Renata Ricardi

**Estudo dos mecanismos de supressão da resposta imune
induzida pela crotoxina do veneno de *Crotalus durissus*
*terrificus***

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof. Dra. Eliana Faquim de Lima
Mauro

São Paulo
2010

RESUMO

RENATA R. **Estudo dos mecanismos de supressão da resposta imune induzida pela crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus***. 2010. 114 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Dentre os acidentes ofídicos relatados no Brasil, uma parte deles é causada pela subespécie de cascavel *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.terrificus*). Além de causar alterações na coagulação, o veneno de *C.d.terrificus* apresenta ação neurotóxica, miotóxica e efeito imunossupressivo. Observamos anteriormente, que o veneno de *C.d.terrificus* e a sua fração majoritária, crotoxina (CTX), quando inoculados antes ou após a imunização com albumina humana (SAH) inibem tanto a resposta celular como humoral anti-SAH e ainda, que esse efeito não é devido à indução de morte celular. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos envolvidos nesse efeito da CTX sobre o sistema imune. A análise da secreção de citocinas *in vitro* permitiu verificar que a CTX induz a produção preferencial de IL-10, TGF- β e prostaglandina E₂ (PGE₂) pelas células dos camundongos que receberam a toxina. Em contraste, menor secreção de IFN- γ e IL-12 foi observada nas culturas células de camundongos imunizados com SAH ou OVA e que receberam CTX. Além disso, notamos que CTX promove aumento da expressão da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e a geração de células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em camundongos imunizados com OVA e que receberam a toxina. Pudemos verificar ainda, que a CTX foi capaz de inibir a expressão tanto das moléculas coestimuladoras como de MHC de classe II em células de camundongos imunizados com SAH ou OVA assim como nas células dendríticas (DCs) purificadas destes animais, sugerindo que a toxina tem ação direta nestas células. Em culturas de DCs, a CTX induz maior secreção de IL-10, TGF- β e PGE₂ e menor de IL-12 em relação ao obtido em DCs estimuladas com LPS. Maior expressão da enzima IDO também foi observada nas DCs que foram incubadas com a CTX. A neutralização da IL-10 *in vivo*, permitiu observar que esta citocina está envolvida na modulação induzida pela CTX. Esses resultados, em conjunto, nos permitiram avançar no esclarecimento dos mecanismos de ação da CTX sobre o sistema imune.

Palavras-chave: Veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Crotoxina. Produção de citocinas.. Células dendríticas. Células T reguladoras. Imunossupressão.

ABSTRACT

RENATA R. **Study of immune response suppression mechanisms induced by isolated crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom.** 2010. 114 p. Master thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

It has been shown that some of the accidents with snakes in Brazil, is caused by the subspecies of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.terrificus*). The venom of *C.d.terrificus* changes the coagulation system, neurotoxic, myotoxic action and immunosuppressive effect. We previously observed that the venom and its main fraction, crotoxin (CTX), when inoculated before or after immunization with human serum albumin (SAH) could inhibit both cellular and humoral anti-SAH responses and we also reported that this effect is not due to the induction of cell death. Therefore, the objective of this work was to investigate the mechanisms involved in the suppression CTX of the immune system. The analysis of *in vitro* cytokine secretion showed that the CTX induces the preferential production of IL-10, TGF- β and prostaglandin E2 (PGE₂) by cells from mice that received the toxin. In contrast, lower secretion of IFN- γ and IL-12 was observed in the cell cultures from mice immunized with OVA or SAH and that received the CTX. Moreover, we verified that CTX promotes an increase of the enzyme indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) expression and generation of TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in mice immunized with OVA and that received the toxin. CTX was able to inhibit the expression of both MHCII and costimulatory molecules in cells from mice immunized with OVA or SAH as well as in dendritic cells (DCs) purified from these animals, suggesting that the toxin has a direct action in these cells. In cultures of DCs, CTX increased the secretion of IL-10, TGF- β and PGE₂ and lower IL-12 compared to those observed in DCs stimulated with LPS. In the *in vivo* IL-10 neutralization, we observed that this cytokine is involved in the immunomodulation induced by CTX. These results, taken together, allowed us to advance in the elucidation of the mechanisms of CTX action on the immune system.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus* venom. Crotoxin. Cytokine production. Dendritic cells. Regulatory T cells. Immunosuppression.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, são registrados cerca de 30.000 acidentes ofídicos/ano. A ocorrência destes acidentes está relacionada às atividades fisiológicas das serpentes como: defesa, busca por alimentos ou reprodução. Dentre as famílias de serpentes encontradas no território brasileiro, a *Viperidae* destaca-se das demais por representar o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública, uma vez que é responsável pela maioria e os mais graves acidentes ofídicos notificados. A fauna do brasileira inclui cinco gêneros que podem somar de 30-36 espécies/subespécies de viperídeos. O gênero *Crotalus* é responsável por 7-8 % dos acidentes relatados, os quais apresentam altos índices de letalidade (1,9%) na ausência de soroterapia (CARDOSO et al., 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

As serpentes do gênero *Crotalus* (cascavéis) são robustas, pouco ágeis e apresentam como característica mais evidente a presença de chocalho ou guizo na extremidade caudal. No Brasil, este gênero está representado por uma única espécie, *Crotalus durissus* (*C.d.*), que pode ser subdividida em cinco subespécies de acordo com a sua coloração e distribuição geográfica, habitando os cerrados do Brasil central, as regiões áridas e semiáridas do Nordeste, os campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte (CARDOSO et al., 2003).

