEUAIB

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da crotoxina e sua subunidade CB isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre as células dendríticas: modulação da ativação de células T in vivo e in vitro", antigo 1311/14.", protocolada sob o CEUA nº 9723030718 (ID 661236), sob a responsabilidade de **Eliana Faquim de Lima Mauro** e equipe; Amanda Pereira de Freitas - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 13/07/2018.

We certify that the proposal "Effect of crotoxin and its CB subunit isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on dendritic cells: modulation of T cells activation in vivo and in vitro", utilizing 152 isogenics mice (152 males), protocol number CEUA 9723030718 (ID 661236), under the responsibility of **Eliana Faquim de Lima Mauro** and team; Amanda Pereira de Freitas - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 07/13/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 08/2014 a 08/2018

Área: [Imunopatologia](#)

Origem: [Biotério Central](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade: [6 a 7 semanas](#)

N: [38](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [20 a 22 g](#)

Origem: [Biotério Central](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [114](#)

Linhagem: [Balb/c](#)

Peso: [20 a 22 g](#)

Local do experimento: conforme aprovado anteriormente pela CEUAIB

São Paulo, 30 de agosto de 2018

Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

Nancy Ogulura  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

São Paulo, 15 de agosto de 2018  
CEUA N 9723030718

lmo(a). Sr(a).  
Responsável: Eliana Faquim De Lima Mauro  
Área: imunopatologia  
Eliana Faquim De Lima Mauro (orientador)

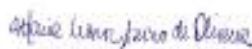
Título da proposta: "Efeito da crotoxina e sua subunidade CB isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre as células dendríticas: modulação da ativação de células T in vivo e in vitro", antigo 1311/14."

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 03/agosto/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Prezada Presidente da Comissão de ética, Solicito alteração da vigência do referido projeto 9723030718 por mais 6 meses, em virtude da necessidade de realização de alguns experimentos para publicação do artigo científico. Declaro que não há alteração dos protocolos experimentais já aprovados pela CEUA/IB. Att, Eliana Faquim."

Comentário da CEUA: ""



Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan



Nancy Ogulura  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

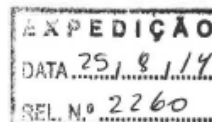
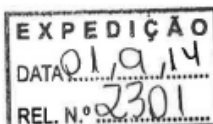
## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 89 nas fls. 22 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Eliana Faquim de Lima Mauro**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito da crotoxina e suas subunidades isoladas do veneno de Crotalus durissus terrificus sobre as células dendríticas: modulação da ativação das células T in vivo e in vitro*" do qual participam o(s) aluno(s) **Amanda Pereira de Freitas**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **18.08.2014**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 19 de agosto de 2014.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES  
Vice- Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE  
Secretária- CEUA - ICB/USP





*Dedico essa tese ao meu maior exemplo de persistência e garra, papai João Pereira de Freitas Neto. Agradeço pela grandeza do seu amor, pelos ensinamentos de nunca desistir e de ter fé na vida. Pelas longas conversas no quarto do hospital e por ver que o senhor nunca desistiu de lutar por sua vida e família... Pela sabedoria em me educar, por seus gestos solidários, pela sua espiritualidade, pelo carinho de pai que soube me proteger e me ensinar os limites da vida, por ter investido e acreditado sempre em mim e incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento capaz de transformar as pessoas sempre para melhor. Amo o senhor infinitamente!!!*

## AGRADECIMENTOS

Durante esses quatro anos muitas pessoas participaram da minha trajetória, deixaram comigo um pouco de si, mesmo as que apenas cruzaram meu caminho rapidamente, além dos incontáveis acontecimentos e das situações surpreendentes, assim não poderia eu deixar de agradecer a tudo isso, e expressar aqui minha gratidão. Nesse período vivi altos e baixos, desafios, conquistas, superação e apredizado, logo meus momentos foram compostos de alegria, pois esses serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os difíceis, para um crescimento pessoal e profissional único, nos quais nunca imaginei vivenciar. A facilidade de transformar sentimentos em palavras é um desafio, mas serei eternamente grata a todos vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho. A realização desta dissertação marca o fim de um importante ciclo na minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Agradeço em primeira instância a *Deus e Nossa Senhora Aparecida*, por sempre me conceder discernimento nas minhas escolhas e nos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar... Agradeço também pela minha vida e paz nos momentos em que me encontrei incapaz de prosseguir... Pela possibilidade de empreender esse caminho evolutivo, por propiciar tantas oportunidades de estudos e por colocar ao meu lado, poucas, mas pessoas amigas e preciosas.

À minha família: *Alide José dos Santos, Aline Pereira de Freitas, Renato Pereira de Freitas e Ana Laurinha Freitas* por fazerem parte da minha vida, pelo amor, apoio, confiança, torcida e motivação incondicional. Que sempre me impulsionaram em direção às vitórias dos meus desafios. Amo vocês para sempre!

À minha orientadora *Dra. Eliana Faquim*, por acreditar que eu era capaz... Obrigada por ter sido minha mestra desde o mestrado, pelos ensinamentos, orientações, imunizações, dedicação, paciência, compreensão e competência durante todo o percurso do meu doutorado.

Este agradecimento se estende também a minha amiga irmã científica *Leijiane Figueira*... Pela forma amiga e generosa com que sempre me incentivou e ajudou, pelo estímulo após cada conversa que me fazia “carregar baterias”. Obrigada pela amizade, pela torcida e a preocupação comigo demonstrada, ao longo deste trabalho. Agradeço as longas conversas ao telefone mesmo de longe, assim como o incentivo a dar continuidade ao desenvolvimento deste projeto e por sempre me fazer visualizar o lado positivo nas situações onde não havia mais esperanças, pois você sempre acreditava que tudo daria certo no final. Pelo ouvido que escutou tantos desabafos e pelas risadas que amenizavam os desafios diários. Quero para sempre perto de mim.

Não posso deixar de agradecer também a minha migaaa marida *Sheylita Nunes*, que mesmo morando do outro lado do mundo, no decorrer do percurso, vem me incentivando e apoiando no doutorado e na vida. O meu muito obrigado às longas conversas ao telefone, as risadas, aos choros, a torcida, incentivo, ao cuidado, a sinceridade e a amabilidade. Um agradecimento carinhoso por todos os momentos de paciência, pela amizade incondicional que vem me ajudando a dividir os problemas e a somar alegrias. E assim como menciona Machado de Assis: “Não é amigo aquele que alardeia a amizade: é traficante; a amizade sente-se, não se diz”. Você é a mais bela prova de que as pessoas não se encontram por acaso. Como você mencionou: “No final tudo ficará bem, se ainda não está bem, é porque ainda não é o final.” (“Wenn es nicht gut wird, ist es noch nicht das ende”). “Amooo tu” como você mesma se refere.

A grande amiga que conquistei no laboratório, minha mãe no lab, *Juçara*... Obrigada por me ouvir, por dizer palavras de conforto, pelo apoio incondicional, principalmente no período em que meu pai teve problemas de saúde, também pelas risadas e confidências, assim como seus conselhos de mãe... Gratidão por ter te conhecido Juzinha!!!

Agradeço também a amizade e estímulo às amizades realizadas no laboratório, *Rafinha, Tiago e Cleusita*.

À *Dra. Patrícia Bianca* pelo auxílio de PCR-RT e ao *Jorge* pela ajuda com a leitura de minhas amostras no citômetro de fluxo.

Agradeço também ao *Prof. Niels* e sua aluna *Flávia* pela receptividade e colaboração prestada no protocolo de diferenciação das células T.

A todos os funcionários do Laboratório de Imunopatologia, que através dos seus trabalhos cotidianos, tornaram possível a produção do presente trabalho.

Meus respeitosos agradecimentos pela contribuição da banca do exame de qualificação e pela participação dos membros da banca de defesa.

À CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro e apoio concedido, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que independentemente do meio contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

**Albert Einstein**

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

**João Guimarães Rosa**

“O fim significa também um novo recomeço. Uma história termina, para outra começar.”

**Amanda Freitas**

**O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2015/15608-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-nº 311915/2012-4; 309392/2015-2) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**

## RESUMO

FREITAS, A, P. **Efeito da crotoxina e sua subunidade CB isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre as células dendríticas: modulação da ativação das células T *in vitro* e *in vivo*.** 2018. 165 f. Tese (Doutorado em: Imunologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Células dendríticas (DCs) participam tanto da geração da resposta imune adaptativa como na manutenção da tolerância. O veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus*, sua principal toxina, crotoxina (CTX) e sua subunidade CB (fosfolipase A<sub>2</sub>), apresentam efeito supressor sobre o sistema imunológico. Neste trabalho foi avaliado o efeito da CTX e CB sobre a ativação/função das DCs e consequente indução de resposta adaptativa específica anti-Ovalbumina (OVA). Primeiramente, foi verificada a eficiência do processo de maturação das DCs incubadas com OVA associada ao LPS. Os resultados obtidos nesse modelo *in vitro* mostraram que a CTX e CB inibiram a maturação das DCs estimuladas com OVA + LPS, caracterizada por menor expressão de moléculas coestimuladoras, MHC-II e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Em contraste, a CTX e CB induziram maior expressão de ICOS-L, PDL1/2 nas DCs incubadas com OVA + LPS assim como a expressão de RNAm para IL-10 e TGF-β. Além disso, ambas as toxinas foram capazes de aumentar a expressão de PDL1, mas não de ICOS-L ou PDL-2 em DCs. Com relação ao mecanismo envolvido no efeito da CTX e CB sobre as DCs, os resultados mostraram o envolvimento dos receptores peptídeo-formil (FPRs) e a via da 5-Lipoxigenase nesse processo. Sobre a imunidade adaptativa, os resultados mostraram menor proliferação de células TCD3<sup>+</sup> ou TCD4<sup>+</sup> obtidas de animais imunizados com OVA quando co-cultivadas com DCs incubadas com ConA ou OVA + LPS na presença de CTX ou CB. A diferenciação de células Th1 e Th2 foi inibida pela adição de CTX ou CB nas co-culturas com DCs estimuladas com LPS. No entanto, verificou-se aumento da população Treg nas co-culturas de células CD4<sup>+</sup> e DCs incubadas com LPS + CTX ou CB em comparação com DCs estimuladas somente com LPS. A CTX e CB inibiram a diferenciação de células CD4<sup>+</sup> Tbet<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>Gata3<sup>+</sup> nas co-culturas de TCD4<sup>+</sup> purificados de animais DO 11.10 com DCs estimuladas com OVA + LPS. No entanto, apenas a CTX foi capaz de induzir aumento da porcentagem de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Em experimentos *in vivo*, foi observada menor proliferação e secreção de IL-2 e IFNγ nas culturas de células de camundongos imunizados com OVA que receberam CTX ou CB quando estimuladas com OVA em comparação com o observado nas culturas de células de camundongos imunizados com OVA. CTX e CB administradas *in vivo* em camundongos imunizados com OVA também inibiram a porcentagem de células CD4<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> e promoveram aumento da população CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> em comparação com o obtido em camundongos imunizados somente com a OVA. Em relação à imunidade humoral, a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA também foi inibida em camundongos imunizados com OVA que receberam a CTX ou CB. Além disso, a reação de hipersensibilidade do tipo tardio foi suprimida somente em camundongos imunizados com OVA e que receberam a CTX. Estes dados demonstram que a CTX e CB exercem efeito regulador sobre o sistema imune inato e adaptativo e os FPRs bem como a via da 5-lipoxigenase estão envolvidos nessa ação imunomoduladora.

**Palavras- chave:** *Crotalus durissus terrificus*. Células dendríticas. Toxinas ofídicas. Linfócitos. Imunomodulação.



## ABSTRACT

FREITAS, A, P. **Effect of crotoxin and its CB subunit isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on dendritic cells: modulation of T cell activation *in vitro* and *in vivo*.** 2018. 165 p. Ph. D. these (Immunology)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Dendritic cells (DCs) are involved in both the generation of the adaptive immune response and maintenance of the tolerance. The *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake venom, its main toxin, crotoxin (CTX) and CB (phospholipase A<sub>2</sub>) subunit have suppressive effect on the immune system. In this work it was analyzed the effect of CTX and its CB subunit on the activation/function of DCs and consequent induction of anti-ovalbumin immune response. Firstly, the efficiency of the DCs maturation incubated with OVA associated with LPS was verified. Following, the results obtained in this *in vitro* model showed that CTX and CB inhibited the maturation of DCs stimulated with OVA + LPS, characterized by lower expression of costimulatory, MHC-II molecules on DCs as well as secretion of proinflammatory cytokines. In contrast, CTX and CB induced an enhancement of ICOS-L, PDL1/2 expression on DCs incubated with OVA+LPS as well as the expression of IL-10 and TGF- $\beta$  RNAm. In addition, both toxins were able to increase the expression of PDL1, but not ICOS-L or PDL-2, on DCs. Regarding the mechanism involved in the effect of CTX and CB on DCs, the results showed the involvement of the formyl-peptide receptors (FPRs) and the 5-Lipoxygenase pathway in this process. On adaptive immunity, the results showed lower proliferation of TCD3<sup>+</sup> or TCD4<sup>+</sup> cells obtained from mice immunized with OVA when co-cultured with DCs incubated with ConA or OVA + LPS in the presence of CTX or CB. The differentiation of Th1 and Th2 cells were inhibited by the addition of CTX or CB in co-cultures with DCs stimulated with LPS. However, it was verified increased Treg population in co-culture of CD4<sup>+</sup> cells and DCs incubated with LPS plus CTX or CB compared with DCs LPS-stimulated. CTX and CB inhibited the differentiation of CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>Gata 3<sup>+</sup> cells in co-cultures of TCD4<sup>+</sup> purified from DO11.10 mice with DCs stimulated with OVA + LPS. However, only CTX was able to increase the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells. In *in vivo* experiments, it was observed lower proliferation and IL-2 and IFN $\gamma$  secretions in cell cultures of mice immunized with OVA that received CTX or CB incubated with OVA compared with those observed in cell culture of OVA-immunized mice. The administration of CTX and CB *in vivo* in mice immunized with OVA also inhibited the percentage of CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> cells and increased the CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> population compared with those observed in mice immunized with OVA. In relation to the humoral immunity, the production of anti-OVA IgG1 and IgG2a antibodies was also inhibited in mice immunized with OVA that received CTX or CB. In addition, the delayed hypersensitivity reaction (DTH) was also diminished in mice immunized with OVA that received the CTX. These data demonstrate that CTX and CB exert regulatory effect on innate and adaptive immune system and that FPRs as well as the 5-lipoxygenase pathway are involved in this immunomodulatory activity.

**Keywords:** *Crotalus durissus terrificus*. Dendritic cells. Ophidian toxins. Lymphocytes. Immunomodulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Tipos de células dendríticas.....	29
Figura 2-	Diferenciação de linfócitos T naíve em várias subpopulações por intermédio da apresentação antigênica mediada por APCs em uma resposta imune normal.....	35
Figura 3-	Estratégia de análise utilizada para análise das DCs.....	52
Figura 4-	Ensaio de co-cultura de DCs com LTCD3 <sup>+</sup> para análise da resposta proliferativa OVA- específica.....	57
Figura 5-	Ensaio de co-cultura de DCs com LTCD4 <sup>+</sup> obtidos de animais naíves ou imunizados com a OVA para análise da resposta proliferativa.....	58
Figura 6-	Estratégia de análise para caracterização fenotípica de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	62
Figura 7-	Análise da expressão de Tbet e Gata 3 em co-culturas de LTCD4 <sup>+</sup> com DCs incubadas com CTX e CB na presença ou não de OVA+ LPS.....	63
Figura 8-	Perfil de diferenciação de LTCD4 <sup>+</sup> incubados com DCs estimuladas com LPS na presença ou não da CTX ou CB.....	65
Figura 9-	Esquema representativo dos animais imunizados com OVA seguida da administração da CTX e CB para análise de proliferação de LTs <i>in vivo</i> .....	68
Figura 10-	Figura 10- Esquema representativo dos animais imunizados com OVA seguida da administração da CTX e CB para análise de perfil celular <i>in vivo</i> .....	69
Figura 11-	Perfil cromatográfico do veneno de <i>C.d.terrificus</i> submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna MONO-Q.....	72
Figura 12-	Perfil de eluição das subunidades CA e CB na amostra de CTX submetida à cromatografia de troca catiônica em coluna MONO-S.....	73
Figura 13-	Perfil proteico do veneno de <i>C.d. terrificus</i> e dos picos obtidos em cromatografia de troca aniônica e catiônica em gel de poliacrilamida 12,5% e gel de 16% de poliacrilamida na presença de tricina.....	74
Figura 14-	Atividade fosfolipásica da CTX e suas subunidades CA e CB obtidas do veneno de <i>C.d. terrificus</i> .....	75
Figura 15-	Expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II nas DCs diferenciadas <i>in vitro</i> e incubadas com OVA na presença ou não de LPS.....	77
Figura 16-	Efeito da CTX e CB sobre a expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs incubadas com OVA + LPS <i>in vitro</i> .....	78
Figura 17-	Efeito da CTX e CB sobre a expressão de ICOSL, PDL-1 e PDL-2 em DCs diferenciadas <i>in vitro</i> e estimuladas ou não com OVA + LPS.....	80
Figura 18-	Expressão gênica de IL-10 e TGFβ e produção de citocinas inflamatórias nas culturas de DCs estimuladas <i>in vitro</i> com CTX ou CB na presença ou não de OVA + LPS.....	81
Figura 19-	Expressão gênica de FPR 1 e 2 em DCs estimuladas <i>in vitro</i> com CTX, ou CB em associação ou não com o LPS Figura.....	83
Figura 20-	Envolvimento de FPRs no efeito da CTX e CB sobre a expressão de	84

	moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs incubadas com a OVA + LPS.....	
Figura 21-	Envolvimento de FPRs no efeito da CTX e CB sobre a expressão de ICOSL, PDL-1 e PDL-2 em DCs incubadas com OVA + LPS.....	85
Figura 22-	Produção de IL-10 e citocinas e pró- inflamatórias em sobrenadantes das culturas de DCs pré-incubadas ou não com Boc-2 seguida de estimulação com CTX e CB na presença de OVA + LPS.....	87
Figura 23-	Papel do inibidor seletivo das 5-lipoxigenases sobre o efeito da CTX e CB na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs estimuladas com OVA + LPS.....	88
Figura 24-	Envolvimento da via da 5- lipoxigenase no efeito da CTX e CB sobre a expressão de moléculas ICOS-L e PDL-1/2 em DCs incubadas com OVA + LPS.....	90
Figura 25-	Produção de IL-10, IL-12, IL-6 e TNF- $\alpha$ nos sobrenadantes das culturas de DCs incubadas com o BWA4C simultaneamente com a CTX ou CB na presença de OVA + LPS.....	91
Figura 26-	Resposta proliferativa de LTCD3 <sup>+</sup> co-cultivados com DCs pré-incubadas com CTX e CB na presença ou não de OVA + LPS ou ConA.....	93
Figura 27-	Resposta proliferativa de LTCD4 <sup>+</sup> co-cultivados com DCs pré-incubadas com CTX e CB na presença ou não de OVA + LPS.....	94
Figura 28-	Porcentagem de células CD4 <sup>+</sup> Tbet <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> Gata3 <sup>+</sup> ou CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> em co-culturas com DCs incubadas com CTX e CB na presença ou não de OVA+ LPS.....	96
Figura 29-	Análise do efeito da CTX e CB sobre a diferenciação de LTCD4 <sup>+</sup> incubados com DCs diferenciadas <i>in vitro</i> e estimuladas com LPS.....	98
Figura 30-	Produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti- OVA em camundongos imunizados com a OVA que receberam ou não a CTX ou CB.....	99
Figura 31-	Resposta proliferativa e produção de citocinas em cultura de células de camundongos não imunizados ou imunizados com a OVA que receberam ou não a CTX ou CB.....	101
Figura 32-	Reação de hipersensibilidade tardia em camundongos imunizados ou não com a OVA e que receberam ou não a CTX ou CB.....	103
Figura 33-	Porcentagem de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> obtidos de animais imunizados com a OVA que receberam ou não a CTX ou CB.....	104
Figura 34-	Expressão de citocinas IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10 obtidas de animais imunizados com a OVA e que receberam ou não a CTX ou CB.....	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Anticorpos utilizados para avaliação da expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs.....	50
<b>Tabela 2</b> - Anticorpos utilizados para avaliação da expressão de moléculas coestimuladoras, MHC-II, ICOS-L, PDL1 e 2 em DCs.....	51
<b>Tabela 3</b> - Sequência dos primers utilizados nas PCRs.....	55
<b>Tabela 4</b> - Anticorpos utilizados para marcação das células CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> e fenotipagem das células CD4 <sup>+</sup> .....	60
<b>Tabela 5</b> - Anticorpos utilizados para citocinas correspondentes as diferentes suppopulações de LTCD4 <sup>+</sup> .....	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>ABST</b>	<i>3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico</i> (ácido 2,2'-azino-bis)
<b>AnxA1</b>	Anexina 1
<b>APCs</b>	Células apresentadoras de antígenos
<b>AP1</b>	Proteína ativadora 1
<b>Asc</b>	<i>Ascaris suum</i>
<b>AST</b>	Aspartase aminotransferase
<b>BCG</b>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<b>BMDCs</b>	<i>Mouse bone marrow dendritic cells</i> (células dendríticas murinas derivadas de medula óssea)
<b>Boc-2</b>	Antagonista do receptor peptídeo- formil
<b>BrdU</b>	<i>Bromodeoxyuridine</i> (bromodeoxiuridina)
<b>BSA</b>	<i>Bovine albumin serum</i> (soro albumina bovina)
<b>BWA4C</b>	Inibidor seletivo da 5-lipoxigenase
<b>CA</b>	<i>Crotapotin</i> (crotapotina)
<b>CB</b>	Subunidade fosfolipásica A <sub>2</sub>
<b>cDCs</b>	<i>Conventional dendritic cells</i> (Células dendríticas mielóides ou convencionais)
<b>cDCs1</b>	Células dendríticas mielóides ou convencionais do tipo 1
<b>cDCs2</b>	Células dendríticas mielóides ou convencionais do tipo 2
<b>CD40L</b>	Ligante de CD40
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>C.d.t.</b>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<b>CdtV</b>	Veneno total de <i>C.d.terrificus</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>ConA</b>	Concanavalina A
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>CpGs</b>	<i>Guanine phosphorothioate oligodeoxynucleotides</i> (guanina oligodeoxinucleotídeos fosforotioato)
<b>cPLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase citosólica A <sub>2</sub> α
<b>Ct</b>	<i>Cycle Threshold</i>
<b>CTLA-4</b>	Antígeno 4 associado com linfócito T citotóxico
<b>CTX</b>	Crotoxina
<b>CTX A</b>	Crotoxina A ou crotapotina
<b>CTX B</b>	Crotoxina B
<b>DAMPs</b>	Padrões moleculares associado a danos
<b>DCs</b>	<i>Dendritic cells</i> (células dendríticas)
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DTH</b>	<i>Delayed hypersensitivity reaction</i> (Teste de hipersensibilidade tardia)
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilodiaminotetracético)
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
<b>Flt3</b>	Quinase hepática fetal 2
<b>FPR</b>	<i>Formyl peptide receptor</i> (receptor peptídeo formil)
<b>FMO</b>	<i>Fluorescence-minus-one</i>

<b>FPLC</b>	<i>Fast- Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter area</i> (tamanho relativo)
<b>FVS 510</b>	<i>Fixable Viability Stain 510</i> (reagente de viabilidade 510)
<b>GM- CSF</b>	Fator estimulador de colônias- granulócitos e monócitos
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de nitrogênio
<b>ICB/USP</b>	Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo
<b>ICOS</b>	Coestimulador induzível <b>de células T</b>
<b>ICOS-L</b>	Coestimulador induzível
<b>iDCs</b>	Células dendríticas imaturas
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon- gama
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IRAKs 4</b>	Quinase 4 associada a interleucina 1
<b>kDa</b>	Unidade de massa atômica
<b>LAL</b>	<i>Limulus Amoebocyte Lysate</i>
<b>LDH</b>	<i>Lactate dehydrogenase</i> (Desidrogenase láctica)
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub></b>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
<b>LTE<sub>4</sub></b>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
<b>LTs</b>	Linfócitos T
<b>LXs</b>	Lipoxinas
<b>LXA<sub>4</sub></b>	Lipoxina A <sub>4</sub>
<b>5-LO</b>	Enzima 5-Lipoxigenase
<b>15-LO</b>	Enzima 15-Lipoxigenase
<b>MAPKs</b>	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade principal
<b>MIF</b>	<i>Mean fluorescence intensity</i> (média de intensidade de fluorescência)
<b>MLR</b>	<i>Mixed Leukocyte reaction</i> (Reação mista leucocitária)
<b>MyD88</b>	Proteína adaptadora fator de diferenciação mieloide 88
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa B
<b>NK</b>	<i>Natural Killer Cell</i> (célula matadora natural)
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OPD</b>	<i>Orto-fenilenodiamina</i> (ortofenilenodiamina)
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>OX40L</b>	Ligante de OX40
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados a patógenos)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
<b>PBS-T</b>	<i>Phosphate buffered saline tween</i> (solução salina tamponada com fosfato + Tween 20)
<b>PCR- RT</b>	Reação de transcriptase reversa em tempo real
<b>pDCs</b>	<i>Plasmacytoid dendritic cells</i> (células dendríticas plasmocitoides)
<b>PDL-1</b>	Molécula ligante de morte programada 1
<b>PDL-2</b>	Molécula ligante de morte programada 2
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i> (ficoeritrina)

<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PGD<sub>2</sub></b>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PI3K</b>	Inibidor de fosfatidilinositol-3-cinase
<b>PLA<sub>2</sub></b>	<i>Phospholipase A<sub>2</sub></i> (fosfolipase A <sub>2</sub> )
<b>PRRs</b>	<i>Pattern recognition receptors</i> (receptores de reconhecimento de padrões)
<b>RPMI</b>	Meio de cultura RPMI 1640
<b>RPMI-S</b>	Meio de cultura RPMI 1640 suplementado
<b>RT</b>	<i>Reverse transcriptase</i> (transcrição reversa)
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (reação da transcriptase reversa em tempo real)
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida)
<b>SEA</b>	<i>Shistosoma mansoni</i> soluble egg antigen (antígenos solúveis dos ovos de <i>Shistosoma mansoni</i> )
<b>SFB</b>	<i>Fetal bovine serum</i> (soro fetal bovino)
<b>SPS</b>	Produtos solúveis de <i>Trichuris suis</i>
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter área</i> (granulosidade ou complexidade interna)
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TCR</b>	<i>T lymphocyte receptor</i> (receptor de linfócitos T)
<b>TGF-β</b>	Fator de transformação de crescimento
<b><i>T. gondii</i></b>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<b>Th</b>	Linfócitos T auxiliaries
<b>TIR</b>	Domínio IL-1R
<b>TLRs</b>	Receptores do tipo <i>toll</i>
<b>TMB</b>	<i>Tetramethylbenzidine</i> (tetrametilbenzidina)
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral- alfa
<b>Tp</b>	Tripomastigotas de <i>Tripanossoma cruzi</i>
<b>Treg</b>	Célula T reguladora
<b>TRIS</b>	<i>Tris- hydroxymethyl- aminomethane</i> (hidroximetil amino metano)
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>vs</b>	Versus



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>1.1 Origem e distribuição das DCs</b> .....	<b>27</b>
<b>1.2 Maturação das DCs</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3 Indução e regulação da resposta imune adaptativa por DCs</b> .....	<b>31</b>
<b>1.4 <i>Crotalus durissus terrificus</i> e os principais componentes de seu veneno</b> ..	<b>38</b>
<b>1.5 Sistema imune e veneno crotálico</b> .....	<b>40</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>43</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1 Animais</b> .....	<b>44</b>
<b>3.2 Antígenos e adjuvantes</b> .....	<b>44</b>
<b>3.3 Purificação da crotóxina a partir do veneno de <i>C. d. terrificus</i></b> .....	<b>45</b>
<i>3.3.1 Purificação das subunidades CA e CB a partir da CTX isolada do veneno de C. d. terrificus</i> .....	
<b>3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> Erro! Indicador não definido.	
<b>3.5 Eliminação de endotoxinas na CTX e suas subunidades CA e CB</b> .....	<b>45</b>
<b>3.6 Determinação da concentração de proteína nas amostras</b> Erro! Indicador não definido.	<b>47</b>
<b>3.7 Atividade fosfolipásica com substrato 4-nitro-3-octanoiloxi- benzoico (4N3OBA)</b> .....	<b>47</b>
<b>4. MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>48</b>
<b>4.1 Diferenciação de DCs <i>in vitro</i> a partir de medula óssea de camundongos</b> .	<b>48</b>
<b>4.2 Estimulação das DCs com CTX e CB na presença ou não de LPS ou OVA + LPS</b> .....	<b>49</b>
<b>4.3 Marcação e estratégia de análise para determinação da população das DCs diferenciadas <i>in vitro</i> por citometria de fluxo</b> .....	<b>50</b>
<b>4.4 Expressão gênica de IL-10, TGF-<math>\beta</math>, FPRs 1 e 2 em DCs por PCR- RT</b> .....	<b>53</b>
<i>4.4.1 Extração de RNA total</i> .....	<b>53</b>
<i>4.4.2 Reação de Transcrição Reversa (RT)</i> .....	<b>54</b>
<i>4.4.3 PCR em tempo real em sistema Syber Green</i> .....	<b>54</b>
<b>4.5 Ensaio de proliferação de LTs co-cultivados com DCs</b> .....	<b>56</b>
<i>4.5.1 Co- cultura de DCs diferenciadas <i>in vitro</i> com células CD3<sup>+</sup> purificadas de órgãos linfoides de camundongos imunizados com OVA</i> .....	<b>56</b>
<i>4.5.2 Co- de proliferação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> a partir de órgãos linfoides de camundongos BALB/c naives ou imunizados com OVA co-cultivados com DCs</i> .....	<b>58</b>

4.5.3 Ensaio de proliferação das células T .....	59
<b>4.6 Marcação extracelular/intracelular e estratégia de análise para a determinação das populações de LTs por citometria de fluxo .....</b>	<b>59</b>
<b>4.7 Ensaio de co- culturas de LTCD3<sup>+</sup> ou LTCD4<sup>+</sup> com DCs diferenciadas <i>in vitro</i> .....</b>	<b>62</b>
4.7.1 Estudo do efeito da CTX e CB sobre o perfil de diferenciação de linfócitos T obtidos de camundongos transgênicos DO11.10 co-cultivados com DCs <i>in vitro</i> .....	62
4.7.2 Análise do efeito da CTX e CB sobre o perfil de diferenciação de LTCD4 <sup>+</sup> incubados com DCs diferenciadas <i>in vitro</i> .....	64
<b>4.8 Determinação de citocinas pró-inflamatórias, IL-10, IL-2 e IFN<math>\gamma</math> nos sobrenadantes das diferentes culturas celulares .....</b>	<b>65</b>
<b>5 MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1 Análise da proliferação de linfócitos totais obtidos dos linfonodos dos camundongos previamente imunizados com a OVA e que receberam CTX ou CB .....</b>	<b>68</b>
<b>5.2 Análise do efeito da CTX e CB sobre células CD8<sup>+</sup> e subpopulações de células CD4<sup>+</sup> em suspensões celulares obtidas de linfonodos de camundongos BALB/c que receberam ou não a CTX ou CB <i>in vivo</i> .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3 Determinação da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA nos soros dos camundongos imunizados com OVA que receberam ou não CTX ou CB ..</b>	<b>70</b>
<b>5.4 Reação de hipersensibilidade tardia (DTH).....</b>	<b>70</b>
<b>5.5 Análise dos resultados .....</b>	<b>71</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
<b>6.1 Purificação da CTX e sua subunidade CB .....</b>	<b>72</b>
<b>6.2 Análise da massa molecular da CTX e suas subunidades CA e CB por eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) .....</b>	<b>73</b>
<b>6.3 Avaliação da atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>) por ensaio enzimático .....</b>	<b>75</b>
<b>6.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6.4.1 DCs são ativadas de maneira eficiente com a OVA + LPS.....	76
6.4.2 CTX e sua subunidade CB modulam a expressão de moléculas MHC-II, coestimuladoras (CD40, CD80, CD86), ICOSL, PD-1L, PD-2L em DCs incubadas com OVA + LPS <i>in vitro</i> .....	78
6.4.3 Citocinas anti e pró -inflamatórias foram moduladas por CTX e sua subunidade CB em DCs estimuladas com OVA + LPS <i>in vitro</i> .....	80
6.4.4 DCs estimuladas ou não com LPS na presença ou não da CTX ou CB expressam FPRs 1 e 2.....	82
6.4.5 CTX e CB modulam DCs estimuladas com OVA + LPS <i>in vitro</i> via FPRs.....	83

6.4.6 FPRs estão envolvidos no efeito da CTX e CB sobre a produção de citocinas anti- e pró-inflamatórias pelas DCs estimuladas com OVA + LPS.....	86
6.4.7 O bloqueio da enzima 5-lipoxigenase abole o efeito modulador da CTX e CB sobre as DCs estimuladas com OVA + LPS.....	88
<b>6.5 CO- CULTURA DE DCs COM LTs IN VITRO .....</b>	<b>92</b>
6.5.1 CTX e CB inibem a proliferação e produção de IL-2 de LTCD3 <sup>+</sup> co-cultivados com DCs incubadas com OVA + LPS ou ConA.....	92
6.5.2 Proliferação de LTCD4 <sup>+</sup> OVA-específicos é inibida na co-cultura com DCs estimuladas com OVA + LPS na presença de CTX ou CB.....	94
6.5.3 CTX e CB modulam a expressão de Tbet, Gata-3 e FoxP3 em LTCD4 <sup>+</sup> obtidos de animais DO 11.10 co-cultivados com DCs estimuladas com a OVA + LPS.....	95
6.5.4 CTX e CB interferem na diferenciação de subpopulações de LTCD4 <sup>+</sup> co-cultivados com DCs estimuladas com LPS.....	97
<b>6.6 MODELO IN VIVO .....</b>	<b>99</b>
6.6.1 CTX e CB administradas <i>in vivo</i> inibem a produção de anticorpos anti-OVA, a proliferação de linfócitos totais e produção de citocinas pró-inflamatórias.....	99
6.6.2 Efeito inibitório da CTX na reação de hipersensibilidade tardia.....	102
6.6.3 A administração <i>in vivo</i> da CTX e sua subunidade CB resulta em menor porcentagem de células T CD4 <sup>+</sup> , mas não CD8 <sup>+</sup> em camundongos imunizados com OVA.....	103
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>106</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>125</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>125</b>
<b>APÊNDICE A- Células dendríticas <i>in vitro</i> .....</b>	<b>152</b>
<b>APÊNDICE B- Co- cultura de DCs com LTs <i>in vitro</i> .....</b>	<b>156</b>
<b>APÊNDICE C- Modelo <i>in vivo</i> .....</b>	<b>162</b>
<b>APÊNDICE D- Artigo publicado.....</b>	<b>165</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é capaz de detectar a presença de patógenos (Durai e Murphy, 2016), danos no tecido e também participa do reparo tecidual. Para tanto, componentes do sistema imune inato e adaptativo estão presentes em todos os tecidos e órgãos do indivíduo com o intuito de reconhecer agentes potencialmente patogênicos presentes no sangue, superfícies de mucosas incluindo o trato gastrointestinal, respiratório, urinário, trato urogenital, e por fim no tecido cutâneo (Hu e Pasare, 2013).

Assim sendo, o sistema imune desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase que inclui a distinção entre antígenos próprios que devem ser tolerados (como por exemplo, a microbiota comensal) ou de antígenos que devem induzir a geração de respostas efetoras, desde que sua magnitude e qualidade sejam adequadas para cada tipo de patógeno/infecção do hospedeiro (Costa-Pinto *et al.*, 2006; Veiga-Fernandes e Mucida, 2016).

A resposta imune inata compreende a primeira linha de defesa do organismo contra inúmeros patógenos/antígenos e seus componentes são essenciais para a geração da imunidade adaptativa (Itano e Jenkins, 2003; Catron *et al.*, 2004). Com isso, sabe-se que as células dendríticas (DCs) constituem uma população heterogênea de células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais (Maldonado-López e Moser, 2001; Merad *et al.*, 2013) que exercem várias funções, dentre elas, intersecção do sistema imune inato e adaptativo (Steinman e Cohn, 1973; Maldonado-López e Moser, 2001; Merad *et al.*, 2013). Nesse sentido, as DCs são as principais APCs, sendo importantes na regulação de respostas imunes entre a indução de tolerância e a ativação do sistema imunológico (Kapsenberg, 2003; Sie e Korn, 2016).

### 1.1. Origem e distribuição das DCs

Até o presente momento, as DCs podem ser classificadas em quatro tipos de acordo com marcadores fenotípicos: DCs mieloides (DC convencional ou cDC), DCs

plasmocitoides (pDCs), células de Langerhans e DCs derivadas de monócitos sendo essa, por sua vez, envolvida com processos inflamatórios (Merad *et al.*, 2013).

As cDCs são encontradas nos tecidos não linfoides periféricos, linfonodos e sangue. Uma vez ativadas, essas células migram dos tecidos não-linfoides para órgãos linfoides secundários (Wojas e Pajtasz-Piasecka, 2010; Segura e Amigorena, 2013).

DCs convencionais expressam na superfície a integrina CD11c, o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) (Steinman *et al.*, 1979; Metlay *et al.*, 1990; Merad *et al.*, 2013), marcador hematopoético CD45 e o receptor para Flt3, também denominado quinase hepática fetal 2 (Flk2) ou CD135 (Merad *et al.*, 2013). Essa população de DCs pode ser dividida ainda, em residentes de órgãos linfoides e migratórias. DCs residentes de tecidos linfoides permanecem nesses locais durante todo o seu ciclo de vida e são fenotipicamente imaturas exibindo baixa expressão de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD86). As cDCs migratórias podem estar presentes nos tecidos periféricos e em órgãos não linfoides como pele, fígado, rim e pulmão. Essas cDCs migram via sistema linfático para os tecidos linfoides com um fenótipo maduro, ou seja, alta expressão de moléculas coestimuladoras e de MHC. Esta migração de DCs derivadas de tecido é aumentada em resposta a estímulos inflamatórios (Zhan *et al.*, 2012; Hu e Pasare, 2013; Segura e Amigorena, 2013).

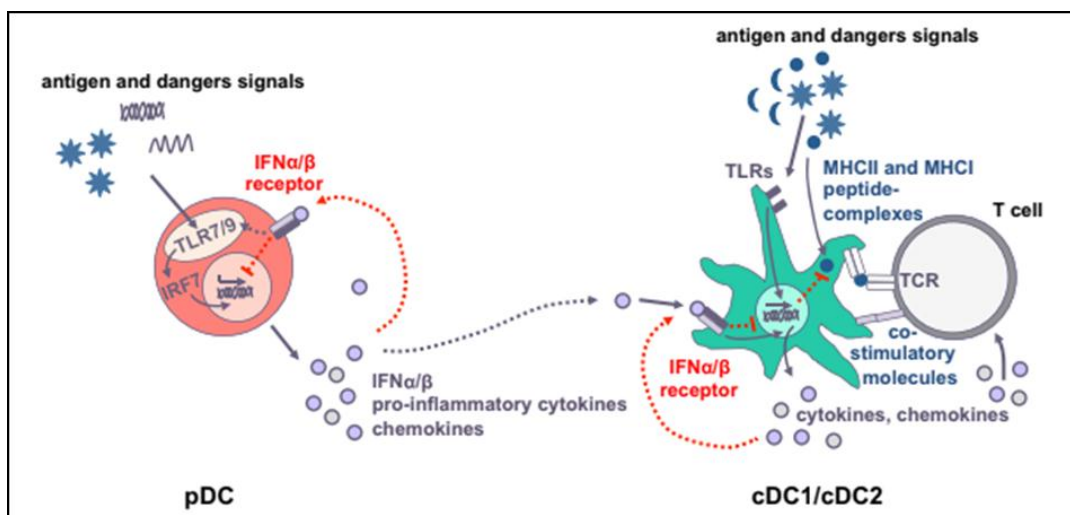
Estudos em modelo murinos também mostram que as cDCs podem ser subdivididas em dois tipos: cDC do tipo 1 (cDC1) e cDCs do tipo 2 (cDC2) com base na expressão do marcador da superfície celular, no perfil de expressão gênica e em sua dependência de diferentes fatores de transcrição para o seu desenvolvimento (Schlitzer *et al.*, 2015; Guilliams *et al.*, 2016).

As cDCs1 caracterizam-se por expressar CD8 $\alpha$  ou CD103<sup>+</sup> sendo especializada na apresentação cruzada de antígenos exógenos via MHC-I para linfócitos (LTs) CD8<sup>+</sup> em resposta a infecções virais. Essas células são propensas a secretar a interleucina (IL) 12p70 (IL-12p70) induzir a diferenciação dos linfócitos T auxiliares (Th) CD4<sup>+</sup> para o tipo 1 (Th1), mas também são capazes de produzir citocinas imuno-regulatórias como o fator de transformação de crescimento (TGF $\beta$ ) e IL-10. Portanto, essas células em estado imaturo são importantes na indução da

tolerância, no entanto quando ativadas desencadeiam respostas Th durante a inflamação (Merad *et al.*, 2013).

Em relação às cDCs do tipo 2, essas por sua vez, caracterizam-se por expressar CD11b, sendo responsáveis em apresentar o peptídeo antigênico via MHC-II para as células TCD4<sup>+</sup> como por exemplo, em resposta a infecções por helmintos ou fungos resultando na polarização dos linfócitos para o perfil Th2 ou Th17, respectivamente (Mildner e Jung, 2014). Essas células apresentam menor capacidade de apresentação antigênica cruzada em comparação com as cDCs 1 (Merad *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 2016).

Em contraste com as cDCs, as pDCs de murinos são caracterizadas pela expressão intermediária de CD11c, ausência de CD11b (Ginhoux *et al.*, 2009; Guilliams *et al.*, 2016), assim como baixa expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II. Estas células podem estar envolvidas tanto na indução da imunidade adaptativa como mediando tolerância (Wright *et al.*, 2013). As pDCs são caracterizadas também pela sua capacidade de produzir grandes quantidades de interferon (IFN) do tipo I em resposta à estímulos virais (Merad *et al.*, 2013). Com relação à sua distribuição, essas células acumulam-se principalmente no sangue e nos tecidos linfoides e entram nos gânglios linfáticos através da circulação sanguínea. A figura 1 ilustra os diferentes tipos de DCs.



**Figura 1- Tipos de células dendríticas**  
Fonte: (Dress *et al.*, 2018)

Células de Langerhans, por sua vez, são abundantes na epiderme, como por exemplo, no epitélio escamoso estratificado da pele e tecidos mucosos. Essas

células são caracterizadas por expressarem CD103<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> e CD207, ou ainda marcadores típicos de DCs, como MHCII, CD11c e CD11b (Merad *et al.*, 2008; Schlitzer *et al.*, 2013) .

Diferentes metodologias têm sido empregadas para induzir a diferenciação de DCs a partir de monócitos humanos (Sallusto e Lanzavecchia, 1994), assim como células progenitoras hematopoiéticas humanas e de camundongos (Caux *et al.*, 1992; Inaba, Steinman, *et al.*, 1992; Caux *et al.*, 1996). Dentre eles, DCs murinas podem ser geradas a partir de medula óssea (BMDCs) cultivadas *in vitro* na presença somente do fator de estimulação de colônias de granulócitos/ macrófagos (GM-CSF) (Inaba, Inaba, *et al.*, 1992) ou em conjunto com a IL-4 (Masurier *et al.*, 1999; Son *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 2005). Ambos os métodos de cultura resultam na produção de populações de DCs heterogêneas com propriedades fenotípicas e estimuladoras distintas.

## 1.2. Maturação das DCs

As DCs imaturas (iDCs) são caracterizadas por sua alta atividade endocítica, baixa expressão de moléculas coestimuladoras, bem como produção de citocinas (Mellman e Steinman, 2001). As DCs, na ausência de estímulo de maturação, desempenham papel crítico na manutenção da tolerância periférica (Tsitoura *et al.*, 1999).

O primeiro mecanismo envolvido na captação de antígenos ocorre por intermédio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) inatos que estão diretamente envolvidos com a maturação das DCs (Medzhitov e Janeway, 1997). Dentre os PRRs expressos pelas DCs destaca-se os do tipo *Toll* (TLR) (Terrazas *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015) que desempenham um papel proeminente no reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e alguns padrões moleculares associado a danos (DAMPs) (Moll, 2003; Kawai e Akira, 2011). Portanto, PAMPs e DAMPs interagem com diferentes receptores na superfície das iDCs, assim como de macrófagos desencadeando o processo de ativação destas células (Mellman e Steinman, 2001; Medzhitov e Janeway, 2002; Reis E Sousa *et al.*, 2003; Akira *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2014) e

consequentemente o padrão de ativação da imunidade adaptativa (Jeon *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016).

Neste contexto, as DCs e os macrófagos podem ser ativados pelos produtos da parede celular de bactérias Gram-positivas (Takeuchi *et al.*, 1999; Means *et al.*, 2000), bactérias Gram-negativas (Qureshi *et al.*, 1999), espiroquetas (Brightbill *et al.*, 1999), leveduras (Underhill *et al.*, 1999) e micobactérias (Means *et al.*, 2000) por meio do TLR4 e TLR2.

Comum à vários TLRs, a cauda citoplasmática do TLR4 contém o domínio IL-1R (TIR) (Imler e Hoffmann, 2003; O'Neill e Bowie, 2007) que, após a interação do TLR com seu ligante, recruta várias proteínas adaptadoras intracelulares como a MyD88 (proteína adaptadora fator de diferenciação mieloide 88), as quais ativam uma série de proteínas quinases chamadas IRAKs 4 (quinase 4 associada a IL-1) e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) levando à ativação de fatores de transcrição como fator nuclear kappaB (NF-κB) e a proteína ativadora 1 (AP-1) responsáveis pela transcrição de genes envolvidos com a ativação celular, produção de citocinas dentre outros (Akira *et al.*, 2001; Lee e Kim, 2007; Shen *et al.*, 2008; Guma *et al.*, 2011).

Como exemplo, a interação entre a molécula de lipopolissacarídeo (LPS) com o TLR4 (Takeda *et al.*, 2003) expresso em DCs induz a maturação desta célula que inclui aumento da expressão do complexo MHC/peptídeo, moléculas coestimuladoras, acompanhado da produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-12, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNFα) (Steinman e Pope, 2002; Fujihara *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005; Dudek *et al.*, 2013). Assim, a ativação das DCs determina a ativação dos linfócitos T e geração da resposta celular adaptativa (Gause *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2003; Van Kooyk e Geijtenbeek, 2003; Ma e Clark, 2009).

### **1.3. Indução e regulação da resposta imune adaptativa por DCs**

DCs, ao entrar em contato com agentes potencialmente patogênicos, capturam, processam esses antígenos em peptídeos, sofrem mudanças fenotípicas e funcionais e migram para os órgãos linfoides secundários (Schraml e Reis E Sousa, 2015). Esse processo de migração das DCs para os nódulos linfáticos



drenantes ocorre através dos vasos linfáticos e requer a expressão do receptor de quimiocina CCR7, que torna essas APCs sensíveis à ação quimiotática dos seus ligantes CCL19 e CCL21 (Cyster, 1999; Sallusto e Lanzavecchia, 2000; 2013). Essas duas quimiocinas são constitutivamente produzidas nos órgãos linfoides e atraem também as células T *naives* do sangue para os órgãos linfoides secundários (Sallusto e Lanzavecchia, 2000). Dessa maneira, nos órgãos linfoides, as DCs podem induzir ativação e proliferação de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (Timmerman e Levy, 1999; Gunzer *et al.*, 2001). Assim sendo, as DCs apresentam os peptídeos antigênicos para as células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, em associação com as moléculas de MHC-II e MHC-I, respectivamente e coestimuladoras. Os LTs tornam-se ativados, proliferam, diferenciam-se em subpopulações distintas e efetoras de uma resposta imune adaptativa antígeno-específica (Reis E Sousa *et al.*, 1999; Mellman e Steinman, 2001; Weigel *et al.*, 2002; Mempel *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009; Joffre *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2012; Davison *et al.*, 2013).

Para a ativação dos LTCD4<sup>+</sup> pelas APCs, como as DCs, três eventos de sinalização são necessários: o primeiro sinal é mediado pela ligação do receptor de células T (TCR) ao complexo MHC-II/peptídeo apresentado pela APC (Zygmunt e Veldhoen, 2011).

Interações entre outras moléculas expressas nas APCs e nos LTs fornecem a coestimulação necessária para a ativação e diferenciação dessas células T (Schwartz *et al.*, 1990; June *et al.*, 1994; Croft, 2003). Portanto, a interação entre a molécula CD28 expressa nos LTs e seus ligantes CD80/CD86 nas APCs fornecem o 2º sinal necessário para a proliferação e diferenciação das células T humanas ou murinas (Ding *et al.*, 1993; Lenschow *et al.*, 1996; Mondino *et al.*, 1996).

Na superfície das APCs, a molécula CD86 é expressa em baixos níveis e é rapidamente aumentada após a ativação da célula, enquanto que a expressão de CD80 é induzida mais tardiamente. A expressão mais rápida de CD86 pode indicar sua maior participação como coestimuladora durante a iniciação da resposta imune que a CD80, entretanto isto não está definido visto que ambas compartilham as mesmas funções (Diehl *et al.*, 2000; Wallet *et al.*, 2005). Além disso, a interação entre a molécula CD40 expressa pelas APCs e o ligante de CD40 (CD40L-CD154) na membrana de linfócitos é importante na ativação de linfócitos T, bem como na

própria APC (Peng *et al.*, 1996; Diehl *et al.*, 2000; Macdonald *et al.*, 2002; O'sullivan e Thomas, 2003).

Por fim, o 3º sinal é mediado pelas citocinas secretadas no ambiente de contato entre os linfócitos e as DCs induzindo a ativação e diferenciação destes LTs (Ding *et al.*, 1993; Frucht *et al.*, 2001; Guermonprez *et al.*, 2002; Watford *et al.*, 2003; Carbone *et al.*, 2004).

A capacidade de DCs maduras de apresentar o peptídeo antigênico aos LTs *naives* e promover a sua diferenciação em subpopulações distintas é, portanto, atribuída ao aumento da expressão do MHC, das moléculas coestimuladoras e capacidade de secretar diferentes citocinas (Enk *et al.*, 1993; Hope *et al.*, 1995; Macatonia *et al.*, 1995; Scheicher *et al.*, 1995; Zhou e Tedder, 1995; Blauvelt *et al.*, 1996; Cella *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 1996; Jonuleit *et al.*, 1997; De Saint-Vis *et al.*, 1998; Stoll *et al.*, 1998; Fukao *et al.*, 2000).

Durante a interação entre as DCs e os linfócitos T, o padrão de secreção de citocinas ou a prevalência de alguma delas está diretamente relacionado com a diferenciação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> em populações distintas. A IL-12 está correlacionada com a diferenciação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> para a subpopulação Th1, enquanto que a diferenciação da população de Th2 é resultante da presença de IL-4 (secretada por células Natural killer- NK) e/ou IL-10 via inibição da sinalização da IL-12. DCs secretoras de IL-10 e/ou TGFβ induzem a diferenciação das células TCD4<sup>+</sup> reguladoras (Tregs). A polarização das células Th17 por DCs e citocinas ainda não está completamente elucidada, há evidências da participação da IL-23 na geração destas células (Gately *et al.*, 1998; Macdonald *et al.*, 2002; Mannon *et al.*, 2004; Kaiko *et al.*, 2008). Portanto, dependendo da natureza destes três sinais (Gause *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2003; Sutton *et al.*, 2009; Zygmunt e Veldhoen, 2011) as células T *naives* diferenciam-se em populações efetoras distintas como células Th do tipo Th1, Th2, Th17 e Tregs (Gause *et al.*, 1999; Maldonado-López e Moser, 2001; Kapsenberg, 2003; Takeda *et al.*, 2003; Van Kooyk e Geijtenbeek, 2003; Ma *et al.*, 2012).

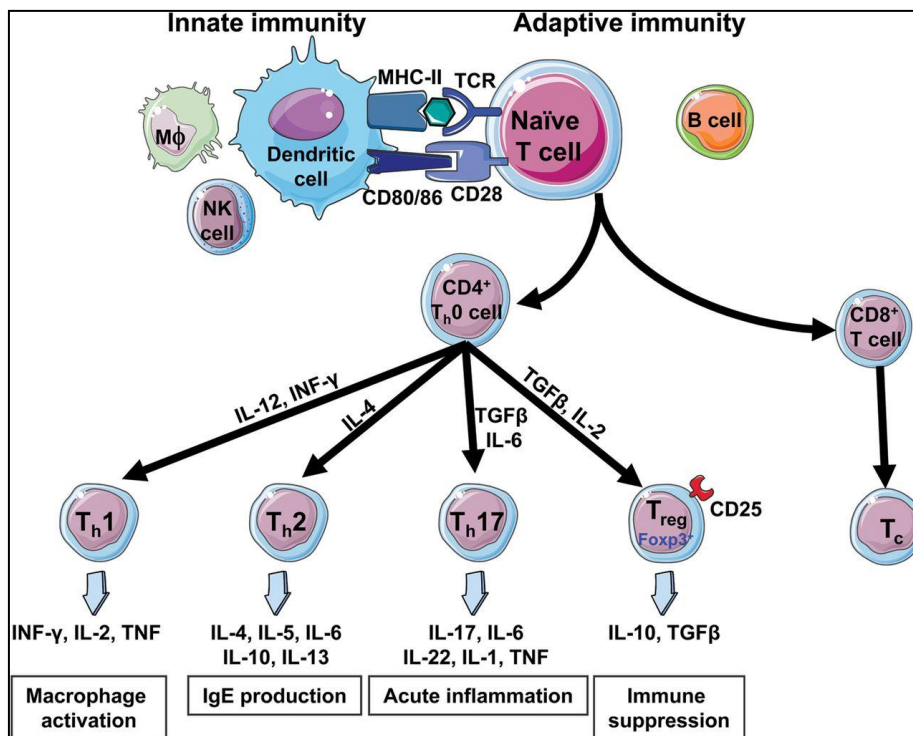
Linfócitos Th1 são classicamente descritos como as principais células secretoras de interferon-gama (IFN-γ) (Badovinac *et al.*, 2000; Dalton *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2013) e expressam o fator de transcrição T-bet e STAT-4 (Szabo *et al.*, 2000). A subpopulação Th2, por sua vez, é produtora de altas

quantidades de IL4, IL-5 e IL-13 mediadas pela ativação dos fatores de transcrição GATA-3 e STAT-6 (Zheng e Flavell, 1997; Rissoan *et al.*, 1999). As células Th17 expressam o fator de transcrição ROR $\gamma$ t, são secretoras de IL-17 e participam das reações inflamatórias (Moser e Murphy, 2000; Sutton *et al.*, 2009).

As células Tregs expressam o fator de transcrição FoxP3 (TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) e estão envolvidas com o controle da ativação do sistema imune em várias situações e manutenção da tolerância periférica (Roncarolo e Battaglia, 2007). Essas células podem atuar via contato, ou seja, ligação do receptor CTLA-4 (antígeno 4 associado com linfócito T citotóxico ou CD152) do linfócito T com os receptores CD80 ou CD86 em APCs (Mccoy e Le Gros, 1999; Mills, 2004) ou via secreção de citocinas imunorreguladoras como a IL-10 e TGF- $\beta$  (Takahashi *et al.*, 2000; Roncarolo *et al.*, 2001; Shevach *et al.*, 2001; Setoguchi *et al.*, 2005; Tran, 2013; Wright *et al.*, 2013). IL-10 secretada por células T age suprimindo as funções das DCs, inibindo a produção de IL-2, citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) e a sinalização intracelular via CD28 (Moore *et al.*, 2001). Trabalhos descrevem também, que a presença de TGF- $\beta$ , juntamente com a IL-10, pode estar associada com a indução de tolerância e geração de células Tregs (Doetze *et al.*, 2000; Grütz, 2005). Em outras situações, DCs ao apresentar antígenos para os linfócitos T podem também induzir anergia dessas células (Mempel *et al.*, 2004; Davison *et al.*, 2013).

Está bem estabelecido na literatura que a Concanavalina A (ConA) é responsável em estimular a proliferação de LTs. ConA é uma lectina vegetal capaz de se ligar a receptores glicosilados de superfície como o TCR dos LTs (Ahmann *et al.*, 1978; Chatila *et al.*, 1987). A ligação de ConA com células T promove um aumento na taxa de entrada de cálcio na célula, proporcionando assim o estímulo para uma eventual síntese de DNA resultando na proliferação dessas células (Lichtman *et al.*, 1983; Gosselin *et al.*, 1995).

Como apresentado na figura 2, APCs (DCs ou monócitos/macrófagos) apresentam antígenos através da molécula de MHC-II para células T *naives* (Th0) nos tecidos linfoides secundários, levando à expansão e diferenciação clonal de LTs em células efetoras ou Treg, de acordo com a estimulação combinada por diferentes citocinas, assim como foi mencionado anteriormente.



**Figura 2- Diferenciação de linfócitos T *naïve* em várias subpopulações por intermédio da apresentação antigénica mediada por APCs em uma resposta imune normal.**  
 Fonte: adaptado de (Idris-Khodja *et al.*, 2014)

Sobre a modulação da imunidade adaptativa pelas DCs, trabalhos descrevem que além das moléculas CD80 e CD86, outras também participam desse processo como as moléculas ligantes de PD-1(morte programada-1) e PD-2 (PDL-1 ou B7-H1; PDL-2 ou B7DC), ligante de OX40 (OX40L) e ligante de ICOS ou ICOSL (coestimulador induzível ICOS) (Hubo *et al.*, 2013).

ICOSL é expressa nas APCs, como células B (Hu *et al.*, 2011), macrófagos e DCs (Swallow *et al.*, 1999; Yoshinaga *et al.*, 2000). PDL-1 e PDL-2 também são expressas em DCs, bem como em outros tipos de células (Freeman *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003). Sabe-se ainda, que a expressão de PDL-1 é regulada por estímulos inflamatórios. A PDL-2, por sua vez é restrita à DCs e macrófagos (Yamazaki *et al.*, 2002), sendo predominantemente expressas em DCs tolerogênicas e assim, estão envolvidas na geração de células T regs e manutenção do estado de tolerância periférica (Hubo *et al.*, 2013).

Quanto aos mecanismos reguladores dos LTs, cinco moléculas pertencentes à família CD28 são expressas em diferentes fases da diferenciação dessas células tais como: CD28, CTLA-4, ICOS (coestimulador induzível de células T), PD1 e BTLA (Sharpe e Freeman, 2002; Bour-Jordan e Bluestone, 2009). A molécula PD-1 no linfócito T interage com PDL-1 ou PDL-2 nas APCs, como as DCs (Yamazaki *et al.*,

2002; Zhong *et al.*, 2007), o que resulta em sinais inibitórios para os LTs inibindo a ativação do PI3K (inibidor de fosfatidilinositol-3-cinase) (Keir *et al.*, 2008). Em resumo, a sinalização por PD-1 regula as respostas imunológicas e assim participa na tolerância periférica (Nishimura *et al.*, 2001; Krupnick *et al.*, 2005; Riley, 2009).

A molécula ICOS também é descrita com um importante regulador das células T e assim, do sistema imune adaptativo (Hutloff *et al.*, 1999). Trabalhos descrevem que a sinalização via ICOS é importante para a tolerância imune e, portanto no controle da geração de autoimunidade (Herman *et al.*, 2004; Prevot *et al.*, 2010). Além disso, a interação de ICOS no linfócito T com ICOSL na APC é importante na geração e expansão de células Treg Foxp3<sup>+</sup> quando na presença de um antígeno (Burmeister *et al.*, 2008; Linterman *et al.*, 2009).

Em murinos, ICOS é um importante marcador de célula Tregs (Grinberg-Bleyer *et al.*, 2010; Gomez De Agüero *et al.*, 2012) e desempenha papel indispensável na indução e manutenção da tolerância imunológica, por meio da regulação da diferenciação de células T efetoras (Lischke *et al.*, 2012). Neste contexto, alguns trabalhos mostram que DCs que apresentam alta expressão da molécula ICOSL são capazes de gerar células Tregs que secretam IL-10 (Han *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2007).

Além das citocinas, componentes lipídicos podem modular a ativação dos linfócitos T e conseqüentemente a resposta imune adaptativa. Estudos evidenciaram que as lipoxinas (LXs), em particular a lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>), são eicosanoides produzidos após a resposta pró-inflamatória e, dentre as diversas funções podem participar como anti-inflamatórios e mediadores pró-resolução da inflamação. A LXA<sub>4</sub> é gerada pela lipoxigenação de ácido araquidônico (AA) pela ação das enzimas 15-Lipoxigenase (15-LO) e/ou 5-LO em células epiteliais, monócitos, neutrófilos, células dendríticas (Serhan *et al.*, 1984; Scannell *et al.*, 2007; Sordi *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2014).

Lípidos bioativos derivados de ácidos graxos, como o AA, desempenham um papel essencial na regulação da inflamação. O AA é liberado da membrana celular predominantemente pela fosfolipase citosólica A2 $\alpha$  (cPLA<sub>2</sub>) e é processado por uma variedade de enzimas para formar os eicosanoides. As ciclooxigenases (COX) produzem prostaglandinas (PGs), incluindo PGE<sub>2</sub>, prostaciclina, bem como tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). A enzima 5-LO controla outra via chave no metabolismo do

AA, e seus principais produtos incluem o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e os cisteinil leucotrienos: leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) e leucotrieno E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>). Outros produtos da via 5-LO incluem o ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico, o ácido 5-oxo-eicosatetraenóico, as lipoxinas A<sub>4</sub> e B<sub>4</sub>, bem como as resolvinas e protectinas, derivadas dos ácidos eicosapentaenóico ou docosahexaenóico (Schwab e Serhan, 2006; Peters-Golden e Henderson, 2007; Pidgeon *et al.*, 2007; Steinhilber *et al.*, 2010).

A LXA<sub>4</sub> se liga ao receptor peptídeo-formil (FPR) do tipo 2 acoplado à proteína G. A literatura descreve três FPRs (FPR, FPRL1 e FPRL2) identificados em humanos, e fpr1 e fpr2 encontrados em camundongos (Le *et al.*, 2002; Migeotte *et al.*, 2006). Fpr2 de murino, assim como o FPR2 de humanos, também reconhece o mediador lipídico LXA<sub>4</sub> e os peptídeos N-terminais da anexina I (AnxA1) que desencadeiam respostas anti-inflamatórias (Chiang *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 2002).

A relevância dos FPRs como receptores de reconhecimento de padrões para peptídeos formilados tem sido bem estabelecida com relação à defesa do hospedeiro (Le *et al.*, 2002; Migeotte *et al.*, 2006) a diversos agentes patogênicos como em infecções bacterianas (Gao *et al.*, 1999). Os FPRs são expressos principalmente em fagócitos como neutrófilos, monócitos, macrófagos e DCs bem como em células imunes como os linfócitos T e B (Le *et al.*, 2002; Migeotte *et al.*, 2006; Panaro *et al.*, 2006). Um estudo mostra que o extrato de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) pode induzir como mecanismo de supressão a LXA<sub>4</sub> e assim, inibir a produção de IL-12 nas DCs em modelo *in vivo* ou *in vitro* (Aliberti *et al.*, 2002).

A funcionalidade das DCs está, portanto relacionada ao tipo de interação/reconhecimento dos diversos patógenos ou seus produtos, ao seu estágio de ativação e maturação e às condições do microambiente, como presença de citocinas ou agentes imunomoduladores (Müller *et al.*, 2002; Kubach *et al.*, 2005; Kabelitz *et al.*, 2006). Neste contexto, inúmeros trabalhos demonstram a ativação e maturação das DCs via interação dos patógenos com os PRRs. No entanto, também tem sido demonstrado que alguns patógenos ou produtos secretados por eles apresentam a capacidade de modular/inibir o sistema imune por diferentes mecanismos, sendo um deles a inibição da ativação das DCs (Rescigno, 2002); Van Liempt *et al.*, 2007; Poncini *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2009; Mattos *et al.*, 2011; Vukman *et al.*, 2013).

Além disso, outros estudos vêm mostrando que o veneno total da cascavel *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.terrificus* / *C.d.t*) ou suas subunidades possuem a capacidade de inibir o processo inflamatório, assim como outros mecanismos imunes (Sampaio *et al.*, 2010).

#### **1.4. *Crotalus durissus terrificus* e os principais componentes de seu veneno**

A *C.d.terrificus*, denominada popularmente como cascavel ou bioqueira é encontrada nas zonas altas e secas do Brasil, também é comum nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, áreas de Mato Grosso, Rondônia, Amazonas, Pará a oeste, incluindo Paraguai, Uruguai e Argentina (Guidolin *et al.*, 2013). As serpentes do gênero *Crotalus* estão distribuídas em regiões áridas e rochosas, de baixa vegetação, sendo raramente encontradas em floresta. São répteis robustos, pouco ágeis e apresentam como característica mais evidente a presença de chocalho ou guizo na extremidade caudal (Campbell e Lamar, 1989).

A literatura descreve que a toxicidade bem como a letalidade observada nos envenenamentos por serpentes do gênero *Crotalus* variam de acordo com a idade (Jimenez Porras, 1964), o sexo (Marsh e Glatston, 1974), hábitos alimentares (Daltry *et al.*, 1996), localização geográfica (Rodrigues *et al.*, 1998; Francischetti *et al.*, 2000) e a sazonalidade (Magro *et al.*, 2001).

O envenenamento por *C.d.terrificus* é caracterizado pela ação neurotóxica, miotóxica e alterações da coagulação sanguínea. Em casos moderados ou graves, observam-se desordens hemostáticas, paralisia respiratória, hipotensão e falência renal aguda (Azevedo-Marques *et al.*, 1985; Azevedo-Marques *et al.*, 1987; Hernández Cruz *et al.*, 2008).

O veneno total *C. d. terrificus* (CdtV) é uma mistura complexa de substâncias biologicamente ativas, como peptídeos, enzimas (5-nucleotidase, fosfodiesterase, trombina, Lamino-oxidase) e toxinas (crotamina, crotoxina, giroxina, convulxina), os quais são responsáveis pelos vários efeitos observados nos envenenamentos (Sano-Martins *et al.*, 2001; Hernández Cruz *et al.*, 2008).

Dentre as toxinas identificadas, a crotoxina (CTX) representa a fração majoritária do veneno (cerca de 60%). Essa toxina é um complexo hetero-dimérico

com massa molecular de aproximadamente 24 kDa (Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971) composto por duas subunidades associadas de forma não covalente (Neumann e Habermann, 1955; Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971) denominadas: crotoxina A ou crotapotina (CA) que é ácida, não tóxica e enzimaticamente inativa e a crotoxina B (CB) ou fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que por sua vez é básica, tóxica e apresenta atividade enzimática (Rübsamen *et al.*, 1971; Aird *et al.*, 1986; Faure *et al.*, 1994; Sampaio *et al.*, 2010). Além disso, variações de CTX inter e intra-espécies têm sido descritas nos venenos de *C. durissus* sugerindo a presença de isoformas de CA e CB (Pereañez *et al.*, 2012).

As subunidades CA e CB são importantes para a atividade da CTX, sendo a primeira considerada como molécula carreadora, ou seja, chaperona dirigindo a subunidade CB para o seu receptor na membrana celular, o que potencializa a toxicidade da PLA<sub>2</sub> (Bon *et al.*, 1989). A CTX circula como um complexo até que reconheça o sítio específico da membrana alvo e, após a ligação da subunidade CB em seu receptor de membrana a CA é liberada no meio (Chang e Su, 1981; Radvanyi *et al.*, 1989).

A subunidade CA apresenta massa molecular de aproximadamente 9,5 kDa (Aird *et al.*, 1986) e consiste de três cadeias polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) ligadas por pontes de dissulfeto (Pereañez *et al.*, 2012) geradas através da quebra proteolítica do precursor da crotapotina. Doley e Kini isolaram do veneno de *C.d.terrificus* quatro isoformas de CA que foram denominadas CA1, CA2, CA3 e CA4 (Doley e Kini, 2009). Estes mesmos autores relatam ainda, que a crotapotina previne interações não específicas entre a PLA<sub>2</sub> e fosfolípidos da membrana na junção neuromuscular sugerindo que, quando a CTX atinge a membrana alvo, é formado um complexo ternário transiente entre o receptor e as subunidades da CTX.

Quanto à subunidade CB, essa fosfolipase, está presente não só em venenos de serpentes, mas também nos venenos de vespas, abelhas e no suco pancreático de mamíferos (Harris e Franson, 1991). A subunidade CB (14,5 kDa) é formada por uma cadeia simples de 122 aminoácidos ligados por sete pontes de sulfeto (Aird *et al.*, 1986). As PLA<sub>2s</sub> apresentam um amplo espectro em relação as suas atividades biológicas, dentre elas: ação neurotóxica, cardiotoxica, edematogênica, anticoagulante, hemolítica e miotóxica (Kini e Evans, 1989; Montecucco *et al.*, 2008).



## 1.5. Sistema imune e veneno crotálico

A CTX, além de apresentar as atividades biológicas clássicas identificadas, também exerce ação imunomoduladora e anti-inflamatória (Sampaio *et al.*, 2010). Em alguns modelos experimentais foi mostrado que essa atividade da CTX sobre o sistema imune pode ser mediada pelas subunidades CA e/ou CB isoladas (Landucci *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2005; Zambelli *et al.*, 2008).

Nesse sentido, Sampaio e colaboradores (Sampaio *et al.*, 2001) mostraram que o veneno crotálico, além de inibir a capacidade fagocítica e de espraiamento dos macrófagos, promove a produção de óxido nítrico (NO), peróxido de nitrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), metabolismo de glucose e glutamina, o que sugere efeito dual sobre as funções dessa célula.

Em 2003, esse mesmo grupo de pesquisadores mostrou que a CTX é o componente do veneno crotálico responsável pela inibição da atividade fagocítica de macrófagos residentes ou ativados pela injeção de tioglicolato ou *Mycobacterium bovis* (BCG) da cavidade peritoneal de ratos (Sampaio *et al.*, 2003).

Além disso, em outro trabalho foi mostrado que o efeito da CTX, assim como do veneno total sobre as funções do macrófago está relacionado à sua capacidade de alterar o rearranjo do citoesqueleto, inibição da fosforilação de tirosinas e diminuição das proteínas Rho GTPases associadas à membrana, as quais estão envolvidas na sinalização de processos intracelulares e atividade fagocitária dessas células (Niedergang e Chavrier, 2005).

Modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* mostraram que a CTX apresenta também ação anti-tumoral, ou seja, interferindo no crescimento do tumor (Rudd *et al.*, 1994; Donato *et al.*, 1996). Costa e colaboradores (Costa *et al.*, 2013) relataram que o efeito da CTX sobre o crescimento do tumor também é dependente da sua ação sobre os macrófagos, os quais são essenciais no microambiente tumoral.

Em modelo *in vitro* foi mostrado que a incubação da cultura de neutrófilos com CdtV ou CTX inibiu a atividade fagocitária dos neutrófilos. O mesmo foi observado em modelo *in vivo*, onde a administração do veneno bruto ou ainda, do complexo CTX em ratos inibiu a atividade fagocítica dos neutrófilos após a indução da inflamação com carragenina (Lima *et al.*, 2012). Células obtidas do baço de

camundongos tratados com CTX quando incubadas com ConA secretaram menores níveis de IL-4, IL-6 e IL-10 (Cardoso *et al.*, 2001; Rangel-Santos, Lima, *et al.*, 2004).

Quanto à participação das subunidades da CTX sobre sistema imune, foi mostrado que a CB, mas não a CA, é responsável em inibir o espraiamento e atividade fagocítica de macrófagos em modelo *in vivo* e *in vitro* (Sampaio *et al.*, 2005).

Além disso, também foi mostrado que a incubação de macrófagos com o veneno bruto, CTX, sua subunidade CB, mas não a CA, induzem a produção de LXA<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub>. Além disso, foi verificado que a injeção intraperitoneal da subunidade CB da CTX em camundongos induziu a síntese de prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) e PGE<sub>2</sub> (Moreira *et al.*, 2008).

Cardoso *et al.* (2001) demonstraram que a CTX induz em camundongos acentuada diminuição no número de leucócitos circulantes. Além disso, estes autores verificaram que há diminuição no número de monócitos e aumento de neutrófilos circulantes (Cardoso *et al.*, 2001). Em outro trabalho, a administração da CTX ou CB em ratos resultou em diminuição do número de leucócitos e linfócitos na circulação sanguínea. Em contrapartida, houve aumento de células B e T nos nódulos linfáticos mesentéricos (Zambelli *et al.*, 2008).

Por outro lado, outros estudos descrevem que a administração da crotopotina *in vivo* é capaz de modular negativamente o desenvolvimento de doenças autoimunes como a neurite em ratos Lewis (Castro *et al.*, 2007) e a encefalomielite, sendo este efeito acompanhado pela menor resposta proliferativa de linfócitos T encefalitogênicos cultivados com macrófagos peritoneais murinos e aumento da produção de PGE<sub>2</sub> na cultura celular (Garcia *et al.*, 2003). Em outro trabalho foi mostrado que a CA inibe significativamente o edema da pata de ratos induzido por carragenina tanto na fase precoce como tardia da resposta inflamatória (Landucci *et al.*, 1995).

Quanto aos mecanismos envolvidos na ação da CTX sobre os macrófagos, Costa e colaboradores mostraram que o bloqueio dos FPRs com um antagonista seletivo (Boc-2) bloqueou tanto o efeito estimulador da CTX sobre a produção de NO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e IL-1β destas células como o efeito inibitórios delas sobre a proliferação de células tumorais (Costa *et al.*, 2013).

Em modelo *in vivo*, o efeito inibitório da CTX sobre o edema, migração celular e a adesão de leucócitos em vênulas pós-capilares do músculo cremaster foi abolido em camundongos tratados com Boc-2 seguida da injeção com carragenina em camundongos (Nunes *et al.*, 2010) indicando que o efeito anti-inflamatório da toxina depende da ativação de FPRs. Outro estudo também mostra que o tratamento *in vivo* e *in vitro* com inibidor da 5-lipoxigenase (zileuton), mas não com o inibidor da cicloxigenase (indometacina) aboliu o efeito inibitório do veneno total, CTX ou CB sobre a fagocitose de macrófagos (Sampaio et al, 2006).

O conjunto destes resultados sugere, portanto, que a CTX possa interferir com a indução da imunidade adaptativa via modulação de componentes da imunidade inata, como as DCs. Em vista disso, nós mostramos que a CTX e a CB, mas não a CA, foram capazes de inibir a maturação das DCs incubadas com ligante de TLR4, como o LPS, caracterizada por menor expressão de moléculas coestimuladoras, MHC-II, NF- $\kappa$ Bp65, via das MAPKs (p38/ ERK1/2), assim como secreção de citocinas pró-inflamatórias. Os resultados indicaram ainda, a participação dos FPRs nesse efeito. Além disso, CTX e CB induziram a secreção de IL-10, PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> em DCs incubadas com LPS. Baixa proliferação e secreção de IL-2 também foram verificadas em co-cultura de células CD3<sup>+</sup> e DCs incubadas com LPS + CTX ou LPS + CB em comparação com DCs estimuladas com LPS (Freitas, 2014).

Em vista desses relatos descrevendo as moléculas que estão envolvidas na capacidade das DCs em induzir ativação da imunidade adaptativa ou gerar tolerância e ainda, os diferentes trabalhos mostrando a ação da CTX e CB sobre essas células, fica evidente a relevância em estudar a participação dessas moléculas no processo de modulação da resposta imune exercida pela toxina e sua subunidade CB em um modelo de antígeno específico convencional.

Antígenos proteicos como a ovalbumina (OVA) são comumente utilizados como ferramentas para entender os mecanismos que regulam a ativação ou controle do sistema imune (Puigneró *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Miki K e T, 2016). Dessa maneira, o estudo do efeito modulador da CTX e CB em modelos *in vivo* e *in vitro* de resposta de linfócitos T OVA-específica pode acrescentar informações relevantes sobre os mecanismos envolvidos na regulação da resposta imune exercida pela CTX e CB.

## 2. OBJETIVO

Considerando o efeito imunomodulador da CTX sobre as respostas humoral e celular e o papel crucial das DCs na indução da resposta imune adaptativa, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da CTX e CB sobre as DCs e consequente interação com os linfócitos T em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

### 2.1. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito da CTX e CB sobre o estado de maturação de DCs estimuladas com OVA + LPS;
- ✓ Verificar a participação de FPRs e da via da 5-lipoxigenase no efeito modulador da CTX ou CB sobre a maturação das DCs incubadas *in vitro* com OVA + LPS;
- ✓ Estudar o efeito das toxinas sobre a capacidade das DCs de induzir a resposta proliferativa de linfócitos T e diferenciação dos linfócitos T OVA-específicos;
- ✓ Avaliar o efeito da CTX e CB sobre o perfil de linfócitos T gerados *in vivo* em animais imunizados com OVA;
- ✓ Avaliar o efeito da CTX e CB sobre a indução da imunidade adaptativa em resposta à imunização com OVA.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Para os protocolos experimentais foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c com 7-8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Além disso, foram utilizados camundongos machos BALB/c DO11.10 com idade entre 6 e 10 semanas, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os experimentos foram realizados após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) nº1311/14 e Comissão de ética do ICB- USP (CEUA, nº89) do Departamento de Imunologia-ICB-USP. Todos os animais foram mantidos em condições padronizadas do biotério em relação à temperatura e umidade e com livre acesso a água e ração, até o momento da realização dos experimentos.

#### **3.2. Antígenos e adjuvantes**

Ovalbumina grau V- OVA (Sigma- Aldrich Inc., ST. Louis, USA) foi utilizada nos protocolos de imunização dos camundongos e estimulação das DCs *in vitro*. No modelo *in vivo*, solução de OVA foi emulsificada em adjuvante Montanide ISA 50V2 (fornecedor SEPPIC) na proporção de 1:1 (vol/vol) e injetada via subcutânea na base da cauda.

OVA grau II (Sigma- Aldrich Inc., ST. Louis, USA) também foi utilizada para o teste de hipersensibilidade tardia (DTH).

LPS (lipopolissacarideo de *E. coli*- Sigma) foi utilizado nos ensaios de estimulação das DCs *in vitro*.

Boc-2 (butoxycarbonil-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe) (NUNES et al., 2010) e BWA4C (Santa Cruz Biotechnology) foram utilizados nos ensaios *in vitro* de maturação das DCs.

### 3.3. Purificação da CTX a partir do veneno de *C.d. terrificus*

O *pool* de veneno liofilizado foi obtido de espécimes adultos de serpentes *Crotalus durissus terrificus* fornecido pelo laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. O veneno foi estocado a -20° C até a sua utilização.

A CTX do veneno total da cascavel foi purificada utilizando o procedimento adotado na literatura (Faure e Bon, 1987; 1988; Faure *et al.*, 1994) com algumas modificações. Uma alíquota contendo o veneno liofilizado (15 mg) de cascavel foi ressuspensa em 1,0 mL de solução Tris- HCL (50mM, pH 7,0) e posteriormente, submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna MONO-Q HR 5/5 em sistema FPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência, Pharmacia) previamente equilibrada no mesma solução.

As proteínas ligadas à resina foram eluídas por gradiente linear de solução de NaCl 0-1 M em solução de 50 mM Tris- HCL; pH7,0 . Após esse procedimento, as frações contendo a CTX foram reunidas e dialisadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e analisadas quanto a sua pureza e homogeneidade em gel de poliacrilamida.

#### 3.3.1. Purificação das subunidades CA e CB a partir da CTX isolada do veneno de *C.d. terrificus*

As subunidades da CTX foram obtidas de acordo com o protocolo descrito por Faure; Bom e Faure e colaboradores (Faure e Bon, 1988; Faure *et al.*, 1991) com algumas modificações. Para tanto, amostra de CTX foi dialisada em solução Tris- HCL pH 7,2 e em seguida, foi acrescentado 0,72 g de uréia para cada 2,0 mL de toxina. As amostras foram incubadas por 18 horas/4°C. Para obtenção da subunidades CA e CB, foi realizado cromatografia catiônica utilizando uma coluna MONO-S HR 5/5 em sistema FPLC. O material foi eluído da coluna utilizando um gradiente linear de 2,0 M de NaCl e 6,0 M de uréia, tamponado com o Tris/ HCL 50 mM, pH7,2. As frações contendo CB foram reunidas e dialisadas contra PBS para remoção de sais e uréia. Em seguida, foram armazenadas para posterior utilização.

### 3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras de CTX e CB foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % com agente desnaturante SDS (dodecil-sulfato de sódio), conforme citado por Laemmli (Laemmli, 1970). O procedimento foi realizado em condições redutoras na presença de 2-mercaptoetanol. Para identificar a presença da CTX e da subunidade CB foi feito o gel de empilhamento preparado na concentração de 4% de bisacrilamida/acrilamida em Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e 1 % SDS e um gel de separação contendo 12,5% de bisacrilamida/acrilamida em Tris-HCl 2,0M pH 8,8 e 1% SDS.

As amostras foram diluídas em tampão (Tris-HCl 0,625 mM pH 6,8; 10% glicerol (v/v); 5%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v); 2 % de SDS e 0,001 % de azul de bromofenol na proporção de 1:5 e, em seguida, foram aquecidas a 95°C/ 5 min.

As frações de CTX (picos 1, 2 e 3), sua subunidade CB, amostra de veneno total de *C.d.terrificus* e o padrão de massa molecular (20  $\mu$ L) (Trail Mix<sup>tm</sup>- Novagen) foram aplicados no gel de poliacrilamida 12,5%. O tampão de corrida utilizado foi constituído por Tris-HCl 0,25 mM, glicina 0,19 M e SDS a 0,1 %, pH 8,3. Em seguida, o gel foi submetido a uma corrente elétrica de 110 V e 55 mA por 2 horas em cuba *SE 245 Mighty Small II* (Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech) acoplada a fonte EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech).

Em relação a subunidade CA, a proteína assim como o padrão de massa molecular *Fast ruler* (Thermo Scientific) foram aplicados no gel de 16% de poliacrilamida contendo tricina. A corrida eletroforética foi realizada com dois tampões, sendo um tampão para o catodo (0,1M Tris, 0,1M Tricina e 0,1% SDS) e o outro para o anodo (0,2M Tris-Cl, pH8,9) em uma voltagem constante de 30 V a 40mA por aproximadamente 1h. Após esse período, a corrida foi mantida por mais 5 horas em corrente de 90 V.

No término das corridas, os géis foram imersos em solução de 0,2 % (m/v) de *Coomassie Blue* R-250 em água (H<sub>2</sub>O) e metanol na proporção de 1:1 (v/v) para a visualização do padrão de bandejamento das proteínas presentes nas amostras. Em seguida, o excesso de corante foi retirado mergulhando o gel em solução de 30% de metanol, 10% de ácido acético em água (H<sub>2</sub>O) destilada.

### **3.5. Eliminação de endotoxinas na CTX e suas subunidades CA e CB**

A CTX e suas subunidades CA e CB foram submetidas à coluna de polimixina para a remoção de possíveis endotoxinas bacterianas (LPS), conforme o protocolo estabelecido pelo fabricante (Thermo Scientific Rockford, USA). Posteriormente, essas amostras foram analisadas quanto ao conteúdo de endotoxina em ensaio imunoenzimático de *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) (Cambrex/ Lonza) realizado no Laboratório de Microbiologia do controle de qualidade da Divisão de Produção do Instituto Butantan.

O laudo técnico notificou que as amostras apresentaram níveis inferiores ao limite de detecção do ensaio de 0, 125 VE/mL, o que permitiu a sua utilização nos diferentes protocolos experimentais.

### **3.6. Determinação da concentração de proteína nas amostras**

A concentração proteica das amostras de veneno bruto, CTX e suas subunidades CA e CB foram determinadas utilizando-se o método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras foram diluídas em PBS e assim distribuídas em placas de 96 poços (Costar) em volume de 50 µL. A solução de soro albumina bovina (BSA) foi utilizada como curva padrão na concentração de 500 µg/mL diluída na razão 1:2 (50 µL/poço). Após esses procedimentos foram acrescentados 150 µL/poço do reagente de Bradford previamente diluído em H<sub>2</sub>O destilada (1:5).

A leitura da densidade óptica (DO) das amostras foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm e o cálculo da concentração de proteínas foi realizado com o auxílio do programa INSTAT. A concentração proteica das amostras foi calculada em relação à curva-padrão de BSA.

### **3.7. Atividade fosfolipásica com substrato 4-nitro-3-octanoiloxi- benzoico (4N3OBA)**

Após a remoção de LPS nas amostras de CTX, CA e CB por coluna de polimixina foi realizada a análise da atividade fosfolipásica das toxinas, de acordo com os protocolos adotados por (Holzer e Mackessy, 1996; Knittel *et al.*, 2016) e



adaptado para placas de 96 poços. Assim, em placas de 96 poços foram adicionados 200 µL de tampão de ensaio (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> e 100 mM de NaCl, pH 8,0) seguida de adição de 20 µL do substrato 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico (0,3 mM 4N3OBA diluído em DMSO – Biomol, EUA), 20 µL de H<sub>2</sub>O e 20 µL de amostras (0,25 µg de CTX ou CB). Em seguida, foi realizada incubação de 20 min a 37°C. Após esse período, os valores de hidrólise foram determinados segundo a DO mensurada a 414nm em espectrofotômetro (Multiskan EX, Labsystems, Finlândia). A atividade fosfolipásica foi expressa pela variação na absorbância em função do substrato liberado por minuto por µg de toxina (Abs/min/µg) em 3 experimentos independentes.

#### **4. MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO***

##### **4.1. Diferenciação de DCs *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos**

Para a diferenciação de DCs *in vitro* foram seguidos os protocolos de descritos por Son e colaboradores (Son *et al.*, 2002) e Chen e colaboradores (Chen *et al.*, 2013) com algumas modificações. Grupos de camundongos BALB/c foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e posteriormente, ambas as extremidades da medula óssea dos animais foram cortadas e condicionadas em placas de Petri contendo meio de cultura RPMI1640 (Invitrogen).

Em seguida, com o auxílio de uma seringa, uma agulha de calibre 25 foi introduzida em uma das extremidades do fêmur, a medula óssea foi lavada com meio RPMI1640. A suspensão celular obtida foi centrifugada (Eppendorf 5810 R) por 10 minutos a 327 x g à 4°C e ressuspensa em meio RPMI-1640 suplementado (RPMI-S) com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB), 0,5% de 2-Mercaptoetanol, 1% de L- glutamina (200mM), vitamina (100mM) e os antibióticos penicilina/estreptomicina (10mg/mL). A concentração e a viabilidade celular foram determinadas em câmara de Neubauer utilizando Azul de Tripán 0,1%.

As células obtidas foram distribuídas em placas contendo 6 orifícios na concentração de 10x10<sup>6</sup> céls/mL e incubadas com GM-CSF (10 ng/mL) e IL-4 (5ng/mL). No 4º dia de cultivo, o sobrenadante da cultura das células foi removido,

centrifugado por 10 minutos a 145 x g/4°C e adicionado um novo meio RPMI-S (contendo GM-CSF + IL-4).

As culturas de células foram mantidas por mais 3 dias em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>/37°C. Após esse período, as células não aderentes (onde se encontram as células enriquecidas de DCs) foram coletadas e novamente contadas em câmara de Neubauer para determinar sua concentração e posterior realização dos ensaios *in vitro*.

#### **4.2. Estimulação das DCs com CTX e CB na presença ou não de LPS ou OVA + LPS**

Com o intuito de avaliar a ação da CTX bem como sua subunidade CB sobre a funcionalidade das DCs, foram realizados vários protocolos experimentais, assim como descrito abaixo:

- ✓ Para determinar a concentração de OVA ou de OVA + LPS capazes de induzir a maturação das iDCs, 5x10<sup>6</sup> células foram incubadas *in vitro* com LPS (250 ng/mL) ou com diferentes concentrações de OVA (100, 200 ou 300 µg/mL) por 18 h/37° C em estufa de 5% CO<sub>2</sub> umidificada;
- ✓ iDCs também foram incubadas ou não com antagonista do receptor de peptídeo-formil (Boc-2-100 mM) por 15 min/37° C e após esse período, as células foram lavadas com meio RPMI-S e então estimuladas com:
  - OVA + LPS (200 µg/mL + 250 ng/mL);
  - OVA + LPS + CTX (200 µg/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL);
  - OVA + LPS + CB (200 µg/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL).
- ✓ Em outro experimento, iDCs também foram incubadas *in vitro* na presença ou não do inibidor seletivo da enzima 5-lipoxigenase (BWA4C- 10 µM) com os seguintes estímulos:
  - OVA + LPS (200 µg/mL + 250 ng/mL);

- OVA + LPS + CTX (200 µg/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL);
- OVA + LPS + CB (200 µg/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL).

- ✓ Para os ensaios de PCR em tempo real (RT-PCR), DCs também foram estimuladas com a OVA + LPS ou somente com o LPS na presença ou não da CTX ou CB.

Após o período de incubação das células com os diferentes estímulos, as culturas foram centrifugadas a 145 x g, os sobrenadantes coletados e as células utilizadas para análise da expressão das moléculas de MHC de classe II, CD40, CD80, CD86, ICOS-L e PDL-1/2 por citometria de fluxo. Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para determinação da secreção das diferentes citocinas por ELISA.

#### 4.3. Marcação e estratégia de análise para determinação da população das DCs diferenciadas *in vitro* por citometria de fluxo

As culturas de DCs incubadas com os diferentes estímulos foram centrifugadas, as células ressuspensas em 1 mL de meio RPMI e incubadas com anticorpo anti-receptor FcγRII/RIII por 15 min/4°C. Em seguida, as DCs foram novamente centrifugadas por 5min a 4°C/327 x g. As células foram ressuspensas em PBS e distribuídas em placas de 96 orifícios (0,5 x 10<sup>6</sup>/poço).

A expressão das moléculas envolvidas na apresentação antigênica nas DCs estimuladas na presença ou não de diferentes concentrações de OVA foi analisada utilizando a incubação com anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos ficoeritrina ou isotiocianato de fluoresceína (Tabela 1) de camundongo, por 30 min/4°C.

**Tabela 1 - Anticorpos utilizados para avaliação da expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs**

Anticorpos	Fluorocromos	Clone /Marca	Diluição
CD11c	FITC	HLE/ BD	1:60
CD40	PE	3-23/ BD	1:50
CD80	PE	16-10A1/ BD	1:70
CD86	PE	GL1/ BD	1:60
MHC-II I-A(d)	PE	AMS-32.1/ BD	1:50

Em outros experimentos onde DCs foram incubadas com OVA + LPS na presença ou não das toxinas e a expressão de moléculas coestimuladoras, MHC-II, ICOS-L E PDL-1/2 foi avaliada através da marcação com anticorpos monoclonais diluídos em PBS, por 30 min/4°C de acordo com o painel abaixo: (Tabela 2).

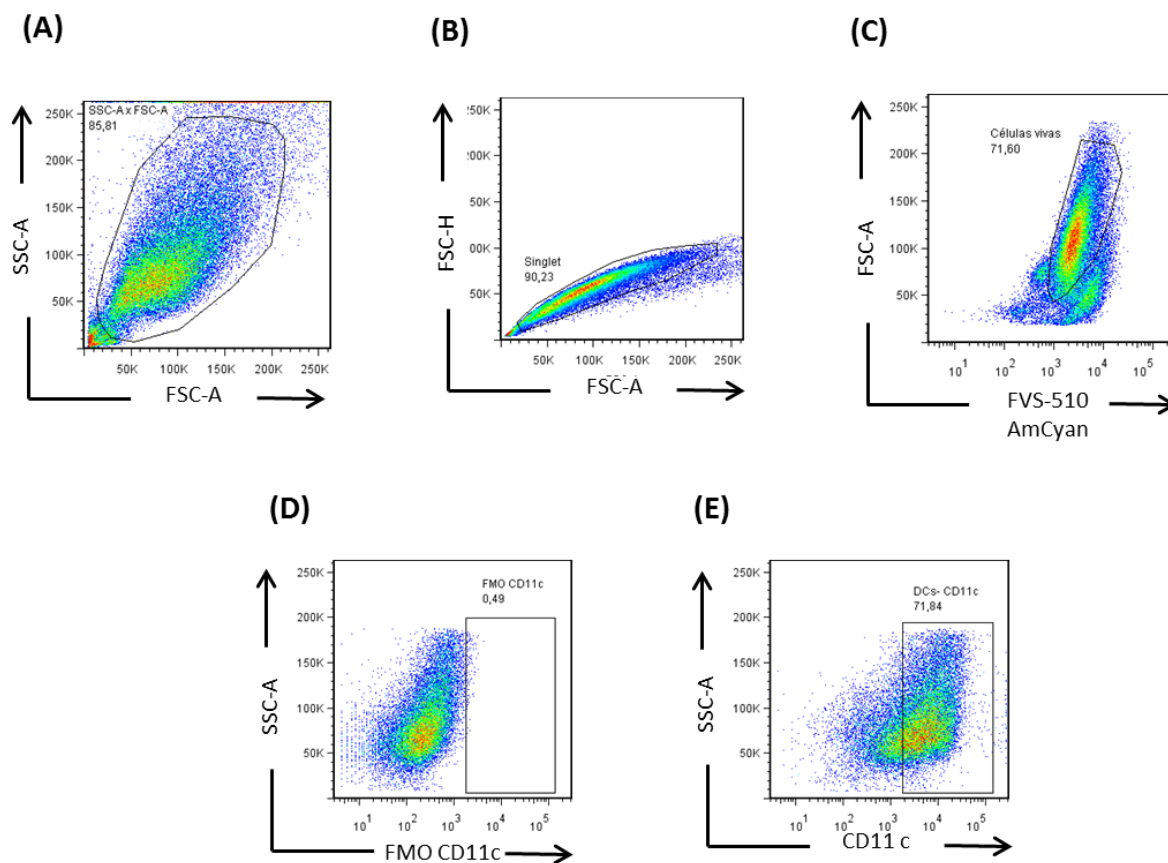
**Tabela 2 - Anticorpos utilizados para avaliação da expressão de moléculas coestimuladoras, MHC-II, ICOS-L, PDL1 e 2 em DCs**

Anticorpos	Fluorocromos	Clone /Marca	Diluição
<b>CD11c</b>	PeCy7	HL3/ BD	1:300
<b>CD40</b>	BV421	3-23/ BD	1:80
<b>CD80</b>	APC	16-10A1/ BD	1:80
<b>CD86</b>	PE	GL1/ BD	1:180
<b>MHC-II I-A(d)</b>	PerCP/Cy5.5	MS-114.15-2/ BD	1:300
<b>ICOS-L</b>	PE	HK5.3/ BD	1:50
<b>PDL-1</b>	PE	MIH5/ BD	1:90
<b>PDL-2</b>	PE	122/ BD	1:70

Após esse período, foram adicionados 100 µL do PBS/poço para posterior centrifugação por 5min/4°C/ 327 x g. O sobrenadante foi removido e posteriormente foi adicionado o Reagente de Viabilidade 510 (Fixable Viability Stain 510- FVS-510) AmCyan (1:1000) diluído em PBS. A placa foi incubada por 15 min em temperatura ambiente (TA), adicionado PBS + 1% de SFB seguida de centrifugação por 5min/4°C/ 327 x g. As células foram ressuspensas e fixadas com PBS contendo 1% de formaldeído.

Como estratégia de análise de todos os experimentos com as DCs *in vitro*, o primeiro passo foi selecionar uma janela ampla de análise chamada *gate* no qual contemplou a população total. Os parâmetros utilizados para essa seleção foram granulosidade ou complexidade interna- *Side Scatter area* (SSC- A no eixo y) versus (vs) tamanho relativo, *Forward Scatter area* (FSC-A no eixo x) (Figura 3A). Para eliminar debris e células aglomeradas, foi realizado plotagem do FSC-H em relação à área da FSC-A (Figura 3B). O reagente FVS-510 foi utilizado para discriminar células viáveis de não viáveis. As células vivas correspondem à população esquerda nos dot-plots (Figura 3C). Vale ressaltar, que todos os dados gerados e analisados nesse estudo foram calculados a partir da população de células viáveis. Em seguida, utilizou-se a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO), para determinar a células que expressam poucas concentrações de marcadores de superfície

(Roederer, 2001) (Figura 3D). A partir das células vivas, foram selecionadas as DCs utilizando como parâmetro a expressão de CD11c (Figura 3E).



**Figura 3-**

**Estratégia de análise utilizada para análise das DCs.**

DCs foram diferenciadas *in vitro* por 7 dias com 10ng/mL de GM-CSF e 5 ng/mL de IL-4. Posteriormente, as DCs imaturas ( $5 \times 10^6$ ) foram incubadas *in vitro* na presença ou não de diferentes antígenos como descrito em Material e Métodos. (A) Determinação de células totais, FSC-A vs SSC-A. (B). Exclusão de debris e aglomerados celulares. (C) Gate para determinar a viabilidade celular. FMO para CD11c para determinar a população de DCs (E) Identificação da população de DCs através da expressão de CD11c.

Os resultados foram expressos em histogramas considerando a média da intensidade de fluorescência (MIF). As amostras foram feitas em quadruplicatas (10.000 ou 30.000 eventos foram adquiridos por amostra em FACS Canto,-BD). Os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo 7.5. Como calibrador do citômetro, foram utilizadas as próprias células mantidas em meio de cultura e marcadas ou não com anticorpos de superfície conjugados (PE ou FITC) ou CompBeads (*anti-rat and anti-hamster Ig κ /negative control compensation particles set- BD<sup>tm</sup>*).

#### 4.4. Expressão gênica de IL-10, TGF- $\beta$ , FPRs 1 e 2 em DCs por PCR- RT

As PCRs- RT foram realizadas em termociclador da marca BioEr Line Gene K. Para tanto, pares de *primers* específicos para os genes da IL-10, TGF- $\beta$ , FPRs 1 e 2 foram desenhados e sintetizados especificamente para a reação de PCR- RT.

##### 4.4.1. Extração de RNA total

Culturas de DCs ( $5 \times 10^6$ ) foram estimuladas com as diferentes toxinas na presença ou não de LPS (descrito no item 4.2) e após 18 h/37°C foram submetidas a centrifugação por 5 min/327 x g/4°C. Em seguida, as células foram ressuspensas em 500  $\mu$ L do reagente Trizol (Invitrogen), transferidas para um eppendorf livre de RNase e armazenadas a -80°C até seu uso.

Para a realização da extração de RNA total, foram adicionados 100  $\mu$ L de clorofórmio para cada 500  $\mu$ L de reagente Trizol contendo as células, seguida de agitação por 15 segundos e mantidas por 10 min/TA. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 min/209 x g e o sobrenadante resultante (fase aquosa) foram transferidos para um novo eppendorf, no qual foram acrescentados 250  $\mu$ L de isopropanol. As amostras foram agitadas por 15 segundos, mantidas por 10 min/TA, centrifugadas novamente por 10 min/209 x g e em seguida o sobrenadante foi descartado.

O precipitado (RNA) foi lavado com 500  $\mu$ L de etanol 75%, centrifugado novamente por 5 min/209 x g e o sobrenadante foi removido. Os tubo contendo os precipitados (amostras) foram mantidos abertos em fluxo laminar por aproximadamente 15 minutos para secagem e, posteriormente, os RNAs foram ressuspensos em 30  $\mu$ L de água livre de RNase (Promega). A concentração de RNA foi quantificada no NanoDrop seguindo o procedimento descrito por Sambrook e colaboradores, onde a absorbância em 260nm = 1, significa uma solução contendo 40  $\mu$ g de RNA (Sambrook e Gething, 1989). A pureza do RNA foi determinada através da razão entre as absorbâncias obtidas em 260 e 280 nm (razão entre 260/280 maior que 1,7).

#### 4.4.2. Reação de Transcrição Reversa (RT)

O RNA mensageiro foi convertido em DNA complementar (cDNA) utilizando o kit *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. Para cada reação foi feita uma mistura dos seguintes reagentes: 2 µg de RNA, 1 µL de oligo (dT)<sub>20</sub> 50 µM, 1 µL de dNTP Mix (10mM) e completado o volume final para 13 µL com água livre de RNase.

Esta mistura foi aquecida por 5 min/65°C e após esse tempo resfriada em banho de gelo por mais 5 min. Posteriormente, ao conteúdo do tubo foram acrescentados os seguintes componentes: 4 µL de tampão da reação [5X], 1µL de *RiboLock RNase inhibitor* [20U/µL], 2µL de dNTP mix [10mM], 2µL de Transcriptase [20u/µL] para o volume total de 20 µL por amostra. A mistura foi incubada por 50°C durante 60 minutos e depois a 70°C por 15 minutos para inativar a reação. Após a reação de transcrição reversa, o cDNA obtido foi estocado em freezer -80°C.

#### 4.4.3. PCR em tempo real em sistema Syber Green

Para o PCR em tempo real pelo sistema Syber Green, o RNA foi amplificado usando um kit “qPCR – Sybr Green Rox Plus – Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Dessa maneira foi avaliada a expressão de RNAm para IL-10, TGF-β, FPRs 1 e 2 comparando a amplificação com o gene constitutivo β-actina, pois já mostrou-se um eficiente “*housekeeping*” gene.

Para tanto, as reações foram realizadas em volume total de 12 µL contendo: 6,5 µL de solução Syber Green Super Mix combinado com 1 µL do *primer sense* (5pM), 1 µL *primer anti-sense* (5pM) para a IL-10 e TGFβ ou 1 µL do *primer sense* e *anti-sense* (10pM) para os FPRs1 e 2 (Tae *et al.*, 2012) (Tabela 3), 0,25 µL de ROX Reference Dye; 2,25 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase e 1 µL de cDNA (500ng).

**Tabela 3 – Sequência dos primers utilizados nas PCRs**

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5' -3')</b>
IL-10 <i>sense</i>	GGT TGC CAA GCC TTA TCG
IL-10 <i>anti-sense</i>	ACC TGC TCC AGT GCC TTG
TGFβ <i>sense</i>	TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACGG
TGFβ <i>anti-sense</i>	GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC
FPR1 <i>sense</i>	CAT GAA CAA GTC TGC AGT GAA CCT
FPR1 <i>anti-sense</i>	AGG TTT ATG TCT ATT ACA GTA TAT
FPR2 <i>sense</i>	TCT ACC ATC TCC AGA GTT CTG TGG
FPR2 <i>anti-sense</i>	TTA CAT CTA CCA CAA TGT GAA CTA
β actina <i>sense</i>	CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT
β actina <i>anti-sense</i>	AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC

As condições de corrida foram: 50°C por 15 minutos (temperatura de ativação da enzima TaqStart- DNA Polimerase), 95° C por 15 segundos (temperatura de desnaturação), 58° C por 30 segundos (temperatura de anelamento), 72° C por 30 segundos (temperatura de extensão), seguida por um ciclo para detecção da Curva de *Melting* de cada produto amplificado, de 65° C a 95° C diminuindo 0,5° C a cada 20 segundos.

A técnica de PCR- RT possibilita a quantificação do produto durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle Threshold* (Ct). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência. Para quantificar os resultados obtidos por PCR em tempo real, 2 métodos diferentes têm sido descritos na literatura: o método da curva padrão e o método de comparação do Ct pela equação:  $2^{-DDCt}$ , onde  $-DDCt = DCt$  (amostra) -  $DCt$  (calibrador ou controle), e  $DCt$  é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene constitutivo (Livak e Schmittgen, 2001) nas mesmas condições experimentais.

A quantificação relativa da expressão do gene foi realizada através da comparação da amplificação com um controle endógeno (β-actina). A partir dos resultados de amplificação deste gene, foi realizada a normalização para minimizar os erros nas variações da quantidade de RNA e eficiência da transcrição reversa



(Giulietti *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos em “Expressão Relativa de mRNA”, que significa o número de vezes a mais que um determinado gene foi expresso em relação às respectivas amostras controles.