As subespécies mais freqüentemente encontradas são *C.d.terrificus* (região sudeste), *C.d. cascavella* (região nordeste) e *C.d. collilineatus* (região sudeste). Destas três, a mais estudada é a *C.d.terrificus* e apresenta veneno com maior toxicidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Os envenenamentos por *C.d.terrificus* são caracterizados por quadro local pouco evidenciado, porém sistemicamente apresentam efeito neurotóxico e miotóxico, alterações da coagulação sanguínea e em casos moderados ou graves, observam-se desordens hemostáticas, paralisia respiratória, hipotensão e falência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985, 1987, 2003; SANO-MARTINS et al., 2001). Em casos severos, podem ser observadas outras sérias complicações como danos no

coração e no fígado resultando na falência múltipla de órgãos (HERNANDEZ CRUZ et al., 2008).

Estes efeitos observados são resultantes da ação de diferentes componentes do veneno como: a crotamina, a convulxina, a giroxina, a crotoxina, alguns peptídeos e enzimas (BERCOVICI et al., 1987).

A crotamina é geralmente encontrada nos venenos das cascavéis da região Sul do Brasil e da Argentina. É uma miotoxina polipeptídica que age sobre estruturas de canais de sódio da musculatura esquelética podendo causar paralisia muscular e respiratória (MOURA-GONÇALVES e VIEIRA, 1950). A convulxina é uma glicoproteína que representa cerca de 5% do veneno total (BERCOVICI et al., 1987), é tóxica quando injetada por via intravenosa e apresenta a capacidade de agregação plaquetária (PRADO-FRANSCESCHI e VITAL BRAZIL, 1981).

Outro componente isolado do veneno, a giroxina (BARRIO, 1961), é um peptídeo trombina-sílimo e apresenta atividades amidásica, esterásica e fibrinogenolítica. Em camundongos e ratos é responsável pelo movimento giratório ao longo do eixo longitudinal da cauda destes animais, característico de ação neurotóxica (SEKI et al, 1980; CAMILO et al, 2001).

Dentre essas toxinas encontradas nos venenos crotálicos, a crotoxina (CTX) representa cerca de 60% da composição do veneno e é responsável pela sua ação tóxica (SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT, 1980). Esta toxina exibe atividades fosfolipásica, neurotóxica e miotóxica (STOCKER, 1990). Além destas ações, a crotoxina pode ativar plaquetas quando em altas concentrações em relação à convulxina (VARGAFITN et al, 1980; LANDUCCI et al., 1994). Quanto à atividade neurotóxica, foi mostrado que a CTX apresenta efeito pré-sináptico inibindo a liberação de acetilcolina nas junções neuro-musculares. O efeito miotóxico desta toxina é resultante da sua capacidade de induzir elevação nos níveis de creatino quinase (CK) no soro dos indivíduos acidentados (BOM et al., 1988; SALVINI et al, 2001; CURY et al., 2007).

Estudos físico-químicos mostraram que a CTX possui massa molecular de aproximadamente 30kDa (FRANKEL CONRAT et al., 1971) é um complexo hetero-

dimérico, composto por duas subunidades associadas de forma não-covalente, sendo uma subunidade ácida (CA-crotopotina) desprovida de ação tóxica e a outra subunidade básica (CB) ou fosfolipase A2, que é responsável pela atividade tóxica e enzimática da toxina (RUBSAMEN et al., 1971; AIRD et al., 1986). Ambas as subunidades são importantes para a atividade da CTX, sendo a subunidade A considerada a molécula carreadora dirigindo, portanto a subunidade B para o seu receptor na membrana celular, onde há a dissociação destas seguida da ação efetora da fração CB (BOM et al., 1988).

Rangel-Santos et al. (2004) estudando a atividade tóxica das crotoxinas e frações CB isoladas de venenos das subespécies *C.d.terrificus*, *C.d.cascavella* e *C.d.collilineatus* observaram que as frações CB apresentam menor atividade neurotóxica, miotóxica e capacidade de induzir edema que as crotoxinas correspondentes. Os resultados demonstram, portanto que a interação entre as subunidades CA e CB é fundamental para a alta toxicidade desta proteína.

No sistema imune, foi observado que os venenos crotálicos induzem baixa produção de anticorpos específicos em relação à outros venenos de serpentes sugerindo, portanto baixa imunogenicidade ou ação supressora sobre a resposta imunológica (ROLIM-ROSA, 1980, 1981; SOERENSEN, 1990).

Outros trabalhos demonstraram que a administração do veneno de *C.d.terrificus* ou da CTX isolada antes da imunização de camundongos com antígeno heterólogo resulta na diminuição da produção de anticorpos produzidos em resposta a este antígeno não relacionado (SANTOS et al., 1986; CARDOSO-MOTA, 1997).

Souza e Silva (1996) demonstraram ainda, que venenos crotálicos podem exercer efeito anti-inflamatório em macrófagos residentes ou previamente ativados. Após o tratamento com o veneno de *C.d.terrificus*, as funções fagocíticas e de espreadimento dos macrófagos ficam comprometidas. Assim, o veneno pode suprimir o sistema imune por meio de células de imunidade inata, como os macrófagos.