#### **4.5. Ensaio de proliferação de LTs co-cultivados com DCs**

##### *4.5.1. Co-cultura de DCs diferenciadas in vitro com células CD3<sup>+</sup> purificadas de órgãos linfoides de camundongos imunizados com OVA*

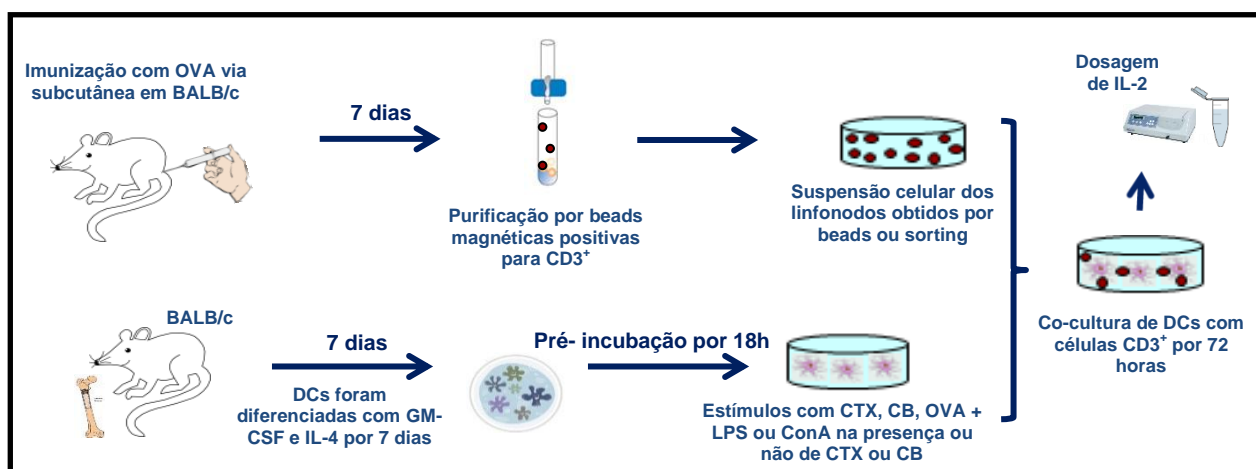
Para a obtenção de células CD3<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>, grupos de 4 camundongos BALB/c foram imunizados com OVA emulsificada em Montanide ISA 50V2 (200 µg/animal). Para obtenção de células TCD3<sup>+</sup>, camundongos da linhagem BALB/c foram eutanasiados com câmara de CO<sub>2</sub>, e os linfonodos periaórticos e inguinais retirados e acondicionados em placa de Petri contendo meio RPMI. Com o auxílio de homogeneizador estéril, os linfonodos foram macerados em meio RPMI e transferidos para um tubo *Falcon* de 50 mL. Em seguida, o número e a viabilidade das células foram determinados em câmara de Neubauer utilizando azul de tripan 0,1%. Posteriormente, as células foram submetidas à centrifugação por 5min/10°C/327 x g, o sobrenadante foi descartado e as células (16,2 x 10<sup>6</sup>) foram ressuspensas em PBS contendo 0,5% BSA e 2mM de ácido etilodiaminotetracético (EDTA).

As células TCD3<sup>+</sup> presentes na suspensão foram purificadas utilizando o sistema MidiMACS segundo o protocolo de Sudowe e colaboradores (Sudowe *et al.*, 2000). No tubo contendo as células, foi acrescentado o anticorpo anti-CD3<sup>+</sup> na concentração de 2 µg/10<sup>6</sup> células e realizada incubação por 30 min/4<sup>o</sup> C. Em seguida, foram acrescentados 5 mL de PBS contendo BSA e EDTA e realizada nova centrifugação por 5 min/10°C/ 145 x g. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em PBS contendo BSA e EDTA e adicionado o conjugado estreptoavidina-microesferas magnéticas (20µL/10<sup>7</sup> células) seguida de incubação por 30 min/4<sup>o</sup> C. Ao final, foram adicionados 2 mL de PBS + EDTA + BSA e a suspensão centrifugada assim como descrito anteriormente.

Após remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 800 µL de tampão e aplicadas na coluna MidiMACS (Miltenyi Biotec) acoplada em campo

magnético previamente equilibrada com 8 mL de PBS contendo 0,5% BSA e 2mM EDTA. Após a aplicação da suspensão celular foram realizadas 5 lavagens com 5 mL do tampão permitindo com que as células não ligadas à coluna fossem eluídas da coluna. Posteriormente, a coluna foi removida do suporte magnético e os linfócitos T CD3<sup>+</sup> foram eluídos com 5 mL de tampão e coletados em um tubo de 15 mL.

DCs foram diferenciadas *in vitro* (item 4.1) e incubadas durante 18 horas com CTX, CB, OVA + LPS na presença ou não das toxinas. Após esse período, as DCs ( $0,6 \times 10^5$ ) foram co-cultivadas com os LTCD3<sup>+</sup> ( $3 \times 10^5$ ) obtidos de animais imunizados com a OVA. Além disso, co-culturas de DCs com LTCD3<sup>+</sup> também foram incubados com a ConA (1,25 ug/mL), ConA + CTX ou ConA + CB (1,25 µg/mL + 250 ng/mL). Como controles do ensaio, as células em meio RPMI-S também foram distribuídas em placas da seguinte maneira: DCs + LTCD3<sup>+</sup>, somente DCs ou LTCD3<sup>+</sup>. Os sobrenadantes das co-culturas também foram coletados para dosagem de IL-2 (Figura 4).



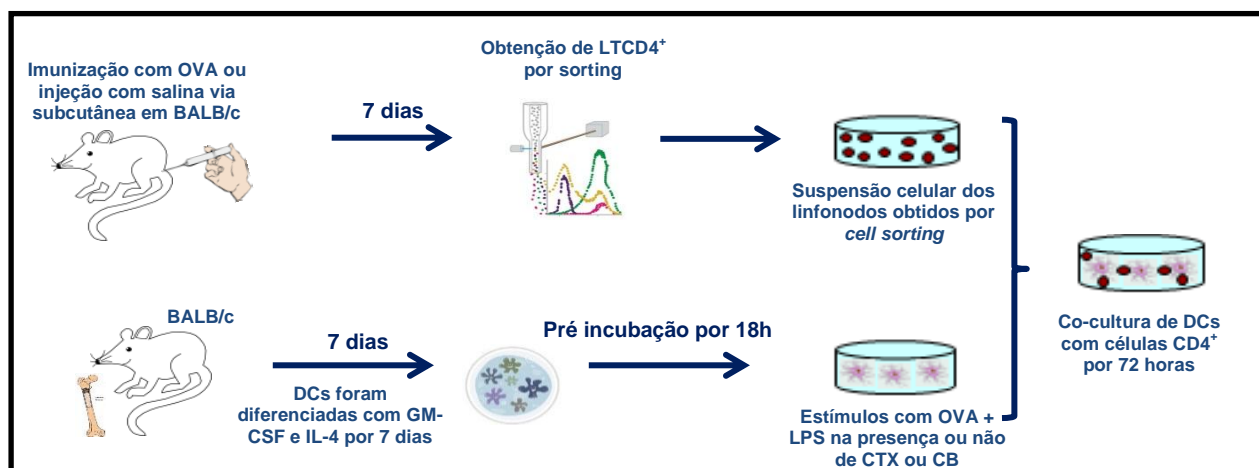
**Figura 4- Ensaio de co-cultura de DCs com LTCD3<sup>+</sup> para análise da resposta proliferativa OVA- específica.**

DC ( $0,6 \times 10^5$ ) diferenciadas *in vitro* da medula óssea de camundongos BALB/c foram incubadas durante 18 horas com CTX, CB (0,25 µg/mL); OVA + LPS (200 ug/mL + 250 ng/mL); OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200 ug/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL). DCs previamente estimuladas com os diferentes antígenos foram co-cultivadas com linfócitos CD3<sup>+</sup> ( $3 \times 10^5$ ) purificadas por sistema de seleção positiva a partir de camundongos BALB/c imunizados com a OVA. Essas co-culturas também foram incubadas com a ConA (1, 25 ug/mL), ConA + CTX ou ConA + CB (1,25 µg/mL + 250 ng/mL). Após um período de 72 horas, analisou-se a resposta proliferativa de LTs utilizando -se o Kit "Cell proliferation ELISA Biotrak System version 2".

#### 4.5.2. Ensaio de proliferação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> a partir de órgãos linfoides de camundongos BALB/c naives ou imunizados com OVA co-cultivados com DCs

Para obtenção de LTCD4<sup>+</sup> naives (controle), foi injetada salina estéril na base da cauda de camundongos BALB/c. Animais BALB/c também foram imunizados com a OVA emulsificada em Montanide ISA 50V2 via subcutânea. Após 7 dias de imunização, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e as suspensões celulares obtidas dos linfonodos inguinais e periaórticos foram preparadas de acordo como descrito acima (item 4.5.1). Após a determinação da concentração celular em câmara de Neubauer por azul de tripan (0,1%), foram adicionados 100 µL de PBS + 2% SFB diluído contendo o anticorpo anti-CD4 PEcy5 (1:200)/ 10<sup>6</sup> de linfócitos totais, seguida de incubação por 15 min em TA. Posteriormente, foram acrescentados 5 mL de SFB 10%, filtradas e as suspensões foram centrifugadas por 5min a 327 x g e ressuspendidas em RPMI-S contendo 3% SFB para posterior purificação por *cell sorting*.

Como controles do ensaio, as células mantidas em meio de cultura foram distribuídas em placas da seguinte maneira: DCs + LTCD4<sup>+</sup>, somente DC ou LTCD4<sup>+</sup>. Para o ensaio de proliferação, iDCs foram diferenciadas e mantidas em meio de cultura ou previamente estimuladas com OVA + LPS na presença ou não de CTX ou CB por 18 horas, lavadas e co-cultivadas com LTCD4<sup>+</sup> após sua purificação. Após um período de 72 horas, analisou-se a resposta proliferativa de LTs utilizando o Kit “Cell proliferation ELISA”, como descrito abaixo (Figura 5).



**Figura 5- Ensaio de co-cultura de DCs com LTCD4<sup>+</sup> obtidos de animais naives ou imunizados com a OVA para análise da resposta proliferativa.**

DCs ( $0,5 \times 10^5$ ) diferenciadas *in vitro* da medula óssea de camundongos BALB/c foram incubadas durante 18 horas com OVA + LPS (200 ug/mL + 250 ng/mL); OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200 ug/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL). DCs previamente estimuladas com os diferentes antígenos foram co-cultivadas com linfócitos CD4<sup>+</sup> ( $2,5 \times 10^5$ ) purificadas por sistema de *cell sorting* a partir de camundongos naives ou imunizados com a OVA. A resposta proliferativa de LTs foi avaliada após 72 horas utilizando -se o Kit “Cell proliferation ELISA Biotrak System version 2”.

#### 4.5.3. Ensaio de proliferação das células T

O índice de proliferação dos LTs foi determinado pelo ensaio de incorporação por bromodeoxiuridina (BrdU) após 72 horas de cultura utilizando-se o Kit *Cell proliferation* ELISA Biotrak System version 2 (Armstrong GE Healthcare). Em resumo, nas co-culturas de DCs com linfócitos CD3<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> foram adicionados 10 µL de BrdU/poço diluído na razão 1:10 em meio RPMI- S. Após 72 horas, as co-culturas foram centrifugadas por 10 min/10°C/ 145 x g. O meio foi removido e posteriormente foram acrescentados 200 µL de solução fixadora seguida de incubação por 30 min/TA. Após o período, o meio foi removido e acrescentada a solução B-bloqueio (200 µL/poço) diluída 1/10 em solução Tris (50mM) contendo 150 mM de NaCl com incubação de 30 min/TA. Novamente o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com 100 µL/poço de anticorpo anti-BrdU- peroxidase (1:100) diluído em solução D (*antibody dilution solution*) por 90 min/TA. O conjugado foi removido e as células foram lavadas com *Wash buffer* e incubadas por 15 min/TA por 3 vezes. A revelação foi realizada com a adição de 100 µL/poço do substrato TMB (tetrametilbenzidina) proveniente do kit e a reação foi interrompida com 25 µL/poço de ácido sulfúrico 0,2M. As placas foram lidas em leitor de ELISA utilizando o filtro de 450 nm. Os resultados foram expressos como a média de DO obtida das amostras em triplicatas  $\pm$  desvio padrão. Quanto aos testes estatísticos, os resultados obtidos foram realizados por análise de variância seguida de comparações múltiplas entre os grupos pelo método de Tukey.

#### 4.6. Marcação extracelular/intracelular e estratégia de análise para a determinação das populações de LTs por citometria de fluxo

Para a obtenção de células T, grupos de camundongos foram imunizados com OVA emulsificada em Montanide ISA 50 V2 (200 µg/animal) e os linfonodos periaórticos e inguinais retirados, macerados em meio RPMI-S e transferidos para uma placa de 96 poços.

Para a determinação da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, essas células (1x10<sup>6</sup>) foram incubadas com anti-CD4 ou CD8 diluídos em PBS. Em outros experimentos, as suspensões celulares também foram incubadas com anti-CD4/CD25 para determinar a população de células Treg (Tabela 4). Esse linfócitos foram incubados a 4°C por 30 min e posteriormente foram adicionados 100 µL/ poço de PBS, centrifugadas por 5 min/4°C/ 453 x g, seguida da incubação com 25 µL / poço do reagente de viabilidade FVS-510 diluídos em PBS (1:1000).

A marcação intracelular foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Kit BD Transcription Factor Buffer Set). Em resumo, após a marcação de diversas moléculas expressas na superfície celular, as células foram permeabilizadas com a adição de 65 µL/ poço do reagente TF Fix Perm diluído em TF Diluent Buffer seguida de incubação por 50 min/ 4°C. Posteriormente, foram adicionados 125 µL/ poço do tampão Perm Wash do Kit (2x) e as células centrifugadas por 6 min a 4°C/ 350 x g. Os sobrenadantes foram descartados, as células incubadas com anticorpos anti-Tbet, anti-Gata 3, anti-RORγt ou anti-FoxP3 diluídos em tampão Perm Wash e realizada incubação a 4<sup>o</sup> por 50 min (Tabela 4). Após esse período, as células foram lavadas 2X com µL/ poço do Perm Wash, centrifugadas e ressuspendidas com PBS + 1% de formaldeído.

**Tabela 4 - Anticorpos utilizados para marcação das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e fenotipagem das células CD4<sup>+</sup>**

<b>Anticorpos</b>	<b>Fluorocromos</b>	<b>Clone /Marca</b>	<b>Diluição</b>
<b>CD8</b>	FITC	53-6.7/ BD	1:70
<b>CD4</b>	PerCP/Cy5.5	GK1.5/ BD	1:200
<b>CD25</b>	FITC	7D4/ BD	1:70
<b>Tbet</b>	PE	4B10/ BD	1:50
<b>Gata 3</b>	PE	LSO-823/ BD	1:50
<b>RORγt</b>	PE	AFKJS-9/ BD	1:50
<b>FoxP3</b>	PE	FJK-16s	1:60

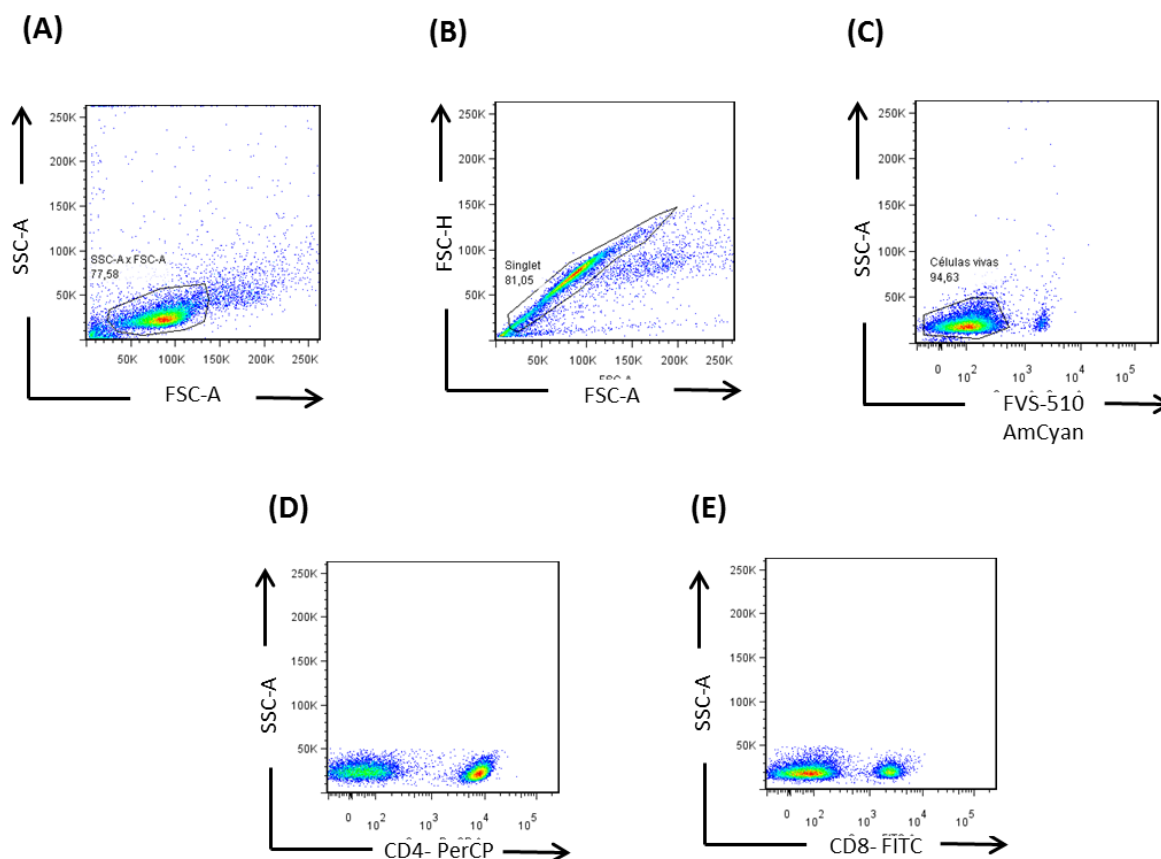
Além disso, após a marcação com anti-CD4 ou anti-CD4/CD25, seguida da incubação com o FVS-510, os linfócitos também foram analisadas quanto a expressão de citocinas. Para tanto, co- culturas de linfócitos CD4<sup>+</sup> com DCs foram plaqueadas por 4 horas em câmara de CO<sub>2</sub> umidificada com 500 ng/mL de ionomicina (Invitrogen) e brefeldina (BD) diluído na razão 1:1000 em RPMI-S para linfócitos contendo 1% de piruvato de sódio (Gibco) e aminoácido não essencial (MEM Non- essential Amino Acid Solution- Sigma). Posteriormente, foram adicionados 100 µL/ poço de RPMI-S, centrifugadas por 5 min/4°C/ 453 x g, seguida de marcação extracelular com anti-CD4 ou CD4/CD25, assim como descrito anteriormente. Após a incubação com o FVS-510 para determinar a população viável, as células foram permeabilizadas com Cytoperm (100µl/poço) por 30 min em TA de acordo com as especificações do fabricante (BD). Em seguida, foram adicionados 100 µL/ poço do Perm Wash diluído em PBS e as amostras centrifugadas por 5 min a 4°C/ 450 x g. Os sobrenadantes foram descartados e as amostras de células marcadas com anti-IFN $\gamma$ , anti-IL-4 ou anti-IL-10 para posterior análise por FACs (Tabela 5).

**Tabela 5 - Anticorpos utilizados para citocinas correspondentes as diferentes suppopulações de LTCD4<sup>+</sup>**

Anticorpos	Fluorocromos	Clone /Marca	Diluição
IFN $\gamma$	PE	4B10/ BD	1:50
IL-4	PE	LSO-823/ BD	1:50
IL-10	PE	AFKJS-9/ BD	1:50

A figura 6 ilustra um ensaio representativo da estratégia de escolha do *gate* para análise das populações de LTCD4<sup>+</sup> ou LTCD8<sup>+</sup>. Inicialmente considerou-se como parâmetros: tamanho das células (FSC) e a complexidade interna ou granulosidade (SSC), excluindo células potencialmente mortas e debris celulares (Figura 6A). Posteriormente, foi realizado um *gate* na condição de singlet com base nas características físicas das células em estado de debris ou aglomeração determinadas por dispersão, FSC-H em relação a FSC-A (Figura 6B). Células não viáveis foram determinadas a partir do reagente de morte celular FVS-510 (Figura 6 C) seguido do marcador específico para a população de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Figura 6D e 6E, respectivamente). Todas as amostras foram feitas em triplicatas ou quadruplicatas e os dados foram expressos como porcentagem de células positivas

para CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> (seus fatores de transcrição Tbet<sup>+</sup>, Gata3<sup>+</sup>, RORyt<sup>+</sup> ou FoxP3<sup>+</sup>), tendo como parâmetro as marcações com os FMOs (aquisição de 20.000 eventos).



**Figura 6- Estratégia de análise para caracterização fenotípica de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.** (A) Gate das células totais com base em suas características físicas considerando FSC vs SSC; (B) Exclusão dos *doublets*. (C) Representação da separação de células viáveis e não viáveis. (D) Porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Todas as análises de linfócitos T foram realizadas utilizando esta estratégia.

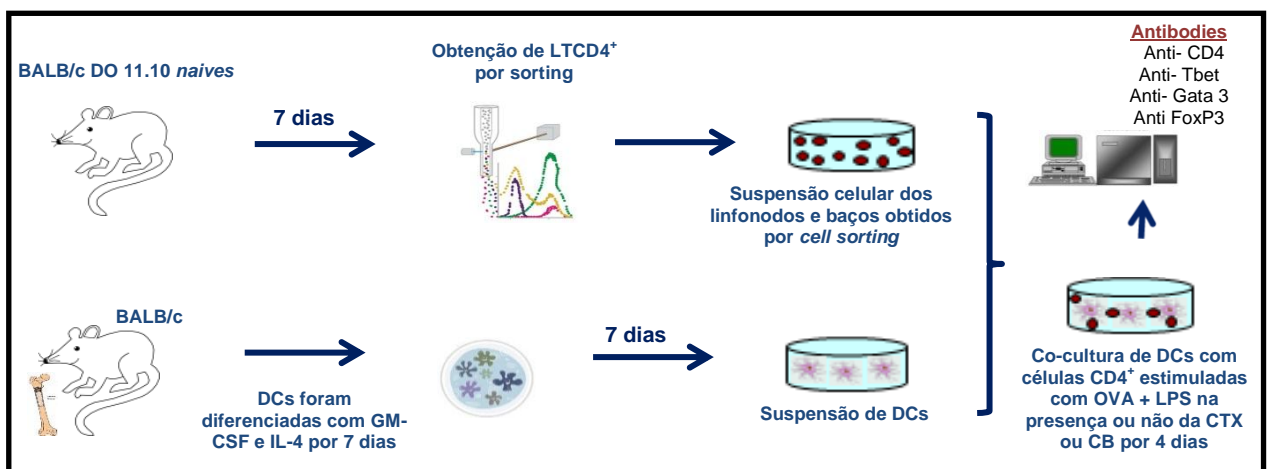
#### 4.7. Ensaios de co-culturas de LTCD3<sup>+</sup> ou LTCD4<sup>+</sup> com DCs diferenciadas *in vitro*

##### 4.7.1. Estudo do efeito da CTX e CB sobre o perfil de diferenciação de linfócitos T obtidos de camundongos transgênicos DO11.10 co-cultivados com DCs *in vitro*

Para investigar o perfil de diferenciação de LTCD4<sup>+</sup>, células obtidas dos linfonodos inguinais e periaorticos de 5 camundongos naives DO11.10 BALB/c foram preparadas como descrito no item 4.5.1. Além disso, suspensões celulares obtidas do baço também foram preparadas. Para tanto, o baço foi macerado em

meio de cultura não suplementado com o auxílio de homogeneizador estéril. As células foram transferidas para um tubo *Falcon* de 50 mL, submetidas à centrifugação por 5min/4°C/327 x g, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 1mL tampão de lise contendo 155mM de NH<sub>4</sub>Cl, 10mM de NaHCO<sub>3</sub> e 0,1mM de EDTA (Ph 7,2). Após 3 minutos em gelo, foi adicionado 10mL de PBS, centrifugada por 5min/4°C/327 x g. Em seguida essas células foram marcadas com anti-CD4 e purificadas por sistema *cell sorting* assim como descrito no item 4.5.2.

iDC ( $0,5 \times 10^5$ ) diferenciadas *in vitro* foram co-cultivadas com linfócitos CD4<sup>+</sup> ( $2,5 \times 10^5$ ) e estimuladas com OVA + LPS (200 ug/mL + 250 ng/mL); OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200 ug/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL) por 4 dias (Figura 7). Após o período de incubação, as células foram centrifugadas por 5min a 4°C/327 x g, sobrenadante removido para posterior marcação extracelular e intracelular como especificado (Item 4.6). A figura 7 representa a metodologia adotada para o devido experimento.



**Figura 7- Análise da expressão de Tbet<sup>+</sup>, Gata3<sup>+</sup> e FoxP3<sup>+</sup> em co-culturas de LTCD4<sup>+</sup> com DCs incubadas com CTX e CB na presença ou não de OVA+ LPS.**

iDCs foram diferenciadas de animais BALB/c por 7 dias com GM-CSF e IL-4. Suspensões celulares de linfonodos inguinais, periaorticos e baço de animais DO11.10 foram obtidas e marcadas com anti- CD4 PECy5, seguido de purificação por sistema de *cell sorting*. Posteriormente, iDCs ( $0,5 \times 10^5$ ) foram co-cultivadas com linfócitos CD4<sup>+</sup> ( $2,5 \times 10^5$ ) e estimuladas com OVA + LPS (200 ug/mL + 250 ng/mL); OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200 ug/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL) por 4 dias. Após esse período, foi avaliada a expressão de Tbet<sup>+</sup>, Gata3<sup>+</sup> e FoxP3<sup>+</sup> na população de células CD4<sup>+</sup> por citometria de fluxo.



#### 4.7.2. Análise do efeito da CTX e CB sobre o perfil de diferenciação de LTCD4<sup>+</sup> incubados com DCs diferenciadas *in vitro*

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram obtidos a partir dos linfonodos inguinais, periaorticos e baço de camundongos Balb/c não-imunizados e purificados por sistema de sorting (item 4.5.2). O grau de pureza da suspensão obtida foi determinado por citometria de fluxo utilizando anticorpo anti-CD4<sup>+</sup>.

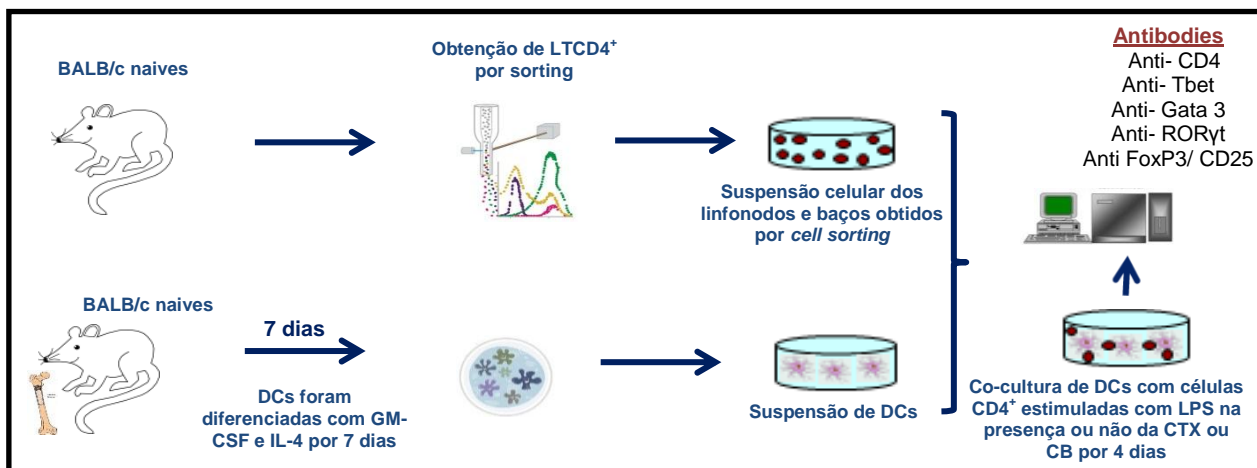
A co-cultura foi realizada com as células CD4<sup>+</sup> ( $2,5 \times 10^5$ ) incubadas com as DCs diferenciadas ( $0,5 \times 10^5$ ) e estimuladas com a CTX, CB (250 ng/mL), LPS (250 ng/mL), LPS + CTX, LPS + CB (250 ng/mL + 250 ng/mL) ou mantidas em meio de cultura. À essas co-culturas foram adicionados anticorpo anti-CD3, citocinas recombinantes e anticorpos anti-citocinas para a polarização dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, conforme apresentado na tabela 6 (Iwamoto *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010; Shiner *et al.*, 2014; Agaloti *et al.*, 2018). Além disso, como controle do experimento, as co-culturas foram incubadas somente com anti-CD3 em meio de cultura para linfócitos.

**Tabela 6 – Anticorpos e citocinas recombinantes para a diferenciação de subpopulações de LTCD4<sup>+</sup>**

<b>Perfil de TCD4<sup>+</sup></b>	<b>Citocinas recombinantes</b>	<b>Anticorpos</b>
<b>Th1</b>	10ng/mL de IFN $\gamma$ e IL-12	1 $\mu$ g/mL de anti-IL4 e 0,3 $\mu$ g/mL anti-CD3
<b>Th2</b>	10ng/mL de IL-2 e IL-4	2,5 $\mu$ g/mL de anti- IFN $\gamma$ e 0,3 $\mu$ g/mL anti-CD3
<b>Treg</b>	5ng/mL de TGF $\beta$	0,3 $\mu$ g/mL anti-CD3
<b>Th17</b>	10ng/mL de IL-1 $\beta$ , IL-23 e TNF $\alpha$ ; 1ng/mL TGF- $\beta$ e 40ng/mL de IL-6	1ng/mL de anti- IFN $\gamma$ ; 2 $\mu$ g/mL de anti- IL4 e 0,3 $\mu$ g/mL anti-CD3

No 4<sup>o</sup> dia de co-cultura, a polarização dos linfócitos para os diferentes perfis foi determinada pela marcação intracelular dos fatores de transcrição Tbet<sup>+</sup>, Gata 3<sup>+</sup>, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> e FoxP3/CD25<sup>+</sup> correspondente a cada um dos perfis de LTCD4<sup>+</sup> marcados

com fluoróforos e análise em citômetro de fluxo (item 4.6). A figura 8 ilustra o protocolo experimental utilizado.



**Figura 8- Perfil de diferenciação de LTCD4<sup>+</sup> incubados com DCs estimuladas com LPS na presença ou não da CTX ou CB.**

Células T CD4<sup>+</sup> obtidas por *cell sorting* de camundongos BALB/c virgens foram coletadas a partir dos linfonodos inguinais, periaorticos e baço. Em seguida LTCD4<sup>+</sup> foram cultivados com as DCs simultaneamente com a CTX, CB (250 ng/mL), LPS (250 ng/mL), LPS + CTX, LPS + CB (250 ng/mL + 250 ng/mL) ou mantidas em meio de cultura. Além disso, para obtenção de células diferenciadas nas populações Th1, Th2, Th17 e Treg, células T CD4<sup>+</sup> foram ativadas com anti-CD3 concomitantemente com citocinas recombinantes e anticorpos neutralizantes que promovessem condições polarizantes para cada um dos perfis. Todas as amostras foram feitas em triplicatas e os dados foram expressos como porcentagem de subpopulações de linfócitos T correspondentes a Th1, Th2, th17 e Treg.

#### **4.8. Determinação de citocinas pró-inflamatórias, IL-10, IL-2 e IFN $\gamma$ nos sobrenadantes das diferentes culturas celulares**

A produção de IL-12, IL-6, TNF $\alpha$  e IL-10 foi determinada nos sobrenadantes das culturas de DCs ( $5 \times 10^6$  células/mL) estimuladas por 18 horas com OVA + LPS na presença ou não da CTX ou CB em uma atmosfera umidificada com 5 % de CO<sub>2</sub>.

A produção de IFN $\gamma$  e IL-2 foi avaliada em culturas de células ( $5 \times 10^6$  células/mL) obtidas dos linfonodos de camundongos previamente imunizados com a OVA que receberam ou não CTX ou CB e foram incubadas com OVA ou ConA na presença ou não das proteínas isoladas (CTX ou CB) e mantidos por 72 horas a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5 % de CO<sub>2</sub>.

A produção de IL-2 também foi avaliada nos sobrenadantes das coculturas de 72 horas de LTCD3<sup>+</sup> com DCs previamente estimuladas com OVA + LPS ou ConA na presença ou não de CTX ou CB.

A produção de IL-12, IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  determinada utilizando kits de ELISA segundo instruções do fabricante (Ebioscience). A produção de IL-2 e IL-10 foi determinada utilizando os kits da R&D Systems. Além disso, nos ensaios das DCs pré-incubadas ou não com o BWA4C, a dosagem de IL-12 foi realizada com o Kit da Peptotech.

As placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-IL-12, anti-IL-6, anti-TNF $\alpha$  ou anti-IFN $\gamma$  (1:250) em tampão *Coating Buffer* (50 $\mu$ L/poço) e incubados “overnight” à 4°C. Para dosagem de IL-10 e IL-2, as placas foram sensibilizadas com anticorpo anti-IL-10 (720  $\mu$ g/mL) ou anti-IL-2 (180  $\mu$ g/mL) diluído em PBS. As placas foram incubadas por 18 horas/TA e, em seguida lavada 3 vezes com PBS-T (solução salina tamponada com fosfato + 0,05% Tween 20) para posterior bloqueio.

Para a determinação de IL-12, IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , as placas foram lavadas com PBS-T e os sítios livres foram bloqueados com 200  $\mu$ L/ poço com tampão *Assay Diluent* por 1 h/ TA. A etapa de bloqueio nos ensaios de dosagem de IL-10 e IL-2 ocorreu com a adição de 200  $\mu$ L/poço de *Reagent Diluent* (PBS contendo 20 mM de Tris, 0,1% BSA, 150 mM de NaCl e 0,05% Tween 20) por 1 h/TA.

Após esse período, foram adicionados 50  $\mu$ L/poço de IFN $\gamma$ , IL-12 (2000 pg/mL), IL-6 (500 pg/mL) e TNF $\alpha$  (1000 pg/mL) recombinantes e amostras diluídos na razão 1:2 em *Assay Diluent*. Nos ensaios para dosagem de IL-10 e IL-2, foram adicionados 50  $\mu$ L/poço de IL-10 (300 ng/mL) ou IL-2 (100 ng/mL) ou amostras diluídas na razão 1:2.

Em seguida, todas as placas foram incubadas por 2 h/TA seguida de nova lavagem em PBS-T. O volume de 50  $\mu$ L/poço dos anticorpos de detecção anti-IL-10 (54  $\mu$ g/ mL) ou anti- IL-2 (72  $\mu$ g/ mL) diluídos em *Reagent Diluent* foram adicionados na placa seguida de incubação por 2 h/TA. Outros anticorpos de detecção anti-IL-12, IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (50  $\mu$ L/poço) diluídos na razão 1:250 em *Assay Diluent* também foram adicionados nas placas e incubadas por 1 h/TA.

Posteriormente, foram adicionados 50  $\mu$ L/poço de estreptoavidina-peroxidase (1:250) diluída em tampão *Assay Diluent* por 30 min/TA para IL-12, IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Para a IL-10 e IL-2, foi adicionado o conjugado (1:200) diluído em tampão *Reagent Diluent* por 20 min/TA. Outras lavagens foram feitas em PBS-T e adicionados 50  $\mu$ L/poço de estreptoavidina-peroxidase diluída em tampão (1:200)

para as citocinas. O conjugado foi removido com lavagem e posteriormente, 50 µL/poço do reagente cromogênico TMB foram acrescentados nos poços para ocorrer a revelação. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M).

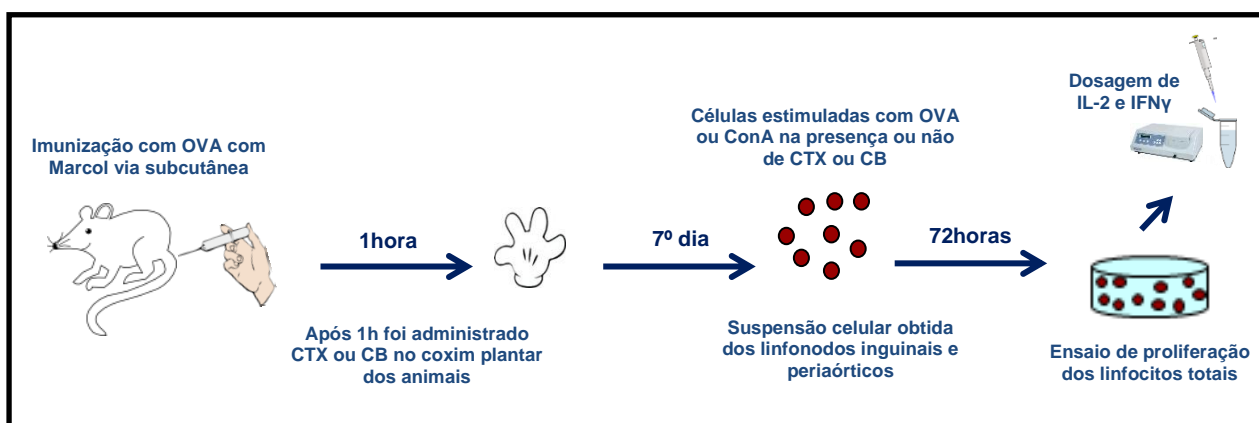
As concentrações de IL-12, IL-6, TNFα e IFNγ (E-Bioscience) e de IL-10 e IL-2 (R&D Systems) nos sobrenadantes das células foram calculadas e a partir das curvas-padrões construídas com as concentrações crescentes das citocinas recombinantes de acordo com as orientações dos respectivos fabricantes. Os resultados foram obtidos pela leitura da DO em espectrofotômetro com filtro de 450 nm (especificação do leitor).

No kit da Peprotec, as placas foram sensibilizadas com 100 µL/ poço de PBS diluído com o anticorpo de captura (1µg/mL) e incubadas por aproximadamente 18h à 4°C. Após esse período, as placas foram bloqueadas com 1% BSA em PBS (200 µL/ poço), seguida de lavagem com PBS-T. Posteriormente, foram adicionadas a placa, 100 µL/poço de IL-12 recombinante (2ng/mL), assim como os sobrenadantes das culturas de DCs seguida de incubação por 2 horas em TA. Ao final, as placas foram lavadas com PBS-T e adicionados 100 µL/poço do anticorpo de detecção anti-IL-12 (0,25 µg/ mL) diluído em *Reagent Diluent* (0,05% Tween 20, 0,1% de BSA em PBS) seguida de incubação por 2 h/TA. Posteriormente, foi adicionado o conjugado de estreptoavidina-peroxidase (1:2000) diluído em *Reagent Diluent* e incubado por 30 min em TA. No momento da revelação, foram acrescentados 100 µL/ poço do substrato ácido 2,2'-azino-bis (3-*etilbenzotiazolina*-6-sulfônico) (ABST) monitorando a DO da leitura a cada 5 min em espectrofotômetro com filtro de 405 a 605 nm. A leitura foi interrompida após 25 min de reação até atingir o limiar máximo da curva padrão de 1.2, de acordo com o protocolo do fabricante.

## 5. MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

### 5.1. Análise da proliferação de linfócitos totais obtidos dos linfonodos dos camundongos previamente imunizados com a OVA e que receberam CTX ou CB

Para avaliar a resposta proliferativa OVA-específica, grupos de 5 camundongos foram previamente imunizados com OVA (200 µg/animal) emulsificada em adjuvante Montanide ou solução salina via subcutânea (item 4.5.1) e após 1 hora foram administradas CTX ou CB (5 µg/animal) no coxim plantar dos camundongos em volume de 40 µL (20 µL/coxim plantar). No sétimo dia pós imunização, as suspensões celulares dos diferentes grupos experimentais foram preparadas a partir dos linfonodos inguinais e periaórticos. Em seguida,  $3 \times 10^5$  células foram plaqueadas em meio contendo CTX, CB, OVA, OVA + CTX, OVA + CB, ConA, ConA + CTX ou ConA + CB (100 µL). Após 72h, foi analisada a resposta proliferativa desses LTs utilizando o kit “Cell proliferation ELISA Biotrak System version 2” de acordo com as orientações do fabricante (Armersham GE Gealthcare - item 4.5.3). Abaixo segue o esquema experimental de imunização com os diferentes antígenos (Figura 9).



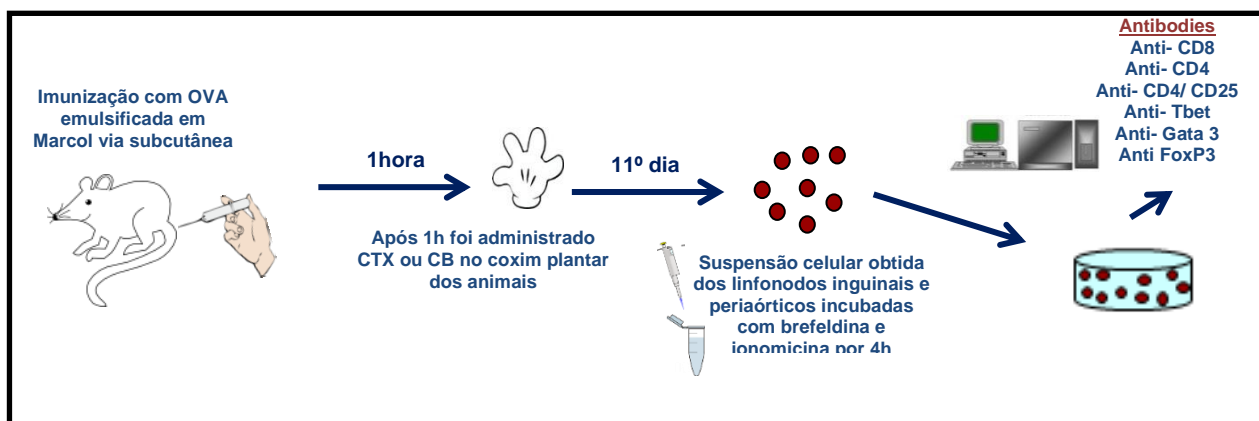
**Figura 9-** Esquema representativo dos animais imunizados com OVA seguida da administração da CTX e CB para análise de proliferação de LTs *in vivo*.

Camundongos foram imunizados com OVA (200 µg/animal) emulsificada em Montanide ou injetados com a salina e após 1 hora receberam ou não a CTX ou CB (5 µg/animal). Após 7 dias, suspensões celulares foram preparadas dos linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos não imunizados ou imunizados com a OVA. Essas células totais foram incubadas com a CTX ou CB (250 ng/mL) na presença ou não de OVA (200 µg/mL) ou ConA (1, 25 µg/mL) por 72 horas. A resposta proliferativa foi avaliada utilizando o Kit “Cell proliferation ELISA Biotrak System version 2” de acordo com as

especificações do fabricante. Os níveis de IL-2 e IFN $\gamma$  obtidos dos sobrenadantes das suspensões de LTs totais foram dosados por ELISA.

## 5.2. Análise do efeito da CTX e CB sobre células CD8<sup>+</sup> e subpopulações de células CD4<sup>+</sup> em suspensões celulares obtidas de linfonodos de camundongos BALB/c que receberam ou não a CTX ou CB *in vivo*

Para investigar o efeito das toxinas sobre a população de células CD8<sup>+</sup> bem como o perfil de diferenciação de LTCD4<sup>+</sup>, grupos de 4 camundongos BALB/c foram imunizados ou não com a OVA emulsificada em Montanide (200  $\mu$ g/animal) na base da cauda. Após 1 hora de imunização, esses animais receberam 20  $\mu$ L de CTX ou CB (5  $\mu$ g/animal) no coxim plantar direito e esquerdo. No 11<sup>o</sup> dia de imunização, suspensões celulares dos animais individuais foram preparadas a partir dos linfonodos inguinais e periaórticos (item 4.5.1). Nas suspensões celulares foram avaliadas as subpopulações de células TCD4<sup>+</sup> pela marcação intracelular de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10 por FACs como descrito no item 4.6. Além disso, foi avaliada a porcentagem de células CD8<sup>+</sup> nas suspensões obtidas dos animais imunizados com a OVA que receberam ou não a CTX ou CB (Figura 10).



**Figura 10-** Esquema representativo dos animais imunizados com OVA seguida da administração da CTX e CB para análise de perfil celular *in vivo*.

Grupos de 4 camundongos Balb/c foram imunizados ou não com a OVA. Após 1 hora da imunização, foi administrada a CTX ou CB no coxim plantar dos animais. No 11<sup>o</sup> dia de imunização, suspensões celulares dos animais individuais foram preparadas a partir dos linfonodos inguinais e periaórticos. Estas suspensões foram incubadas por 4h com ionomicina e brefeldina em câmara de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, essas células foram incubadas com anti- CD8, CD4 ou CD4 /CD25, seguida de permeabilização e marcação intracelular com anti-IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10 e analisadas por FACs.

### **5.3. Determinação da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA nos soros dos camundongos imunizados com OVA que receberam ou não CTX ou CB**

A produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA nos diferentes grupos de camundongos acima descritos foi determinada por ELISA. Para isso, os soros foram obtidos dos animais por punção cardíaca após a eutanásia.

Placas de poliestireno (Costar) foram sensibilizadas com 10 µg/mL OVA diluída em PBS (100 µL/poço) por 18h/4°C. Posteriormente, os sítios não ocupados foram saturados com PBS contendo PBS-T em 3% de gelatina por 3 horas/37°C. As placas foram lavadas com PBS-T e subsequentemente, adicionaram-se, em cada orifício da primeira linha, 200 µL de soro dos camundongos diluído a 1/100 para a subclasse IgG1 e 1/20 para IgG2a em 0,05% PBS-T. Nas linhas seguintes, foram feitas diluições seriadas na razão dois (100 µL/orifício) e as placas incubadas a 37°C, por 1 hora.

Após o tempo de reação dos soros testes, as placas foram lavadas com PBS-T e, posteriormente, foram adicionados aos orifícios 100 µL dos anticorpos específicos anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo, diluídos em 1/1.000 e 1/500, respectivamente. Em seguida, as placas foram lavadas e adicionados 100 µL do conjugado anti-IgG marcado com peroxidase na diluição de 1:4000 em PBS-T. A atividade de peroxidase foi revelada utilizando-se uma solução contendo 40 mL de tampão citrato de sódio, 40 µL de H<sub>2</sub>O e 40 mg de ortofenilenodiamina-OPD (100 µl/poço) em TA. A reação foi interrompida com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M). A intensidade da cor da reação foi determinada por absorvância em leitor de microplacas com comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos como a média da DO dos soros individuais na diluição 1/200 para IgG1 e 1/10 para IgG2a ± DP.

### **5.4. Reação de hipersensibilidade tardia (DTH)**

Grupos de quatro camundongos BALB/c imunizados com a OVA e que receberam ou não CTX ou CB (item 5.1) foram avaliados quanto à resposta de hipersensibilidade do tipo tardia específica para a OVA (Favoretto *et al.*, 2014). Para tanto, amostra de OVA (50 mg- grau II) foi diluída em 2,5 mL de solução salina e

incubada por 1 hora à 80°C. Posteriormente, foram adicionados 7,5mL de solução salina seguida de centrifugação por 10 min à 1811 x g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensa em 2 mL de salina.

No 8º dia pós-imunização, os camundongos receberam 30 µL de OVA agregada na pata traseira esquerda e o mesmo volume de solução salina na pata traseira direita. A espessura das patas foi avaliada 24h após a injeção da OVA agregada usando um paquímetro (Starret 799). O resultado foi expresso como a diferença na espessura da pata injetada com salina e a pata injetada com a OVA ± DP. Como controle do DTH, camundongos não imunizados injetados com a OVA agregada ou a salina também foram incluídos.

## **5.5. Análise dos resultados**

Os resultados de citometria de fluxo foram apresentados como a média da intensidade de fluorescência das amostras em quadruplicatas ± desvio padrão ou ainda, em porcentagem de células positivamente marcadas. A produção das citocinas foi expressa como a média ± desvio padrão das concentrações obtidas das amostras em quadruplicatas. A análise estatística adotada foi o método de Tukey, utilizando a análise de variância (ANOVA) e de comparação múltipla entre os grupos experimentais no software GraphPad Prisma 5. Diferenças com o  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes.

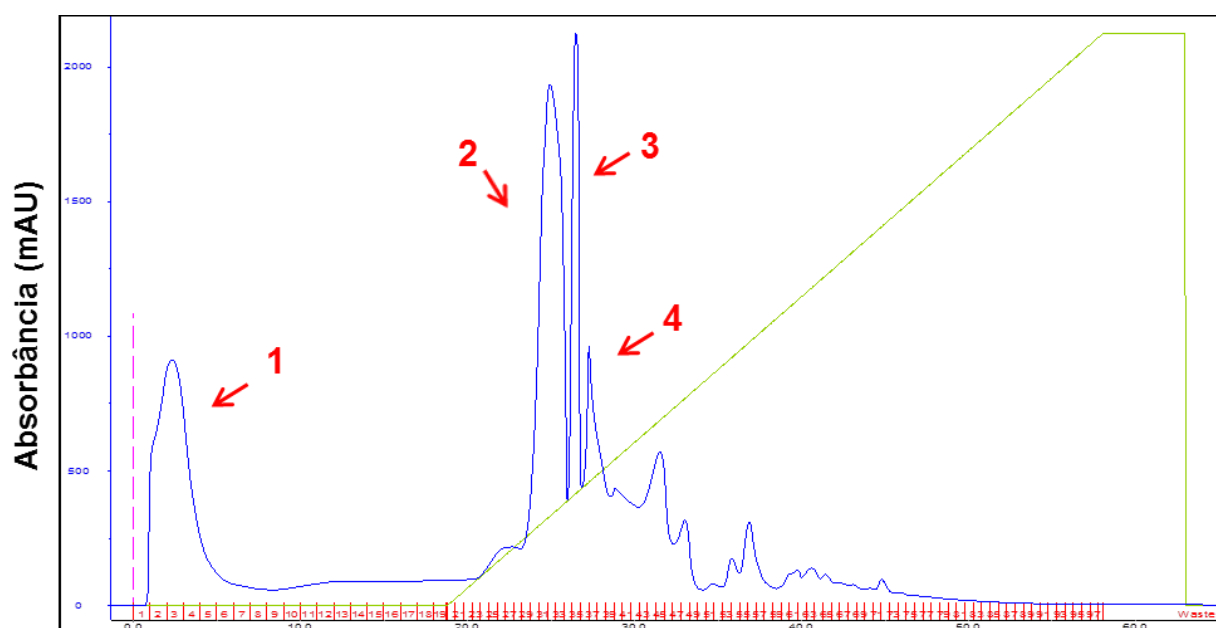


## 6. RESULTADOS

### 6.1. Purificação da CTX e sua subunidade CB

A purificação da fração CTX a partir do veneno bruto da *C.d.terrificus* foi realizada por cromatografia de troca aniônica utilizando uma coluna MONO-Q. Para obtenção da fosfolipase A<sub>2</sub> (CB) e da crotapotina (CA), alíquotas da CTX foram submetidas à cromatografia de troca catiônica utilizando uma coluna MONO-S, assim como descrito em material e métodos.

A figura 11 representa o perfil cromatográfico do veneno bruto da cascavel apresentando 4 picos distintos, sendo os picos 2, 3 e 4 correspondentes à CTX, conforme descrito na literatura (Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971).

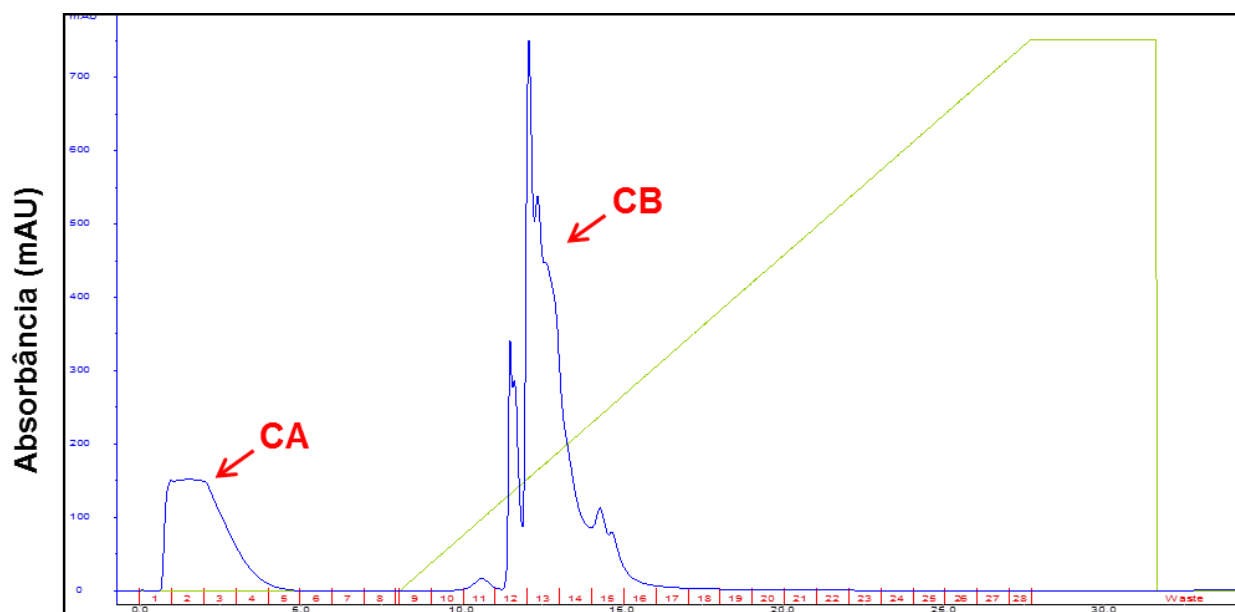


**Figura 11- Perfil cromatográfico do veneno de *C.d.terrificus* submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna MONO-Q.**

O veneno total de *C. d. terrificus* (15mg) foi submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna MONO- Q HR 5/5 por sistema FPLC. O gráfico representa a eluição dos componentes do veneno quando submetidos a um gradiente linear de NaCl (0 a 1M) em tampão Tris- HCL 50 mM em fluxo de 1,0 ml/minuto. A eluição dos componentes do veneno foi monitorada em espectrofotômetro a 280 nm.

Na figura 12, podemos verificar dois picos distintos ao longo do cromatograma, como previamente descrito por Sampaio e colaboradores (Sampaio

et al., 2005), sendo a CA e CB correspondentes ao 1º e 2º pico, respectivamente. Várias cromatografias foram realizadas para a obtenção de material suficiente para utilização dos experimentos propostos. Após as purificações, as amostras de CTX e suas subunidades CA e CB foram submetidas à eletroforese para análise da pureza e identificação da massa molecular. Em seguida, as frações correspondentes à CTX e suas subunidades CA e CB foram reunidas e dialisadas contra PBS para eliminação de sais e uréia das amostras.



**Figura 12- Perfil de eluição das subunidades CA e CB na amostra de CTX submetida à cromatografia de troca catiônica em coluna MONO-S.**

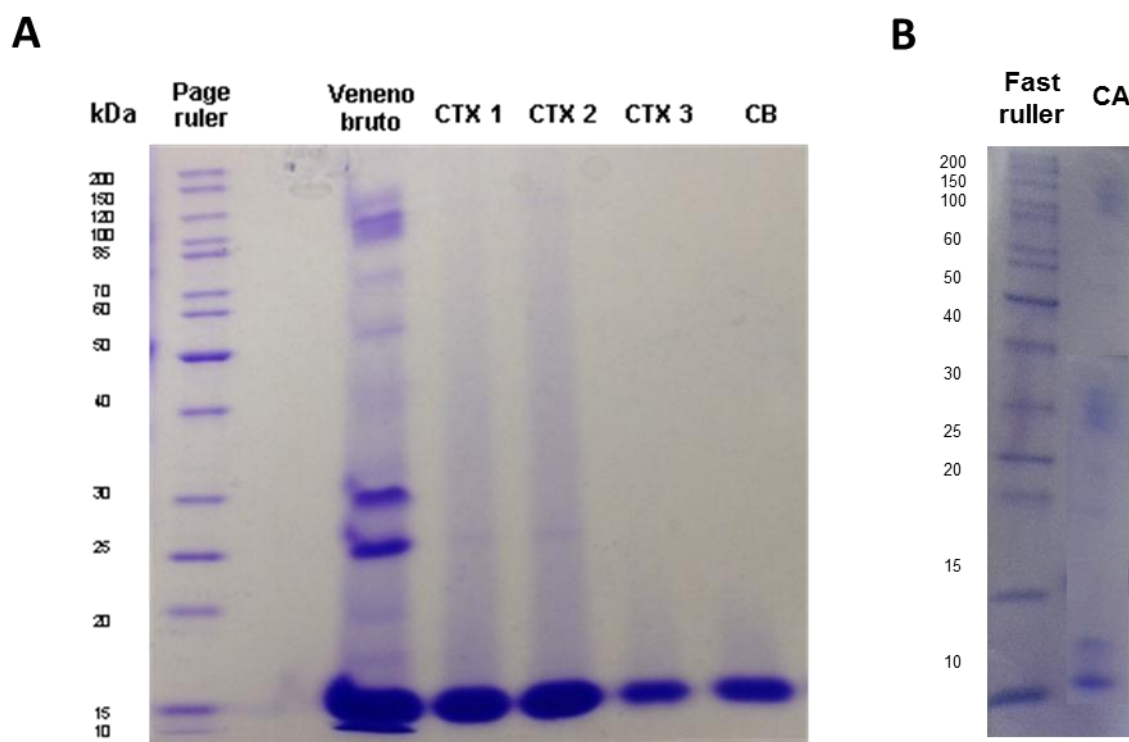
Amostras de CTX diluídas em solução Tris- HCL pH 7,2 contendo uréia 6 M foram submetidas à cromatografia de troca catiônica em coluna MONO-S HR 5/5 por sistema FPLC. As subunidades CA e CB foram eluídas em gradiente linear de 2,- 6M de uréia em solução de NaCl 2M tamponada com Tris/ HCL 50mM, em fluxo de 1,0 mL/minuto. As frações obtidas foram monitoradas em espectrofotômetro a 280 nm.

## **6.2. Análise da massa molecular da CTX e suas subunidades CA e CB por eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)**

Eletroforese em SDS- PAGE foi realizada para avaliar o perfil de migração do veneno total de *C.d.terrificus*, dos três picos correspondentes à CTX (picos 2, 3 e 4) e CB em gel de poliacrilamida 12,5%, assim como da CA em gel de 16% de poliacrilamida na presença de tricina.

A figura 13 mostra a presença de várias bandas com massas moleculares distintas na amostra do veneno bruto da cascavel (posição 2) correspondentes as diferentes toxinas. Além disso, verificamos uma única banda com massa molecular de aproximadamente 15 kDa nos picos correspondentes à CTX e CB (Figura 13A). Além disso, podemos observar uma banda com massa molecular de aproximadamente 10 kDa correspondente à subunidade CA da CTX (Figura 13B).

Os resultados obtidos permitiram evidenciar a eficiência na metodologia de purificação e integridade das frações. A concentração proteica foi determinada de acordo com a metodologia adotada por Bradford (Bradford, 1976) e posteriormente as proteínas foram submetidas à coluna de polimixina para eliminação de endotoxinas.



Fonte:(Freitas, 2014)

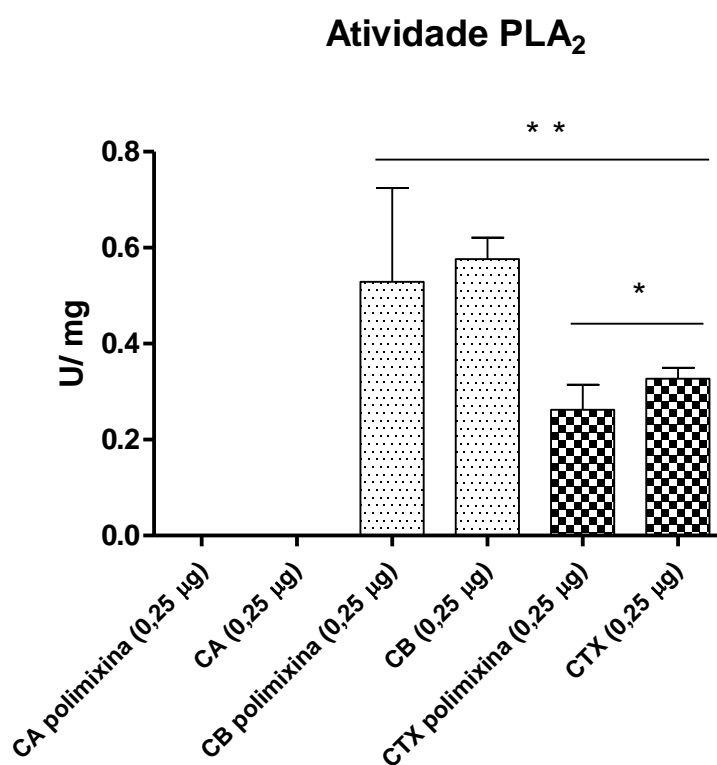
**Figura 13- Perfil proteico do veneno de *C.d. terrificus* e dos picos obtidos em cromatografia de troca aniônica e catiônica em gel de poliacrilamida 12,5% e gel de 16% de poliacrilamida na presença de tricina.**

(A) Perfil eletroforético do veneno total e as amostras (pico 1, 2 e 3 da CTX e CB) em gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras. As amostras (20 µL/mL) foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,625 mM pH 6,8; 10% glicerol (v/v); 5% β-ME (v/v); 2 % de SDS e 0,001 % de azul de bromofenol na proporção de 1:5 e aquecidas por 5min/ 95°C. Em seguida, foram aplicadas no gel e submetidas a uma corrente elétrica de 110 V e 55 mA por 2 horas. Page ruler - Padrão de massa Molecular ((Trail Mix™- Novagen 10-200 kDa); veneno total de *C.d. terrificus*; picos 2, 3 e 4 da CTX (CTX 1, 2, 3, respectivamente); subunidade CB. (B) Perfil eletroforético da subunidade CA em gel de poliacrilamida a 16% na presença de tricina sob condições redutoras. A amostra foi aplicada no gel e submetida a corrida eletroforética sob voltagem constante de 30 V a 40

mA por 1h e em seguida por corrente de 90 V durante 5 horas. Padrão de massa molecular *Fast ruler* (Thermo Scientific); Os geis foram corados com solução de 0,2 % (m/v) de Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad).

### 6.3. Avaliação da atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>) por ensaio enzimático

A atividade fosfolipásica da CTX e suas subunidades CA e CB foi determinada sobre o substrato sintético 4N3OBA, conforme descrito em material e métodos. A figura 14 mostra que tanto a CTX como CB submetidas ou não à cromatografia em coluna de polimixina apresentaram atividade fosfolipásica conservada. Pode-se verificar ainda, que a atividade fosfolipásica da CB foi aproximadamente 2 vezes maior do que a apresentada pelo complexo CTX. Além disso, podemos observar que a subunidade CA não apresentou atividade fosfolipásica.



**Figura 14- Atividade fosfolipásica da CTX e suas subunidades CA e CB obtidas do veneno de *C.d. terrificus*.**

CTX e suas subunidades CA e CB foram submetidas à coluna de polimixina para a remoção de LPS. As amostras na concentração de 0,25 µg (20 µL) foram distribuídas em microplacas contendo 220 µL de tampão Tris-HCl 10 mM, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 100 mM de NaCl, pH 8,0. A seguir, foram adicionados 20 µL de substrato (0,3 mM de 4-nitro-3-[octanoyloxily] benzoico diluído em DMSO), sendo 320 µM de substrato em um volume final de 260 µL, e então as amostras foram incubadas durante 20 min a 37°C. A atividade enzimática foi expressa como a velocidade inicial da reação (V<sub>0</sub>) calculada com base no

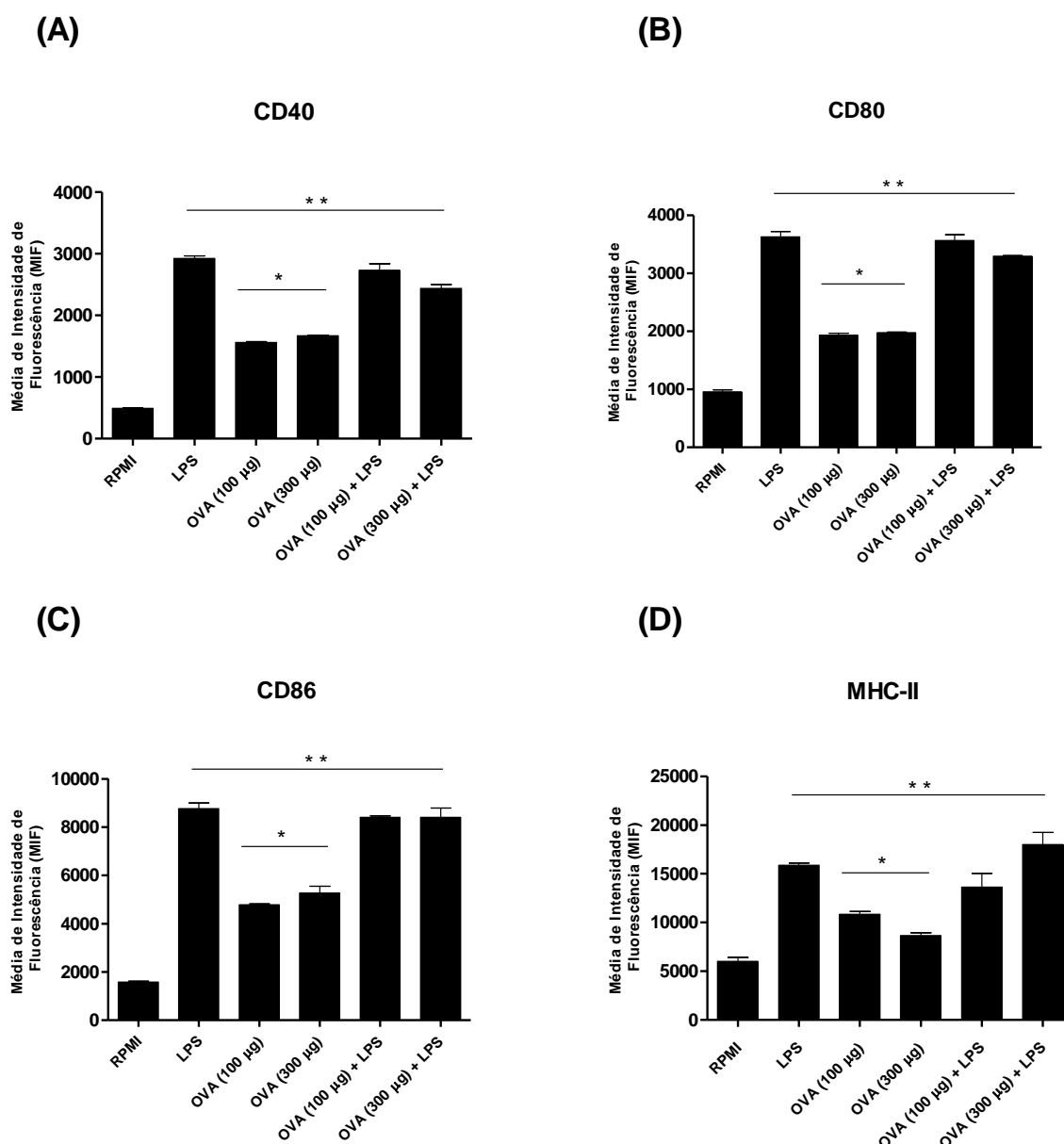
aumento da absorvância. Os resultados foram realizados a partir de 3 experimentos independentes em duplicatas  $\pm$  DP. \*p < 0,05- amostras de CTX comparadas às amostras de CB. \*\*p < 0,05- amostras de CTX e CB comparadas às amostras de CA.

## 6.4. Células dendríticas *in vitro*

### 6.4.1. DCs são ativadas de maneira eficiente com a OVA + LPS

Com o objetivo de avaliar o efeito da CTX e CB sobre a imunidade adaptativa e considerando o papel das DCs nesse processo, inicialmente avaliamos a maturação das DCs incubadas com antígeno heterólogo como a OVA na presença ou não de LPS. Assim sendo, as DCs foram estimuladas por 18 horas com LPS (250 ng/mL), OVA (100 ou 300  $\mu$ g/mL) ou OVA + LPS (100  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL ou 300  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL) por 18 horas. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos anti-CD11c, CD40, CD80, CD86 e MHC-II e analisadas por citometria de fluxo.

Podemos verificar nos gráficos que as duas concentrações de OVA ou OVA + LPS induziram aumento da expressão das moléculas CD40, CD80, CD86 (Figuras 15 A-C) e MHC-II (Figura 15D), em relação ao obtido com as células mantidas em meio de cultura. Verificamos ainda, que a adição do LPS às culturas de DCs incubadas com a OVA potencializou a maturação destas células. Considerando esses resultados, os próximos experimentos foram realizados em DCs diferenciadas *in vitro* e estimuladas com OVA na concentração intermediária (200  $\mu$ g/mL) juntamente com o LPS.



**Figura 15- Expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II nas DCs diferenciadas *in vitro* e incubadas com OVA na presença ou não de LPS.**

DCs imaturas foram estimuladas com LPS (250 ng/mL), OVA (100 ou 300 µg/mL) ou OVA + LPS (100 µg/mL + 250 ng/mL ou 300 µg/mL + 250 ng/mL) por 18 horas. Em seguida,  $0,5 \times 10^6$  células foram marcadas com anticorpos anti-CD11c-FITC, anti-CD40-PE, CD80-PE, CD86-PE e MHC-II-PE e analisadas em citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média da intensidade de fluorescência das células (MIF) das amostras em duplicata  $\pm$  DP. Resultados representativos de 2 experimentos. \* $p < 0,05$ - grupos de células estimuladas com OVA comparado ao grupo de células incubadas com LPS ou OVA + LPS. \*\* $p < 0,05$ - grupos de células estimuladas com LPS, OVA ou OVA + LPS comparado ao grupo de células mantidas em meio de cultura.

#### 6.4.2. CTX e sua subunidade CB modulam a expressão de moléculas MHC-II, coestimuladoras (CD40, CD80, CD86), ICOSL, PD-1L, PD-2L em DCs incubadas com OVA + LPS *in vitro*

Em experimentos anteriores (Freitas *et al.*, 2018), demonstraram que a CTX e CB são capazes de inibir a maturação das DCs incubadas com LPS. Portanto tivemos como próximo objetivo analisar o efeito da CTX e CB sobre a maturação das DCs estimuladas com OVA + LPS *in vitro*.

Para tanto, DCs foram incubadas com OVA + LPS, OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> umidificada por 18h. Posteriormente, essas células foram marcadas com anticorpos anti-CD40, CD80, CD86 e MHC-II ou CD11c e os resultados foram analisados por citometria de fluxo.

Observamos na figura 16, aumento da expressão das moléculas de MHC-II e coestimuladoras nas DCs incubadas com OVA + LPS em comparação ao obtido nas DCs mantidas em meio RPMI-S. Além disso, verificamos que a CTX e CB inibiram a expressão de MHC-II, CD40, CD80 e CD86 nas DCs estimuladas com OVA + LPS.

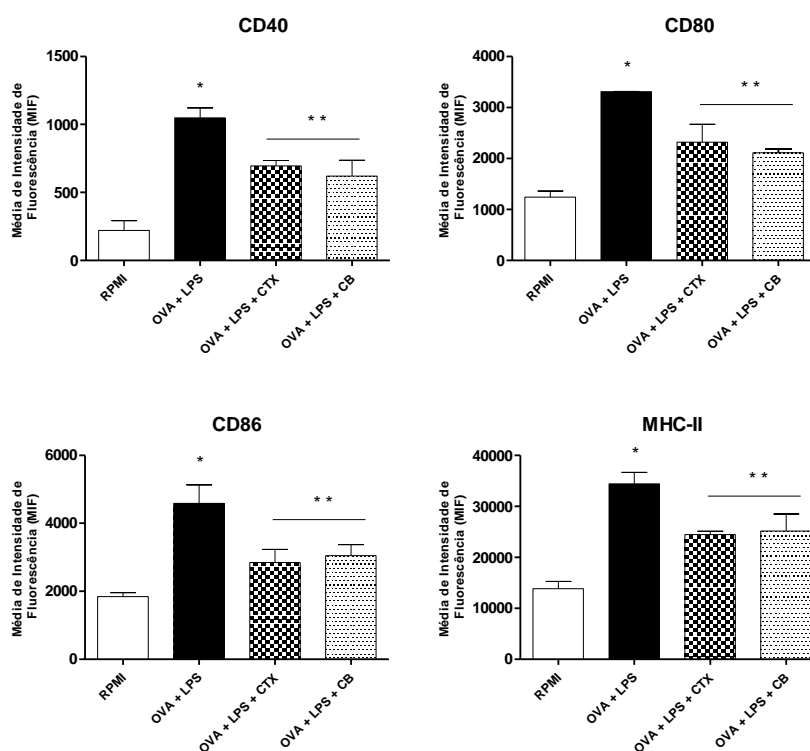
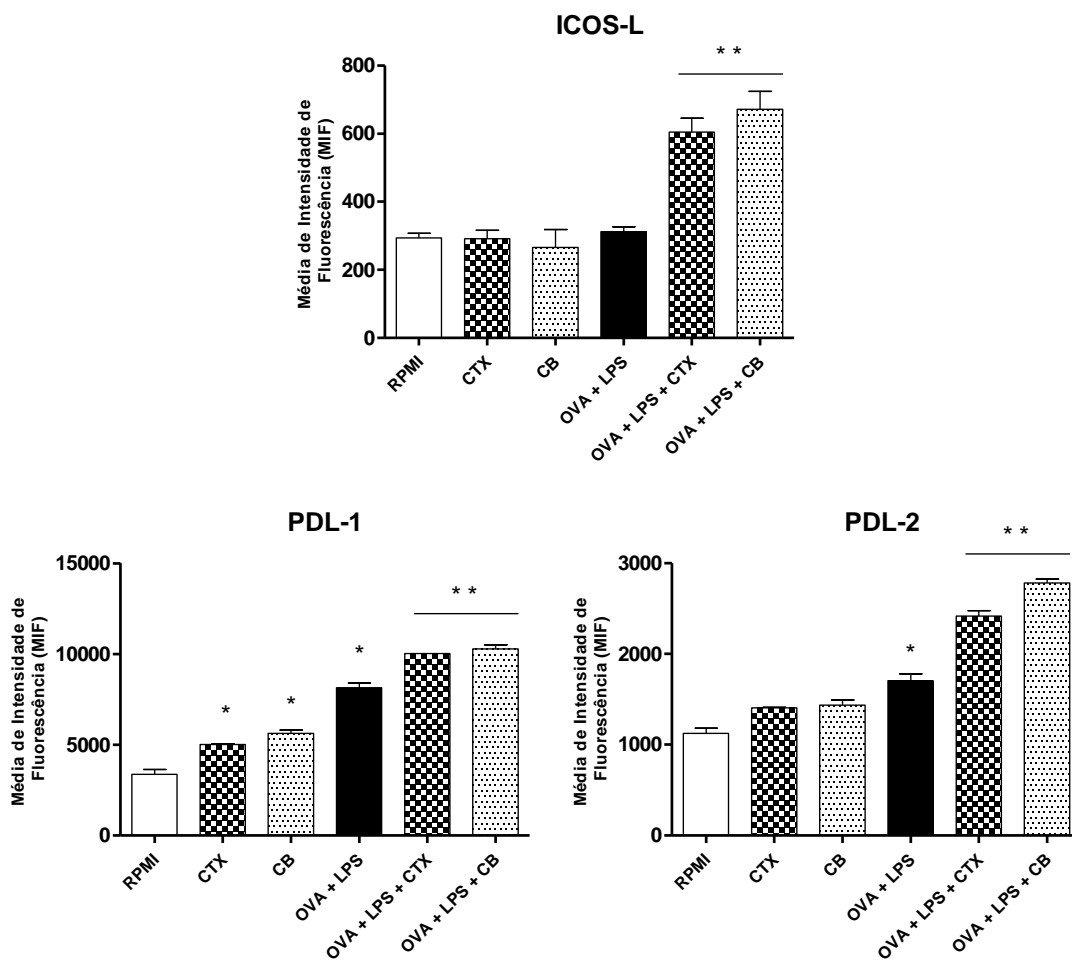


Figura 16- Efeito da CTX e CB sobre a expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs incubadas com OVA + LPS *in vitro*.

DCs imaturas ( $5 \times 10^6$ ) foram estimuladas com OVA + LPS (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 250  $\text{ng}/\text{mL}$ ), OVA + LPS + CTX ou CB (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 250  $\text{ng}/\text{mL}$  + 250  $\text{ng}/\text{mL}$ ) por 18 horas. As células foram estimuladas com os diferentes antígenos em duplicatas e marcadas em quaduplicata. Após esse período, as células ( $0,5 \times 10^6$ ) foram marcadas com anti-CD11c (PeCy7), FVS510 (AmCyan), CD40 (Pacific Blue), CD80 (APC), CD86 (PE) ou MHC-II (*PerCP/Cy5.5*) em quaduplicatas e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF) das culturas de DCs  $\pm$  DP. Resultados representativos de 2 experimentos. \*\* $p < 0,05$ - grupos OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB comparados ao grupo OVA + LPS. \* $p < 0,05$ - grupos de células incubadas com OVA + LPS comparados ao grupo de DCs mantidas em meio de cultura.

Neste experimento avaliamos também o efeito da CTX e CB sobre a expressão das moléculas ICOS-L, PDL-1 e PDL-2 em DCs estimuladas com OVA + LPS. Podemos observar na figura 17 aumento da expressão de PDL-1 nas DCs incubadas com OVA + LPS, CTX ou CB em relação ao observado nas células mantidas em meio de cultura. Além disso, verificamos que a adição de CTX ou CB nas culturas de DCs incubadas com OVA + LPS potencializou a expressão de ICOS-L, PDL-1 e 2 em relação as DCs estimuladas somente com a OVA + LPS.





**Figura 17- Efeito da CTX e CB sobre a expressão de ICOSL, PDL-1 e PDL-2 em DCs diferenciadas *in vitro* e estimuladas ou não com OVA + LPS.**

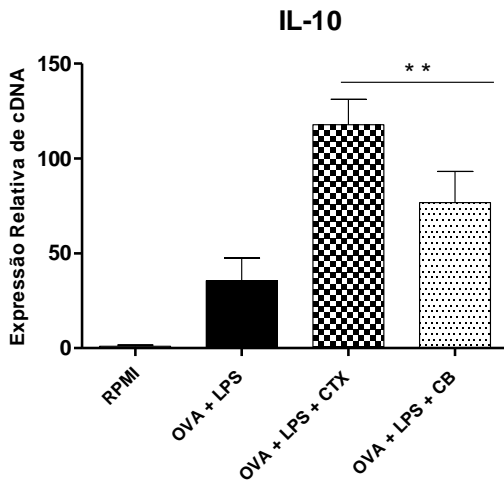
DCs imaturas ( $3 \times 10^6$ ) foram estimuladas com OVA + LPS (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 250  $\text{ng}/\text{mL}$ ), CTX, CB (0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 250  $\text{ng}/\text{mL}$  + 250  $\text{ng}/\text{mL}$ ) por 18 horas. Após esse período, as células ( $0,5 \times 10^6$ ) foram marcadas com anti- CD11c (PeCy7), FVS510 (AmCyan), ICOS-L, PDL-1 e PDL-2 (PE) em duplicata e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF) das culturas de DCs em quadruplicatas  $\pm$  DP. Resultados representativos de 3 experimentos. \*\* $p < 0,05$ - grupos OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB comparados ao grupo OVA + LPS. \* $p < 0,05$ - grupos de células incubadas com OVA + LPS, CTX ou CB comparados ao grupo de DCs mantidas em meio de cultura.

**6.4.3. Citocinas anti e pró-inflamatórias foram moduladas por CTX e sua subunidade CB em DCs estimuladas com OVA + LPS *in vitro***

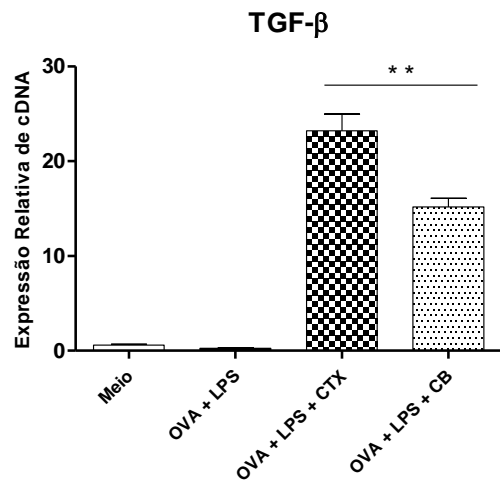
Com o objetivo de estudar mais um parâmetro de modulação da CTX e CB sobre as DCs, avaliamos a produção das citocinas pró (TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-12) por ELISA e a expressão gênica das anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) por PCR em tempo real.

Ao analisar a figura 18, podemos verificar que a CTX e CB induziram aumento da expressão de IL-10 (Figura 18A) e TGF $\beta$  (Figura 18B) nas DCs incubadas com OVA + LPS quando comparado ao obtido em DCs estimuladas somente com OVA + LPS. Em contraste, DCs incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB produziram níveis menores de TNF $\alpha$  (Figura 18C), IL-6 (Figura 18D) e IL-12 (Figura 18E) em relação aos obtidos nas culturas de DCs estimuladas somente com a OVA + LPS. Além disso, a OVA + LPS aumentaram a secreção de todas as citocinas pró-inflamatórias nas DCs quando comparada as células em RPMI-S (Figura 18C-E).

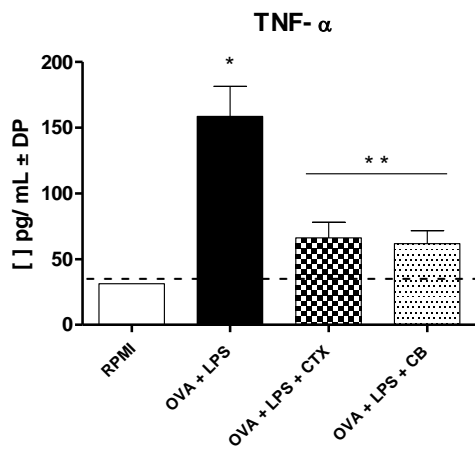
(A)



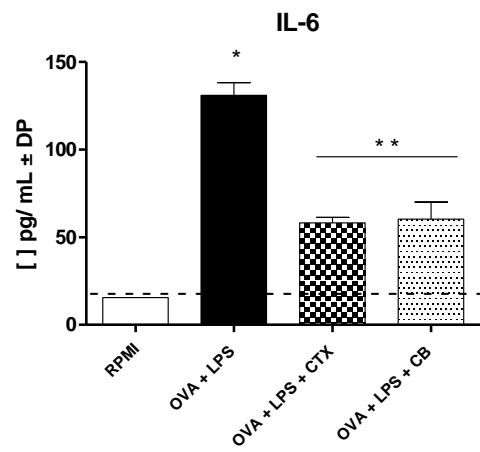
(B)



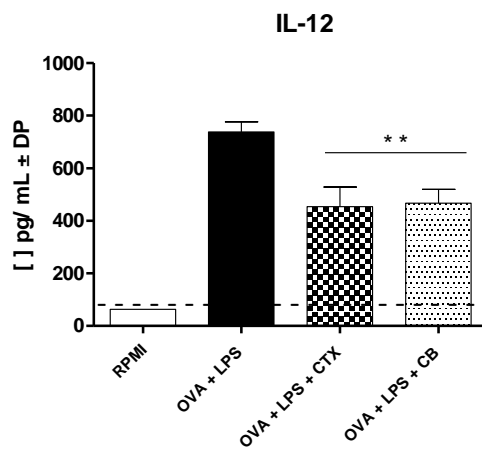
(C)



(D)



(E)



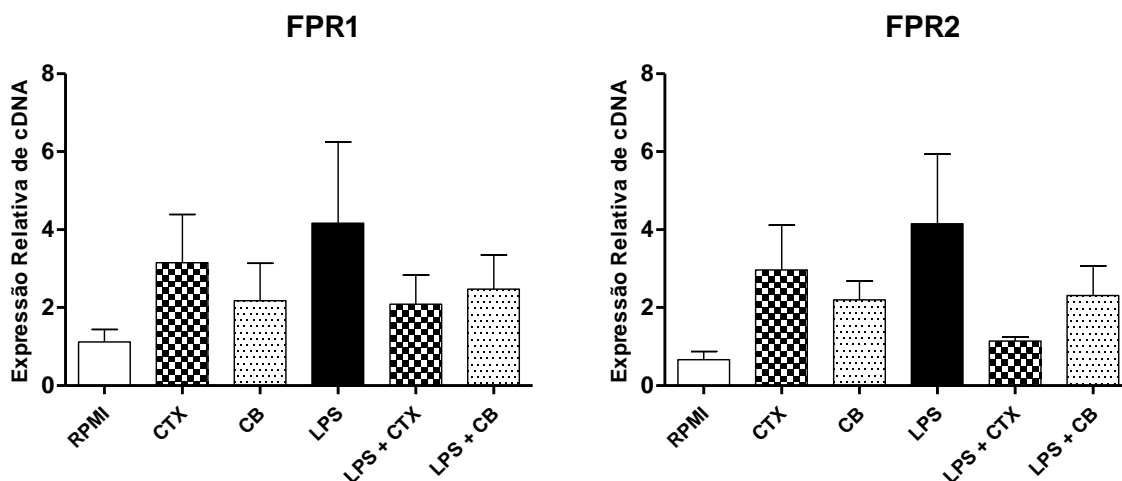
**Figura 18- Expressão gênica de IL-10 e TGFβ e produção de citocinas inflamatórias nas culturas de DCs estimuladas *in vitro* com CTX ou CB na presença ou não de OVA + LPS.**

DCs diferenciadas *in vitro* foram estimuladas com OVA + LPS (200 µg/mL + 250 ng/mL), OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200 µg/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL). Após 18 horas, a expressão gênica de IL-10 e TGFβ foi realizada nas DCs ( $5 \times 10^6$ ) estimuladas com diferentes antígenos e analisadas por RT-PCR em sistema Syber Green utilizando como controle endógeno a  $\beta$ -Actina. Os resultados foram expressos em quantidade relativa de cDNA calculada a partir do método de  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm DP$ . A produção de TNFα, IL-6 e IL-12 foi determinada nos sobrenadantes das culturas de DCs e dosados por ELISA. Resultados expressos com a média da concentração de cada citocina das amostras em quadruplicatas  $\pm DP$ . A linha pontilhada representa o limite de detecção do ensaio. Resultados representativos de 2 experimentos. \*\*p < 0,05- DCs incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB comparadas às DCs estimuladas somente com OVA + LPS. \*p < 0,05- DCs estimuladas com OVA + LPS em comparação ao grupo de células mantidas em meio de cultura.

**6.4.4. DCs estimuladas ou não com LPS na presença ou não da CTX ou CB expressam FPRs 1 e 2**

Recentemente, nós mostramos que o bloqueio dos receptores peptídeo formil (FPRs) utilizando o antagonista não seletivo de FPRs (Boc-2) abole o efeito inibitório da CTX e sua subunidade CB sobre a maturação das DCs incubadas com LPS receptores peptídeo formil (FPRs). Além disso, pudemos demonstrar que ambas as moléculas CTX e CB induzem a produção de LXA<sub>4</sub> (Freitas *et al.*, 2018), que por sua vez, se liga ao FPR2 (Migeotte *et al.*, 2006) em DCs estimuladas com LPS.

Nesse sentido, o próximo objetivo foi avaliar a expressão de FPR1 e 2 em amostras de DCs mantidas em meio de cultura ou incubadas com as toxinas na presença ou não de LPS. Assim sendo, na figura 19, podemos observar que não houve diferença na expressão de FPRs 1 e 2 em DCs mantidas em meio de cultura ou estimuladas com a CTX ou CB na presença ou não de LPS.



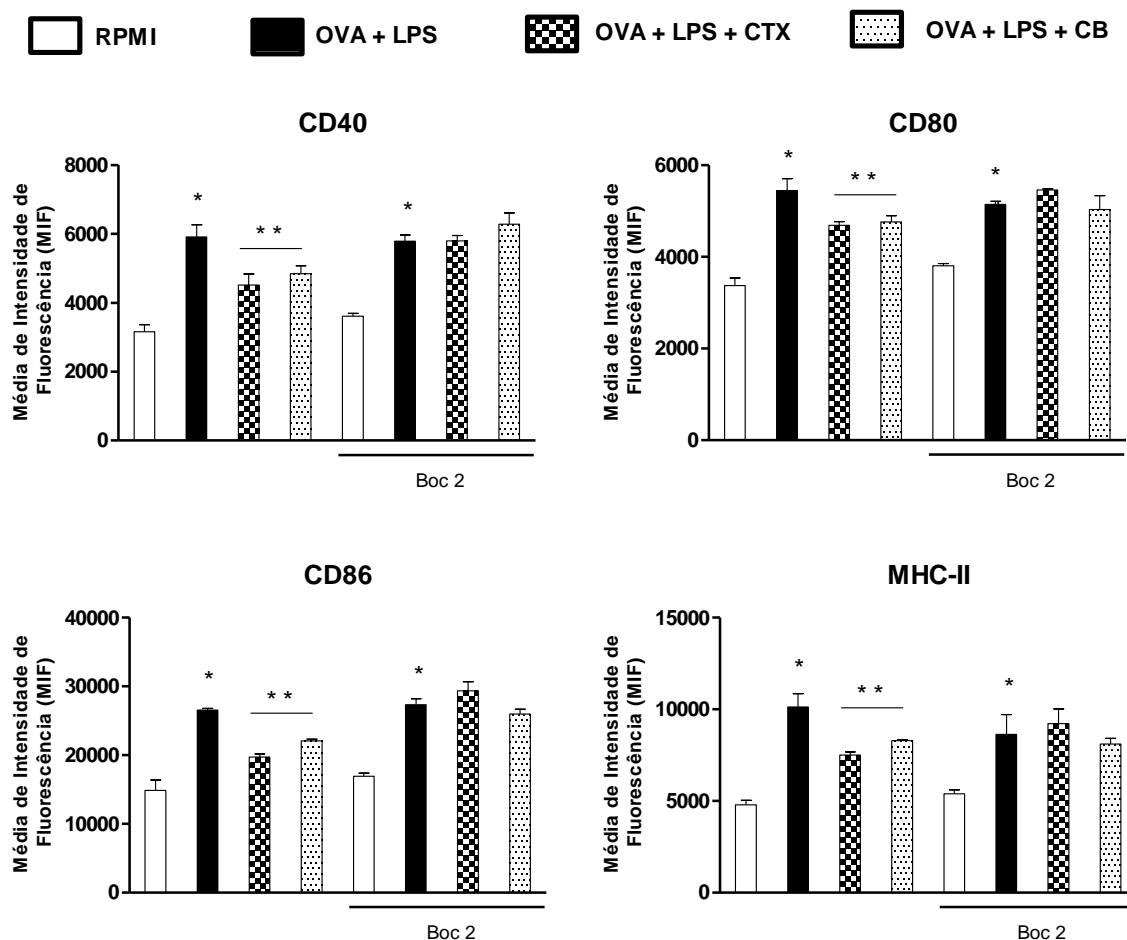
**Figura 19- Expressão gênica de FPR 1 e 2 em DCs estimuladas *in vitro* com CTX, ou CB em associação ou não com o LPS.**

DCs diferenciadas *in vitro* foram incubadas por 18 horas com LPS (250 ng/mL), LPS + CTX ou LPS + CB (250 ng/mL + 250 ng/mL) por 18h. Em seguida,  $5 \times 10^6$  células foram separadas, centrifugadas e utilizadas para a extração de RNA e síntese de cDNA. A partir desse material foi realizada a análise da expressão de ambos receptores formil peptídeo por PCR em tempo real em sistema Syber Green utilizando como controle endógeno a  $\beta$ -Actina. Os resultados foram expressos em quantidade relativa de cDNA calculada a partir do método de  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$  desvio padrão, como descrito em material e métodos. Resultado representativo de 2 experimentos realizados em triplicatas.

#### 6.4.5. CTX e CB modulam DCs estimuladas com OVA + LPS *in vitro* via FPRs

Em vista dos resultados mostrando a participação dos FPRs no efeito da CTX sobre macrófagos e DCs (Costa *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2018), analisamos o papel destes receptores na ação da CTX e CB sobre a maturação das DCs incubadas com OVA + LPS. Para tanto, as DCs foram pré-incubadas ou não com o antagonista de FPRs (Boc-2 - 100  $\mu$ M) por 15 minutos. Em seguida, as DCs foram centrifugadas e estimuladas com OVA + LPS na presença ou não de CTX ou CB por 18 horas. Após esse período, foi realizada a análise da expressão das moléculas ICOS-L, PDL1 e 2, MHC-II e coestimuladoras nas DCs por citometria de fluxo.

Os gráficos mostram novamente, que a OVA + LPS induziram aumento na expressão das moléculas MHC-II e coestimuladoras nas DCs incubadas ou não com Boc-2, enquanto que a CTX e CB inibiram essas moléculas nas DCs incubadas com OVA + LPS sem a pré-incubação com Boc-2. Em contrapartida, o efeito da CTX e CB sobre a expressão dessas moléculas nas DCs foi abolido nas culturas pré-incubadas com Boc-2 (Figura 20).

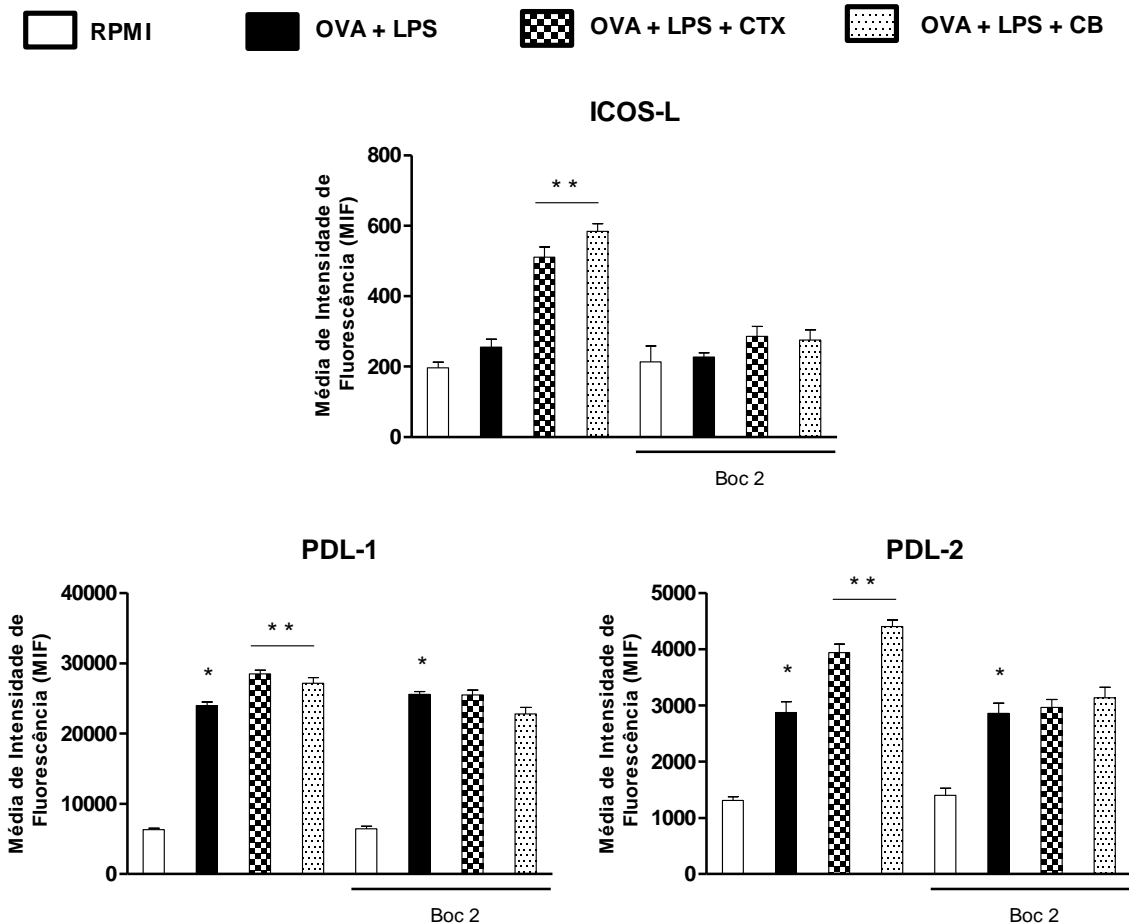


**Figura 20- Envolvimento de FPRs no efeito da CTX e CB sobre a expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs incubadas com a OVA + LPS.**

DCs ( $5 \times 10^6$ ) diferenciadas com GM-CSF + IL-4 por 7 dias foram incubadas na presença ou não de Boc-2 (100  $\mu$ M) por 15 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas e estimuladas com OVA + LPS (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL), OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL) por 18 horas. Em seguida, as suspensões dessas células ( $10^6$ ) foram marcadas com anti-CD11c (PeCy7), FVS510 (AmCyan), CD40 (Pacific Blue), CD80 (APC), CD86 (PE) ou MHC-II (*PerCP/Cy5.5*) e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF) das DCs  $\pm$  DP das quadruplicatas. Resultados representativos de 2 experimentos. \*\*p < 0,05- células incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB comparadas às DCs estimuladas somente com OVA + LPS. \*p < 0,05- células pré-incubadas ou não com o BOC-2, seguido do estímulo com OVA + LPS comparados ao grupo de células mantidas em meio de cultura.

Na figura 21 verificamos também, que independente da pré-incubação das DCs com Boc-2, a OVA+LPS induziram maior expressão das moléculas PDL- 1 e 2, mas não de ICOS-L, quando comparado ao grupo de DCs mantidas em meio RPMI-S. Além disso, pudemos observar que o efeito potencializador da CTX e CB sobre a

expressão de ICOS-L, PDL-1/2 nas DCs incubadas com OVA/LPS foi abolido quando as culturas foram pré-incubadas com Boc-2.



**Figura 21- Envolvimento de FPRs no efeito da CTX e CB sobre a expressão de ICOSL, PDL-1 e PDL-2 em DCs incubadas com OVA + LPS.**

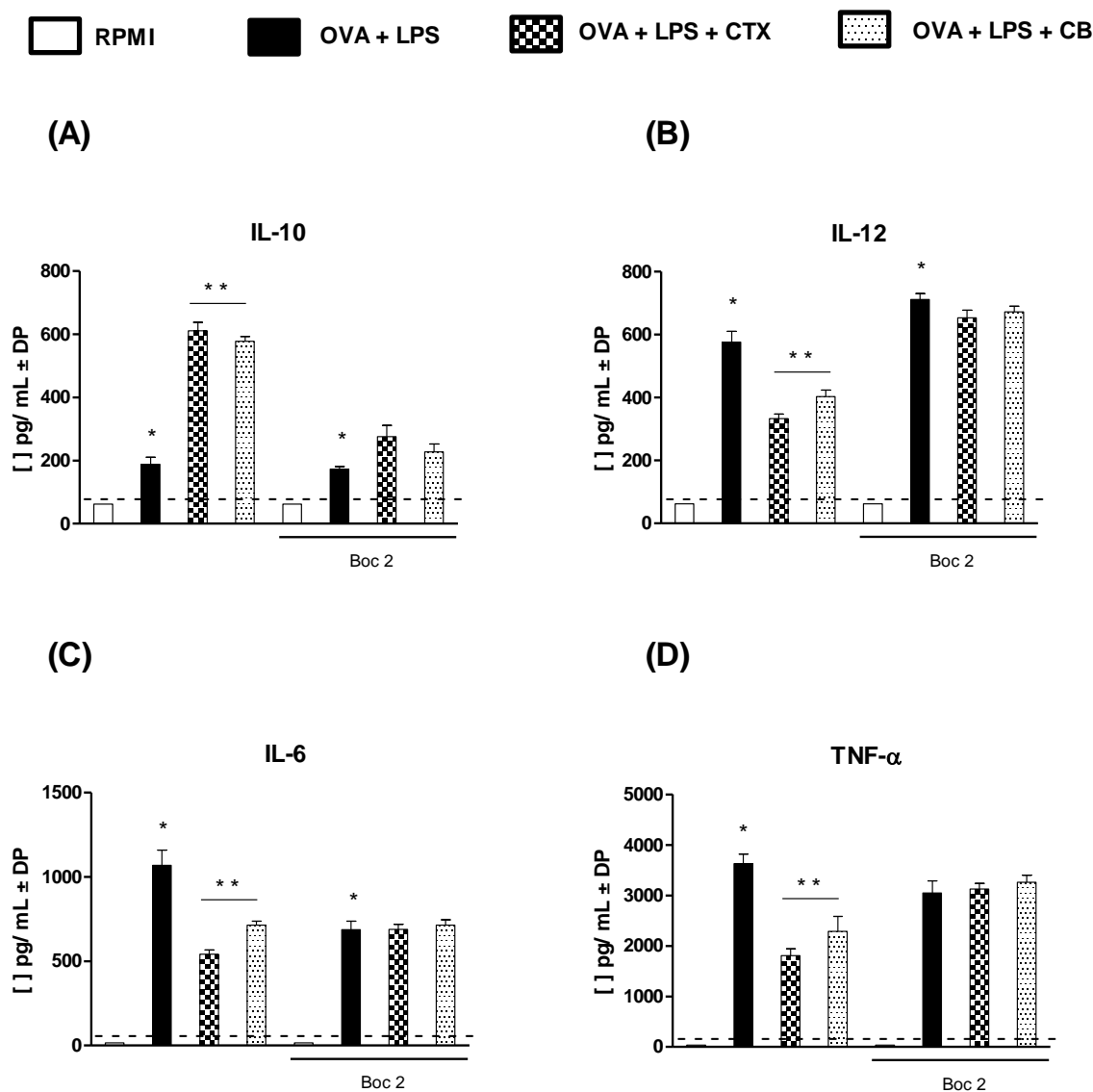
DCs ( $3 \times 10^6$ ) diferenciadas *in vitro* foram incubadas ou não com Boc-2 (100  $\mu$ M) por 15 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas e estimuladas com OVA + LPS (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL), OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL) por 18 horas. Em seguida, as suspensões dessas células ( $10^6$ ) foram marcadas com anti- CD11c (PeCy7), FVS510 (AmCyan), ICOSL, PDL-1 e PDL-2 (PE) e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF) das DCs  $\pm$  DP das quadruplicatas. Resultados representativos de 2 experimentos. \*\* $p < 0,05$ - células incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB comparadas às DCs estimuladas somente com OVA + LPS. \* $p < 0,05$ - células pré-incubadas ou não com o Boc-2 seguido dos estímulos com OVA + LPS em comparação com as DCs mantidas em meio de cultura.

#### *6.4.6. FPRs estão envolvidos no efeito da CTX e CB sobre a produção de citocinas anti- e pró-inflamatórias pelas DCs estimuladas com OVA + LPS*

O próximo objetivo do estudo foi investigar o padrão de secreção de citocinas pelas DCs pré-incubadas com o antagonista de FPRs seguida de estimulação com OVA + LPS na presença ou não de CTX ou CB.

A análise das citocinas nos sobrenadantes das culturas permitiu verificar que as DCs estimuladas com OVA + LPS pré-incubadas ou não com Boc-2 secretaram níveis maiores de IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 em relação ao obtido nas células mantidas em meio RPMI-S (Fig. 22 A-D). Pudemos verificar ainda, na figura 22 (B-D), menor secreção de citocinas pró-inflamatórias nas culturas de DCs incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB em comparação com a cultura de células estimuladas somente com a OVA + LPS. Em contrapartida, o efeito inibitório da CTX e CB sobre a secreção destas citocinas pelas DCs incubadas com OVA + LPS foi abolido nas culturas pré-incubadas com Boc- 2.

Quanto à citocina anti-inflamatória, a figura 22A mostra que a adição da CTX e CB às culturas de DCs incubadas com OVA + LPS induziu aumento da produção de IL-10 em relação à observada nas DCs estimuladas com OVA + LPS. Por outro lado, verificamos que a pré-incubação das DCs com Boc-2 seguida da estimulação com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB aboliu o efeito potencializador da CTX e CB sobre a produção desta citocina. Podemos verificar ainda nesta figura, que o pré-tratamento das DCs com Boc-2 não altera a produção das citocinas induzidas pela OVA + LPS.