Sampaio et al. (2001) demonstraram que o veneno de *C.d.terrificus* inibe o espreadimento e atividade fagocítica de macrófagos residentes da cavidade peritoneal assim como previamente ativados pela injeção de tioglicolato ou *Mycobacterium bovis* (BCG) em ratos. Por outro lado, verificaram alta produção de espécies reativas de

oxigênio e nitrogênio por estas células sugerindo, portanto que o veneno crotálico é capaz de modular atividades distintas desempenhadas pela mesma célula. Em 2003, estes mesmos autores, mostraram que a crotoxina isolada do veneno de *C.d.terrificus* é a fração responsável por esse efeito descrito sobre os macrófagos.

Em estudo subsequente, evidenciou-se que a inibição tanto do espraio como da capacidade de macrófagos de ratos de fagocitar partículas de zimosam, eritrócitos de carneiro e *Candida albicans* é devido à ação da subunidade CB da crotoxina (PLA₂) de *C.d.terrificus* nestas células. Além disto, foi mostrado que este efeito da PLA₂ não é resultante da perda de integridade da membrana celular, uma vez que a viabilidade dos macrófagos esteve acima de 95% após incubação com a PLA₂ (SAMPAIO et al., 2005).

Em 2006, Sampaio et al. demonstraram que o veneno, CTX e PLA₂ de *C.d.terrificus* induzem alta produção de prostaglandina E₂ e lipoxina A₄ por macrófagos de ratos. Resultados obtidos em experimentos realizados com inibidores seletivos de lipoxigenase e cicloxigenase mostraram ainda, que este efeito inibitório do veneno, CTX ou PLA₂ nos macrófagos parece ser dependente de eicosanóides derivados da ação da enzima lipoxigenase como a lipoxina A₄.

Rangel-Santos. (2004) mostraram que o veneno e a CTX foram também efetivos em inibir a resposta proliferativa de linfócitos T estimulados com Concanavalina A (ConA) assim como a produção de algumas citocinas *in vitro*. Nesse mesmo trabalho, em experimento de transferência de linfócitos T e B purificados de camundongos injetados com o veneno ou CTX para camundongos normais e em seguida imunizados com SAH foi demonstrado a participação destas células na supressão da síntese de anticorpos IgG1 anti-SAH.

O sistema imune responde a diversos agentes patogênicos por mecanismos dependentes da imunidade inata e adaptativa, sendo a resposta inflamatória a primeira barreira de defesa e a ponte de ligação para a geração da imunidade adquirida (BOOM et al., 1987; STREET et al., 1999). Neste sentido, o tipo/grau de resposta inflamatória, ou seja, o estado de ativação das células da imunidade inata e as citocinas secretadas durante esta fase inicial da resposta imune são fundamentais para o direcionamento da imunidade mediada por linfócitos T e linfócitos B produtores de anticorpos antígeno-específicos que será gerada (ROMAGNANI, 1992).

Células da imunidade inata como os macrófagos e as células dendríticas (DCs) assim como os linfócitos B possuem a capacidade de apresentar os agentes/produtos patogênicos para os linfócitos T e assim induzir a sua ativação e diferenciação em célula efetora. O sinal inicial para ativação de células T CD4⁺ é proveniente da interação entre o receptor de antígeno associado ao complexo CD3 (TCR/CD3) expressos na membrana celular, e o peptídeo antigênico apresentado pela molécula do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) na superfície das células apresentadoras de antígeno (*antigen presenting cells*, APCs). Além desse reconhecimento do antígeno, interações entre moléculas expressas nas APCs e nos linfócitos T fornecem o segundo sinal, chamado de coestimulador, necessário para a ativação e diferenciação dessas células T (SCHWARTZ et al., 1990; JUNE et al., 1994; CROFT, 2003). Assim sendo, a interação entre a molécula CD28 expressa no linfócito T e seus ligantes CD80/CD86 nas APCs provê o sinal coestimulador necessário para a proliferação e diferenciação das células T murinas ou humanas (THOMPSON et al., 1989; DING e SHEVACH, 1994). Esta interação recruta *rafts* de membrana contendo proteínas quinases e adaptadoras que amplificam até 100 vezes o processo de sinalização iniciada pelo TCR no linfócito T (LANZAVECCHIA, 2001).

A interação entre a molécula CD40 expressa pelas APCs e seu ligante CD40 (CD40L-CD154) na membrana de linfócitos T também exerce papel importante na ativação tanto de linfócitos T como B (DIEHL et al., 2000). A ligação entre CD40-CD40L nas DCs estimula a expressão de outras moléculas envolvidas com a apresentação dos antígenos para os linfócitos T favorecendo desta maneira, a ativação destes linfócitos (O'SULLIVAN et al., 2003). Inicialmente, acreditava-se que os sinais induzidos pela ligação de CD40-CD40L eram essencialmente relevantes para a indução da resposta do tipo Th1 tanto *in vivo* como *in vitro* (PENG et al., 1996; KELSALL et al., 1996). No entanto, outros estudos mostraram que esta interação entre CD40-CD40L é também crucial para o desenvolvimento de linfócitos Th2 (MACDONALD, 2002; STRAW, 2003). Trabalhos demonstraram que clones de células Th1 ativadas via CD3, quando na presença de anticorpos anti-CD28 ou de células acessórias estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), secretam IL-2 e proliferam. No entanto, a ausência da ligação da molécula acessória CD28 com seus ligantes CD80 ou CD86 na APC, induz anergia

de linfócitos Th1 (JUNE et al. 1987; HARDING, et al., 1992). Da mesma forma, a ativação mediada por CD3 e CD28 de clones Th2 torna estas células sensíveis a IL-2 e a IL-4, provavelmente pela ação autócrina da IL-1, levando à proliferação e diferenciação celular (FERNANDEZ-BOTRAN et al., 1988; MC ARTHUR e RAULET, 1993).