**Figura 22- Produção de IL-10 e citocinas e pró- inflamatórias em sobrenadantes das culturas de DCs pré-incubadas ou não com Boc-2 seguida de estimulação com CTX e CB na presença de OVA + LPS.**

DCs diferenciadas *in vitro* foram incubadas ou não com Boc-2 (100  $\mu$ M) por 15 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas e estimuladas com OVA + LPS (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL), OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL) por 18 horas. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados e a concentração das citocinas foram determinadas por ELISA, conforme descrito em material e métodos. Todas as amostras foram feitas em quaduplicatas e os resultados expressos com a média da concentração de cada citocina  $\pm$  DP. A linha pontilhada representa o limite de detecção correspondente a cada citocina. Resultado representativo de 2 experimentos. \*\*p < 0,05- células incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB comparadas às DCs estimuladas somente com OVA + LPS. \*p < 0,05- células pré- incubadas ou não com o Boc- 2 seguida da estimulação com OVA + LPS comparadas ao grupo de células mantidas em meio de cultura.

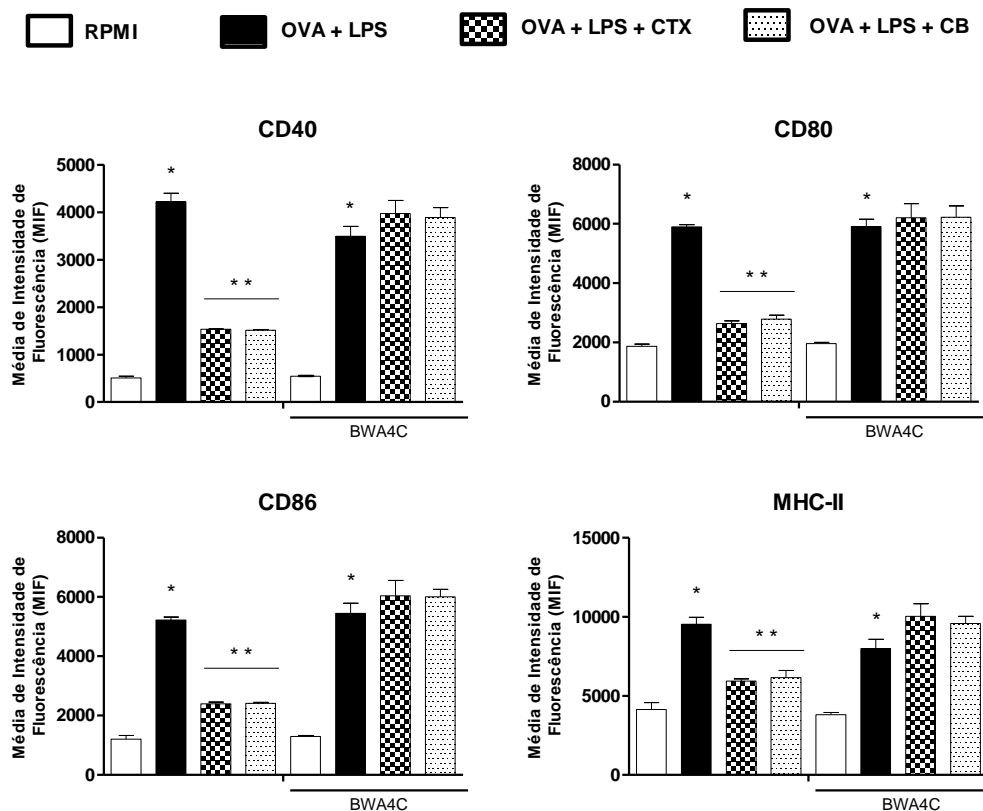


#### 6.4.7. O bloqueio da enzima 5-lipoxigenase abole o efeito modulador da CTX e CB sobre as DCs estimuladas com OVA + LPS

Tendo em vista os resultados anteriores mostrando o envolvimento do FPRs no efeito da CTX e CB sobre a maturação das DCs induzidas pelo LPS, e sabendo que o FPR2 se liga as lipoxina A4 (Migeotte *et al.*, 2006), o próximo passo do presente estudo foi avaliar a participação da enzima 5-lipoxigenase nas DCs estimuladas com OVA + LPS na presença ou não da CTX e CB.

Para tanto, DCs foram incubadas ou não com o inibidor seletivo da 5-lipoxigenase (BWA4C) por 18 horas concomitantemente com OVA + LPS, OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB. Posteriormente, foi avaliada a expressão das moléculas envolvidas na apresentação antigênica pelas DCs.

É possível verificar na figura 23 menor expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II nas DCs incubadas com CTX ou CB na presença de OVA + LPS em comparação com as células estimuladas somente com OVA + LPS. No entanto, esse efeito inibitório da CTX ou CB foi abolido quando as DCs foram pré-incubadas com BWA4C.

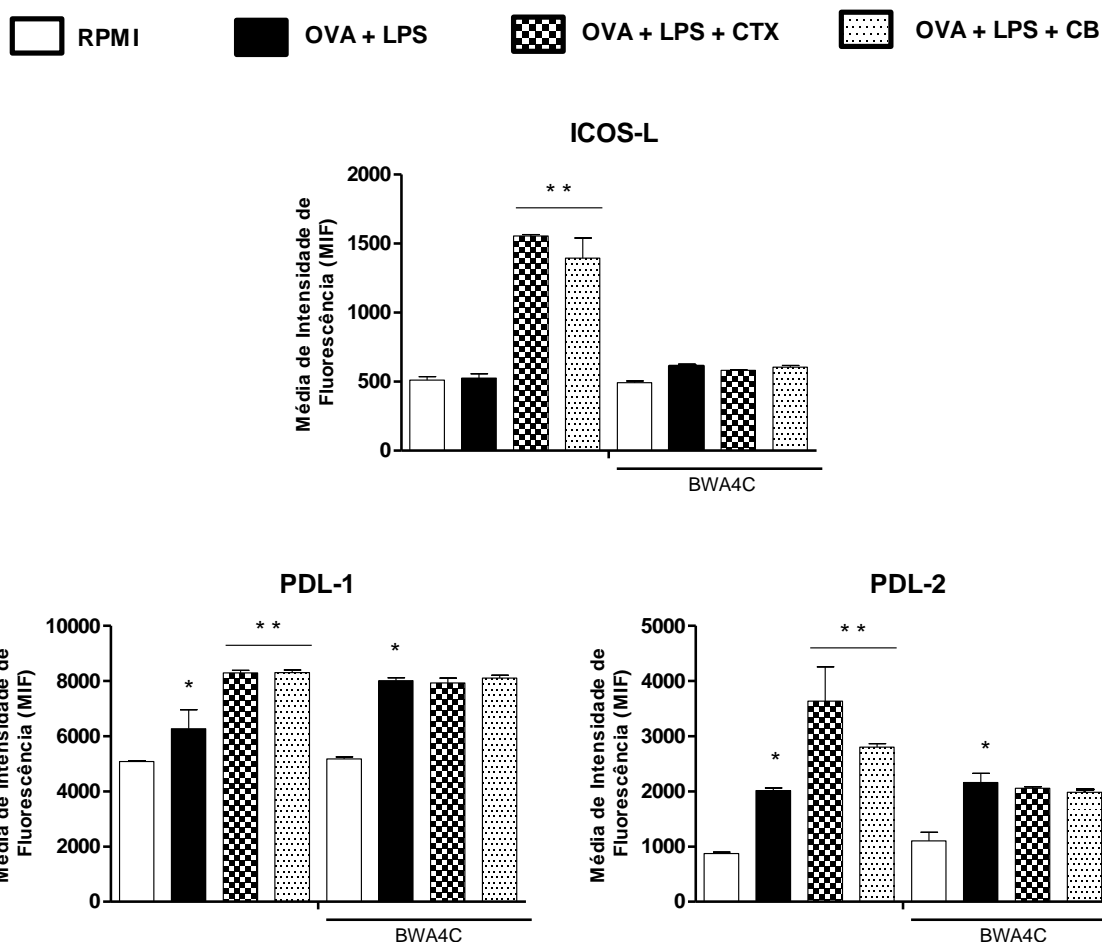


**Figura 23- Papel do inibidor seletivo das 5-lipoxigenases sobre o efeito da CTX e CB na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs estimuladas com OVA + LPS.**

DCs diferenciadas *in vitro* foram incubadas na presença ou não de BWA4C (10  $\mu$ M) por 18 horas simultaneamente com a OVA + LPS (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL), OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL). Após 18 horas de cultura, as suspensões celulares ( $0,5 \times 10^6$ ) foram marcadas com anticorpos anti-CD11c (PeCy7), FVS510 (AmCyan), CD40 (Pacific Blue), CD80 (APC), CD86 (PE) ou MHC-II (PerCP/Cy5.5) e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF) das DCs  $\pm$  desvio padrão das quadruplicatas. Resultado representativo de 2 experimentos. \*\*p < 0,05- células incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB comparadas às DCs estimuladas somente com OVA + LPS; \*p < 0,05- células incubadas com o BWA4C ou não, seguida da estimulação com OVA + LPS comparadas ao grupo de células mantidas em meio de cultura.

Analizamos também o efeito da CTX e CB sobre a expressão de ICOS-L e PDL1/2 nas DCs estimuladas com OVA + LPS incubadas ou não com o BWA4C. Pode-se observar na figura 24 que a incubação das DCs com OVA + LPS na ausência ou presença do BWA4C, promoveu aumento da expressão de PDL-1/2 em relação ao observado nas DCs mantidas em meio de cultura. Entretanto, o mesmo não foi observado em relação a molécula ICOS-L.

Os resultados também mostraram que a CTX e CB induziram nas DCs incubadas com OVA + LPS aumento da expressão de ICOS-L, PDL-1 e 2 em comparação às DCs estimuladas somente com OVA + LPS. Entretanto, o efeito potencializador da CTX ou CB na expressão de ICOS-L, PDL-1/2 nas DCs incubadas com OVA + LPS foi abolido com a pré-incubação com o BWA4C. Portanto, esses resultados mostram a participação da via da 5-lipoxigenase no efeito da CTX e CB sobre a expressão de ICOS-L, PDL-1 e PDL-2 nas DCs incubadas com OVA + LPS.

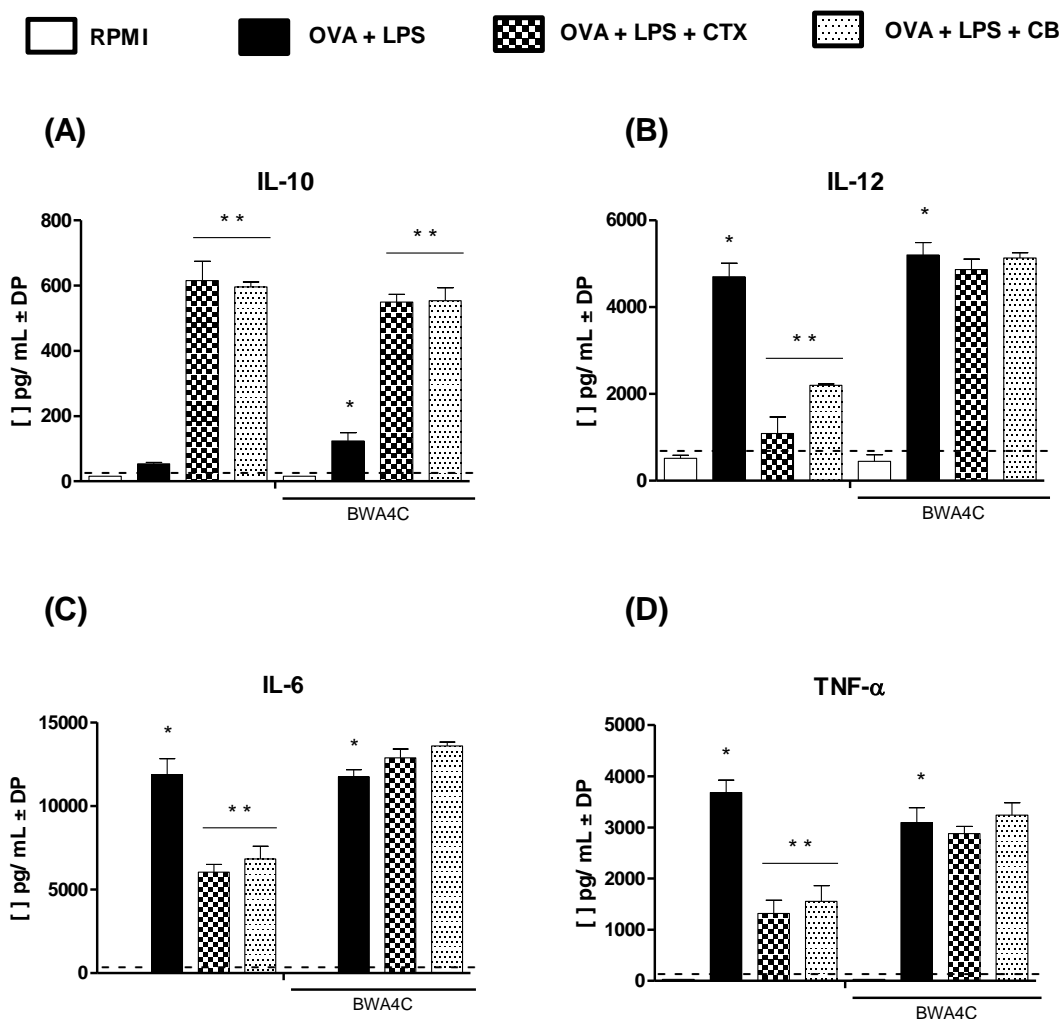


**Figura 24- Envolvimento da via da 5- lipoxigenase no efeito da CTX e CB sobre a expressão de moléculas ICOS-L e PDL-1/2 em DCs incubadas com OVA + LPS.**

DCs diferenciadas *in vitro* foram incubadas na presença ou não de BWA4C concomitantemente (10  $\mu$ M) com OVA + LPS (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL), OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL) por 18 horas. Em seguida, as suspensões dessas células (10<sup>6</sup>) foram marcadas com anti-CD11c (PeCy7), FVS510 (AmCyan), ICOS-L, PDL-1 e PDL-2 (PE) e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MFI) das DCs  $\pm$  DP das quadruplicatas. Resultado representativo de 2 experimentos. \*\*p < 0,05- células incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB comparadas às DCs estimuladas somente com OVA + LPS. \*p < 0,05- células incubadas com o BWA4C ou não simultaneamente com OVA + LPS ao grupo de células mantidas em meio de cultura.

As secreções das diferentes citocinas (IL-10, TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-12) também foram avaliadas nos sobrenadantes das culturas das DCs estimuladas como acima descrito. Os resultados mostraram que as DCs incubadas com OVA + LPS produziram altos níveis de citocinas pró-inflamatórias em relação às células mantidas em meio de cultura. Como mencionado anteriormente, efeito inibitório da CTX e CB sobre a secreção destas citocinas foi observado nas culturas de DCs incubadas com OVA + LPS. No entanto esse efeito foi abolido quando as DCs foram

incubadas com o inibidor da 5-lipoxigenase (Figura 25B-D). Com relação à secreção de IL-10, podemos verificar aumento da produção dessa citocina nas culturas de DCs estimuladas com OVA + LPS na presença de ambas toxinas em comparação ao obtido nas culturas de DCs incubadas somente com OVA + LPS. Além disso, o BWA4C não foi capaz de abolir esse efeito potencializador da CTX e CB sobre a produção de IL-10 nas DCs incubadas com a OVA + LPS (Figura 25 A).



**Figura 25- Produção de IL-10, IL-12, IL-6 e TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes das culturas de DCs incubadas com o BWA4C simultaneamente com a CTX ou CB na presença de OVA + LPS.**

DCs diferenciadas *in vitro* foram incubadas ou não com BWA4C (10  $\mu$ M) simultaneamente com a OVA + LPS (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL), OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200  $\mu$ g/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL). Após 18 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e analisados quanto a secreção das diferentes citocinas por ELISA. Resultados expressos com a média da concentração de cada citocina das amostras em quadruplicatas  $\pm$  DP. A linha pontilhada representa o limite de detecção do ensaio. Resultados representativos de 2 experimentos. \*\*p < 0,05- células incubadas ou não com o BWA4C, seguida da estimulação com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB comparados ao grupo OVA + LPS. \*\*p < 0,05- células incubadas ou não com o BWA4C, seguida da estimulação com OVA + LPS comparadas ao grupo de células mantidas em meio de cultura.

## 6.5. CO- CULTURA DE DCs COM LTs *IN VITRO*

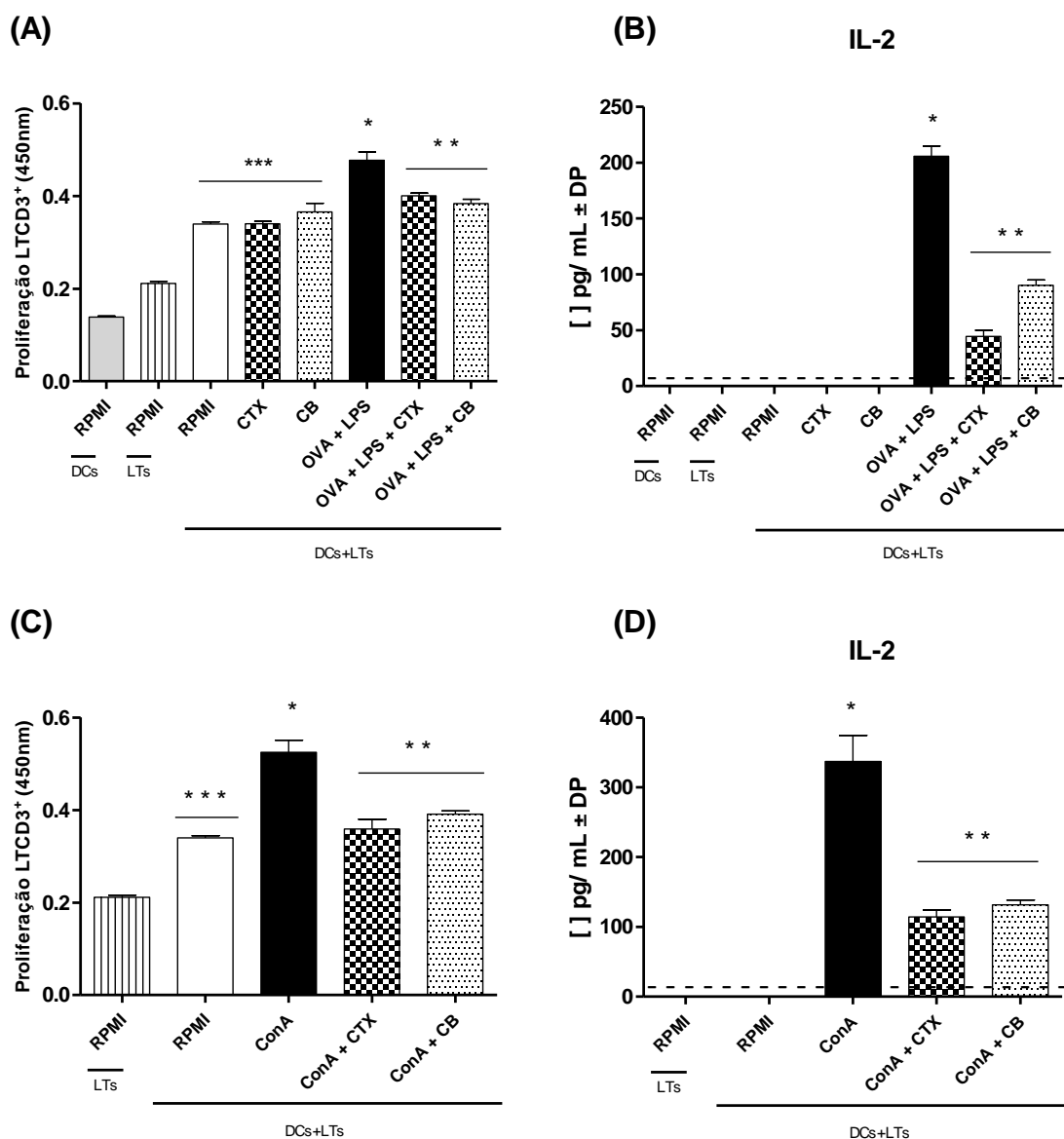
### 6.5.1. *CTX e CB inibem a proliferação e produção de IL-2 de LTCD3<sup>+</sup> co-cultivados com DCs incubadas com OVA + LPS ou ConA*

Uma vez que a CTX e CB modulam a maturação das DCs incubadas com OVA + LPS, avaliamos a capacidade destas células de induzir a proliferação de linfócitos TCD3<sup>+</sup> purificados de camundongos imunizados com OVA.

Para tanto, DCs foram mantidas em meio de cultura ou incubadas com OVA + LPS na presença ou não da CTX ou CB por 18 horas. Após esse período, as DCs foram co-cultivadas com LTCD3<sup>+</sup> purificados de camundongos imunizados com OVA por 72 horas para análise da proliferação celular e produção de IL-2. A resposta proliferativa dos LTCD3<sup>+</sup> também foi avaliada nas co-culturas com DCs previamente mantidas em meio de cultura e estimuladas com ConA, ConA + CTX ou ConA + CB.

Podemos observar na figura 26 (A-B) aumento da produção de IL-2 e elevada proliferação nas co-culturas de LTCD3<sup>+</sup> e DCs estimuladas com OVA + LPS em comparação com as co-culturas com DCs mantidas em meio de cultura. Em contraste, podemos observar diminuição de IL-2 e menor resposta proliferativa de LTCD3<sup>+</sup> co-cultivados com DCs previamente incubadas com CTX ou CB em conjunto com a OVA + LPS (Figura 26 A-B). Verificamos ainda, maior produção de IL-2 e proliferação de co-culturas de LTs + DCs em meio RPMI-S comparadas com monoculturas de DCs ou LTs mantidas em meio de cultura.

Os resultados mostraram também, maior resposta proliferativa e produção de IL-2 nas co-culturas de DCs com LTCD3<sup>+</sup> incubadas com ConA em relação as co-culturas mantidas em meio. Além disso, pudemos observar que a CTX ou CB adicionadas juntamente com a ConA nas co-culturas inibiram a proliferação e produção de IL-2 dos linfócitos TCD3<sup>+</sup> (Figura 26 C-D).



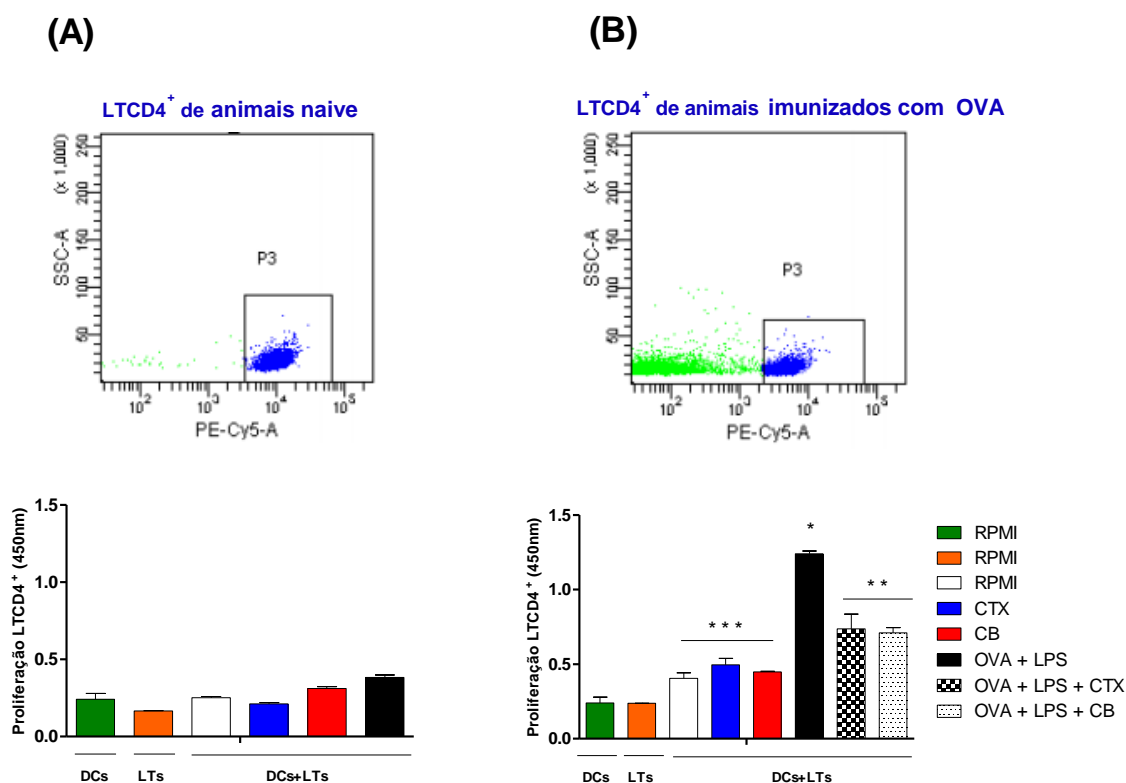
**Figura 26- Resposta proliferativa de LTCD3<sup>+</sup> co-cultivados com DCs pré-incubadas com CTX e CB na presença ou não de OVA + LPS ou ConA.**

DC diferenciadas *in vitro* foram incubadas durante 18 horas com CTX, CB (250 ng/mL); OVA + LPS (200 ug/mL + 250 ng/mL); OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200 ug/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL). Após esse período, as DCs ( $0,6 \times 10^5$ ) foram co-cultivadas com linfócitos CD3<sup>+</sup> ( $3 \times 10^5$ ) purificados por sistema de seleção positiva a partir de camundongos BALB/c imunizados com a OVA. Co-culturas de DCs com LTCD3<sup>+</sup> também foram incubadas com a ConA (1,25 ug/mL), ConA + CTX ou ConA + CB (1,25 ug/mL + 250 ng/mL). Após um período de 72 horas, foi analisada a resposta proliferativa de LTs utilizando o Kit "Cell proliferation ELISA Biotrak System version 2". Os sobrenadantes das co-culturas foram coletados e a concentração de IL-2 foi analisada por ELISA, a partir da curva-padrão da citocina recombinante. \*\*p < 0,05- Co-culturas de DCs com LTs estimuladas com OVA + LPS + CTX, OVA + LPS + CB, ConA + CTX, ConA + CB comparadas às co-culturas incubadas somente com OVA + LPS ou ConA. \*p < 0,05- células incubadas com OVA + LPS ou ConA na presença de ambas toxinas comparadas às co-culturas mantidas em meio de cultura. \*\*\*p < 0,05- co-culturas de DCs + LTs em meio RPMI-S comparadas com monoculturas de DCs ou LTs mantidas em meio de cultura.

### 6.5.2. Proliferação de LTCD4<sup>+</sup> OVA-específicos é inibida na co-cultura com DCs estimuladas com OVA + LPS na presença de CTX ou CB

O efeito das toxinas sobre a capacidade das DCs de ativar os linfócitos T também foi avaliado em co-culturas com linfócitos CD4<sup>+</sup> de animais não-imunizados ou previamente imunizados com OVA. Para tanto, a população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> foi obtida por *cell sorting* de acordo com a figura 27. Pudemos verificar que não houve aumento na proliferação de células CD4<sup>+</sup> obtidos de animais *naives* co-cultivados com DCs estimuladas com CTX, CB ou OVA + LPS, assim como nas culturas mantidas em meio (Figura 27 A-B).

A resposta proliferativa de LTCD4<sup>+</sup> (obtido dos animais imunizados com a OVA) foi aumentada quando co-cultivados com as DCs incubadas somente com OVA + LPS em comparação com as co-culturas mantidas em RPMI-S (Figura 27 B). Por outro lado, os resultados mostraram que as DCs previamente incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB induziram menor proliferação das células TCD4<sup>+</sup> OVA-específicas em comparação com as DCs estimuladas somente com OVA + LPS.



**Figura 27- Resposta proliferativa de LTCD4<sup>+</sup> co-cultivados com DCs pré-incubadas com CTX e CB na presença ou não de OVA + LPS.**

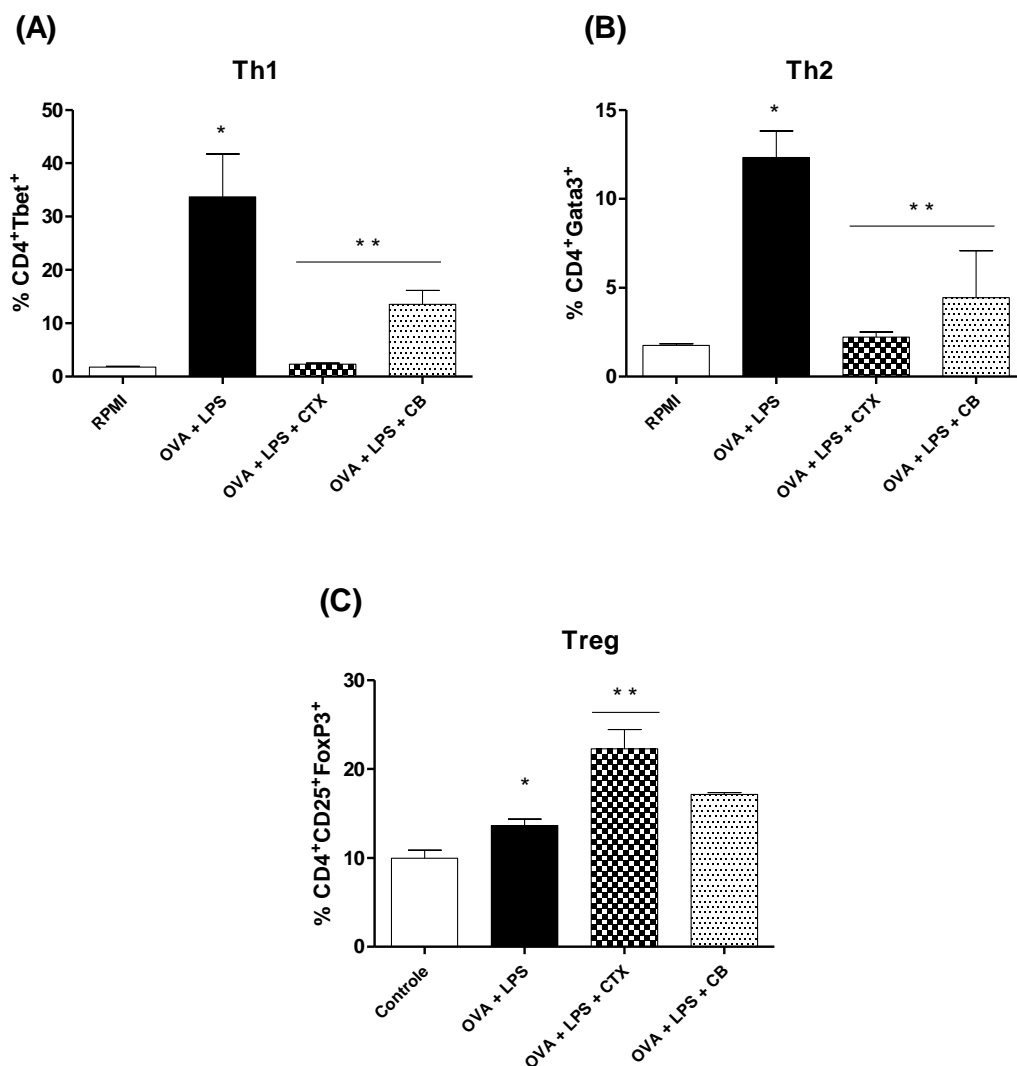
iDC diferenciadas *in vitro* foram incubadas durante 18 horas com CTX, CB (250 ng/mL); OVA + LPS (200 ug/mL + 250 ng/mL); OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200 ug/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL). Camundongos BALB/c foram imunizados com a OVA ou não imunizados (naives). Após 7 dias de imunização, suspensões celulares de linfonodos inguinais e periaorticos foram obtidas e marcadas com anti- CD4 PECy5. DCs ( $0,5 \times 10^5$ ) foram co-cultivadas com linfócitos CD4<sup>+</sup> ( $2,5 \times 10^5$ ) purificados. Após um período de 72 horas, analisou-se a resposta proliferativa de LTs utilizando o Kit “Cell proliferation ELISA Biotrak System version 2”. Resultado representativo de 1 experimento para os animais naives e de 2 experimentos para os animais imunizados com a OVA. \*\*p < 0,05- células incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB, comparadas às co-culturas estimuladas somente com OVA + LPS. \*p < 0,05- células incubadas com OVA + comparadas às co-culturas mantidas em RPMI-S. \*\*\*p < 0,05- co-culturas de DCs + LTs em meio RPMI-S comparadas com monoculturas de DCs ou LTs mantidas em meio de cultura.

**6.5.3. CTX e CB modulam a expressão de Tbet, Gata-3 e FoxP3 em LTCD4<sup>+</sup> obtidos de animais DO 11.10 co-cultivados com DCs estimuladas com a OVA + LPS**

Sabendo que houve diminuição da proliferação de LTCD4<sup>+</sup> em camundongos imunizados a OVA quando co-cultivados com as DCs, o próximo objetivo do estudo foi investigar o efeito das toxinas sobre o fenótipo de células TCD4<sup>+</sup> OVA-específicos diferenciados pelas DCs incubadas com OVA + LPS. Para tanto, utilizamos LTCD4<sup>+</sup> purificados por *cell sorting* de camundongos transgênicos para o peptídeo de OVA (DO11.10). Essas células CD4<sup>+</sup> foram co-cultivadas com DCs na presença de OVA + LPS, OVA + LPS + CTX, OVA + LPS + CB ou mantidas em meio de cultura por 4 dias.

Na figura 28 (A-B), observamos que as co-culturas de LTCD4<sup>+</sup> com DCs estimuladas com OVA + LPS apresentaram um maior percentual de células CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Gata3<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> em relação às mesmas células mantidas em meio de cultura. Além disso, verificamos menor porcentagem de células CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>Gata3<sup>+</sup>, correspondentes as subpopulações Th1 e Th2, nas co-culturas com DCs incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB comparando com as mesmas co-culturas de LTCD4<sup>+</sup> e DCs incubadas somente com a OVA + LPS. Entretanto somente a CTX foi capaz de aumentar a população de células Treg em LTCD4<sup>+</sup> co-cultivados com DCs incubadas com OVA + LPS (Figura 28C).





**Figura 28- Porcentagem de células CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Gata3<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> em co-culturas com DCs incubadas com CTX e CB na presença ou não de OVA + LPS.**

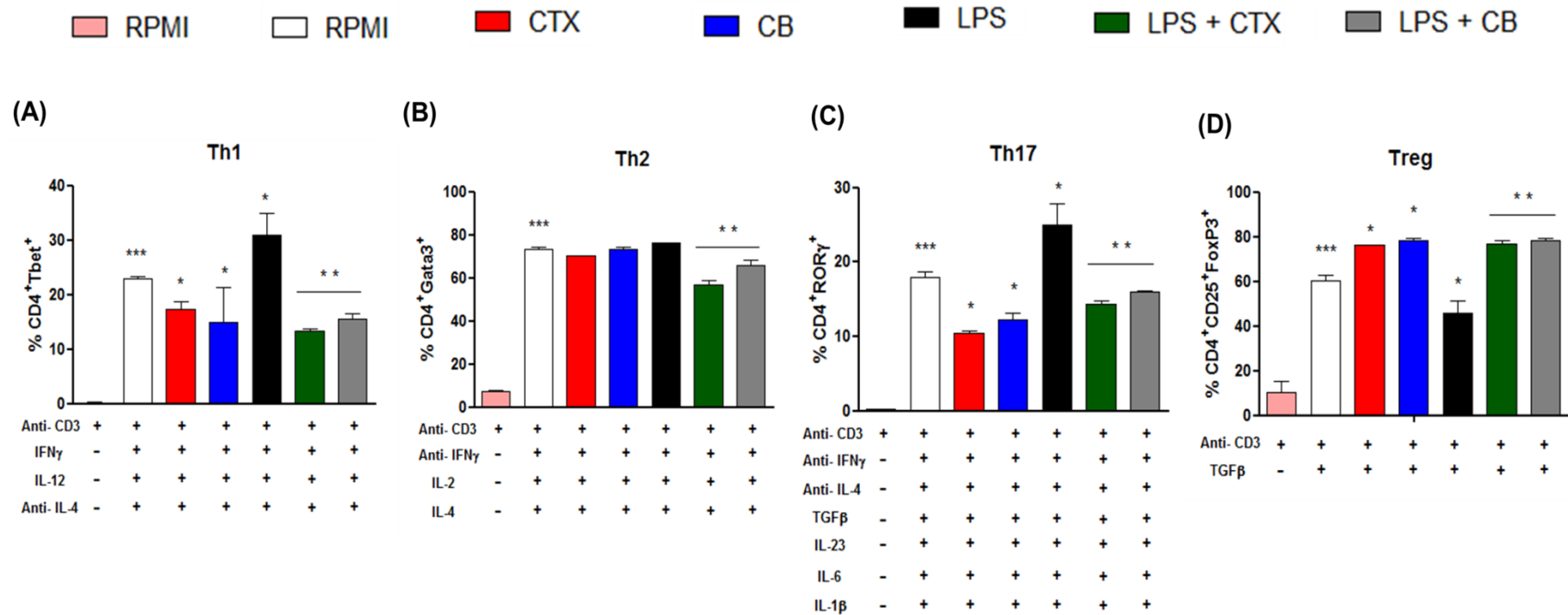
Suspensão celular de linfonodos inguinais, periaorticos e baço de animais DO11.10 foram obtidas e marcadas com anti-CD4 PEcy5, seguido de purificação por sistema de sorting. iDC ( $0,5 \times 10^5$ ) foram co-cultivadas com linfócitos CD4<sup>+</sup> ( $2,5 \times 10^5$ ) e estimuladas com OVA + LPS (200 ug/mL + 250 ng/mL); OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB (200 ug/mL + 250 ng/mL + 250 ng/mL). Após 4 dias de incubação, as co-culturas foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 (PEcy5), FVS510 (AmCyan), anti-Tbet e anti-Gata3 (PE) e analisadas por Facs. Todas as amostras foram feitas em quadruplicatas e os dados foram expressos como porcentagem de células CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup> (Th1) CD4<sup>+</sup>Gata 3<sup>+</sup> (Th2) ou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Treg). Resultado representativo de 2 experimentos.\*\*p < 0,05- co-culturas de DCs e LTCD4<sup>+</sup> incubadas com OVA + LPS + CTX ou OVA + LPS + CB, comparadas às co-culturas incubadas somente com OVA + LPS. \*p < 0,05- células incubadas com OVA + LPS comparadas às co-culturas mantidas em RPMI-S.

#### 6.5.4. CTX e CB interferem na diferenciação de subpopulações de LTCD4<sup>+</sup> co-cultivados com DCs estimuladas com LPS

Visto que não observamos células CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ <sup>+</sup> (Th17) nas co-culturas de TCD4<sup>+</sup> com DCs incubados com OVA + LPS na presença ou não de CTX ou CB, utilizamos um outro protocolo experimental de diferenciação das subpopulações de LTCD4<sup>+</sup> *in vitro* para analisar o efeito das toxinas sobre esse processo. Para tanto, LTCD4<sup>+</sup> de animais Balb/c foram co-cultivados por 4 dias com as DCs estimuladas com LPS, LPS + CTX ou LPS + CB na presença de anti-CD3, citocinas recombinantes e/ou anticorpos neutralizantes de citocinas.

Nossos resultados mostraram que o protocolo de diferenciação das subpopulações de linfócitos T foi eficiente gerando células CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Gata-3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> nas co-culturas de DCs nas diferentes condições *in vitro* em relação às mesmas co-culturas (controle negativo da diferenciação) incubadas somente com as DCs e anti-CD3 (Figura 29 A-D). A adição da CTX ou CB às co-culturas com DCs e as citocinas recombinantes ou anticorpos neutralizantes promoveu inibição da porcentagem de células Th1 (CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup>), Th17 (CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) e aumento da porcentagem de células Tregs (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) (Figura 29 A, C e D).

Além disso, pudemos observar que o LPS potencializou a diferenciação de células CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> nas co-culturas com as DCs em relação as co-culturas mantidas em meio de cultura na presença de citocinas recombinantes e anti-CD3. Verificamos ainda, que a CTX e CB foram capazes de modular a diferenciação das subpopulações de LTCD4 co-cultivados com DCs na presença de LPS, ou seja, inibição da diferenciação de células Th1, Th2 e Th17, em contrapartida com aumento das células Tregs (Figura 29 A-D).



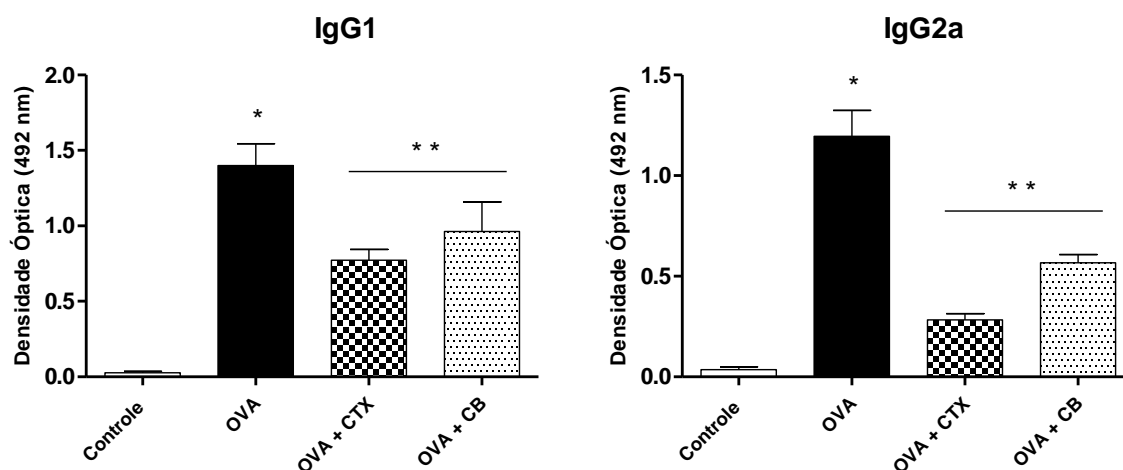
**Figura 29- Análise do efeito da CTX e CB sobre a diferenciação de LTCD4<sup>+</sup> incubados com DCs diferenciadas *in vitro* e estimuladas com LPS.** Linfócitos TCD4<sup>+</sup> obtidos por *cell sorting* de camundongos BALB/c virgens (2,5X10<sup>5</sup>) foram coletados a partir dos linfonodos inguinais, periaorticos e baço. Em seguida LTCD4<sup>+</sup> foram cultivados com as DCs (0,5X10<sup>5</sup>) simultaneamente com a CTX, CB (250 ng/mL), LPS (250 ng/mL), LPS + CTX, LPS + CB (250 ng/mL + 250 ng/mL) ou mantidas em meio de cultura. Além disso, para obtenção de células diferenciadas nas populações Th1, Th2, Th17 e Treg, 2X10<sup>5</sup> de células T CD4<sup>+</sup> foram ativadas com anti-CD3 concomitantemente com citocinas recombinantes e anticorpos neutralizantes anti-citocinas que promovem a diferenciação dos LTs, de acordo com a descrição em materiais e métodos. Após 4 dias de incubação, as co-culturas foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 (PECy5), anti-CD4/CD25 (PECy5/CD25), FVS510 (AmCyan), anti-Tbet, anti-Gata 3, anti-ROR $\gamma$ t e anti-FoxP3 (PE) e analisadas por FACS. Todas as amostras foram feitas em triplicatas e os dados foram expressos como porcentagem de subpopulações de linfócitos T correspondentes a Th1, Th2, Th17 e Treg. Resultado representativo de 3 experimentos. \*\*p < 0,05- co-culturas de DCs e LTCD4<sup>+</sup> incubadas com LPS + CTX ou LPS + CB, comparadas às co-culturas estimuladas somente com LPS. \*p < 0,05- células incubadas com CTX, CB ou LPS comparadas às co-culturas mantidas em RPMI-S. \*\*\*p < 0,05- co-culturas de LTCD4<sup>+</sup> e DCs na ausência de citocinas recombinantes em relação às co-culturas com as citocinas

## 6.6. MODELO *IN VIVO*

### 6.6.1. CTX e CB administradas *in vivo* inibem a produção de anticorpos anti-OVA, a proliferação de linfócitos totais e produção de citocinas pró-inflamatórias

Em vista dos resultados *in vitro* mostrando o efeito modulador da CTX e CB sobre as DCs e conseqüente proliferação e diferenciação dos linfócitos T, avaliamos o efeito da administração *in vivo* destas moléculas sobre a geração da resposta adaptativa anti-OVA. Para isto, camundongos BALB/c foram imunizados com OVA e após 1h receberam CTX ou CB. No sétimo dia, foi analisada a produção de anticorpos anti-OVA, a resposta proliferativa OVA-específica e secreção de IL-2 e IFN- $\gamma$  em suspensões celulares obtidas dos linfonodos periaórticos e inguinais dos diferentes grupos experimentais.

A figura 30 mostra que os animais imunizados com a OVA e que receberam a CTX ou CB produziam níveis menores de IgG1 e IgG2a anti-OVA quando comparado ao grupo de animais que receberam somente a OVA.



**Figura 30- Produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti- OVA em camundongos imunizados com a OVA que receberam ou não a CTX ou CB.**

Grupos de 5 camundongos BALB/c foram injetados com PBS (controle) ou imunizados com a OVA (200  $\mu$ g/animal) emulsificada em Montanide na base da cauda. Após 1 hora de imunização com a OVA, esses animais receberam 20  $\mu$ L de CTX ou CB (5  $\mu$ g/animal) no coxim plantar direito e esquerdo. No sétimo dia de imunização, o plasma foi obtido com o auxílio de uma seringa e os animais foram sangrados pelo coração. Para obtenção do soro, as amostras foram incubadas a 37°C por 1h e posteriormente foram centrifugadas a 181 x g por 10min. A produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti- OVA

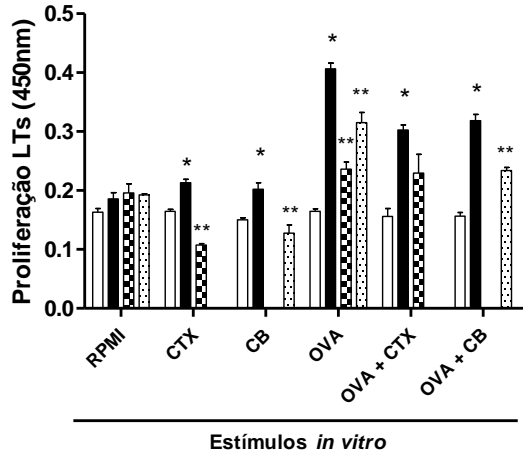
nos soros foi determinada por ELISA. Resultado representativo de 5 experimentos. \*\*p < 0,05- grupos de animais imunizados com OVA + CTX ou OVA + CB comparado aos camundongos imunizados somente com OVA. Os resultados foram expressos como a média da DO dos soros individuais na diluição 1/200 para IgG1 e 1/10 para IgG2a ± DP. \*p < 0,05- grupos de animais imunizados com OVA comparado aos camundongos injetados com PBS.

Na figura 31 podemos observar alta resposta proliferativa na suspensão de células de camundongos imunizados com OVA quando estimuladas com OVA ou ConA em relação ao obtido nas células de animais não-imunizados. A CTX e CB não induziram a proliferação de células dos camundongos imunizados com OVA que receberam CTX ou CB. Além disso, verificamos menor proliferação OVA-específica ou mitogênica nas suspensões de células de animais imunizados com OVA que receberam a CTX ou CB quando estimuladas *in vitro* com OVA, OVA + CTX, OVA + CB, ConA, ConA + CTX ou ConA + CB quando comparada à obtida na suspensão de células de camundongos imunizados com a OVA e estimuladas da mesma maneira *in vitro* (Figura 31A-B).

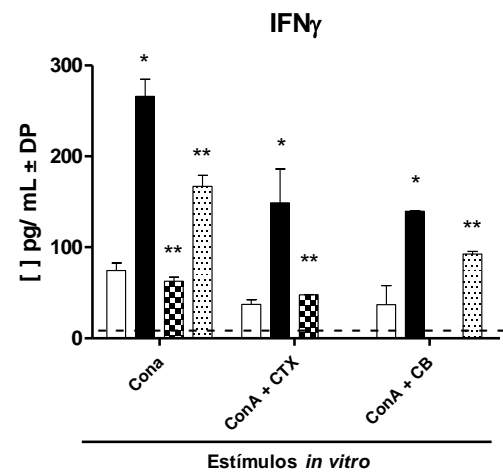
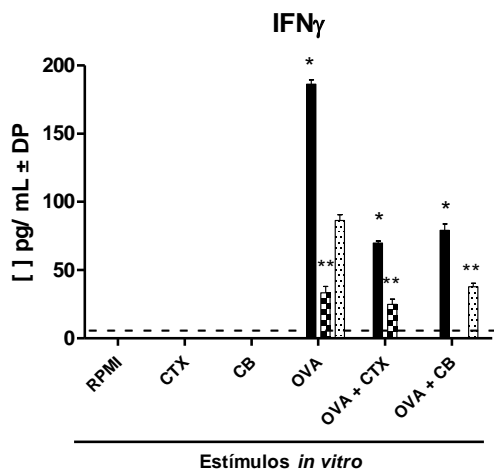
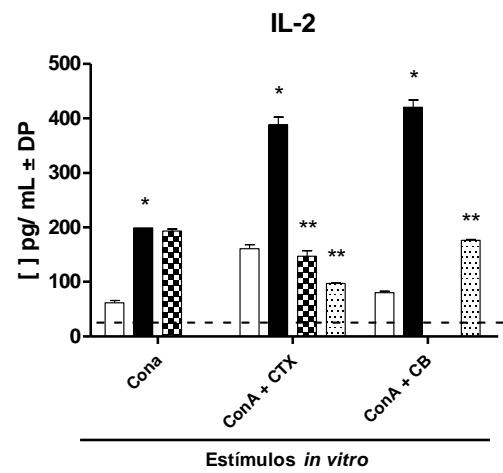
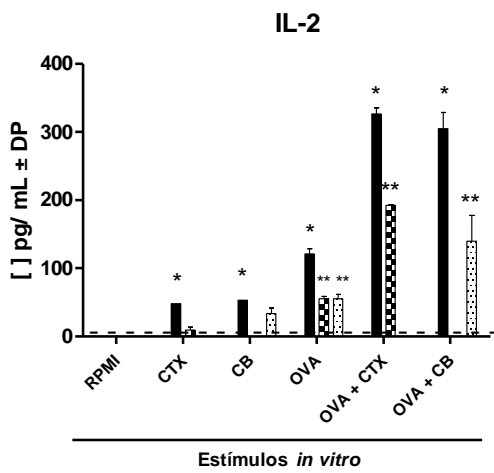
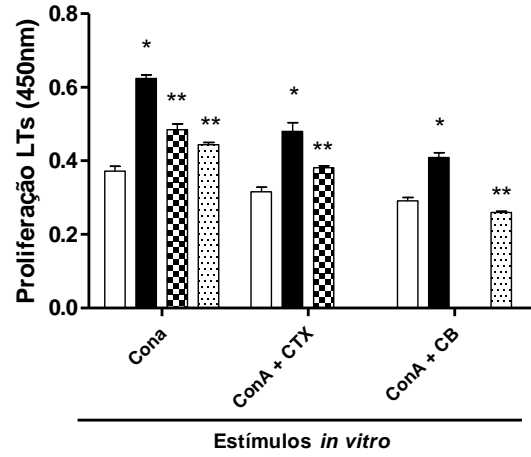
Como pode ser observado na figura 31, houve maior produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  na suspensão de células de camundongos imunizados com OVA quando estimuladas com OVA ou ConA em relação ao obtido nas células de animais não-imunizados. A CTX e CB não induziram a produção dessas citocinas pelas células de camundongos imunizados com OVA que receberam CTX ou CB. Além disso, verificamos menor produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  nas suspensões de células de animais imunizados com OVA que receberam a CTX ou CB quando estimuladas *in vitro* com OVA, OVA + CTX, OVA + CB, ConA, ConA + CTX ou ConA + CB quando comparada à obtida na suspensão de células de camundongos imunizados com a OVA e estimuladas da mesma maneira *in vitro*.