Citocinas presentes no ambiente de interação entre os linfócitos e as APCs são fundamentais para a ativação e diferenciação destes linfócitos (THOMPSON et al., 1989; DING e SHEVACH, 1994; FRUCHT et al, 2001; WATFORD et al., 2003).

Na maioria das populações de APCs, a molécula CD86 é expressa constitutivamente em baixos níveis e rapidamente aumentada após a ativação da célula, enquanto que a expressão de CD80 é induzida mais tardiamente. Tem sido então proposto, que a expressão mais rápida da molécula CD86 poderia indicar sua maior participação como coestimuladora durante a iniciação da resposta imune que a molécula CD80, apesar de ambas compartilharem as mesmas funções. A expressão da molécula CD40 é constitutiva em linfócitos B, DCs, macrófagos, DCs foliculares e células endoteliais, e da mesma forma aumentada na presença de citocinas pró-inflamatórias e/ou de estímulos microbianos (DIEHL et al., 2000 revisado por SHARPE e FREEMAN, 2002).

Neste sentido, qualquer interferência no processo de sinalização celular mediada por estes dois sinais, como a falta/baixa coestimulação provida pelas moléculas acessórias (ligação CD28 com CD80 ou CD86), pode resultar no bloqueio da progressão do ciclo celular e conseqüente anergia dos linfócitos T. A característica clássica de indução de anergia é a presença de reconhecimento antigênico pelo TCR (1º sinal de ativação), porém sem coestimulação (2º sinal). Nesta situação, as células T ficam incapazes de proliferar ou produzir IL-2 nestas condições. Modelos murinos conhecidos para induzir anergia fundamentam-se na administração oral de um peptídeo solúvel *in vivo* ou estimulação cruzada do complexo CD3 na ausência de coestimulação *in vitro* (PODOJIL- MILLER, 2009).

Como já mencionado, várias são as células imunes capazes de apresentar os antígenos para os linfócitos T, entretanto as DCs são as principais iniciadoras da resposta adaptativa, uma vez que estão localizadas nas portas de entrada dos

antígenos e são eficientes na captura, processamento e apresentação dos peptídeos associados às moléculas do MHC, expressão de moléculas coestimuladoras e migração para os tecidos linfóides secundários (ITANO -JENKINS, 2003). Macrófagos e linfócitos B também expressam moléculas de classe II do MHC e são capazes de ativar os linfócitos TCD4⁺ de forma menos eficiente que as DCs. A abundância de macrófagos em vários órgãos não-linfóides indica que estas células são importantes APCs para células T efetoras que migram para esses tecidos em estágios mais avançados da resposta imune primária (CATRON et al., 2004).

As APCs interagem com os agentes patogênicos através de receptores expressos em sua membrana celular que reconhecem padrões moleculares presentes nesses antígenos (PAMPs) (MOLL, 2003). A interação seletiva desses receptores com os PAMPs induzem nas APCs uma cascata de ativação, maturação celular e produção de mediadores solúveis envolvidos na geração da resposta celular adaptativa (GAUSE et al., 1999; SCHNARE et al., 2001; TAKEDA et al., 2003; VAN KOOYK-GEIJTENBEEK, 2003).

Além disso, trabalhos têm evidenciado que as APCs, principalmente as DCs, após reconhecerem os agentes patogênicos são capazes de direcionar a diferenciação dos linfócitos TCD4⁺ para diferentes subpopulações de células T efetoras, induzir tolerância destas células, apoptose ou a geração de células T com capacidade reguladora (T_{Reg}). As células T_{regs} periféricas ou adaptativas são geradas a partir de células TCD4⁺CD25⁻ após o reconhecimento de auto-antígenos apresentados pelas APCs e presença de TGF-β. Estas células passam então, a apresentar o fenótipo CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ e quando ativadas produzem IL-10 e TGF-β (YAMAZAKI et al. 2007).

Esta plasticidade funcional das DCs está, portanto relacionada aos receptores de 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 imunossupressores (DE JONG et al., 1999; STEINBRINK et al., 2002; MULLER et al., 2002; KUBACH et al., 2005). Patógenos como bactérias e protozoários promovem a ativação e maturação das DCs bem como a secreção de citocinas, como a IL-12 por essas células que, no conjunto, resultam na diferenciação dos linfócitos para o subtipo Th1. Por outro lado, antígenos de helmintos ou alérgenos parecem ser reconhecidos

pelas DCs em contexto pouco inflamatório e, quando na presença de IL-4, direcionam os linfócitos para o subtipo Th2 (MACDONALD et al., 2002).

Outros trabalhos descrevem que alguns patógenos ou seus produtos exercem efeito inibitório sobre as DCs mantendo-as imaturas e/ou tolerogênicas (DUGAST - VANHOVE, 2009). Além da ação direta dos patógenos sobre as DCs, citocinas como IL-10 e TGF- β (*transforming growth factor* β) podem induzir DCs imaturas a se tornarem tolerogênicas.

A IL-10 age suprimindo as funções das APCs, inibindo a produção de IL-2 e a sinalização intracelular via molécula CD28, evitando a expansão clonal dos linfócitos (ASKENASY et al. 2008). Além disso, foi mostrado que a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 por monócitos e macrófagos (DEL PRETE et al., 1993; BORISH, 1998; GRUTZ, 2005). Assim, esta citocina secretada por diferentes grupos celulares como linfócitos Th2, células T reguladoras, macrófagos, linfócitos B e DCs é considerada uma citocina com ação inibitória ampla (MOORE et al., 2001; TRINCHIERI et al., 2001).

Fosfolipases do tipo II (PLA₂) hidrolisam fosfolipídeos de membrana, liberando ácido aracônico. Este, por sua vez, pode ser convertido em eicosanóides como prostaglandinas, pela ação das enzimas cicloxigenases (COX-1 e 2) e/ou leucotrienos, resultantes da atividade das lipoxigenases (NEEDLEMAN et al., 1986; SMITH, 1992). Dentre estes eicosanóides, foi observado que a prostaglandina E₂ (PGE₂) é um potente modulador da inflamação e resposta imune celular, inibindo a ação fagocítica dos macrófagos, a atividade das APCs e produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 e induzindo a síntese de IL-10 (OROPEZA-RENDON et al., 1980; KOZLOV et al., 1990; DAVIDSON et al., 1998; HARIZI et al., 2002; HEIDI et al., 2004).

Em 2007, Cools et al. mostraram que células dendríticas na ausência de sinais de perigo não amadurecem e se tornam tolerogênicas. Isto é, há baixa expressão de moléculas co-estimuladoras e isto resulta, pela interação das DC's com os linfócitos T, em anergia destes linfócitos. As células dendríticas tolerogênicas promovem tolerância periférica por induzir a geração de T reg produtoras de IL-10.

No que diz respeito à capacidade tolerogênica das DCs, há relatos de que estas células podem suprimir a ativação e proliferação de linfócitos T via secreção de TGF- β

e IL-10, além de induzir a paralisação do ciclo celular nas fases G0/G1 tornando a célula anérgica. Prostaglandina E₂ (PGE₂) secretada pelas DCs também está diretamente relacionada com a atividade supressora destas células (SCHWARTZ, 2003).

Vários trabalhos têm ainda, correlacionado a produção de IL-10 juntamente com a de TGF- β com a indução de tolerância e geração de células T com atividade reguladora (T_{reg}) (DOETZE et al., 2000; GRUTZ, 2005).

Outro mecanismo pelo qual DCs tolerogênicas podem inibir a resposta de linfócitos T se refere à privação do aminoácido triptofano (TRP) no microambiente de interação celular. Este efeito é resultante do aumento da expressão da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas DCs (CHEN et al., 2008). Trabalhos recentes têm relacionado o aumento expressão gênica da enzima IDO pelas DCs com a indução de tolerância dos linfócitos T *in vivo*, geração de células T_{reg} e com a inibição da proliferação celular *in vitro* em várias situações fisiopatológicas (MUNN et al., 2002; MELLOR-MUNN, 2004; FALLARINO-PUC CETTI, 2006; DUGAST-VANHOVE, 2009).

A enzima IDO participa na manutenção da tolerância materno-fetal como potente regulador da função das células do sistema imune. Evidências ressaltam que DCs expressando IDO interagem com células T_{regs} criando um microambiente imunomodulador que propicia a indução de tolerância. Além disso, a super-expressão gênica da *ido* parece estar relacionada com a maior sobrevida de órgãos transplantados, sugerindo uma via tolerogênica periférica (JIA et al., 2009).

Em modelos experimentais desenvolvidos em camundongos foi observado que macrófagos e DCs presentes na placenta de fêmeas gestantes expressam altos níveis de *ido*. Experimentos *in vitro* mostraram que células são capazes de suprimir a proliferação de linfócitos T através da depleção do TRP presente no meio de cultura demonstrando assim, a participação dessa enzima no processo de tolerância ao feto (MUNN et al., 1999; MELLOR-MUNN, 2004).

Hayashi et al. (2004) estudando o modelo de transplante de pâncreas em camundongos demonstraram que a enzima IDO exerce um importante efeito supressivo, inibindo a rejeição mediada por linfócitos T. No modelo de asma experimental desenvolvido em camundongos foi observada a correlação entre o

aumento da expressão da enzima IDO nas células presentes nos pulmões e a inibição da hiperreatividade mediada por linfócitos T (ALEXANDER et al., 2002).

Outros estudos correlacionam ainda, a manutenção do estado de tolerância periférica e homeostasia com a presença das células T_{regs} capazes de inibir a ativação de linfócitos TCD4⁺ ou CD8⁺ auto-reativos na periferia atribuindo, portanto à estas células papel relevante no controle de autoimunidade (SAKAGUSHI et al., 1995; SURIPAYER et al., 1998; SAKAGUSHI et al., 2000). Alguns estudos evidenciaram ainda, a presença das células T_{regs} em resposta a agentes infecciosos, tumores, tolerância oral e em infecções por helmintos (ZHANG et al., 2001; ASEFFA et al., 2002; SATOGUINA et al., 2002; XU et al., 2003).