(A)



(B)

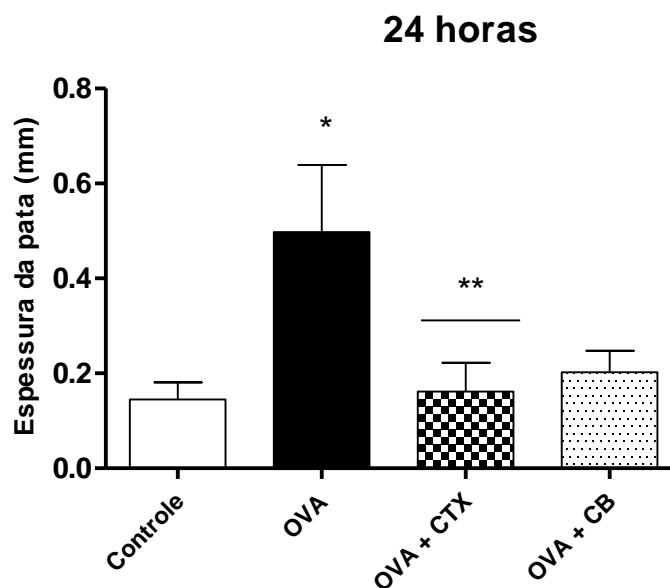


**Figura 31- Resposta proliferativa e produção de citocinas em cultura de células de camundongos não imunizados ou imunizados com a OVA que receberam ou não a CTX ou CB.**

Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados com OVA (200 µg/animal) emulsificada em Montanide ou injetados com PBS (controle) na base da cauda. Após 1 hora de imunização com a OVA, esses animais receberam 20 µL de CTX ou CB (5 µg/animal) no coxim plantar direito e esquerdo. No sétimo dia de imunização, suspensão celular ( $3 \times 10^5$ ) preparada a partir de linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos BALB/c foram incubadas ou não por 72 horas com OVA ou ConA na presença ou não de CTX ou CB em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> umidificada. Após esse período, foi avaliado a resposta proliferativa dos LTs totais (A) utilizando o Kit "Cell proliferation ELISA Biotrak System version 2". Os sobrenadantes das co-culturas de células ( $5 \times 10^5$ ) foram coletados e a concentração de IL-2 e IFN $\gamma$  foram analisadas por ELISA, a partir da curvas-padrão das citocinas recombinantes correspondentes. \*\*p < 0,05- grupos de LTs incubados com OVA + CTX, OVA + CB, ConA + CTX ou ConA +CB obtidos de animais imunizados com OVA/CTX ou OVA/CB comparados aos LTs estimulados com a OVA ou ConA provenientes de camundongos imunizados somente com a OVA. \*p < 0,05- grupos de células de animais imunizados com OVA e incubados com CTX, CB na presença ou não de OVA ou ConA comparados aos LTs de camundongos injetados com a salina e estimulados com os mesmos antígenos.

*6.6.2. Efeito inibitório da CTX na reação de hipersensibilidade tardia*

Os resultados anteriores mostraram que a CTX e CB inibem a produção de anticorpos anti-OVA, proliferação de linfócitos totais, assim como a produção de IL-2 e IFN $\gamma$ . Somado à esses resultados, avaliamos o efeito de ambas toxinas em ensaio de DTH. Na figura 32 podemos observar que os animais imunizados com a OVA e que receberam a OVA agregada apresentaram aumento da espessura da pata em relação ao obtido nos camundongos não-imunizados. Além disso, verificamos inibição da medida da pata nos animais imunizados com a OVA e que receberam a CTX em relação ao grupo de animais imunizados somente com a OVA. Entretanto, o mesmo não foi observado em relação ao grupo de animais que receberam a CB (Figura 32).



**Figura 32-** Reação de hipersensibilidade tardia em camundongos imunizados ou não com a OVA e que receberam ou não a CTX ou CB.

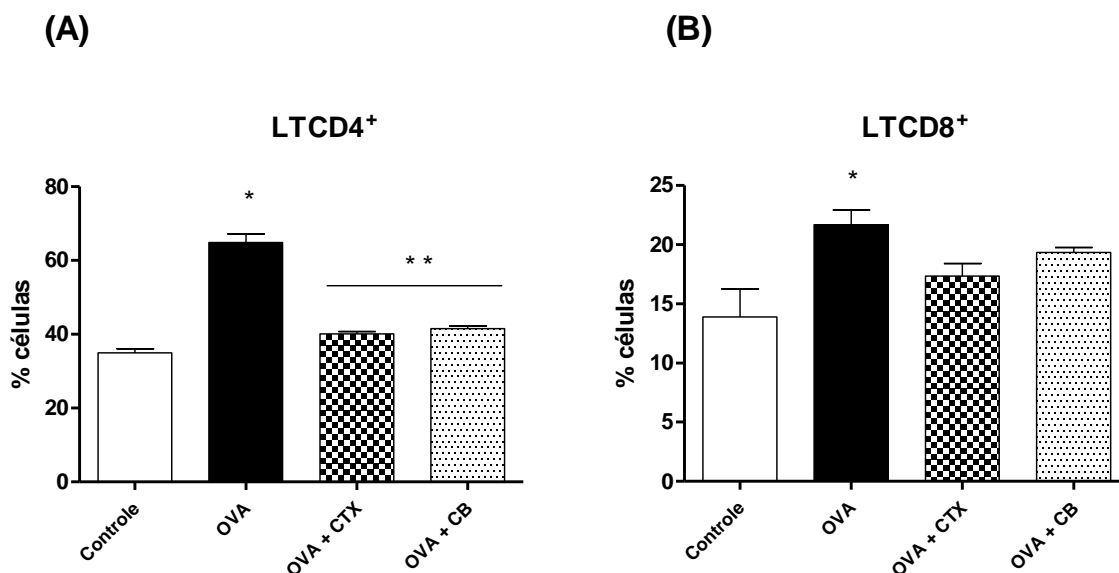
Grupos de 4 camundongos BALB/c foram imunizados com a OVA (200 µg/animal) emulsificada em Montanide ou injetados com PBS (controle) na base da cauda. Após 1 hora de imunização com a OVA, esses animais receberam 20 µL de CTX ou CB (5 µg/animal) no coxim plantar direito e esquerdo. No 8º após a imunização, os camundongos foram injetados com 30 µL de OVA agregada na pata traseira esquerda e o mesmo volume de solução salina na pata traseira direita. O inchaço da pata foi medido com paquímetro 24h após a injeção da salina ou OVA agregada. Resultados expressos como a diferença entre a espessura das patas ± DP dos animais/grupo. Resultado representativo de 1 experimento. \*\*p < 0,05- grupo de animais imunizados com OVA que receberam a CTX comparado aos camundongos imunizados somente com OVA. \*p < 0,05- grupo de animais imunizados com OVA comparado aos camundongos injetados com PBS.

### 6.6.3. A administração *in vivo* da CTX e sua subunidade CB resulta em menor porcentagem de células T CD4<sup>+</sup>, mas não CD8<sup>+</sup> em camundongos imunizados com OVA

Neste tópico foi analisada a quantidade de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> presentes nos linfonodos dos diferentes grupos experimentais imunizados com a OVA que receberam ou não a CTX ou CB. Na figura 33 A e B, podemos observar que o grupo de animais BALB/c imunizados com a OVA apresentaram aumento significativo do percentual de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quando comparada aos animais injetados somente com a salina. Verificamos ainda na figura 33 A, que a administração da CTX e CB foi capaz de suprimir a quantidade de células CD4<sup>+</sup> em animais imunizados com a OVA em relação ao obtido em animais imunizados com a OVA.



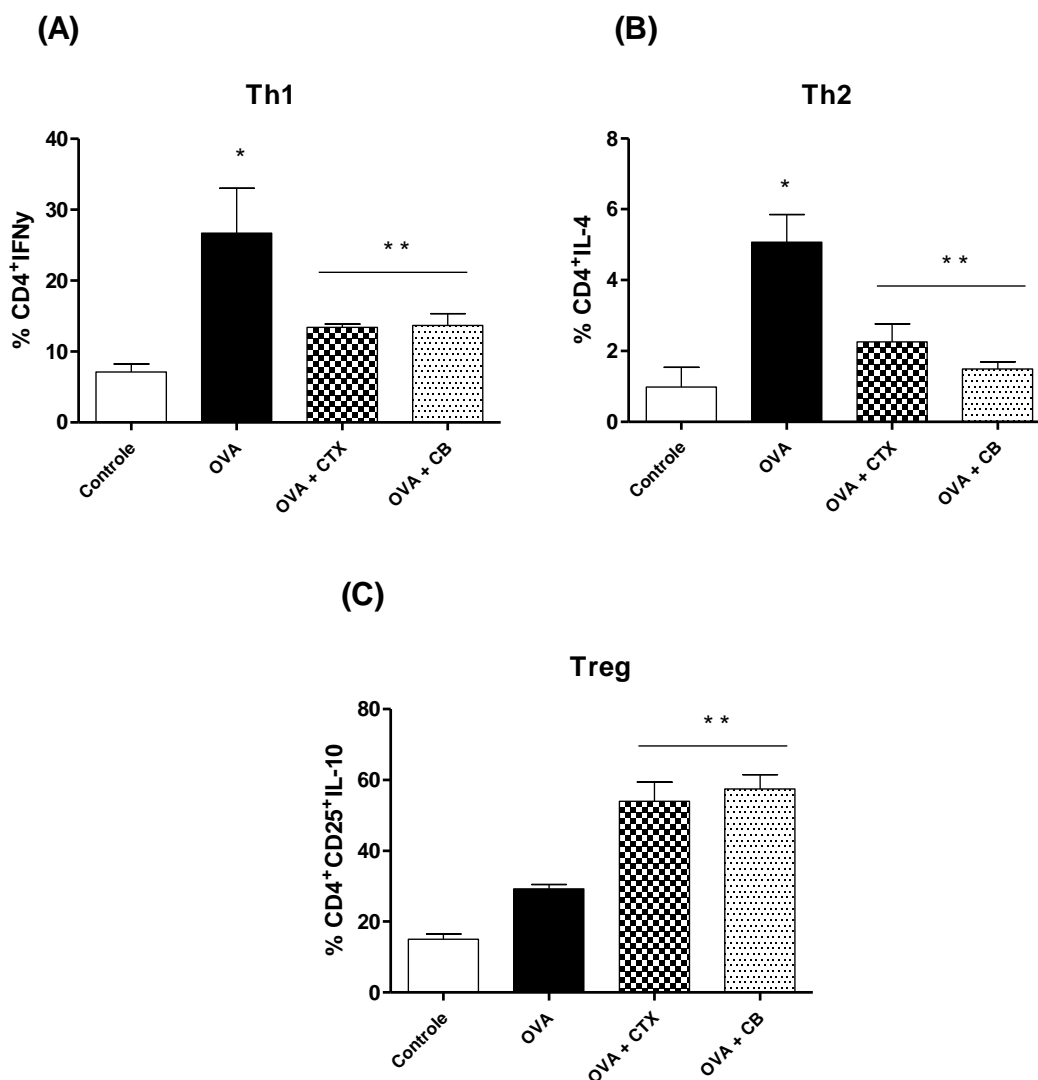
Quanto aos linfócitos CD8<sup>+</sup>, não houve diferença estatística entre os grupos de animais imunizados com a OVA e os que receberam a CTX ou CB (Figura 33B).



**Figura 33- Porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> obtidos de animais imunizados com a OVA que receberam ou não a CTX ou CB.**

Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados com OVA (200 µg/animal) emulsificada em Montanide ou injetados somente com a salina (controle) na base da cauda. Após 1 hora de imunização com a OVA, esses animais receberam 20 µL de CTX ou CB (5 µg/animal) no coxim plantar direito e esquerdo. No 11<sup>o</sup> dia de imunização, suspensão celular obtidos de linfonodos inguinais e periaórticos dos animais individuais ( $1 \times 10^6$ ) foram preparadas marcadas com anticorpos monoclonais para CD4 (PECy5), CD8 (FITC) e FVS510 (AmCyan), e analisadas por citometria de fluxo. Os dados foram expressos como porcentagem de populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Resultado representativo de 3 experimentos. \*\*p < 0,05- grupos de animais imunizados com OVA + CTX ou OVA + CB comparado aos camundongos imunizados somente com OVA. \*p < 0,05- grupos de animais imunizados com OVA comparada aos camundongos injetados somente com PBS.

Nossos resultados mostraram que os animais imunizados com a OVA induziram aumento das células CD4<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, correspondentes as subpopulações Th1 e Th2, respectivamente, em relação aos animais injetados com a salina. Além disso, os animais imunizados com a OVA e que receberam a CTX ou CB, induziram menor porcentagem de células CD4<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em relação aos grupos de camundongos imunizados somente com a OVA (Figura 34A-B). Em contraste, aumento da porcentagem de células CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> foi observado nos animais imunizados com a OVA e que receberam a CTX ou CB em comparação ao obtido nos camundongos imunizados somente com a OVA (Figura 34C).



**Figura 34- Expressão de citocinas IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10 obtidas de animais imunizados com a OVA e que receberam ou não a CTX ou CB.**

Grupos de 4 camundongos BALB/c foram imunizados com OVA (200  $\mu$ g/animal) emulsificada em Montanide ou injetados com PBS (controle) na base da cauda. Após 1 hora de imunização com a OVA, esses animais receberam 20  $\mu$ L de CTX ou CB (5  $\mu$ g/animal) no coxim plantar direito e esquerdo. No 11<sup>o</sup> dia de imunização, suspensão celular preparada a partir de linfonodos inguinais e periaórticos ( $1 \times 10^6$ ) dos animais foram plaqueadas e incubadas com ionomicina e brefeldina por 4h em estufa de CO<sub>2</sub>. Subsequentemente, as células foram marcadas com anti-CD4<sup>+</sup> (PECy5) ou CD4<sup>+</sup>/CD25 (PECy5/CD25) por 30 min a 4<sup>o</sup>C. Após a marcação de superfície, os linfócitos foram incubados com o reagente de viabilidade FVS510 (AmCyan) por 15 min em TA, seguido de marcação com anticorpos monoclonais intracelulares para IFN $\gamma$ , IL-4 e FoxP3 (PE) e analisadas por citometria de fluxo. Os dados foram expressos como porcentagem de células positivas para CD4<sup>+</sup> e as citocinas, tendo como parâmetro os FMOs correspondentes a cada citocina. Resultado representativo de 3 experimentos. \*\*p < 0,05- grupos de animais imunizados com OVA + CTX ou OVA + CB comparados aos camundongos imunizados somente com OVA.\*p < 0,05- grupo de animais imunizados com OVA comparada aos camundongos injetados somente com PBS.

## 7. DISCUSSÃO

Como previamente descrito, a CTX, principal toxina do veneno de *C. d. terrificus*, além de apresentar suas atividades biológicas clássicas, também exerce atividade moduladora sobre o sistema imune (Sampaio *et al.*, 2010). Somado a isso, outros estudos enfatizam que a atividade de CTX sobre o sistema imune pode ser mediada por sua subunidade CB (Landucci *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2005; Zambelli *et al.*, 2008).

Em vista destas observações e observando que as DCs são as principais células iniciadoras de uma resposta imune adaptativa, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da CTX e sua subunidade CB sobre a maturação das DCs e consequente interação com os linfócitos T em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Em primeira instância, foi necessário isolar a CTX e a CB utilizando as metodologias já previamente descritas. A análise das toxinas por eletroforese em gel de poliacrilamida permitiu verificar a eficiência do método de purificação quanto à pureza e integridade das amostras obtidas. Portanto, os perfis de migração eletroforética das amostras em condição redutora mostraram a presença de uma banda com massa molecular de aproximadamente 15 kDa correspondente a subunidade CB, tanto no veneno total como nas amostras de CTX e CB isolada, o que está de acordo com o descrito na literatura (Rangel-Santos, Dos-Santos, *et al.*, 2004). Isso ocorre devido à dissociação das subunidades CA e CB, quando na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e SDS aparecendo no gel predominantemente sob a forma de monômeros (Habermann e Breithaupt, 1978). Além disso, nesse gel não observamos a presença da subunidade CA, possivelmente pela sua baixa massa molecular e maior migração. Em vista disso, foi realizada uma análise eletroforética, em gel contendo tricina, e foi observada uma banda única com massa molecular de aproximadamente 10 kDa correspondente à subunidade CA da CTX.

O próximo passo foi avaliar a atividade fosfolipásica nas amostras de CTX, CB e CA submetidas ou não à coluna de polimixina. Pudemos observar que a atividade enzimática da CTX e CB, em ambas as condições, esteve preservada quando comparada a CA, que por sua vez não apresenta atividade fosfolipásica (controle negativo). Além disso, verificamos que a amostra de subunidade CB teve a

atividade fosfolipásica mais intensa, quando comparada à da CTX. Isso se deve ao fato de que no ensaio utilizamos a mesma concentração de ambas as toxinas (250 ng) e, portanto a subunidade CB isolada foi adicionada ao substrato em concentração molar maior do que a equivalente à CTX, uma vez que o complexo é formado pela associação das subunidades CA e CB. Nossos resultados estão em consonância com o trabalho de Rangel- Santos e colaboradores (Rangel-Santos, Dos-Santos, *et al.*, 2004) mostrando que a CTX obtida da *C. d. terrificus* e ainda, sua subunidade CB apresentam atividade fosfolipásica.

Em trabalho publicado em 2018, nós mostramos que a CTX ou CB (250 ng/mL) são capazes de inibir a maturação de DCs incubadas com LPS, uma vez que verificamos menor expressão de moléculas coestimuladoras, MHC-II e produção de citocinas pró-inflamatórias e ainda, menor ativação das vias de sinalização das MAPKs e NFκB (Freitas *et al.*, 2018).

Considerando esses resultados e que a CTX é formada pela associação de CA e CB, avaliamos o efeito de concentração molar equivalente da subunidade CB (145 ng/mL) em relação ao complexo CTX (250 ng/mL) sobre a maturação das DCs incubadas com LPS. Os resultados mostraram que a CB nessa concentração não foi capaz de modular a maturação das DCs (dados não mostrados). Bon e Kini (1998) (Bon e Kini, 1988) demonstraram que a associação das subunidades CA e CB é importante para a atividade da CTX, sendo a primeira considerada como molécula carreadora (chaperona) dirigindo a CB para o seu receptor na membrana celular e assim, potencializando a atividade da PLA<sub>2</sub>. Portanto, essa observação pode explicar os resultados que obtivemos em nosso experimento.

Em resumo, os dados obtidos até o momento indicam que a CTX e CB podem modular negativamente a ativação destas DCs por um ligante potente de TLR4, como o LPS. É importante ressaltar que a CTX e CB nas concentrações de 250 ng ou 20 µg não induzem morte dessa população celular, o que foi avaliada pelo método de *exclusão com azul de Tripán* (dados não mostrados) ou reagente de viabilidade celular e leitura em citômetro de fluxo. Portanto, estes resultados permitem concluir que qualquer efeito observado nas DCs pela ação das toxinas não é resultante de morte celular.

Para compreender melhor os mecanismos de regulação da imunidade adaptativa, o modelo clássico de OVA (Puigneró *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996) foi

adotado nesse estudo. Como exemplo, Wang e colaboradores (Wang *et al.*, 1996) mostraram que a aplicação epicutânea de OVA resulta em dermatite alérgica acompanhada pelo aparecimento de linfócitos T secretores de IL-4. Além disso, Herrick e colaboradores (Herrick *et al.*, 2000) mostraram que a imunização epicutânea com a OVA induz resposta Th2 em modelo de asma. Em um trabalho mais recente, foi demonstrado que DCs pulsadas com uma mistura de peptídeos de OVA (*PepTivator Ovalbumin*) induz resposta TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> OVA-específica e diminui o tumor em um modelo de linfoma em camundongos (Miki K e T, 2016).

Em vista destas observações, utilizamos a OVA como antígeno heterólogo para avaliar o potencial modulador da CTX e CB sobre a resposta imune adaptativa em modelos *in vitro* e *in vivo*. Para isso, inicialmente avaliamos a capacidade da OVA ou OVA + LPS de induzirem a maturação de DCs *in vitro*. Nossos resultados mostraram que as DCs diferenciadas *in vitro* e estimuladas somente com OVA (100 ou 300 µg/mL) ou com a OVA + LPS induziram maturação das células. Entretanto, esse efeito foi maior na incubação das DCs com a OVA associada ao LPS. Com isso, para os experimentos posteriores foi utilizada a OVA na concentração de 200 µg em associação com o LPS. O efeito potencializador do LPS sobre a maturação das DCs incubadas com OVA também foi evidenciado por Ahrens e colaboradores (Ahrens *et al.*, 2009). Nesse trabalho, os autores mostraram que a estimulação das DCs com a OVA não induz significativamente a secreção de IL-10 e IL-12, mas a estimulação simultânea com OVA e LPS promove a produção de IL-10, favorecendo a resposta Th2. Em outro trabalho foi mostrado também maior expressão de CD80 e CD86 em DCs estimuladas com OVA + LPS em comparação com as células incubadas somente com a OVA (Park e Bryers, 2013).

Subsequentemente, foi avaliado o efeito da CTX e sua subunidade CB sobre a maturação das DCs incubadas com OVA + LPS. Assim como observado anteriormente, nossos experimentos permitiram verificar que a CTX e a CB foram capazes de suprimir a maturação das DCs estimuladas com OVA + LPS.

Em outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa também foi observado que a administração da CTX *in vivo* induz inibição da expressão de moléculas envolvidas na apresentação antigênica pelas APCs totais nos tecidos linfoides de animais imunizados com OVA (Ricardi, 2010).

Em conjunto, esses resultados corroboram os relatos de Sampaio e colaboradores (Sampaio *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2005; Sampaio, Santos, *et al.*, 2006) de que a CTX ou CB exercem um efeito modulador sobre algumas funções biológicas dos macrófagos. Neste contexto, foi demonstrado que macrófagos incubados com o veneno de *C.d.terrificus* apresentam a capacidade fagocítica e de espraiamento comprometidos (Silva *et al.*, 1996). Também foi mostrado que o veneno crotálico além de inibir as atividades acima citadas, promove a produção de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, metabolismo de glucose e glutamina pelos macrófagos, o que sugere efeito dual desse veneno sobre as funções dessas células (Sampaio *et al.*, 2001). Em trabalho posterior, foi demonstrado que a CTX é o componente do veneno crotálico responsável pela inibição da atividade fagocítica de macrófagos residentes ou ativados pela injeção de tioglicolato ou *Mycobacterium bovis* (BCG) obtidos da cavidade peritoneal de ratos (Sampaio *et al.*, 2003). Além disso, o efeito da CTX sobre a atividade funcional dos macrófagos foi atribuído à subunidade CB da toxina (Sampaio *et al.*, 2005). O efeito da CTX e veneno total sobre as funções do macrófago está relacionado à capacidade de alterar o rearranjo do citoesqueleto, inibição da fosforilação de tirosinas e diminuição das proteínas Rho GTPases associadas à membrana (Sampaio, Santos, *et al.*, 2006), as quais estão envolvidas na sinalização de processos intracelulares e atividade fagocitária dessas células (Niedergang e Chavrier, 2005).

Em 2017, Lima e colaboradores demonstraram que a CTX inibe a funcionalidade dos neutrófilos obtidos da medula óssea e que esse efeito pode estar associado a um comprometimento da via de polimerização da actina, a Syk-GTPase. Os autores verificaram ainda, que o efeito modulatório da CTX sobre os neutrófilos circulantes e peritoneais está associado a modificações funcionais dos neutrófilos ainda na medula óssea (Lima *et al.*, 2017).

Outras proteínas animais também têm efeito modulador em DCs, como observado com a CTX e CB. Klaver e colaboradores (Klaver *et al.*, 2013), por exemplo, mostraram que produtos solúveis de *Trichuris suis* inibem a maturação de DCs induzida com LPS como a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12. Resultados semelhantes foram publicados em um estudo com glicoproteínas e glicolípidos presentes nos ovos de *Schistosoma mansoni* (SEA). Os autores mostraram que o SEA associado ao LPS de *Salmonella typhosa* é capaz de inibir os níveis de IL-10,

IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, expressão de moléculas CD80, CD86, CD83 nas DCs, assim como a capacidade destas células de ativar e induzir a diferenciação de linfócitos T para o subtipo Th1 (Van Liempt *et al.*, 2007).

Em outro trabalho, foi relatada menor expressão de moléculas coestimuladoras em DCs estimuladas com tripomastigotas (Tp) de *Trypanosoma cruzi* e LPS de *Escherichia coli* (Poncini *et al.*, 2008). Além disso, a incubação de DCs com antígeno cutâneo de *Fasciola hepatica* concomitantemente com LPS resultou na supressão da expressão das moléculas CD40, CD80 e CD86 pelas DCs, assim como a secreção de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12 em relação às DCs incubadas somente com LPS (Hamilton *et al.*, 2009).

Há também relatos na literatura de que patógenos ou seus produtos exercem efeito inibitório sobre as DCs mantendo-as tolerogênicas. Além da ação direta dos patógenos sobre as DCs, citocinas secretadas por LTs como IL-10 e TGF- $\beta$  também podem induzir DCs imaturas a se tornarem tolerogênicas (Dugast e Vanhove, 2009). Somado à essas informações, foi mostrado que a baixa expressão de moléculas coestimuladoras pelas DCs durante a interação com os linfócitos T pode induzir a anergia destes ou ainda, a geração de células Treg produtoras de IL-10 (Cools *et al.*, 2008).

Considerando que citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) apresentam relevância como reguladores da ativação celular e consequente geração da imunidade adaptativa, analisamos em nossos experimentos a secreção delas nas culturas de DCs incubadas com OVA + LPS na presença ou não da CTX ou CB. Pudemos verificar um efeito potencializador da CTX e CB sobre expressão de RNAm para IL-10 e TGF $\beta$  pelas DCs estimuladas com o OVA + LPS.

Estudos mostram que DCs ao secretarem TGF- $\beta$  suprimem as funções imunes (Coombes *et al.*, 2007) ou ainda que essa citocina é capaz de inibir a expressão de moléculas CD80 e CD86, assim como a secreção de IL-12p70 em BMDCs estimuladas com LPS (Mou *et al.*, 2004).

Com relação ao efeito imunomodulador da IL-10, está descrito que esta citocina regula a imunidade inata atuando diretamente em APCs como macrófagos e DCs (Mocellin *et al.*, 2003). É bem sabido que a IL-10 inibe a expressão de MHC-II e moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) expressas na superfície das DCs (Rizzuti *et al.*, 2015), (Steinbrink *et al.*, 1999; Jonuleit *et al.*, 2001; Mahnke *et al.*, 2002; Müller

*et al.*, 2002). Portanto, a presença destas citocinas secretadas pelas DCs está correlacionada com a atividade tolerogênica dessa célula (Hilkens *et al.*, 2010).

Em se tratando ainda de ativação ou tolerância das células T, está bem estabelecido que ambas são reguladas criticamente por moléculas expressas pelas APCs denominadas de coestimuladoras, especialmente aquelas pertencentes às famílias B7 e CD28, e moléculas reguladoras (Greenwald *et al.*, 2005). PD-1 é considerado um novo membro da família CD28, sendo expresso em células T e células B (Sharpe e Freeman, 2002). Com relação à sua função, trabalhos descrevem o papel da PD-1 como um regulador negativo da ativação de células T e assim, é crucial para manter a tolerância imunológica (Nishimura *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2001). Interações das moléculas coestimuladoras clássicas (B71/B72) expressas em DCs com seu ligante CTLA-4, também estão relacionados com a inibição dos LTs (Lanzavecchia e Sallusto, 2000). Os membros mais recentemente descritos desta família (ICOS:B7H, PD-1: PD-L1/2) foram implicados na regulação da função das células T efetoras, especialmente nos tecidos periféricos (Liang e Sha, 2002).

Com relação às moléculas expressas pelas DCs que podem agir como moduladores da ativação das células T, analisamos a expressão de ICOSL, PDL-1 e PDL-2 nas DCs estimuladas com LPS ou OVA + LPS na presença ou não de CTX e CB. Os resultados mostraram que tanto a CTX como CB potencializaram a expressão destas moléculas nas DCs incubadas com LPS (dados não mostrados) ou OVA + LPS. Em adição, houve aumento da expressão da molécula PDL-1 em DCs estimuladas somente com a CTX ou CB em relação às DCs mantidas em meio de cultura.

Neste contexto, foi demonstrado que o aumento da expressão de PDL-1 e PDL-2 em BMDCs resultam na diminuição da produção de IL-2 por LTs (Latchman *et al.*, 2001). Reforçando o papel destas moléculas na manutenção ou indução de tolerância, foi verificado que animais deficientes *no gene* PD-1 (PD1<sup>-/-</sup>) desenvolvem algumas doenças autoimunes como lúpus ou cardiomiopatia (Nishimura *et al.*, 1999; Nishimura *et al.*, 2001). Além disso, a administração de PDL-2 solúvel em camundongos com malária letal foi suficiente para melhorar drasticamente sua imunidade e sobrevivência (Karunaratne *et al.*, 2016).



Resultados também sugerem que a PDL-2 pode atuar como um regulador negativo da função nas células T. Latchman e colaboradores (Latchman *et al.*, 2001), por exemplo, mostraram que a proteína recombinante PDL-2 inibe a ativação e a produção de citocinas produzidas por células TCD4<sup>+</sup>.

Outros autores mostram a função da PDL-2 usando anticorpos que bloqueiam a ligação da PDL-2 à PD-1. Salama e colaboradores (Salama *et al.*, 2003), mostraram a exacerbação da doença encefalomielite auto-imune (EAE) quando a PDL-2, mas não a PDL-1, foi bloqueada. Em um modelo de hipersensibilidade das vias aéreas, outro grupo (Matsumoto *et al.*, 2004) constatou que o anticorpo anti-PDL-2 administrado no momento do desafio aumentou a eosinofilia em modelo de asma alérgica induzida com OVA em camundongos. Além disso, foi mostrado que o anticorpo anti-PDL-2 aumentou a capacidade das DCs de murinos em estimular células T (Nguyen *et al.*, 2002; Radhakrishnan *et al.*, 2003). Portanto, a molécula PDL-2 expressa por DCs como molécula co-inibitória desempenha um papel crítico na exacerbação de doenças autoimunes ou mesmo em modelo de asma. Esses trabalhos, associados aos nossos resultados sugerem que a CTX ou CB estão induzindo DCs com potencial tolerogênico, as quais poderiam induzir a diferenciação dos LTs para o perfil Treg.

Considerando o envolvimento de FPRs na atividade da CTX sobre os macrófagos (Sampaio, Alba-Loureiro, *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2010) ou em BMDCs (Freitas *et al.*, 2018), analisamos no nosso modelo *in vitro*, a participação desses receptores no efeito da CTX e CB sobre as DCs. Os FPRs se ligam a diversos grupos de ligantes que apresentam em sua composição peptídeos N-formil e não formil incluindo LXs, anexina-1 e peptídeos liberados por neutrófilos (Devchand *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2009). Fpr2 de camundongos apresenta 76% de homologia com FPR2/ ALX de humanos (Ye *et al.*, 2009) e é está bem estabelecida a sua ligação com LXA<sub>4</sub> (Vaughn *et al.*, 2002). A significância dos FPRs como receptores de reconhecimento de padrões para peptídeos formilados tem sido bem estabelecida em relação à defesa do hospedeiro. Esses receptores se ligam a peptídeos formilados derivados de proteínas bacterianas e mitocondriais (Le *et al.*, 2002; Migeotte *et al.*, 2006).

Com isso, confirmamos a expressão desses FPRs nas DCs e analisamos se haveria modulação da expressão desses receptores nas diferentes condições de

estimulação das células. Pudemos verificar a expressão de cDNA para FPR1 e FPR2 em DCs mantidas em meio de cultura, ou ainda estimuladas com LPS na presença ou não da CTX. Com isso, o próximo passo foi avaliar a participação dos FPRs na modulação exercida pela CTX e CB nas DCs usando o antagonista dos FPRs (Boc-2). Nossos resultados demonstram que a pré-incubação de DCs com esse antagonista de FPRs, bloqueou o efeito inibitório de CTX e CB sobre a expressão de moléculas coestimuladoras e MHC de classe II, assim como a secreção de citocinas pró-inflamatórias nas células estimuladas com OVA + LPS. Além disso, o Boc-2 aboliu o efeito das toxinas em aumentar a expressão de moléculas como ICOS-L, PDL-1/2, bem como a produção de IL-10 nas DCs estimuladas com OVA + LPS.

Em 2012, foi mostrado que a inflamação pulmonar após o desafio com OVA foi parcialmente abolida pela ativação dos FPRs durante a sensibilização. A maturação e a migração das DCs do pulmão para os linfonodos foram inibidas pela ativação dos FPRs. Além disso, a ativação de FPRs nas vias aéreas inibiu a proliferação de células T específicas para alérgenos nos gânglios linfáticos. A produção de IL-12 e IL-6 (citocinas que auxiliam na polarização de Th1 e Th17, respectivamente) nas DCs pulmonares foram reduzidas pela ativação das vias aéreas de FPRs. Este efeito resultou na inibição de respostas de células Th1 e Th17 específicas para alérgenos (Tae *et al.*, 2012). Em outro trabalho foi mostrado que camundongos *Fpr2*<sup>-/-</sup> apresentaram uma resposta inflamatória mais rápida caracterizada por maior edema na pata induzido por modelo inflamatório clássico de carragenina, em comparação com os animais controles (WT) e isso foi associado a um influxo acentuado de leucócitos sanguíneos na pata (Dufton *et al.*, 2010). Nesse mesmo sentido, animais deficientes para os FPRs exibiram suscetibilidade aumentada contra infecção com *Listeria monocytogene* ou *Escherichia coli* (*E. coli*) (Gao *et al.*, 1999; Dufton *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010).

Com relação às toxinas, o trabalho de Costa e colaboradores (Costa *et al.*, 2013), demonstrou que a CTX exerce efeito modulador em macrófagos co-cultivados com células tumorais do tipo LLC-WRC 256 via FPRs e secreção de LXA<sub>4</sub>. Esses mesmos autores mostraram ainda, aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO após 24 ou 48 horas de co-cultura em comparação com o obtido em macrófagos mantidos em RPMI.

Em um trabalho mais recente, foi mostrado que o tratamento de ratos com CTX reduziu o crescimento do tumor induzido pela inoculação de células de carcinoma Walker 256 na região plantar desses animais. Nestes animais foi observada inibição na formação de novos vasos, diâmetros dos vasos sanguíneos e aumento da produção de LXA<sub>4</sub> e seu análogo 15- epi- LXA<sub>4</sub>. Além disso, os autores mostraram que esse efeito da CTX foi mediado por FPRs (Brigatte *et al.*, 2016).

Considerando os nossos resultados mostrando o envolvimento de FPRs no efeito da CTX e CB sobre as DCs e ainda, que CTX e CB induzem a produção de LXA<sub>4</sub> que é um dos ligantes de FPR2/ALX (Machado *et al.*, 2006; Scannell *et al.*, 2007; Stenfeldt *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2018), avaliamos a dependência da via da 5-Lipoxigenase que resulta na produção de eicosanoides como as lipoxinas, no efeito da CTX e CB sobre as DCs.

A via da 5-lipoxigenase está envolvida na síntese de eicosanoides como leucotrienos e lipoxinas que estão envolvidos nas respostas imunes inatas e adaptativas (Samuelsson *et al.*, 1987; Funk, 2001). A 5-LO está presente na maioria dos leucócitos incluindo DCs, como as células de Langerhans epidérmicas e de mucosas que por sua vez, participam da inflamação ou regulação da imunidade adaptativa (Spanbroek *et al.*, 1998). Além de DCs humanas, BMDCs também expressam 5-LO e ambas são capazes de produzir leucotrienos e lipoxinas (Spanbroek *et al.*, 2000; Jozefowski *et al.*, 2005).

Nós pudemos verificar que o bloqueio da via da 5-LO aboliu o efeito modulador da CTX e CB sobre a expressão de moléculas coestimuladoras, MHC-II, ICOS-L, PDL-1 /2 e as citocinas pró- inflamatórias nas DCs incubadas com OVA + LPS. Portanto, nossos resultados estão em consonância com a literatura mostrando que o zileuton, inibidor seletivo da 5-lipoxigenase, aboliu o efeito antinociceptivo da CTX em modelo de dor neuropática (Nogueira-Neto *et al.*, 2008). Além disso, em outros trabalhos foi mostrado que o zileuton aboliu o efeito inibitório do veneno, CTX ou CB sobre a atividade fagocítica de macrófagos *in vivo* e *in vitro* (Sampaio, Alba-Loureiro, et al., 2006), assim como aboliu o efeito da CTX em diminuir o número de leucócitos circulantes no sangue e na linfa e ainda de promover adesão leucocitária às células endoteliais na microcirculação sanguínea (Zambelli *et al.*, 2008). Esses estudos fornecem informações relevantes da participação da via da 5-LO na regulação da atividade das DCs e conseqüente geração da imunidade adaptativa.

Ademais, na literatura é bem estabelecido que a CTX e CB induzem aumento dos níveis de eicosanoides como as LXA<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> em macrófagos residentes obtidos de lavado peritoneal de ratos (Sampaio, Alba-Loureiro, *et al.*, 2006). Em 2010, Nunes e colaboradores (Nunes *et al.*, 2010) também mostraram que a CTX exerce efeito anti-inflamatório frente à injeção intraperitoneal de carragenina com alta produção de LXA<sub>4</sub> e ainda, que este efeito da CTX sobre os macrófagos é dependente de FPRs (Chiang *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2009).

Em 2015, em um trabalho do nosso grupo de pesquisa foi possível demonstrar que a CTX é capaz de atenuar a colite experimental induzida por agente químico TNBS. A CTX inibiu tanto a inflamação intestinal com TNBS como a perda de peso, *score* clínico, secreção de citocinas pró-inflamatórias e atividade da enzima MPO. Além disso, inibiu as células Th17 e induziu aumento de células Tregs e secreção de IL-10, TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub> (Almeida *et al.*, 2015).

Zhang e colaboradores (2007) (Zhang *et al.*, 2007) também observaram que a LXA<sub>4</sub> é capaz de suprimir a expressão de MHC-II, CD80 e CD86 em DCs, e a atividade de células RAW2647 estimuladas com LPS. Em trabalhos anteriores, demonstrou-se que LXA<sub>4</sub> possui potente efeito inibitório sobre vários mecanismos inflamatórios, incluindo citotoxicidade das células NK (Ramstedt *et al.*, 1987), migração de neutrófilos e eosinófilos (Clish *et al.*, 1999; Bandeira-Melo *et al.*, 2000), e produção de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por neutrófilos humanos (Pouliot e Serhan, 1999). Em vista dessas observações e dos nossos resultados, podemos sugerir que a LXA<sub>4</sub> possa estar envolvida no efeito da CTX e CB sobre as DCs e, conseqüente, desenvolvimento da imunidade adaptativa.

Estudos mostram que o veneno total de *C.d.terrificus*, CTX e/ou suas subunidades possuem a capacidade de inibir o processo inflamatório, assim como a resposta imune adaptativa (Sampaio *et al.*, 2010) e sabe-se que as DCs, dependendo do seu estado de ativação, podem induzir a ativação, proliferação e diferenciação de LTs (Maldonado e Von Andrian, 2010; Svajger *et al.*, 2010; Hammer e Ma, 2013). Além disso, nós mostramos que as DCs previamente incubadas com LPS promoveram alta resposta proliferativa dos linfócitos TCD3<sup>+</sup>. No entanto, redução da proliferação de células T co-cultivadas com DCs, previamente incubadas com a CTX ou CB juntamente com o LPS foi observada (Freitas *et al.*, 2018).

Assim como mencionado anteriormente, é bem sabido que as DCs são consideradas as principais células em induzir a ativação de células T virgens (Fukaura *et al.*, 1996; Moser e Murphy, 2000) e a diferenciação dos subtipos de células T CD4<sup>+</sup> que são distinguidos com base no seu perfil de citocinas e função (Chen *et al.*, 1994; Fukaura *et al.*, 1996; Groux *et al.*, 1997; Cavani *et al.*, 2000; Roncarolo e Levings, 2000). As DCs também participam do controle da imunidade efetora via indução/manutenção de tolerância (Banchereau e Steinman, 1998; Banchereau *et al.*, 2000). Além disso, sabe-se que para ocorrer a proliferação de células T, é necessário reconhecimento do antígeno pelo complexo TCR/CD3, no qual células TCD4<sup>+</sup> são restritas ao reconhecimento de peptídeos em associação à molécula de MHC-II, enquanto que os linfócitos TCD8<sup>+</sup> são restritos ao complexo peptídeo/MHC-I (Rudd *et al.*, 1989). Em vista destas observações, decidimos avaliar o efeito da CTX e CB sobre a proliferação de linfócitos T específicos contra a OVA. Para isso, analisamos a proliferação de LTCD3<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> obtidos de camundongos imunizados com OVA, quando incubados com as DCs pulsadas com OVA + LPS na presença ou não de CTX ou CB. Além disso, avaliamos a produção de IL-2 nas co-culturas de células que continham linfócitos CD3<sup>+</sup> e DCs.

Os sinais induzidos por receptores de células T e IL-2 estão envolvidos na ativação e manutenção da transcrição da cadeia alfa do receptor de IL-2 (IL-2R) (Teague *et al.*, 1999), portanto, essa citocina é conhecida como fator de crescimento das células T (Badovinac *et al.*, 2000; Dalton *et al.*, 2000; Jaleco *et al.*, 2003). A IL-2 também tem sido reconhecida como um regulador da homeostase, modulando o equilíbrio entre a proliferação de células TCD4<sup>+</sup> e a morte apoptótica (Jaleco *et al.*, 2003). Após o contato com peptídeos antigênicos apresentados por DCs, as células T *naïves* iniciam a proliferação, produzindo IL-2 e, em seguida, esta citocina estimula as células T para uma maior proliferação (Lenardo *et al.*, 1999). Esta citocina é produzida principalmente por células T CD4<sup>+</sup> ativadas (Nelson, 2004) ou por DCs (Zelante *et al.*, 2012) e em menor produção por células TCD8<sup>+</sup>, células NK (NK) ou células T natural killer (NKT) naturais (Setoguchi *et al.*, 2005; Malek, 2008).

Assim sendo, os resultados mostraram que a CTX e CB foram capazes de inibir a proliferação de LTCD3<sup>+</sup> ou TCD4<sup>+</sup> OVA-específicos quando co-cultivados com DCs estimuladas com a OVA + LPS. O mesmo foi verificado quanto à produção de IL-2 obtida do sobrenadante das co-culturas de DCs com LTCD3<sup>+</sup>. Portanto,

podemos sugerir que o efeito da CTX e CB sobre a expressão das moléculas MHC-II e coestimuladoras nas DCs, foi capaz de interferir com capacidade dessas células de induzir a ativação e proliferação dos linfócitos T. Além disto, também verificamos efeito inibitório da CTX e CB sobre a secreção de IL-2 assim como a resposta proliferativa dos LTs co-cultivados com as DCs estimuladas com ConA. Portanto, as DCs parecem estar atuando sobre a resposta de células T, inclusive do tipo mitogênica. Além disso, esses resultados demonstram que ambas toxinas interferem na secreção de IL-2 que está correlacionada com a proliferação de células T.

Em 2004, Rangel-Santos e colaboradores (Rangel-Santos, Lima, *et al.*, 2004) mostraram que o veneno e a CTX foram também efetivos em inibir a resposta proliferativa de LTs estimulados *in vitro* com ConA, assim como a produção de algumas citocinas.

Considerando a influência das DCs na diferenciação das subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, foi avaliado o efeito da CTX e CB nesse processo. Para tanto, os linfócitos TCD4<sup>+</sup> de camundongos DO11.10 foram co-cultivados com DCs estimuladas ou não com a OVA + LPS, na presença ou não de CTX ou CB. Os resultados mostraram menor porcentagem de células CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>Gata 3<sup>+</sup> nas co-culturas com DCs estimuladas com CTX ou CB na presença de OVA + LPS. Esses resultados sugerem o efeito inibitório da CTX e CB sobre a polarização de células Th1 e Th2 OVA- específicas pelas DCs. Por outro lado, verificamos aumento da diferenciação de células CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> nas co-culturas com DCs incubadas com a OVA + LPS e CTX.

Corroborando observações anteriores sobre o papel das DCs na ativação de diferenciação de células T antígeno específicas, Son e colaboradores (2002) mostraram uma correlação direta entre o aumento da expressão das moléculas CD86 e CD40 e a capacidade das DCs de estimular a proliferação de células T alogênicas ou de células T CD4<sup>+</sup> específicas para OVA (Son *et al.*, 2002). Em outro trabalho foi mostrado que a transferência de DCs, diferenciadas a partir da medula óssea e pulsadas com peptídeo de OVA na presença dos antibióticos josamicina ou espiramicina foi capaz de inibir a diferenciação de células Th1 e Th2 em camundongos DO11.10 (Matsui *et al.*, 2016).

É bem sabido que a diferenciação de células T helper *naïves* é estritamente dependente da coestimulação CD28 / B7 (Mcadam *et al.*, 1998). A este respeito, os

primeiros dados *in vivo* mostraram que B7.1 leva a polarização de Th1 e sinais mediados por B7.2 estão envolvidos na diferenciação para o fenótipo Th2 (Kuchroo *et al.*, 1995; Lenschow *et al.*, 1995; Perrin *et al.*, 1995; Schweitzer *et al.*, 1997).

Dados gerados a partir de modelos *in vitro* e *in vivo*, utilizando células humanas e de camundongos, demonstram que a composição de citocinas no meio em que as células T helper são ativadas desempenham um papel crucial na polarização dessas células. A IL-12, por exemplo, produzida por monócitos/macrófagos ou DCs ativadas, é o fator dominante que promove a polarização de células Th1 em humanos e camundongos. Por conseguinte, camundongos deficientes em IL-12p40 ou na proteína  $\beta 2$  do receptor de IL-12 apresentam comprometimento nas respostas de células Th1. Além disso, o IFN- $\alpha$  é uma citocina importante para a polarização de Th1 em humanos (Brinkmann *et al.*, 1993; Hsieh *et al.*, 1993; Manetti *et al.*, 1993). Em relação às células Th2, foram desenvolvidos métodos para diferenciar linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naives* em células produtoras de IL-4 *in vitro* (Le Gros *et al.*, 1990; Hsieh *et al.*, 1992; Seder *et al.*, 1992; Dalton *et al.*, 2000). Em outro estudo foi demonstrado que tal diferenciação Th2 exige a ativação de células virgens, inicialmente com estímulos policlonais como anti-CD3 e anti-CD28, e posteriormente com antígeno cognato, na presença de um conjunto particular de citocinas. Nesse sentido, para obter células Th2, a presença de IL-2 e IL-4 durante o processo de diferenciação é importante (Zhu *et al.*, 2010), sendo que outros estudos mostram que a IL-4 é essencial para a diferenciação de células Th2 produtoras de IL-4 em humanos e camundongos (Röcken *et al.*, 1994; Breit *et al.*, 1996; Sornasse *et al.*, 1996; Himmelrich *et al.*, 1998). Entretanto, na polarização de Th2, embora a IL-4 seja dominante, a IL-6 derivada das APCs também desempenha papel importante na diferenciação dessa subpopulação de células T, induzindo a produção precoce de IL-4 por essas células (Rincón *et al.*, 1997).

Vários estudos também relataram que DCs que secretam TGF- $\beta$  ou na presença dessa citocina recombinante induzem a diferenciação de Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) (Luo *et al.*, 2007). Essas DCs são denominadas como tolerogênicas por controlar a autoimunidade diretamente, produzindo citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 ou TGF $\beta$  (Coombes *et al.*, 2007; Kaplan *et al.*, 2007).

IL-6 e TGF- $\beta$ , por sua vez, promovem a diferenciação de células Th17 em camundongos (Zwijnenburg *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2006). Outras citocinas como

IL-23 e IL-1 $\beta$  mantêm a maturação completa desse tipo de subpopulação de LTCD4<sup>+</sup> e também podem favorecer, potencialmente, a função patogênica dessas células (Agaloti *et al.*, 2018). Outros dados também mostram que não só a IL-6, mas também a IL-1 $\beta$ , pode auxiliar na indução de Th17 via ativação de DCs ou ainda, o TNF $\alpha$  pode aumentar a capacidade de monócitos em induzir Th17 (Iwamoto *et al.*, 2007).

Estudos anteriores mostram que DCs diferenciadas de monócitos humanos (Jonuleit *et al.*, 2000) ou geradas de precursores da medula óssea de humanos na presença de IL-10 (Wakkach *et al.*, 2003) ou TGF $\beta$  são capazes de gerar células T com propriedades reguladoras. DCs incubadas com IL-10 podem induzir anergia ou tolerância em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Steinbrink *et al.*, 1997; Steinbrink *et al.*, 1999; Steinbrink *et al.*, 2016). DCs derivadas de medula óssea de camundongos BALB/c também são capazes de promover a expansão de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> sugerindo um papel para o TGF- $\beta$  e IL-2 no aumento dessa população *in vitro* (Marguti *et al.*, 2009). Maior proliferação de Treg também foi observada quando co-cultivadas com BMDCs estimuladas com TNF $\alpha$ , Poly (I:C) ou LPS em ensaio de MLR (Godfrey *et al.*, 2004). Em outro trabalho também foi mostrado que co-cultura de células T virgens com APCs na presença de TGF- $\beta$ , ácido retinoico e IL-2 promoveu a geração de células Treg alogênicas. Nesse mesmo trabalho foi evidenciado que, embora as células B e DCs possam gerar Tregs por si só, uma mistura de ambas APCs aumentou a população de Tregs de maneira mais eficiente (Moore *et al.*, 2010).

Outros estudos também tem demonstrado a eficiência de BMDCs maduras em induzir aumento da população de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> em camundongos (Yamazaki *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2006). Além de seu efeito supressor sobre várias funções das células T efetoras, Treg também mostraram afetar diretamente as APCs, incluindo DCs, células B e monócitos/ macrófagos (Mahnke *et al.*, 2007; Mahnke *et al.*, 2008). BMDCs previamente estimuladas ou não com LPS e co-cultivadas com LTs obtidos de camundongos DO11.10 incubados com TGF $\beta$  e OVA induzem a diferenciação de células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Yamazaki *et al.*, 2003).

Em humanos, DCs isoladas de fluidos inflamatórios produzem IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IL-23 e induzem eficientemente a polarização de células Th17 *in vivo* (Torchinsky *et al.*, 2009). Além disso, DCs maduras derivadas de monócitos



humanos são APCs eficazes para a indução de células T produtoras de IL-17 (Steinman, 2007; Chen e O'shea, 2008). Outros estudos também tem mostrado a capacidade de DCs de murinos em ativar células Th17 (Bailey *et al.*, 2007; Leibundgut-Landmann *et al.*, 2007) (Agaloti *et al.*, 2018). Peptidoglicano bacteriano também pode promover DCs derivadas de monócitos humanos em mediar à expansão de células Th17 (Van Beelen *et al.*, 2007). Tem sido sugerido que monócitos alogênicos ativados por LPS, na presença de anti-CD3, eram APCs eficientes para expansão de células Th17 (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2007).

Em vista destas observações, analisamos o efeito modulador da CTX e CB em modelo *in vitro* de diferenciação das subpopulações de TCD4<sup>+</sup>, pela ação de combinações de citocinas e/ou anticorpos neutralizantes em co-cultura com DCs. Primeiramente, nossos resultados estão de acordo com a literatura que descreve que as citocinas presentes no ambiente de interação entre as DCs e os linfócitos é essencial para a polarização dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> nas diferentes subpopulações. Assim sendo, o próximo objetivo do estudo foi avaliar o efeito das toxinas sobre a diferenciação destas subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg. Os dados demonstraram que a CTX e CB interferiram na diferenciação das subpopulações Th1, Th2 e Th17. Além disso, a CTX e CB na presença ou não do LPS, induziram aumento da porcentagem de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> nas co-culturas com as DCs.

As diferentes subpopulações de células TCD4<sup>+</sup> desempenham papéis centrais em vários mecanismos imunes com: auxiliam na produção de anticorpos pelos linfócitos B, potencializam a resposta das células T CD8<sup>+</sup>, regulam as funções dos macrófagos, participam das respostas imunes contra uma ampla variedade de microorganismos patogênicos, assim como participam da manutenção da tolerância periférica e portanto, no controle de autoimunidade (Zhu *et al.*, 2010).