As células T_{regs} são capazes de inibir diretamente a ativação dos linfócitos T ou exercer seu efeito nas APCs por meio do contato celular ou pela ação de citocinas como a IL-10 e o TGF-β (SHEVACH et al., 2000; CEDERBOM et al., 2000; MALOY-POWRIE, 2001).

Quadro 1: Regulação imune por células não linfóides em transplantes

Tipo Celular	Mecanismo de Ação Reguladora
DC Mielóide	Fas/FasL, TGF-β, IL-10, induz anergia em células T, induz TReg, IDO
DC Plasmocitóide	Controla a polarização de LT, IDO, induz Treg
MSC: Célula tronco mesenquimal	PGE ₂ , TGF-β, NO, IDO, induz anergia em células T, induz TReg, IDO

FONTE: Adaptado de Dugast-Vanhove, 2009

Figura 1. Propriedades imunomoduladoras de uma célula tronco mesenquimal (MSC). Capacidade de induzir diferenciação e amplificação de T_{Regs} . PGE_2 , óxido nítrico (NO), $TGF-\beta$ são produzidos pelas MSCs e estão envolvidos na supressão da proliferação, ativação de células T e induzem anergia. PGE_2 e $TGF-\beta$ bloqueiam a proliferação e citotoxicidade por células Natural Killer (NK). PGE_2 suprime a proliferação de linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos. A secreção de M-CSF e IL-10 pelas MSCs previne a maturação de DCs.

FONTE: Adaptado de Dugast-Vanhove, 2009

Inúmeros trabalhos relatam que as células T_{regs} , via secreção de $TGF-\beta$ e IL-10, podem modular a resposta imune dirigida contra vários antígenos inibindo a atividade funcional tanto de células $CD4^+$ como $CD8^+$ efectoras. As células T_{Regs} também são capazes de modular o processo de apresentação dos antígenos pelas APCs. Neste contexto, foi observado que o $TGF-\beta$ é capaz de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos $CD4^+$ sem induzir sua morte celular por apoptose. Além disso, esta citocina, juntamente com a IL-10, inibem as funções das células Th1 efectoras. A IL-10, por sua vez, aumenta a resposta de células T ativadas pelo $TGF-\beta$, via indução da expressão do receptor para esta citocina (ASKENASY et al., 2008).

Cools et al. (2007) mostraram ainda, que ambas as citocinas são secretadas por DCs que apresentam características tolerogênicas após a fagocitose de células apoptóticas. Assim, os efeitos combinados de TGF- β e IL-10 podem resultar na inibição da atividade de células T efetoras e das APCs, afetando a intensidade da resposta imune

As células T reguladoras podem inibir a proliferação, diferenciação e funções efetoras de células T autorreativas, através de diversos mecanismos. Um deles é a expressão de Fas e Fas ligante que resulta na apoptose da célula autorreativa. Este mecanismo é utilizado principalmente na eliminação de linfócitos TCD8⁺ autorreativos. Em contraste, as células TCD4⁺ são mais resistentes à indução de apoptose via Fas pelos T regs. (STRAUSS; BERGMANN; WHITESIDE; 2009)

Para a geração da resposta humoral à maioria dos antígenos é necessária a interação entre os linfócitos TCD4⁺ ativados e os linfócitos B resultante tanto do reconhecimento antigênico como da ligação entre as moléculas coestimuladoras expressas pelas células. Somado à este contato celular, as citocinas presentes no microambiente contribuem para a ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos B em células produtoras das diferentes classes de anticorpos antígeno-específicos (LEBMAN-COFFMAN, 1988; JOHNSON-LÉGER et al., 1998). Neste sentido, situações onde se observa indução de tolerância, geração de células T_{Regs} ou supressão da resposta de linfócitos T podem também comprometer a ativação e diferenciação dos linfócitos B e, portanto a produção dos anticorpos antígeno-específicos.

Em nossos estudos sobre o efeito da CTX de *C.d.terrificus* na resposta imune induzida por um antígeno não-relacionado, verificamos que a administração desta toxina horas após a imunização dos camundongos com SAH associada ao Aldrox ou adjuvante completo de Freund (CFA) resulta na inibição da síntese de anticorpos anti-SAH e da proliferação de linfócitos T em resposta à estimulação com SAH ou ConA *in vitro*. Por outro lado, constatamos que a intensidade da supressão induzida pela CTX variou de acordo com o adjuvante utilizado na imunização com a SAH. Em outros experimentos, observamos que a CTX de *C.d.terrificus* administrada no 14º dia de imunização, ou seja, 1 hora antes do reforço antigênico, ainda foi capaz de suprimir parcialmente a resposta de anticorpos resultante da ativação das células B de memória

anti-SAH. Além destas observações, outros resultados permitiram constatar que a supressão da resposta anti-SAH exercida pela CTX não é mediada pela indução de morte das células linfóides por necrose ou apoptose.

Considerando esses resultados mostrando que a CTX isolada do veneno de *C.d.terrificus* é capaz de modular tanto a resposta de linfócitos T como a produção dos anticorpos induzida pela imunização com antígeno protéico como a SAH, podemos sugerir que esse efeito possa ser resultante da sua ação na fase de indução da resposta imune, ou seja, durante a apresentação dos antígenos pelas APCs.

6 CONCLUSÕES

- ❖ CTX não alterou o perfil celular encontrado nos tecidos linfóides secundários que drenam o local de inoculação da toxina ou da imunização.
- ❖ A toxina induz a secreção de citocinas imunomoduladoras (IL-10, TGF- β e PGE₂) e diminui a de citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-12), além de promover a expressão da enzima IDO tanto em células linfóides *in vitro*.
- ❖ A administração da CTX *in vivo* promove a geração de células T_{regs}.
- ❖ Nas APCs e DCs a CTX inibe a expressão de moléculas coestimuladoras e de MHC de classe II, o que pode resultar no comprometimento da indução da imunidade adaptativa.
- ❖ A CTX promove a secreção de citocinas anti-inflamatórias e aumento a expressão de *ido* em DCs diferenciadas *in vitro*.
- ❖ IL-10 está diretamente envolvida no mecanismo de supressão da resposta imune humoral induzida pela CTX.

REFERÊNCIAS *

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular..** 5º Ed. EUA,. Editora Elsevier, 2005

AIRD, S. D.; KAISER, I. I.; LEWIS, R. V.; KRUGGEL, W.G. A complete aminoacid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 249, p. 296-300, 1986.

ALEXANDER, A. M.; CRAWFORD, M.; BERTERA, S.; RUDERT, W. A.; TAKIKAWA, O.; ROBBINS, P. D. ; TRUCCO, M. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. **Diabetes.**, v. 51, p. 356-65, 2002.

ASEFFA, A.; GUMY, A.; LAUNOIS, P.; MACDONALD, H. R.; LOUIS, J. A.; TACCHINI-COTTIER, F. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. **J. Immunol.**, v. 169, p. 323-3241, 2002.

ASKENASY, N.; KAMINITZ, A.; YARKONI, S. Mechanisms of T regulatory cell function **Autoimmun. Rev.**,v. 7,n. 5, p. 370-5, 2008. Review

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAVRE, C. J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, p. 631-6, 1985.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, H. ; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v. 25, p. 1163-1168, 1987.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: J. L. C. Cardoso; F. O. S. França; F. H. Wen; C. M. S. Málaque; V. Hadda Jr. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2003. p. 91-107.

BABU, S.; BLAUVELT, C. P.; KUMARASWAMI, V.; NUTMAN, T. B. Diminished expression and function of TLR in lymphatic filariasis: a novel mechanism of immune dysregulation. **J. Immunol.**, 2005.

BARRIO, A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Physiol. Latino-Am.**, v.11 p.224-230. 1961.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERCOVICI, D.; CHUDZINSKI, A. M.; DIAS, W. O.; ESTEVES, M. I.; HIRACHI, E.; OISHI, N. Y.; PICARELLI, Z. P.; ROCHA, M. C.; UEDA, C. M. P. M.; YAMANOUYE, N.; RAW, I. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 49, p. 69-78, 1987.

BETTINI, M.; VIGNALI, D. A. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, 2009. Review

BOM, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Biochemical analysis of the mechanism of action of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from snake venom. **Neuro. Neurochem.**, v. 8 p. 52-63. 1988.

BOOM, H.; LIANO, D.; ABBAS, A. K. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 167 p. 1350-63, 1987.

BORISH, L. IL-10: evolving concepts. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 101 p.293-297, 1998.

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. 248-253, 1976.

CARDOSO, D. F. ; MOTA, I. Effects of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune responses **Toxicon**, v. 35 p. 607-12, 1997

CARDOSO, D. F.; RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E. C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; MOTA, I. 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 p. 801-10.2003

CATRON, M.; DREW; ANDREA, A.; ITANO-KATHRYN, A.; PAPE, D. L.; MUELLER, M. K. J. Visualizing the first 50 Hr of the Primary Immune Response to a Soluble Antigen. **Immunity**, v. 21, p. 341-347. 2004.

CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. **Euro. J. Immunol.**, v. 30 p. 1538-43, 2000.

CHEN, W.; LIANG, X.; PETERSON, A. J.; MUNN, D. H.; BLAZAR, B. R. The indoleamine 2,3 dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. **J. Immunol.**, v. 181 p. 5396-404, 2008.