Assim sendo, o próximo objetivo foi avaliar o efeito de ambas as toxinas sobre a resposta adaptativa anti-OVA induzida *in vivo*. Os resultados mostraram que células T totais obtidas de animais imunizados com a OVA que receberam CTX ou CB proliferaram menos *in vitro* quando estimuladas com OVA ou ConA comparadas às células de animais imunizados com a OVA e estimuladas da mesma maneira. O mesmo foi observado quanto à produção de IL-2 e IFN $\gamma$ . Nos ensaios *in vitro*, ambas

toxinas, juntamente com a OVA ou ConA, também inibiram a resposta proliferativa assim como a produção de IL-2 de LTs de animais imunizados com a OVA, e que receberam ou não CTX ou CB *in vivo*.

Além disso, verificamos que a porcentagem de células CD4<sup>+</sup> foi menor em camundongos imunizados com OVA que receberam CTX ou CB, em relação aos animais somente imunizados com a OVA. Entretanto, o mesmo não foi observado nas células CD8<sup>+</sup>, mostrando o efeito inibitório das toxinas sobre linfócitos T auxiliares e não em células citotóxicas. Vale ressaltar, que o modelo de imunização com a OVA, por nós utilizado, promove a ativação predominante de células TCD4<sup>+</sup>. Assim sendo, para avaliar o efeito da CTX e CB, sobre a ativação de células TCD8 seria mais apropriado utilizar um modelo de ativação preferencial de resposta T citotóxica.

Em relação às diferentes subpopulações de células CD4<sup>+</sup>, nós também mostramos menor porcentagem de células CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> nas suspensões celulares de animais imunizados com a OVA, que receberam a CTX ou CB, em relação aos camundongos imunizados somente com a OVA. Além disso, a CTX e CB induziram aumento de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> em relação ao observado nos animais imunizados somente com a OVA.

Sobre a imunidade humoral, Cardoso e Mota mostraram que além do veneno total, a CTX é capaz de inibir a produção de anticorpos IgG1 contra a OVA e HSA (Cardoso e Mota, 1997). Outros trabalhos também mostraram que o veneno da cascavel *C.d.terrificus* induz baixa produção de anticorpos quando comparado à outros venenos ofídicos (Rolim-Rosa *et al.*, 1980- 1981). Outros autores demonstraram ainda, que a transferência de linfócitos T e B purificados de camundongos injetados com o veneno total de *C.d.terrificus* ou CTX para camundongos, inibe a produção de anticorpos IgG1 ou a produção de citocinas (IL-2, IL-4 e IL-10) em resposta à imunização com SAH (Rangel-Santos, Lima, *et al.*, 2004).

Adicionalmente, nós também avaliamos a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a em animais imunizados com a OVA que receberam ou não CTX ou CB. Os resultados aqui apresentados foram semelhantes aos obtidos nos diferentes trabalhos citados. Os animais que receberam a OVA + CTX ou OVA + CB, a produção de IgG1 e IgG2a anti-OVA foi menor, quando comparado ao grupo de

animais imunizados somente com a OVA. Embora existam trabalhos descrevendo o efeito inibitório da CTX sobre a resposta imune humoral, nossos resultados são inéditos quanto ao efeito da CB sobre a produção de IgG1 e IgG2a anti-OVA. Esses diferentes estudos em conjunto com nossos resultados, sugerem que a baixa produção de anticorpos anti- OVA nos animais que receberam a CTX ou CB, possa ser um reflexo do comprometimento da resposta de células T pela ação de ambas toxinas.

Ainda, sobre o contexto de avaliação do efeito da CTX sobre a imunidade adaptativa, resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa também permitiram verificar que essa toxina é capaz de inibir a produção de anticorpos anti-SAH e a resposta proliferativa *in vitro* dos linfócitos T SAH-específicos. Pôde ser observado ainda, que a CTX exerce esse efeito modulador em situações de imunização com a SAH associada a adjuvantes polarizadores de resposta Th1 ou Th2 (Favoretto *et al.*, 2014).

A hipersensibilidade do tipo tardia é uma importante manifestação *in vivo* da imunidade mediada por células. O DTH é uma reação local que envolve a produção de citocinas e quimiocinas, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento predominantemente de células efetoras antígeno-específicas (células Th1 ou células T CD8<sup>+</sup>) para o local da reação, após um prévio contato com o patógeno ou antígeno (Alexander e Curtis, 1979; Roychowdhury e Svensson, 2005; Justiz e Ramphul, 2018). Portanto, analisamos a reação de hipersensibilidade do tipo tardio desencadeada pela OVA injetada na pata dos camundongos previamente imunizados com a OVA e que receberam ou não CTX e CB. Nossos resultados mostraram que os animais imunizados com a OVA e que receberam a CTX, mas não a CB, apresentaram menor reação de DTH, em relação aos animais somente imunizados com OVA. Esses resultados sugerem que o efeito da CB seja menos pronunciado que o obtido com CTX, reforçando achados anteriores de que a subunidade CA no complexo CA/CB potencializa a ação da molécula CTX.

Em síntese, nossos resultados mostraram que a CTX e sua subunidade CB inibiram a expressão de moléculas coestimuladoras, MHC-II, citocinas pró-inflamatórias e aumentaram a expressão de ICOS-L, PDL-1/2, bem como mediadores anti-inflamatórios em DCs estimuladas com LPS ou OVA + LPS. Os resultados também mostram, a participação dos FPRs e da via das lipoxigenases no

efeito modulador da CTX e CB sobre as funções das DCs. Além disso, pudemos nesse trabalho, estabelecer uma correlação entre a ação das toxinas sobre as DCs e a geração da imunidade celular adaptativa específica para OVA, *in vitro* e *in vivo*.

## 8. CONCLUSÃO

Os dados na literatura, em conjunto com os outros obtidos pelo nosso grupo permitiram, mais uma vez, constatar que a CTX e CB modulam a atividade funcional das DCs, e a conseqüente geração da imunidade adaptativa mediada pelos linfócitos TCD4<sup>+</sup>. Assim sendo, este trabalho de investigação corrobora com estudos anteriores e contribui com informações relevantes, sobre os mecanismos de imunidade inata que influenciam a imunidade adaptativa com ênfase no papel das DCs nesse processo. Além disso, o entendimento dos mecanismos envolvidos na ação moduladora da CTX e sua fração fosfolipásica, poderão contribuir para novos estudos voltados para o desenvolvimento de substâncias com propriedades terapêuticas.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V. et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, p. 942-9, Sep 2007.
- AGALIOTI, T. et al. T. **J Autoimmun**, v. 87, p. 50-60, Feb 2018.
- AHMANN, G. B.; SACHS, D. H.; HODES, R. J. Requirement for an Ia-bearing accessory cell in Con A-induced T cell proliferation. **J Immunol**, v. 121, n. 5, p. 1981-9, Nov 1978.
- AHRENS, B. et al. Lipopolysaccharide stimulation of dendritic cells induces interleukin-10 producing allergen-specific T cells in vitro but fails to prevent allergic airway disease. **Exp Lung Res**, v. 35, n. 4, p. 307-23, May 2009.
- AIRD, S. D. et al. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch Biochem Biophys**, v. 249, n. 2, p. 296-300, Sep 1986.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat Immunol**, v. 2, n. 8, p. 675-80, Aug 2001.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 2006.
- ALEXANDER, J.; CURTIS, J. Development of delayed hypersensitivity responses in Mycobacterium lepraemurium infections in resistant and susceptible strains of mice. **Immunology**, v. 36, n. 3, p. 563-7, Mar 1979.
- ALIBERTI, J. et al. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. **Nat Immunol**, v. 3, n. 1, p. 76-82, Jan 2002.
- ALMEIDA, C. E. S. et al. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0121427, 2015.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M. et al. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 631-6, 1985.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1163-8, 1987.
- BADOVINAC, V. P.; TVINNEREIM, A. R.; HARTY, J. T. Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1354-8, Nov 2000.

BAILEY, S. L. et al. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. **Nat Immunol**, v. 8, n. 2, p. 172-80, Feb 2007.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, Mar 1998.

BANDEIRA-MELO, C. et al. Cutting edge: lipoxin (LX) A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 block allergen-induced eosinophil trafficking. **J Immunol**, v. 164, n. 5, p. 2267-71, Mar 2000.

BLAUVELT, A. et al. Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation. **J Invest Dermatol**, v. 106, n. 5, p. 1047-52, May 1996.

BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol Pharmacol Latinoam**, v. 39, n. 4, p. 439-48, 1989.

BON, C.; KINI, R. M. Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism. v. 17, n. 4, p. 269-285, 1988.

BOUR-JORDAN, H.; BLUESTONE, J. A. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. **Immunol Rev**, v. 229, n. 1, p. 41-66, May 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976.

BREIT, S. et al. A strict requirement of interleukin-4 for interleukin-4 induction in antigen-stimulated human memory T cells. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 8, p. 1860-5, Aug 1996.

BRIGATTE, P. et al. Walker 256 Tumor Growth Suppression by Crotoxin Involves Formyl Peptide Receptors and Lipoxin A4. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 2457532, 2016.

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732-6, Jul 1999.

BRINKMANN, V. et al. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. **J Exp Med**, v. 178, n. 5, p. 1655-63, Nov 1993.

BROWN, J. A. et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. **J Immunol**, v. 170, n. 3, p. 1257-66, Feb 2003.

BURMEISTER, Y. et al. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. **J Immunol**, v. 180, n. 2, p. 774-82, Jan 2008.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Latin America. In: (Ed.). Comstock, Ithaca, 1989. p.330-373.

CARBONE, F. R.; BELZ, G. T.; HEATH, W. R. Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 655-8, Dec 2004.

CARDOSO, D. F. et al. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators Inflamm**, v. 10, n. 3, p. 125-33, Jun 2001.

CARDOSO, D. F.; MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon**, v. 35, n. 4, p. 607-12, Apr 1997.

CASTRO, F. R. et al. The effect of treatment with crotopotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 299-305, Mar 2007.

CATRON, D. M. et al. Visualizing the first 50 hr of the primary immune response to a soluble antigen. **Immunity**, v. 21, n. 3, p. 341-7, Sep 2004.

CAUX, C. et al. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. **Nature**, v. 360, n. 6401, p. 258-61, Nov 1992.

CAUX, C. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 695-706, Aug 1996.

CAVANI, A. et al. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. **J Invest Dermatol**, v. 114, n. 2, p. 295-302, Feb 2000.

CELLA, M. et al. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 747-52, Aug 1996.

CHAN, J. K. et al. Alarmins: awaiting a clinical response. **J Clin Invest**, v. 122, n. 8, p. 2711-9, Aug 2012.

CHANG, C. C.; SU, M. J. A study on the interaction of crotopotin with crotoxin phospholipase A2, notexin and other presynaptic neurotoxins. **Br J Pharmacol**, v. 73, n. 2, p. 495-503, Jun 1981.

CHATILA, T. A. et al. Requirement for mitogen, T cell-accessory cell contact, and interleukin 1 in the induction of resting T-cell proliferation. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 44, n. 2, p. 235-47, Aug 1987.



CHEN, D. Y. et al. Dextromethorphan inhibits activations and functions in dendritic cells. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 125643, 2013.

CHEN, H. et al. Effects of leukotriene B4 and prostaglandin E2 on the differentiation of murine Foxp3+ T regulatory cells and Th17 cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 80, n. 4, p. 195-200, Apr 2009.

CHEN, Y. et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science**, v. 265, n. 5176, p. 1237-40, Aug 1994.

CHEN, Z.; O'SHEA, J. J. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. **Immunol Res**, v. 41, n. 2, p. 87-102, 2008.

CHIANG, N. et al. Activation of lipoxin A(4) receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. **J Exp Med**, v. 191, n. 7, p. 1197-208, Apr 2000.

CHIANG. et. al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 463-87, Sep 2006.

CLISH, C. B. et al. Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 14, p. 8247-52, Jul 1999.

COOLS, N. et al. Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. **J Cell Mol Med**, v. 12, n. 2, p. 690-700, Apr 2008.

COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. **J Exp Med**, v. 204, n. 8, p. 1757-64, Aug 2007.

COSTA, E. S. et al. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. **Toxicon**, v. 74, p. 167-78, Nov 2013.

COSTA-PINTO, F. A. et al. Neural correlates of IgE-mediated allergy. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1088, p. 116-31, Nov 2006. ISSN 0077-8923.

CROFT, M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, n. 3-4, p. 265-73, 2003 Jun-Aug 2003. ISSN 1359-6101.

CYSTER, J. G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. **Science**, v. 286, n. 5447, p. 2098-102, Dec 1999. ISSN 0036-8075.

DALTON, D. K. et al. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. **J Exp Med**, v. 192, n. 1, p. 117-22, Jul 2000.

DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, n. 6565, p. 537-40, Feb 1996. ISSN 0028-0836.

DAVISON, G. M.; NOVITZKY, N.; ABDULLA, R. Monocyte derived dendritic cells have reduced expression of co-stimulatory molecules but are able to stimulate autologous T-cells in patients with MDS. **Hematol Oncol Stem Cell Ther**, v. 6, n. 2, p. 49-57, Jun 2013.

DE SAINT-VIS, B. et al. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. **J Immunol**, v. 160, n. 4, p. 1666-76, Feb 1998.

DEVCHAND, P. R. et al. Human ALX receptor regulates neutrophil recruitment in transgenic mice: roles in inflammation and host defense. **FASEB J**, v. 17, n. 6, p. 652-9, Apr 2003.

DIEHL, L. et al. The role of CD40 in peripheral T cell tolerance and immunity. **J Mol Med (Berl)**, v. 78, n. 7, p. 363-71, 2000. ISSN 0946-2716.

DING, L. et al. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **J Immunol**, v. 151, n. 3, p. 1224-34, Aug 1993.

DOETZE, A. et al. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. **Int Immunol**, v. 12, n. 5, p. 623-30, May 2000.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 17, p. 2851-71, Sep 2009.

DONATO, N. J. et al. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A2 toxin. A novel growth inhibitory mechanism. **Biochem Pharmacol**, v. 51, n. 11, p. 1535-43, Jun 1996.

DRESS, R. J.; WONG, A. Y.; GINHOUX, F. Homeostatic control of dendritic cell numbers and differentiation. **Immunol Cell Biol**, v. 96, n. 5, p. 463-476, May 2018.

DUDEK, A. M. et al. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. **Front Immunol**, v. 4, p. 438, Dec 2013.

DUFTON, N. et al. Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. **J Immunol**, v. 184, n. 5, p. 2611-9, Mar 2010.

DUGAST, A. S.; VANHOVE, B. Immune regulation by non-lymphoid cells in transplantation. **Clin Exp Immunol**, v. 156, n. 1, p. 25-34, Apr 2009.

DURAI, V.; MURPHY, K. M. Functions of Murine Dendritic Cells. **Immunity**, v. 45, n. 4, p. 719-736, Oct 2016.

ENK, A. H. et al. An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. **J Immunol**, v. 150, n. 9, p. 3698-704, May 1993.

EVANS, H. G. et al. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 43, p. 17034-9, Oct 2007.

FANG, H. et al. TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. **Cell Mol Immunol**, v. 11, n. 2, p. 150-9, Mar 2014.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, n. 2, p. 229-34, 1987.

FAURE, G.; BON, C. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 730-8, Jan 1988.

FAURE, G. et al. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur J Biochem**, v. 223, n. 1, p. 161-4, Jul 1994.

FAURE, G. et al. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry**, v. 30, n. 32, p. 8074-83, Aug 1991.

FAVORETTO, B. C. et al. Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. **Toxicon**, v. 57, n. 4, p. 600-7, Mar 2011.

FRANCISCHETTI, I. M. et al. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 127, n. 1, p. 23-36, Aug 2000.

FREEMAN, G. J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med**, v. 192, n. 7, p. 1027-34, Oct 2000.

FREITAS, A. P. **Estudo do potencial regulador da crotoxina e suas subunidades isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a atividade funcional das células dendríticas**. p.139. 2014

FREITAS, A. P. et al. Crotoxin Isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom modulates the functional activity of dendritic cells via formyl peptide receptors. **J Immunol Res**, v. 2018, p. 7873257, 2018.

FRUCHT, D. M. et al. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends Immunol**, v. 22, n. 10, p. 556-60, Oct 2001.

FUJIHARA, M. et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacol Ther**, v. 100, n. 2, p. 171-94, Nov 2003.

FUKAO, T.; MATSUDA, S.; KOYASU, S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. **J Immunol**, v. 164, n. 1, p. 64-71, Jan 2000.

FUKAURA, H. et al. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. **J Clin Invest**, v. 98, n. 1, p. 70-7, Jul 1996.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-5, Nov 2001.

GAO, J. L.; LEE, E. J.; MURPHY, P. M. Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. **J Exp Med**, v. 189, n. 4, p. 657-62, Feb 1999.

GARCIA, F. et al. Crotaotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. **Toxicol**, v. 42, n. 4, p. 433-7, Sep 2003.

GATELY, M. K. et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 16, p. 495-521, 1998.

GAUSE, W. C. et al. The development of CD4+ T effector cells during the type 2 immune response. **Immunol Res**, v. 20, n. 1, p. 55-65, 1999.

GINHOUX, F. et al. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. **J Exp Med**, v. 206, n. 13, p. 3115-30, Dec 2009.

GIULIETTI, A. et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386-401, Dec 2001.

GODFREY, W. R. et al. In vitro-expanded human CD4(+)/CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 453-61, Jul 2004.

GOMEZ DE AGÜERO, M. et al. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. **J Clin Invest**, v. 122, n. 5, p. 1700-11, May 2012.

GOSSELIN, D.; TURCOTTE, R.; LEMIEUX, S. Phenotypic characterization of two cell populations involved in the acquisition of suppressor activity by cultured spleen

cells from *Mycobacterium lepraemurium*-infected mice. **Clin Exp Immunol**, v. 102, n. 3, p. 515-22, Dec 1995.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 515-48, 2005.

GRINBERG-BLEYER, Y. et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. **J Exp Med**, v. 207, n. 9, p. 1871-8, Aug 2010.

GROUX, H. et al. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, v. 389, n. 6652, p. 737-42, Oct 1997.

GRÜTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 1, p. 3-15, Jan 2005.

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

GUIDOLIN, F. R. et al. Characterization of anti-crotalic antibodies. **Toxicon**, v. 66, p. 7-17, May 2013.

GULLIAMS, M. et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. **Immunity**, v. 45, n. 3, p. 669-684, 09 2016.

GUMA, M. et al. Constitutive intestinal NF- $\kappa$ B does not trigger destructive inflammation unless accompanied by MAPK activation. **J Exp Med**, v. 208, n. 9, p. 1889-900, Aug 2011.

GUNZER, M. et al. Dendritic cells and tumor immunity. **Semin Immunol**, v. 13, n. 5, p. 291-302, Oct 2001.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-review. The crotoxin complex--an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v. 16, n. 1, p. 19-30, 1978.

HAMILTON, C. M. et al. The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. **Infect Immun**, v. 77, n. 6, p. 2488-98, Jun 2009.

HAMMER, G. E.; MA, A. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 743-91, 2013.

HAN, X. et al. Chlamydia infection induces ICOS ligand-expressing and IL-10-producing dendritic cells that can inhibit airway inflammation and mucus overproduction elicited by allergen challenge in BALB/c mice. **J Immunol**, v. 176, n. 9, p. 5232-9, May 2006.

HARRIS, L. K.; FRANSON, R. C. [1-14C]oleate-labeled autoclaved yeast: a membranous substrate for measuring phospholipase A2 activity in vitro. **Anal Biochem**, v. 193, n. 2, p. 191-6, Mar 1991.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 7, p. 1560-3, Jul 1971.

HERMAN, A. E. et al. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. **J Exp Med**, v. 199, n. 11, p. 1479-89, Jun 2004.

HERNÁNDEZ CRUZ, A. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediators Inflamm**, v. 2008, p. 874962, 2008.

HERRICK, C. A. et al. Th2 responses induced by epicutaneous or inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. **J Clin Invest**, v. 105, n. 6, p. 765-75, Mar 2000.

HILKENS, C. M.; ISAACS, J. D.; THOMSON, A. W. Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. **Int Rev Immunol**, v. 29, n. 2, p. 156-83, Apr 2010.

HIMMELRICH, H. et al. The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor beta 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. **J Immunol**, v. 161, n. 11, p. 6156-63, Dec 1998.

HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**, v. 34, n. 10, p. 1149-55, Oct 1996.

HOPE, J. C. et al. Identification of dendritic cells as a major source of interleukin-6 in draining lymph nodes following skin sensitization of mice. **Immunology**, v. 86, n. 3, p. 441-7, Nov 1995.

HSIEH, C. S. et al. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 13, p. 6065-9, Jul 1992.

HSIEH, C. S. et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 547-9, Apr 1993.

HU, H. et al. Noncanonical NF-kappaB regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 31, p. 12827-32, Aug 2011..

HU, W. et al. Differential outcome of TRIF-mediated signaling in TLR4 and TLR3 induced DC maturation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 45, p. 13994-9, Nov 2015.

HU, W.; PASARE, C. Location, location, location: tissue-specific regulation of immune responses. **J Leukoc Biol**, v. 94, n. 3, p. 409-21, Sep 2013.

HUBO, M. et al. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. **Front Immunol**, v. 4, p. 82, 2013.

HUTLOFF, A. et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 263-6, Jan 1999.

IDRIS-KHODJA, N. et al. Dual opposing roles of adaptive immunity in hypertension. **Eur Heart J**, v. 35, n. 19, p. 1238-44, May 2014.

IMLER, J. L.; HOFFMANN, J. A. Toll signaling: the TIREless quest for specificity. **Nat Immunol**, v. 4, n. 2, p. 105-6, Feb 2003.

INABA, K. et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J Exp Med**, v. 176, n. 6, p. 1693-702, Dec 1992.

INABA, K. et al. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. **J Exp Med**, v. 175, n. 5, p. 1157-67, May 1992.

ITANO, A. A.; JENKINS, M. K. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. **Nat Immunol**, v. 4, n. 8, p. 733-9, Aug 2003.

ITO, T. et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. **J Exp Med**, v. 204, n. 1, p. 105-15, Jan 2007.

IWAMOTO, S. et al. TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. **J Immunol**, v. 179, n. 3, p. 1449-57, Aug 2007.

JALECO, S. et al. Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. **J Immunol**, v. 171, n. 1, p. 61-8, Jul 2003.

JEON, Y. T. et al. Modulation of Dendritic Cell Activation and Subsequent Th1 Cell Polarization by Lidocaine. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139845, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26445366> >.

JIMENEZ PORRAS, J. M. INTRASPECIFIC VARIATIONS IN COMPOSITION OF VENOM OF THE JUMPING VIPER, BOTHROPS NUMMIFERA. **Toxicon**, v. 2, p. 187-95, Dec 1964.

JOFFRE, O. P. et al. Cross-presentation by dendritic cells. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 8, p. 557-69, Jul 2012.

JONULEIT, H. et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. **J Exp Med**, v. 192, n. 9, p. 1213-22, Nov 2000.

JONULEIT, H. et al. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. **Trends Immunol**, v. 22, n. 7, p. 394-400, Jul 2001.

JONULEIT, H. et al. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. **J Immunol**, v. 158, n. 6, p. 2610-5, Mar 1997.

JOZEFOWSKI, S. et al. Leukotrienes modulate cytokine release from dendritic cells. **Immunology**, v. 116, n. 4, p. 418-28, Dec 2005.

JUNE, C. H. et al. The B7 and CD28 receptor families. **Immunol Today**, v. 15, n. 7, p. 321-31, Jul 1994.

JUSTIZ, V. E RAMPHULL, K. **Hypersensitivity Reactions , Delayed .** 2018.

KABELITZ, D.; WESCH, D.; OBERG, H. H. Regulation of regulatory T cells: role of dendritic cells and toll-like receptors. **Crit Rev Immunol**, v. 26, n. 4, p. 291-306, 2006.

KAIKO, G. E. et al. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? **Immunology**, v. 123, n. 3, p. 326-38, Mar 2008.

KAPLAN, D. H. et al. Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. **J Exp Med**, v. 204, n. 11, p. 2545-52, Oct 2007.

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

KARUNARATHNE, D. S. et al. Programmed Death-1 Ligand 2-Mediated Regulation of the PD-L1 to PD-1 Axis Is Essential for Establishing CD4(+) T Cell Immunity. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 333-45, Aug 2016.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-50, May 2011.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 677-704, 2008.

KIM, S. D. et al. The agonists of formyl peptide receptors prevent development of severe sepsis after microbial infection. **J Immunol**, v. 185, n. 7, p. 4302-10, Oct 2010.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613-35, 1989.

KLAVER, E. J. et al. Trichuris suis-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated. **Int J Parasitol**, v. 43, n. 3-4, p. 191-200, Mar 2013.



KNITTEL, P. S. et al. Characterising the enzymatic profile of crude tentacle extracts from the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis* (Cnidaria: Hydrozoa). **Toxicon**, v. 119, p. 1-7, Sep 2016.

KOCH, F. et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 741-6, Aug 1996.

KRUPNICK, A. S. et al. Murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogeneic CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. **J Immunol**, v. 175, n. 10, p. 6265-70, Nov 2005.

KUBACH, J. et al. Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance. **Int J Hematol**, v. 81, n. 3, p. 197-203, Apr 2005.

KUCHROO, V. K. et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. **Cell**, v. 80, n. 5, p. 707-18, Mar 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.

LANDUCCI, E. C. et al. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 3, p. 578-83, Feb 1995.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 92-7, Oct 2000.

LATCHMAN, Y. et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat Immunol**, v. 2, n. 3, p. 261-8, Mar 2001.

LE GROS, G. et al. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. **J Exp Med**, v. 172, n. 3, p. 921-9, Sep 1990.

LE, Y.; MURPHY, P. M.; WANG, J. M. Formyl-peptide receptors revisited. **Trends Immunol**, v. 23, n. 11, p. 541-8, Nov 2002.

LEE, M. S.; KIM, Y. J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 447-80, 2007.

LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. **Nat Immunol**, v. 8, n. 6, p. 630-8, Jun 2007.

LENARDO, M. et al. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 221-53, 1999.

LENSCHOW, D. J. et al. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. **J Exp Med**, v. 181, n. 3, p. 1145-55, Mar 1995.

LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. **Annu Rev Immunol**, v. 14, p. 233-58, 1996.

LEVY, B. D. et al. Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). **Nat Med**, v. 8, n. 9, p. 1018-23, Sep 2002.

LIANG, L.; SHA, W. C. The right place at the right time: novel B7 family members regulate effector T cell responses. **Curr Opin Immunol**, v. 14, n. 3, p. 384-90, Jun 2002.

LICHTMAN, A. H.; SEGEL, G. B.; LICHTMAN, M. A. The role of calcium in lymphocyte proliferation. (An interpretive review). **Blood**, v. 61, n. 3, p. 413-22, Mar 1983.

LIMA, T. S. et al. Crotoxin, a rattlesnake toxin, induces a long-lasting inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 237, n. 10, p. 1219-30, Oct 2012.

LIMA, T. S. et al. Crotoxin, a rattlesnake toxin, down-modulates functions of bone marrow neutrophils and impairs the Syk-GTPase pathway. **Toxicon**, v. 136, p. 44-55, Sep 2017.

LINTERMAN, M. A. et al. Roquin differentiates the specialized functions of duplicated T cell costimulatory receptor genes CD28 and ICOS. **Immunity**, v. 30, n. 2, p. 228-41, Feb 2009.

LISCHKE, T. et al. Comprehensive analysis of CD4+ T cells in the decision between tolerance and immunity in vivo reveals a pivotal role for ICOS. **J Immunol**, v. 189, n. 1, p. 234-44, Jul 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LUO, X. et al. Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 8, p. 2821-6, Feb 2007.

MA, C. S. et al. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. **J Exp Med**, v. 209, n. 7, p. 1241-53, Jul 2012.

MA, D. Y.; CLARK, E. A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. **Semin Immunol**, v. 21, n. 5, p. 265-72, Oct 2009.

MACATONIA, S. E. et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. **J Immunol**, v. 154, n. 10, p. 5071-9, May 1995.

MACDONALD, A. S. et al. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. **J Immunol**, v. 168, n. 2, p. 537-40, Jan 2002.

MACHADO, F. S. et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nat Med**, v. 12, n. 3, p. 330-4, Mar 2006.

MAGRO, A. J. et al. Intraspecific variation in the venom electrophoretic profile recently captured *Crotalus durissus terrificus* snakes. **J. Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 2, p. 276-301, 2001.

MAHNKE, K.; BEDKE, T.; ENK, A. H. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. **Cell Immunol**, v. 250, n. 1-2, p. 1-13, 2007 Nov-Dec 2007.

MAHNKE, K. et al. Interaction of regulatory T cells with antigen-presenting cells in health and disease. **Chem Immunol Allergy**, v. 94, p. 29-39, 2008. ISSN 1660-2242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802334> >.

MAHNKE, K. et al. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. **Immunol Cell Biol**, v. 80, n. 5, p. 477-83, Oct 2002.

MALDONADO, R. A.; VON ANDRIAN, U. H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. **Adv Immunol**, v. 108, p. 111-65, 2010.

MALDONADO-LÓPEZ, R.; MOSER, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. **Semin Immunol**, v. 13, n. 5, p. 275-82, Oct 2001.

MALEK, T. R. The biology of interleukin-2. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 453-79, 2008.

MANETTI, R. et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **J Exp Med**, v. 177, n. 4, p. 1199-204, Apr 1993.

MANNON, P. J. et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. **N Engl J Med**, v. 351, n. 20, p. 2069-79, Nov 2004.

MARGUTI, I. et al. Expansion of CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells by bone marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, v. 127, n. 1, p. 50-61, May 2009.

MARSH, N.; GLATSTON, A. Some observations on the venom of the rhinoceros horned viper, *Bitis nasicornis* Shaw. **Toxicon**, v. 12, n. 6, p. 621-8, Dec 1974.

MASURIER, C. et al. Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow cultured with different cytokine combinations: implications for anti-tumoral cell therapy. **Immunology**, v. 96, n. 4, p. 569-77, Apr 1999.

MATSUI, K.; TAMAI, S.; IKEDA, R. Effects of Macrolide Antibiotics on Th1 Cell and Th2 Cell Development Mediated by Langerhans Cells. **J Pharm Pharm Sci**, v. 19, n. 3, p. 357-366, 2016 Jul - Sep 2016.

MATSUMOTO, K. et al. B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 172, n. 4, p. 2530-41, Feb 2004.

MCADAM, A. J.; SCHWEITZER, A. N.; SHARPE, A. H. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. **Immunol Rev**, v. 165, p. 231-47, Oct 1998.

MCCOY, K. D.; LE GROS, G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. **Immunol Cell Biol**, v. 77, n. 1, p. 1-10, Feb 1999.

MEANS, T. K.; GOLENBOCK, D. T.; FENTON, M. J. The biology of Toll-like receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 11, n. 3, p. 219-32, Sep 2000.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Curr Opin Immunol**, v. 9, n. 1, p. 4-9, Feb 1997.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 298-300, Apr 2002.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255-8, Aug 2001.

MEMPEL, T. R.; HENRICKSON, S. E.; VON ANDRIAN, U. H. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. **Nature**, v. 427, n. 6970, p. 154-9, Jan 2004.

MERAD, M.; GINHOUX, F.; COLLIN, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 935-47, Dec 2008.

MERAD, M. et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 563-604, 2013.

METLAY, J. P. et al. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. **J Exp Med**, v. 171, n. 5, p. 1753-71, May 1990.

MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 6, p. 501-19, Dec 2006.

MIKI K, N. K., BOHNENKAMP H, YOSHIMOTO; T, M. R., KAMIGAKI T. **Dendritic cells pulsed with peptivator® ovalbumin induce both ova-specific CD4+ and CD8+ t cells and cause antitumor effects in a mouse model of lymphoma.** 17 2016.

MILDNER, A.; JUNG, S. Development and function of dendritic cell subsets. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 642-56, May 2014.

MILLER, L. S. et al. MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against *Staphylococcus aureus*. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 79-91, Jan 2006.

MILLER, S. I.; ERNST, R. K.; BADER, M. W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 1, p. 36-46, Jan 2005.

MILLS, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 11, p. 841-55, Nov 2004.

MOCELLIN, S. et al. The dual role of IL-10. **Trends Immunol**, v. 24, n. 1, p. 36-43, Jan 2003.

MOLL, H. Dendritic cells and host resistance to infection. **Cell Microbiol**, v. 5, n. 8, p. 493-500, Aug 2003.

MONDINO, A.; KHORUTS, A.; JENKINS, M. K. The anatomy of T-cell activation and tolerance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 6, p. 2245-52, Mar 1996.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 18, p. 2897-912, Sep 2008.

MOORE, C. et al. Dendritic cells and B cells cooperate in the generation of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) allogeneic T cells. **Transplant Proc**, v. 42, n. 1, p. 371-5, 2010 Jan-Feb 2010.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 683-765, 2001. >.

MOREIRA, V. et al. Secretory phospholipases A(2) isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E2 and D2 and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 428-39, Sep 2008.

MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. **Nat Immunol**, v. 1, n. 3, p. 199-205, Sep 2000.

MOU, H. B. et al. TGF-beta1 treated murine dendritic cells are maturation resistant and down-regulate Toll-like receptor 4 expression. **J Zhejiang Univ Sci**, v. 5, n. 10, p. 1239-44, Oct 2004.

MURPHY, T. L. et al. Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. **Annu Rev Immunol**, v. 34, p. 93-119, 05 2016.

MÜLLER, G. et al. Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. **J Invest Dermatol**, v. 119, n. 4, p. 836-41, Oct 2002.

NELSON, B. H. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 3983-8, Apr 2004.

NEUMANN, W. P.; HABERMANN, E. [Crotactin, the main toxin from venom from the Brazilian rattlesnake, *Crotalus terrificus terrificus*]. **Biochem Z**, v. 327, n. 3, p. 170-85, 1955.

NGUYEN, L. T. et al. Cross-linking the B7 family molecule B7-DC directly activates immune functions of dendritic cells. **J Exp Med**, v. 196, n. 10, p. 1393-8, Nov 2002.

NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 291, p. 43-60, 2005.

NISHIMURA, H. et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. **Immunity**, v. 11, n. 2, p. 141-51, Aug 1999.

NISHIMURA, H. et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. **Science**, v. 291, n. 5502, p. 319-22, Jan 2001.

NOGUEIRA-NETO, F. E. S. et al. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 91, n. 2, p. 252-60, Dec 2008.

NUNES, F. P. et al. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1100-6, Jun 2010.

O'NEILL, L. A.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 5, p. 353-64, May 2007.

O'SULLIVAN, B.; THOMAS, R. CD40 and dendritic cell function. **Crit Rev Immunol**, v. 23, n. 1-2, p. 83-107, 2003.

PANARO, M. A. et al. Biological role of the N-formyl peptide receptors. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 28, n. 1, p. 103-27, 2006.

PARK, J.; BRYERS, J. D. Chemokine programming dendritic cell antigen response: part II - programming antigen presentation to T lymphocytes by partially maintaining immature dendritic cell phenotype. **Immunology**, v. 139, n. 1, p. 88-99, May 2013.

PENG, X. et al. Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon-gamma production. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 7, p. 1621-7, Jul 1996.

>.

PEREAÑEZ, J. A.; GÓMEZ, I. D.; PATIÑO, A. C. Relationship between the structure and the enzymatic activity of crotoxin complex and its phospholipase A2 subunit: an in silico approach. **J Mol Graph Model**, v. 35, p. 36-42, May 2012.

PERRIN, P. J. et al. B7-mediated costimulation can either provoke or prevent clinical manifestations of experimental allergic encephalomyelitis. **Immunol Res**, v. 14, n. 3, p. 189-99, 1995.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W. R. Leukotrienes. **N Engl J Med**, v. 357, n. 18, p. 1841-54, Nov 2007.

PIDGEON, G. P. et al. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, n. 3-4, p. 503-24, Dec 2007.

PONCINI, C. V. et al. Trypanosoma cruzi induces regulatory dendritic cells in vitro. **Infect Immun**, v. 76, n. 6, p. 2633-41, Jun 2008.

POULIOT, M.; SERHAN, C. N. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor-alpha-initiated neutrophil responses and trafficking: novel regulators of a cytokine-chemokine axis relevant to periodontal diseases. **J Periodontal Res**, v. 34, n. 7, p. 370-3, Oct 1999.

PREVOT, N. et al. Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 8, p. 2267-76, Aug 2010.

PUIGNERÓ, V.; SALGADO, J.; QUERALT, J. Effects of cyclosporine and dexamethasone on IgE antibody response in mice, and on passive cutaneous anaphylaxis in the rat. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 108, n. 2, p. 142-7, Oct 1995.

QURESHI, S. T. et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). **J Exp Med**, v. 189, n. 4, p. 615-25, Feb 1999. I

RADHAKRISHNAN, S. et al. Naturally occurring human IgM antibody that binds B7-DC and potentiates T cell stimulation by dendritic cells. **J Immunol**, v. 170, n. 4, p. 1830-8, Feb 2003.

RADVANYI, F. et al. Binding of crotoxin, a presynaptic phospholipase A2 neurotoxin, to negatively charged phospholipid vesicles. **J Neurochem**, v. 53, n. 4, p. 1252-60, Oct 1989.

RAMSTEDT, U. et al. Lipoxin A-induced inhibition of human natural killer cell cytotoxicity: studies on stereospecificity of inhibition and mode of action. **J Immunol**, v. 138, n. 1, p. 266-70, Jan 1987.

RANGEL-SANTOS, A. et al. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 801-10, Jun 2004.

RANGEL-SANTOS, A. et al. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 44, n. 6, p. 609-16, Nov 2004.

REIS E SOUSA, C. et al. Regulation of dendritic cell function by microbial stimuli. **Pathol Biol (Paris)**, v. 51, n. 2, p. 67-8, Mar 2003.

REIS E SOUSA, C.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Curr Opin Immunol**, v. 11, n. 4, p. 392-9, Aug 1999.

RESCIGNO, M. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 9, p. 425-61, Sep 2002.

RICARDI, R. **Estudo dos mecanismos de supressão da resposta imune induzida pela crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus***. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo: 114f. p. 2010.

RILEY, J. L. PD-1 signaling in primary T cells. **Immunol Rev**, v. 229, n. 1, p. 114-25, May 2009.

RINCÓN, M. et al. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. **J Exp Med**, v. 185, n. 3, p. 461-9, Feb 1997.

RISSOAN, M. C. et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. **Science**, v. 283, n. 5405, p. 1183-6, Feb 1999.

RIZZUTI, D. et al. Helicobacter pylori inhibits dendritic cell maturation via interleukin-10-mediated activation of the signal transducer and activator of transcription 3 pathway. **J Innate Immun**, v. 7, n. 2, p. 199-211, 2015.

RODRIGUES, V. M. et al. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 121, n. 3, p. 215-22, Nov 1998.

RODRÍGUEZ, M. et al. Polarization of the innate immune response by prostaglandin E2: a puzzle of receptors and signals. **Mol Pharmacol**, v. 85, n. 1, p. 187-97, Jan 2014.

ROEDERER, M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. **Cytometry**, v. 45, n. 3, p. 194-205, Nov 2001.

ROLIM-ROSA, R.; VIERA, E. G. J.; SILLES-VILLARROEL, M. **Análise comparativa pelo Instituto Butantan. Mem. Inst. Butantan**: 259- 267 p. 1980- 1981.

RONCAROLO, M. G. et al. Type 1 T regulatory cells. **Immunol Rev**, v. 182, p. 68-79, Aug 2001.



RONCAROLO, M. G.; BATTAGLIA, M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 8, p. 585-98, Aug 2007.

RONCAROLO, M. G.; LEVINGS, M. K. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 6, p. 676-83, Dec 2000.

ROYCHOWDHURY, S.; SVENSSON, C. K. Mechanisms of drug-induced delayed-type hypersensitivity reactions in the skin. **AAPS J**, v. 7, n. 4, p. E834-46, Dec 2005.

RUDD, C. E. et al. Molecular interactions, T-cell subsets and a role of the CD4/CD8:p56lck complex in human T-cell activation. **Immunol Rev**, v. 111, p. 225-66, Oct 1989.

RUDD, C. J. et al. In vitro comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line. **Invest New Drugs**, v. 12, n. 3, p. 183-4, 1994.

RÖCKEN, M.; URBAN, J.; SHEVACH, E. M. Antigen-specific activation, tolerization, and reactivation of the interleukin 4 pathway in vivo. **J Exp Med**, v. 179, n. 6, p. 1885-93, Jun 1994.

RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 270, n. 3, p. 274-88, 1971.

SALAMA, A. D. et al. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Exp Med**, v. 198, n. 1, p. 71-8, Jul 2003.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J Exp Med**, v. 179, n. 4, p. 1109-18, Apr 1994.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. **Immunol Rev**, v. 177, p. 134-40, Oct 2000.

SAMBROOK, J.; GETHING, M. J. Protein structure. Chaperones, paperones. **Nature**, v. 342, n. 6247, p. 224-5, Nov 1989.

SAMPAIO, S. C. et al. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 313-21, Mar 2006.

SAMPAIO, S. C. et al. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 899-907, Jun 2003.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-60, Jun 2010.

SAMPAIO, S. C. et al. Inhibitory effect of phospholipase A(2) isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 671-6, Apr 2005.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 909-19, Jun 2006.

SAMPAIO, S. C. et al. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 4, p. 551-8, Oct 2001.

SAMUELSSON, B. et al. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, v. 237, n. 4819, p. 1171-6, Sep 1987.

SANO-MARTINS, I. S. et al. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **QJM**, v. 94, n. 10, p. 551-9, Oct 2001.

SCANNELL, M. et al. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. **J Immunol**, v. 178, n. 7, p. 4595-605, Apr 2007.

SCHEICHER, C. et al. Uptake of microparticle-adsorbed protein antigen by bone marrow-derived dendritic cells results in up-regulation of interleukin-1 alpha and interleukin-12 p40/p35 and triggers prolonged, efficient antigen presentation. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 6, p. 1566-72, Jun 1995.

SCHLITZER, A.; MCGOVERN, N.; GINHOUX, F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. **Semin Cell Dev Biol**, v. 41, p. 9-22, May 2015.

SCHLITZER, A. et al. IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 970-83, May 2013.

SCHRAML, B. U.; REIS E SOUSA, C. Defining dendritic cells. **Curr Opin Immunol**, v. 32, p. 13-20, Feb 2015.

SCHWAB, J. M.; SERHAN, C. N. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, n. 4, p. 414-20, Aug 2006.

SCHWARTZ, B. R. et al. Identification of surface proteins mediating adherence of CD11/CD18-deficient lymphoblastoid cells to cultured human endothelium. **J Clin Invest**, v. 85, n. 6, p. 2019-22, Jun 1990.

SCHWEITZER, A. N. et al. Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. **J Immunol**, v. 158, n. 6, p. 2713-22, Mar 1997.

SEDER, R. A. et al. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. **J Exp Med**, v. 176, n. 4, p. 1091-8, Oct 1992.

SEGURA, E.; AMIGORENA, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. **Trends Immunol**, v. 34, n. 9, p. 440-5, Sep 2013.

SERHAN, C. N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 17, p. 5335-9, Sep 1984.

SETOGUCHI, R. et al. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. **J Exp Med**, v. 201, n. 5, p. 723-35, Mar 2005.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 2, p. 116-26, Feb 2002.

SHEN, H. et al. Dual signaling of MyD88 and TRIF is critical for maximal TLR4-induced dendritic cell maturation. **J Immunol**, v. 181, n. 3, p. 1849-58, Aug 2008.

SHEVACH, E. M. et al. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. **Immunol Rev**, v. 182, p. 58-67, Aug 2001.

SHINER, E. K.; HOLBROOK, B. C.; ALEXANDER-MILLER, M. A. CD4+ T cell subset differentiation and avidity setpoint are dictated by the interplay of cytokine and antigen mediated signals. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100175, 2014.

SIE, C.; KORN, T. Dendritic cells in central nervous system autoimmunity. **Semin Immunopathol**, Nov 2016.

SILVA, M. C.; GONÇALVES, L. R.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. **Mediators Inflamm**, v. 5, n. 1, p. 18-23, 1996.

SON, Y. I. et al. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. **J Immunol Methods**, v. 262, n. 1-2, p. 145-57, Apr 2002.

SORDI, R. et al. Dual role of lipoxin A4 in pneumosepsis pathogenesis. **Int Immunopharmacol**, v. 17, n. 2, p. 283-92, Oct 2013.

SORNASSE, T. et al. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 473-83, Aug 1996.

SPANBROEK, R. et al. 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+) hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. **Blood**, v. 96, n. 12, p. 3857-65, Dec 2000.

SPANBROEK, R. et al. 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 2, p. 663-8, Jan 1998.

STEINBRINK, K. et al. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1634-42, Mar 1999.

STEINBRINK, K. et al. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. **J Immunol**, v. 159, n. 10, p. 4772-80, Nov 1997.

STEINBRINK, K. et al. Pillars Article: Induction of Tolerance by IL-10-Treated Dendritic Cells. *J. Immunol.* 1997. 159: 4772-4780. **J Immunol**, v. 197, n. 5, p. 1547-55, 09 2016.

STEINHILBER, D. et al. 5-lipoxygenase: underappreciated role of a pro-inflammatory enzyme in tumorigenesis. **Front Pharmacol**, v. 1, p. 143, 2010.

STEINMAN, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat Med**, v. 13, n. 2, p. 139-45, Feb 2007.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J Exp Med**, v. 137, n. 5, p. 1142-62, May 1973.

STEINMAN, R. M. et al. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. **J Exp Med**, v. 149, n. 1, p. 1-16, Jan 1979.

STEINMAN, R. M.; POPE, M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. **J Clin Invest**, v. 109, n. 12, p. 1519-26, Jun 2002.

STENFELDT, A. L. et al. Cyclosporin H, Boc-MLF and Boc-FLFLF are antagonists that preferentially inhibit activity triggered through the formyl peptide receptor. **Inflammation**, v. 30, n. 6, p. 224-9, Dec 2007.

STOLL, S. et al. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 10, p. 3231-9, Oct 1998.

SUDOWE, S. et al. The role of interleukin-4 in the regulation of sequential isotype switch from immunoglobulin G1 to immunoglobulin E antibody production. **Scand J Immunol**, v. 51, n. 5, p. 461-71, May 2000.

SUTTON, C. E. et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 331-41, Aug 2009.

SVAJGER, U.; OBERMAJER, N.; JERAS, M. Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 525-35, Apr 2010.

SWALLOW, M. M.; WALLIN, J. J.; SHA, W. C. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 423-32, Oct 1999.

SZABO, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655-69, Mar 2000.

TAE, Y. M. et al. Airway activation of formyl peptide receptors inhibits Th1 and Th17 cell responses via inhibition of mediator release from immune and inflammatory cells and maturation of dendritic cells. **J Immunol**, v. 188, n. 4, p. 1799-808, Feb 2012.

TAKAHASHI, T. et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **J Exp Med**, v. 192, n. 2, p. 303-10, Jul 2000.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335-76, 2003.

TAKEUCHI, O. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 443-51, Oct 1999.

TAN, Y. et al. Maturation of morphology, phenotype and functions of murine bone marrow-derived dendritic cells (DCs) induced by polysaccharide Kureha (PSK). **Hum Vaccin Immunother**, v. 8, n. 12, p. 1808-16, Dec 2012.

TEAGUE, T. K. et al. Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 22, p. 12691-6, Oct 1999.

TERRAZAS, C. A. et al. Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. **FASEB J**, v. 27, n. 11, p. 4547-60, Nov 2013.

TIMMERMAN, J. M.; LEVY, R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. **Annu Rev Med**, v. 50, p. 507-29, 1999.

TORCHINSKY, M. B. et al. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. **Nature**, v. 458, n. 7234, p. 78-82, Mar 2009.

TRAN, D. Q. In vitro suppression assay for functional assessment of human regulatory T cells. **Methods Mol Biol**, v. 979, p. 199-212, 2013.

TSITOURA, D. C. et al. Intranasal exposure to protein antigen induces immunological tolerance mediated by functionally disabled CD4+ T cells. **J Immunol**, v. 163, n. 5, p. 2592-600, Sep 1999.

UNDERHILL, D. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 811-5, Oct 1999.

VAN BEELEN, A. J. et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 660-9, Oct 2007.

VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 9, p. 697-709, Sep 2003.

VAN LIEMPT, E. et al. Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. **Mol Immunol**, v. 44, n. 10, p. 2605-15, Apr 2007.

VAUGHN, M. W.; PROSKE, R. J.; HAVILAND, D. L. Identification, cloning, and functional characterization of a murine lipoxin A4 receptor homologue gene. **J Immunol**, v. 169, n. 6, p. 3363-9, Sep 2002.

VEIGA-FERNANDES, H.; MUCIDA, D. Neuro-Immune Interactions at Barrier Surfaces. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 801-11, May 2016.

VUKMAN, K. V.; ADAMS, P. N.; O'NEILL, S. M. Fasciola hepatica tegumental coat antigen suppresses MAPK signalling in dendritic cells and up-regulates the expression of SOCS3. **Parasite Immunol**, v. 35, n. 7-8, p. 234-8, Jul 2013.

WAKKACH, A. et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. **Immunity**, v. 18, n. 5, p. 605-17, May 2003.

WALLET, M. A.; SEN, P.; TISCH, R. Immunoregulation of dendritic cells. **Clin Med Res**, v. 3, n. 3, p. 166-75, Aug 2005.

WANG, L. F. et al. Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like response with high IgE production in mice. **J Immunol**, v. 156, n. 11, p. 4077-82, Jun 1996.

WATFORD, W. T. et al. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, n. 5, p. 361-8, Oct 2003.

WEBER, M. et al. Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. **Science**, v. 339, n. 6117, p. 328-32, Jan 2013.

WEIGEL, B. J. et al. Comparative analysis of murine marrow-derived dendritic cells generated by Flt3L or GM-CSF/IL-4 and matured with immune stimulatory agents on the in vivo induction of antileukemia responses. **Blood**, v. 100, n. 12, p. 4169-76, Dec 2002.

WELLS, J. W. et al. Influence of interleukin-4 on the phenotype and function of bone marrow-derived murine dendritic cells generated under serum-free conditions. **Scand J Immunol**, v. 61, n. 3, p. 251-9, Mar 2005.

WOJAS, J.; PAJTASZ-PIASECKA, E. [Dendritic cell-regulatory T-cell interaction]. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 64, p. 167-74, Mar 2010.

WRIGHT, P.; UTRIAINEN, L.; MILLING, S. Dendritic cells and regulatory T cells in spondyloarthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 25, n. 4, p. 440-7, Jul 2013.

YAMAZAKI, S. et al. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- $\beta$  for the differentiation of Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4293-302, Dec 2007.

YAMAZAKI, S. et al. Direct expansion of functional CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. **J Exp Med**, v. 198, n. 2, p. 235-47, Jul 2003.

YAMAZAKI, S. et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 8, p. 2758-63, Feb 2006.

YAMAZAKI, T. et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. **J Immunol**, v. 169, n. 10, p. 5538-45, Nov 2002.

YE, R. D. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. **Pharmacol Rev**, v. 61, n. 2, p. 119-61, Jun 2009.

YOSHINAGA, S. K. et al. Characterization of a new human B7-related protein: B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS. **Int Immunol**, v. 12, n. 10, p. 1439-47, Oct 2000.

ZAMBELLI, V. O. et al. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1357-67, Jun 2008.

ZELANTE, T. et al. Interleukin-2 production by dendritic cells and its immunoregulatory functions. **Front Immunol**, v. 3, p. 161, 2012.

ZHAN, Y. et al. The inflammatory cytokine, GM-CSF, alters the developmental outcome of murine dendritic cells. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 11, p. 2889-900, Nov 2012.

ZHANG, B. W. et al. T cell responses in calcineurin A alpha-deficient mice. **J Exp Med**, v. 183, n. 2, p. 413-20, Feb 1996.

ZHANG, L. et al. Lipoxin A4 negatively regulates lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophages into dendritic-like cells. **Chin Med J (Engl)**, v. 120, n. 11, p. 981-7, Jun 2007.

ZHANG, Y. et al. TLR4 and TLR9 signals stimulate protective immunity against blood-stage Plasmodium yoelii infection in mice. **Exp Parasitol**, v. 170, p. 73-81, Nov 2016.

ZHENG, W.; FLAVELL, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 587-96, May 1997.

ZHONG, X. et al. PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 9, p. 2405-10, Sep 2007.

ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. **Blood**, v. 86, n. 9, p. 3295-301, Nov 1995.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 445-89, 2010.

ZWIJNENBURG, P. J. et al. IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis. **J Immunol**, v. 170, n. 9, p. 4724-30, May 2003.

ZYGMUNT, B.; VELDHOEN, M. T helper cell differentiation more than just cytokines. **Adv Immunol**, v. 109, p. 159-96, 2011.



# APÊNDICES

## APENDICE A- Células dendríticas *in vitro*

### 6.4.5. CTX e CB modulam DCs estimuladas com OVA + LPS *in vitro* via FPRs

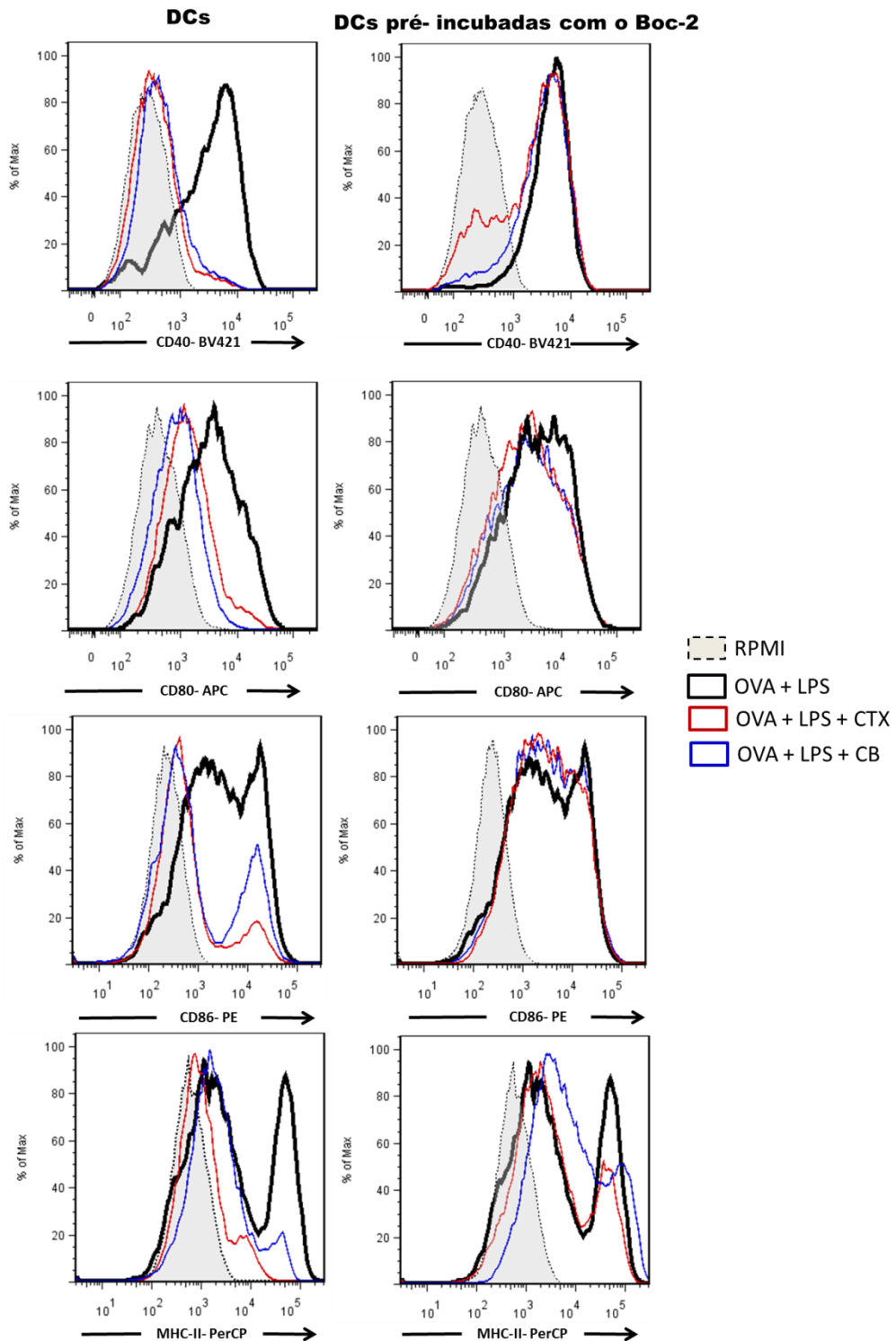


Figura 20- Envolvimento de FPRs no efeito da CTX e CB sobre a expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs incubadas com a OVA + LPS.

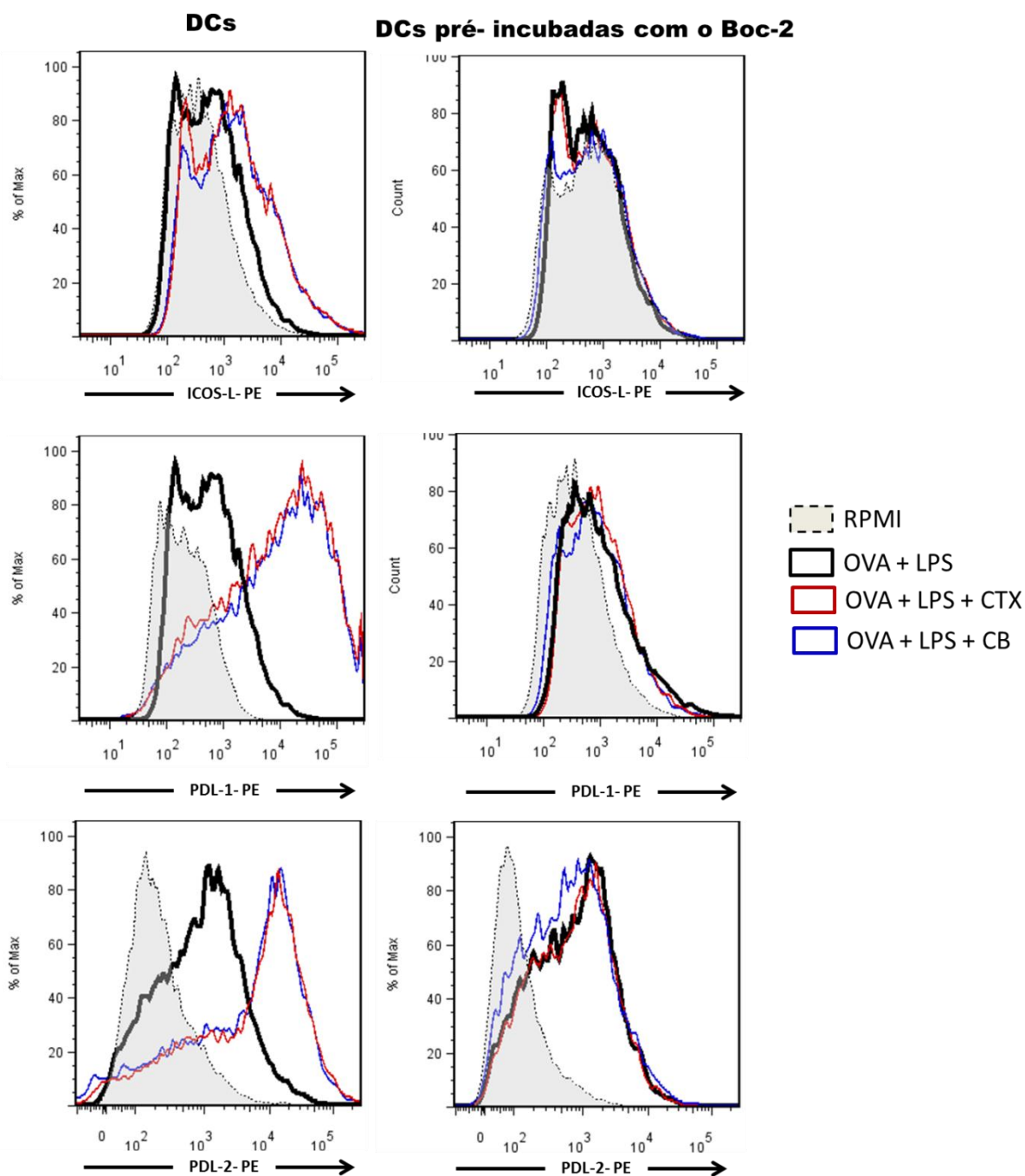
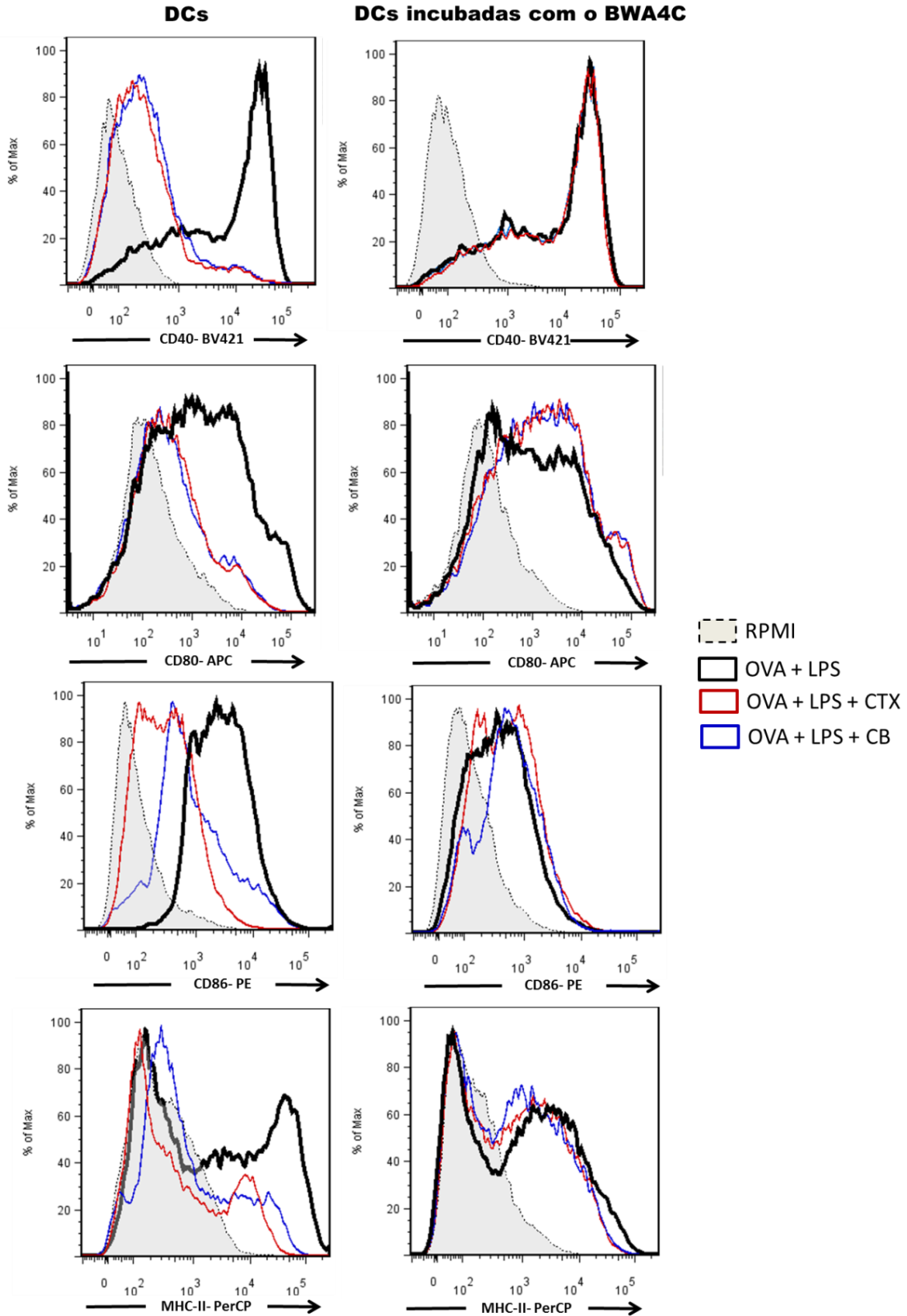
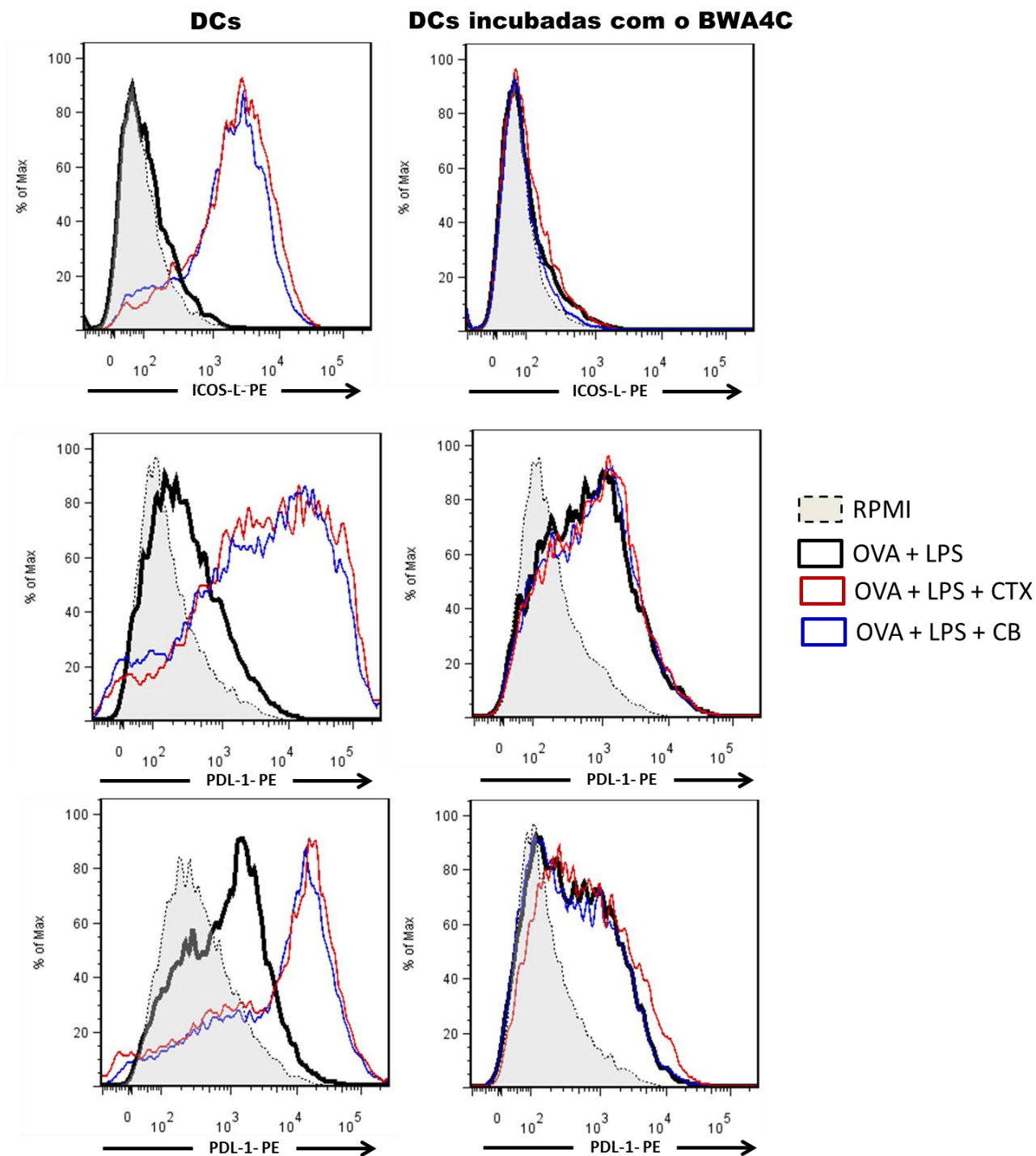


Figura 21- Envolvimento de FPRs no efeito da CTX e CB sobre a expressão de ICOSL, PDL-1 e PDL-2 em DCs incubadas com OVA + LPS.

**6.4.7. O bloqueio da enzima 5-lipoxigenase abole o efeito modulador da CTX e CB sobre as DCs estimuladas com OVA + LPS**



**Figura 23-** Papel do inibidor seletivo das 5-lipoxigenases sobre o efeito da CTX e CB na expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs estimuladas com OVA + LPS.

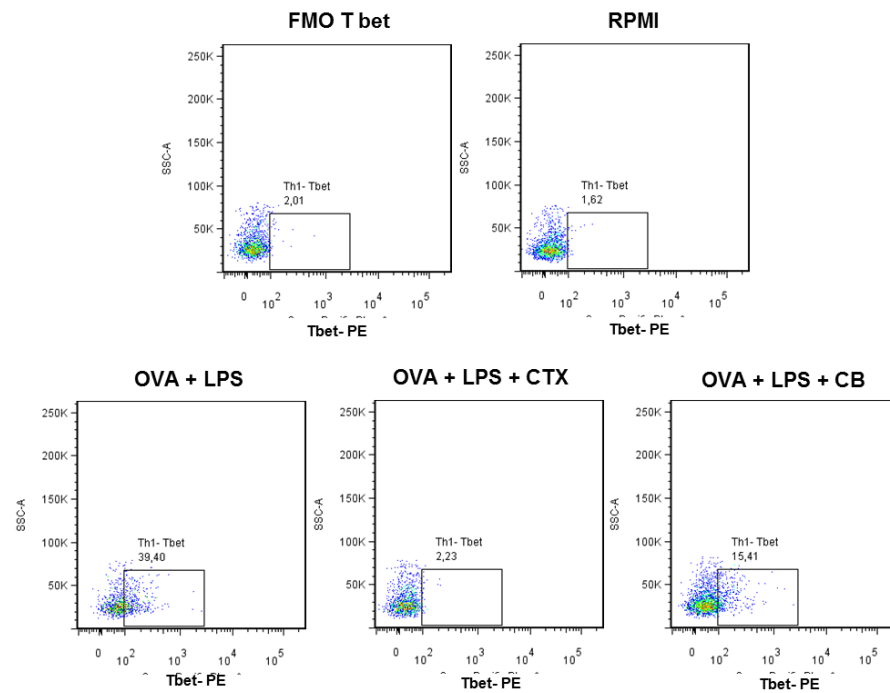


**Figura 24-** Envolvimento da via da 5- lipoxigenase no efeito da CTX e CB sobre a expressão de moléculas ICOS-L e PDL-1/2 em DCs incubadas com OVA + LPS.

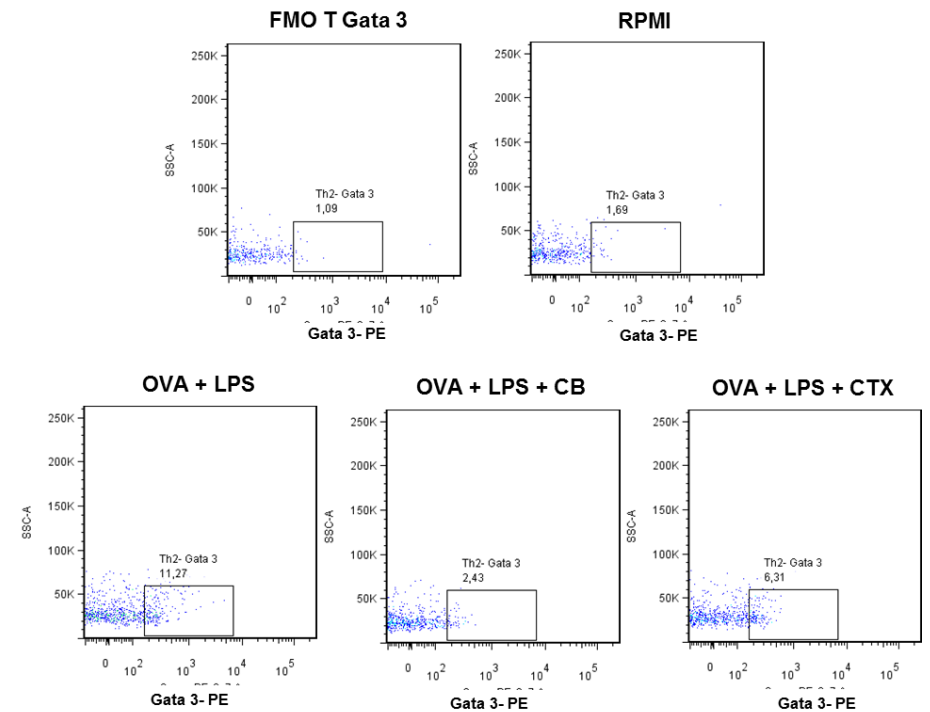
## APÊNDICE B- Co-cultura de DCs com LTs *in vitro*

### 6.5.3.CTX e CB modulam a expressão de Tbet, Gata-3 e FoxP3 em LTCD4<sup>+</sup> obtidos de animais DO 11.10 co-cultivados com DCs estimuladas com a OVA + LPS

(A)



(B)



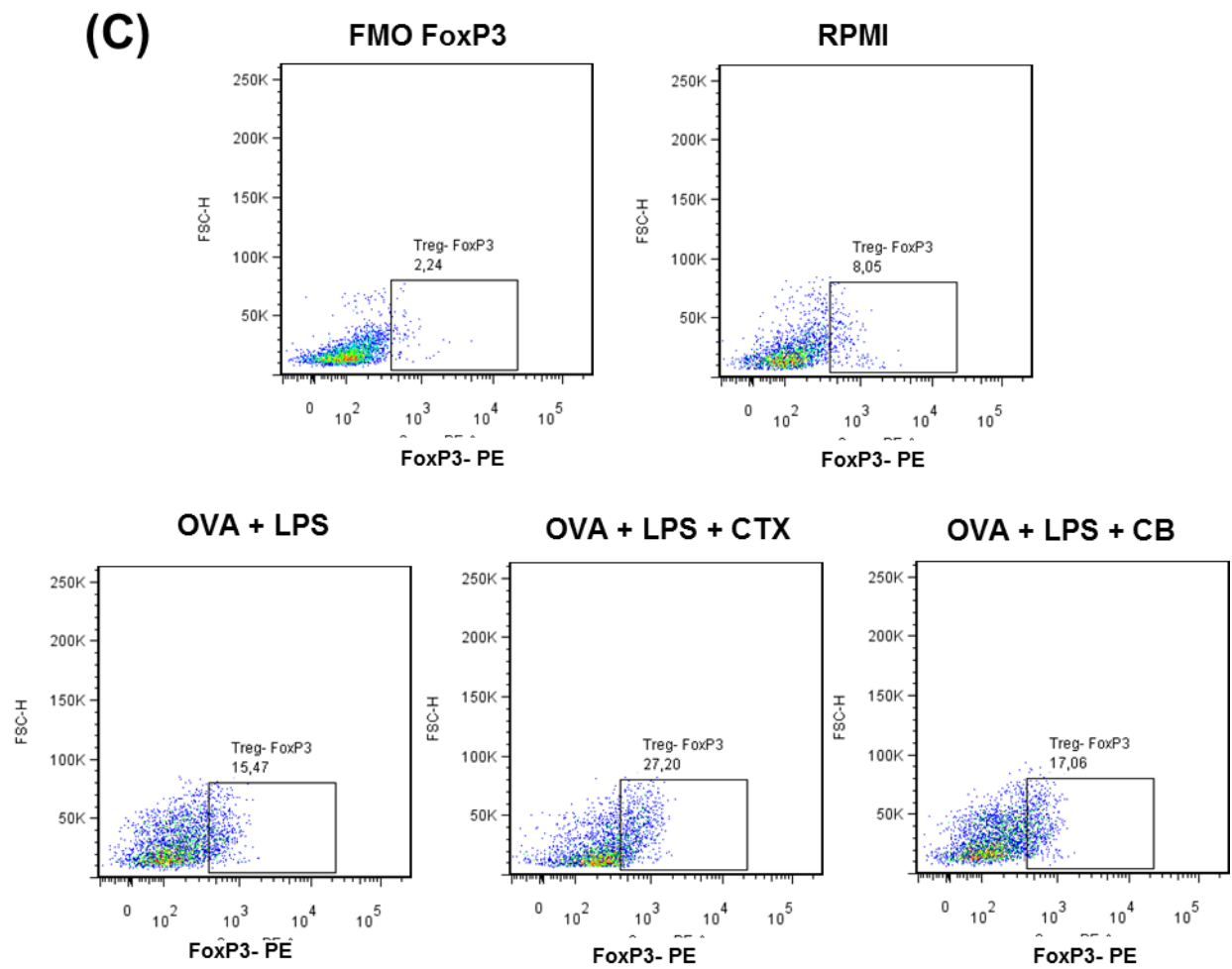
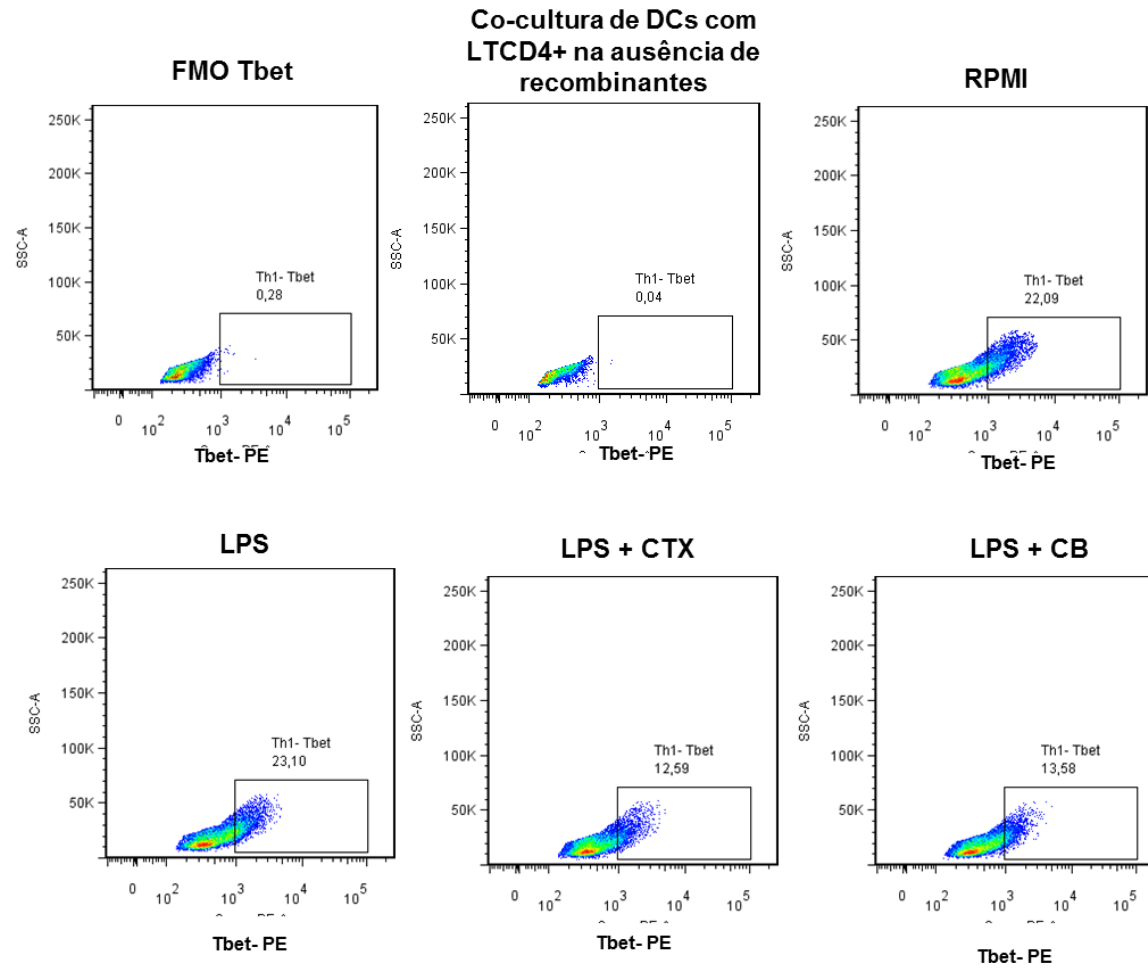


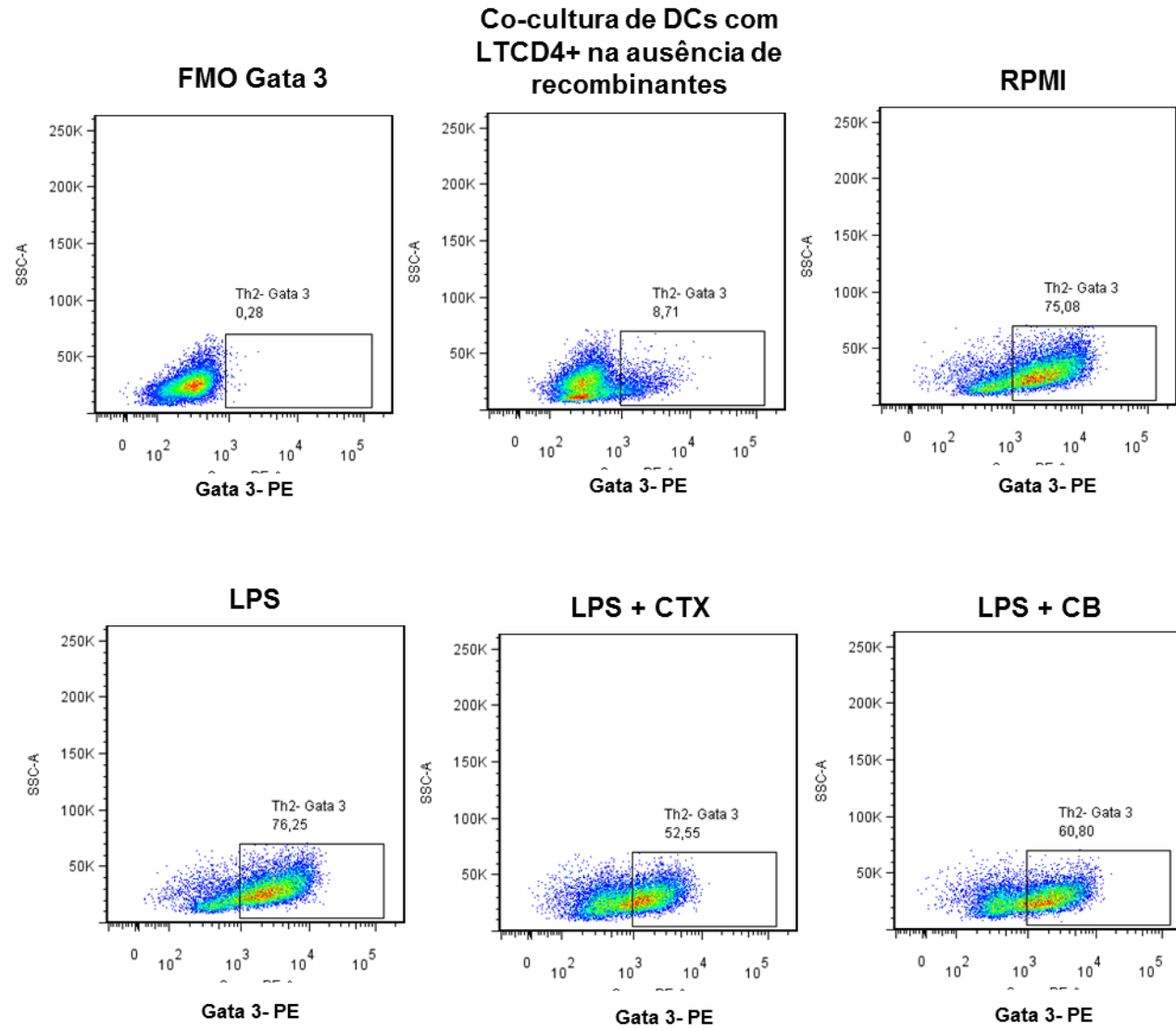
Figura 28- Porcentagem de células  $CD4^+Tbet^+$ ,  $CD4^+Gata3^+$  ou  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  em co-culturas com DCs incubadas com CTX e CB na presença ou não de OVA+ LPS

### 6.5.4. CTX e CB interferem na diferenciação de subpopulações de LTCD4<sup>+</sup> co-cultivados com DCs estimuladas com LPS

(A)



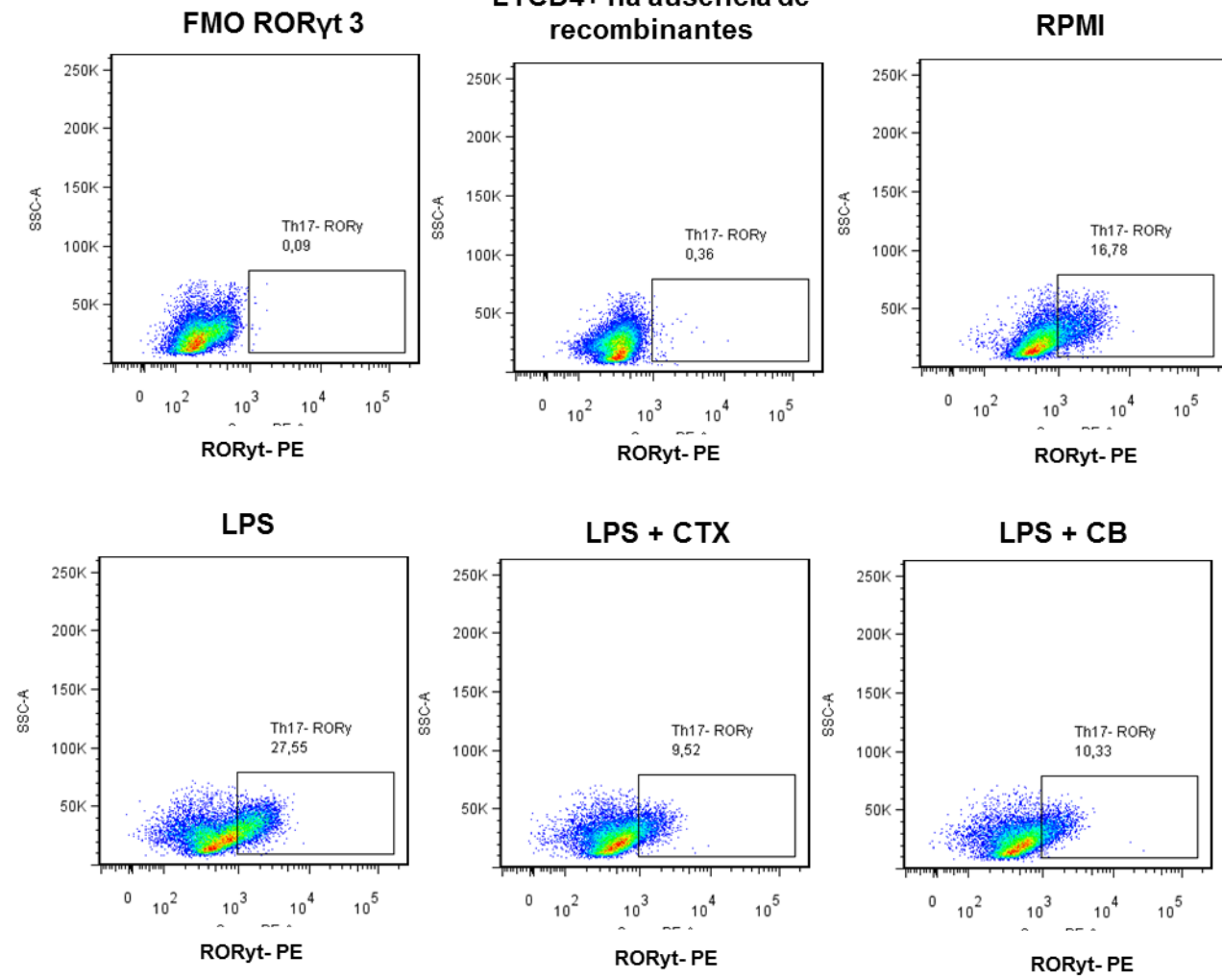
**(B)**





(C)

Co-cultura de DCs com  
LTCD4+ na ausência de  
recombinantes



(D)

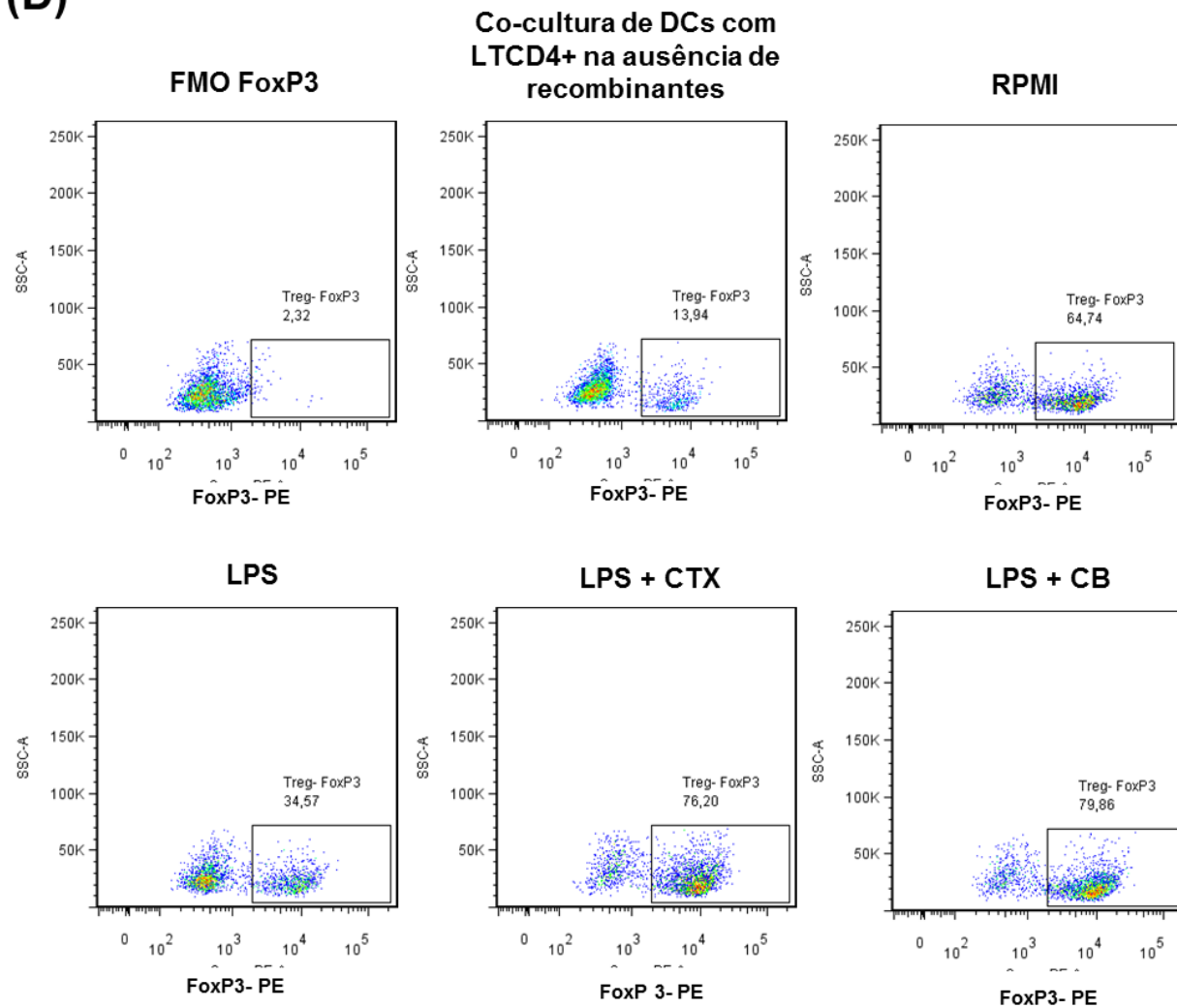


Figura 29- Análise do efeito da CTX e CB sobre a diferenciação de LTCD4<sup>+</sup> incubados com DCs diferenciadas *in vitro* e estimuladas com LPS

## APENDICE C- Modelo *in vivo*

6.6.3. A administração *in vivo* da CTX e sua subunidade CB resulta em menor porcentagem de células T CD4<sup>+</sup>, mas não CD8<sup>+</sup> em camundongos imunizados com OVA

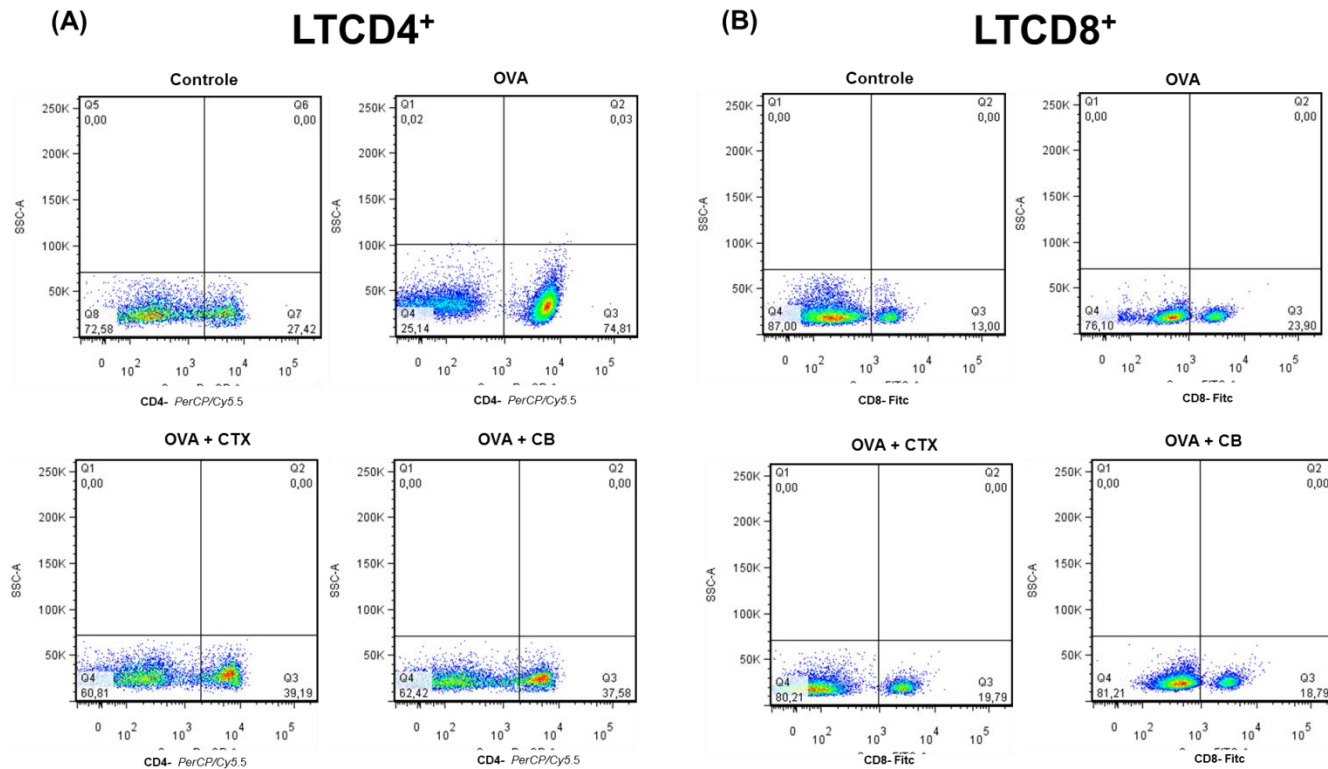
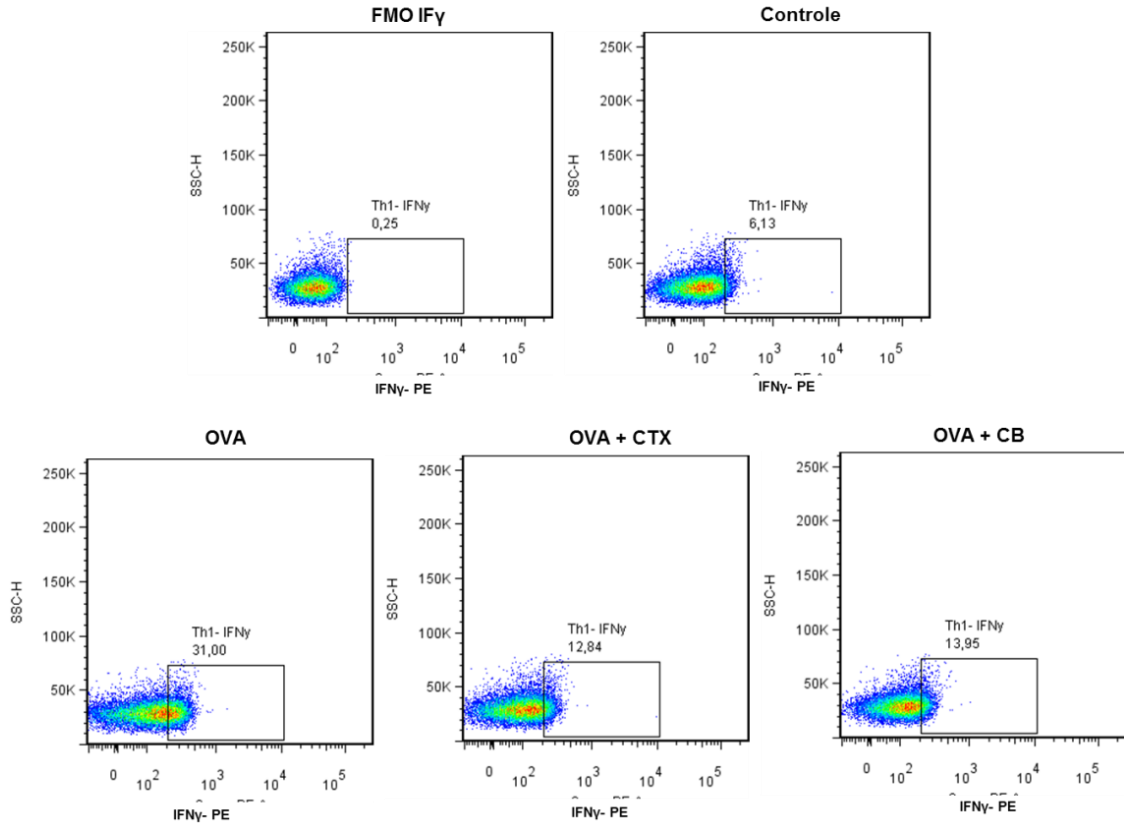


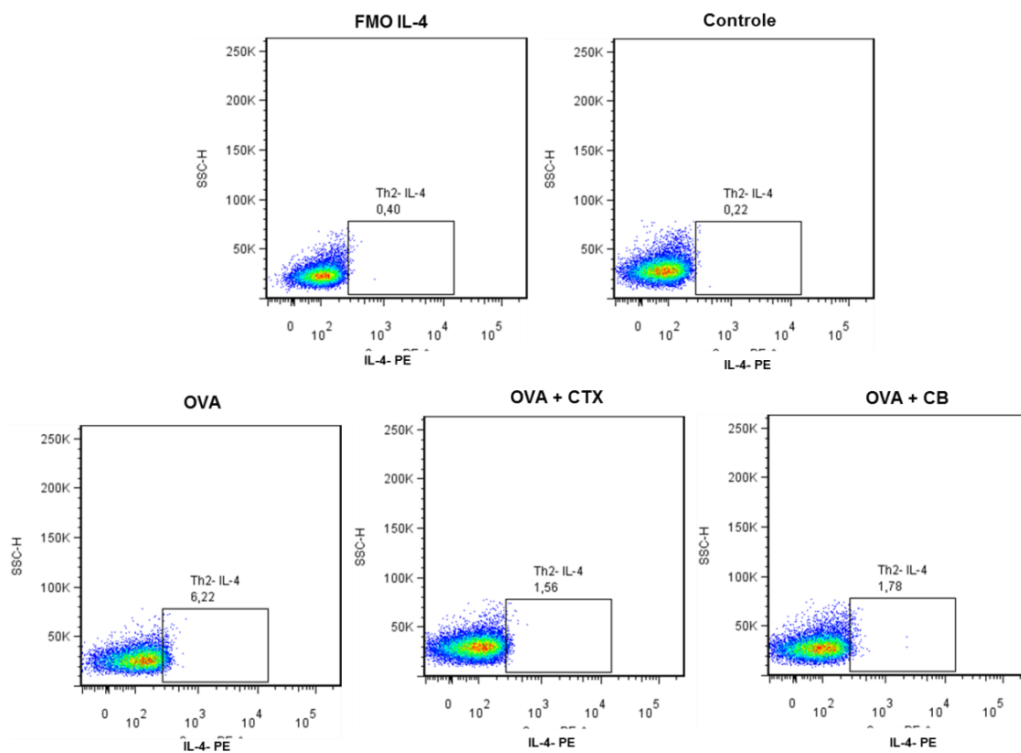
Figura 33- Porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> obtidos de animais imunizados com a OVA que receberam ou não a CTX ou CB.

(A)

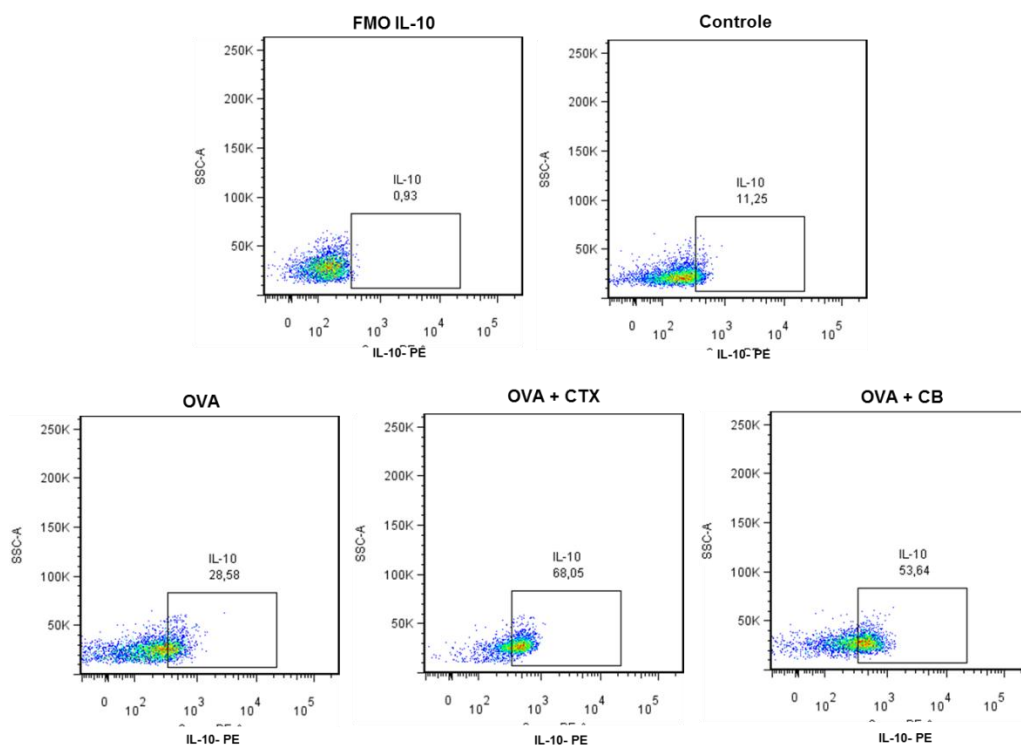
# Th1



**(B) Th2**



**(C) Treg**



**Figura 34- Expressão de citocinas IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10 obtidas de animais imunizados com a OVA e que receberam ou não a CTX ou CB**

## APÊNDICE D- Artigo publicado



### **Crotoxin Isolated from *Crotalus durissus terrificus* Venom Modulates the Functional Activity of Dendritic Cells via Formyl Peptide Receptors**

A. P. Freitas, B. C. Favoretto, P. B. Clissa, S. C. Sampaio, E. L. Faquim-Mauro

Hindawi  
Journal of Immunology Research  
Volume 2018, Article ID 7873257, 15 pages  
<https://doi.org/10.1155/2018/7873257>

#### *Research Article*

### **Crotoxin Isolated from *Crotalus durissus terrificus* Venom Modulates the Functional Activity of Dendritic Cells via Formyl Peptide Receptors**

**A. P. Freitas,<sup>1,2</sup> B. C. Favoretto,<sup>1</sup> P. B. Clissa,<sup>1</sup> S. C. Sampaio ,<sup>3,4</sup>  
and E. L. Faquim-Mauro <sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Immunopathology Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil*

<sup>2</sup>*Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*

<sup>3</sup>*Physiopathology Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil*

<sup>4</sup>*Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*

Correspondence should be addressed to E. L. Faquim-Mauro; [eliana.faquim@butantan.gov.br](mailto:eliana.faquim@butantan.gov.br)

Received 13 December 2017; Accepted 8 April 2018; Published 3 June 2018

Academic Editor: Jacek Tabarkiewicz

Copyright © 2018 A. P. Freitas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.