- CLEMENTS, D. J.; MATVEYEVA, M.; McCOY, K. L. Delta9-tetrahydrocannabinol suppresses macrophage costimulation by decreasing heat-stable antigen expression. **J. Immunopharmacol.** v. 8 p. 415-28, 1998.
- COOLS, N.; VAN-TENDELOO, V. F. I.; SMITS, E. L. J. M.; LENJOU, M.; NIJS, G.; BOCKSTAELE, V.; BERNEMAN, Z. N.; PONSAERTS, P. Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF- β /IL-10 double-positive CD4⁺ regulatory T cells **J. Cell. Mol. Med.** v. 12 p. 690-700, 2007.
- CROFT, M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. **Cytok. Growth Fac. Rev.**, v. 14, p. 265-273, 2003.
- CURY, Y.; ZARZANA, E. C.; SAMPAIO, S. C.; DE-LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. P. Crotoxin, a new approach for the modulation of lung allergic inflammation in rats. **Anal. Inst. Butantan**, v. 1 p.27 2007.
- DAVIDSON, B. L.; GUDMUNDSSON, G.; BOSCH, A.; BERG, D. J.; HUNNINGHAKE, G. W. Interleukin-10 modulates the severity of hypersensitivity pneumonitis in mice. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 13 p. 812-8, 1998.
- DE-JONG, E. C.; VIEIRA, P. L.; KALINSKI, P.; KAPSENBERG, M. L. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66 p. 201-204, 1999.
- DEL-PRETE, G.; DE-CARLI, M.; ALMERIGOGNA, F.; GIUDIZI, M. G.; BIAGIOTTI, R.; ROMAGNANI, S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. **J. Immunol.**, v. 150 p. 353-60, 1993 .
- DIEHL, L.; DEN-BOER, A. T.; VANDER-VOORT, E. I.; MELIEF, C. J. L.; OFFRINGA, R.; TOES, R. E. M. The role of CD40 in peripheral T cell tolerance and immunity. **J. Mol. Med.**, v. 78 p. 363-371, 2000.
- DING, L.; LINSLEY, P. S.; HUANG, LI-YUN,; GERMAIN, R. N.; SHEVACH, E. M. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **J. Immunol.**, v. 151 p. 265-75, 1994.
- DOETZE, A.; SATOGUINA, J.; LOELIGER, C.; KOIVOGUI, L.; Characterization of Human CD4⁺ T-Cell Clones Recognizing Conserved and Variable Epitopes of the Lassa Virus Nucleoprotein **J. Virol.**, v. 5 p. 2186-2192, 1999.
- DUGAST, A. S.; VANHOVE, B. Immune regulation by non-lymphoid cells in transplantation **Clin. Exp. Immunol.**, v. 156 p. 25-34. 2009.

FALLARINO, F.; GAZIANO, R.; BOZZA, S.; BELLOCCHIO, S.; ZELANTE, T.; KURUP, W.; PITZURRA, L.; PUC CETTI, P.; ROMANI, L. Immunity and Tolerance to *Aspergillus* Involve Functionally Distinct Regulatory T cells and Tryptophan Catabolism. **J. Immunol.**, v. 176 p. 1713-1723. 2006.

FAURE, G.; BON, C. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochem.**, v. 27 p. 730-88, 1987.

FERNANDEZ-BOTRAN, R. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. **J. Exp. Med.**, v. 168, p. 543-58, 1988.

FRAENKEL-CONRAT, R. A.; HENDON, A. N. H. Biological roles of two components of crotoxin. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 68 p.1560-63, 1971.

FRUCHT, D. M.; FUKAO, T.; BOGDAN, C.; SCHINDLER, H.; O'SHEA, J. J.; KOYASU, S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends Immunol.**, v. 22 p. 556-60 2001 Review

GAUSE, W. C.; EKKENS, M.; NGUYEN, D.; MITRO, V.; LIU, Q.; FINKELMAN, F. D.; GREENWALD, R. J.; URBAN, J. F. The development of CD4+ T effector cells during the type 2 immune response. **Immunol. Res.**, v. 20 p. 55-65, 1999.

GAZZINELLI, T. R.; MAKINO, M.; SHER, A. Preferential Activation of Th2 Cells during Progression of Retrovirus-Induced Immunodeficiency in Mice. **J. Immunol.**, v. 148 p. 182-188, 1992

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25 p. 386-401, 2001.

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

HARDING, C. V.; GEUZE, H. J. Class II MHC molecules are present in macrophage lysosomes and phagolysosomes that function in the phagocytic processing of *Listeria monocytogenes* for presentation to T cells. **J. Cell Biol.**, v. 119 p. 531-42, 1992.

HARIZI, H.; JUZAN, M.; PITARD, V.; MOREAU, J. F.; GUALDE, N. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. **J Immunol.**, v. 168 p. 2255-63, 2002.

HAYASHI, A.; OHONISHI, H.; OKAZAWA, H.; NAKAZAWA, S.; IKEDA, H.; MOTEGI, S.; AOKI, N.; KIMURA, S.; MIKUNI, M.; MATOZAKI, T. Positive regulation of phagocytosis by SIRPbeta and its signaling mechanism in macrophages. **J. Bio. Chem.**, v. 279 p. 29450-60, 2004 .

HEIDI, H.; NORBERT, G. Inhibition of IL-6, TNF- α and cyclooxygenase-2 protein expression by prostaglandin E₂ induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. **Cell. Immunol.**, v. 228 p. 99-109, 2004

HERNANDEZ, C. A.; GARCIA-JIMENEZ, S.; ZUCATELLI, M. R.; PETRICEVICH, V. L. Pro-and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mediat. Inflamm.**, v. 8 p. 749-62, 2008.

HOU, D. Y.; MULLER, A. J.; SHARMA, M. D.; DUHADAWAY, J.; BANERJEE, T.; JOHNSON, M.; MELLOR, A. L.; PRENDERGAST, G. C.; MUNN, D. H. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. **Cancer Res.**, v. 67 p. 792-801, 2007.

HUNTER, C. A.; NEYER, L. E.; GRUNIG, G.; FORT, M.; REMINGTON, J. S.; RENNICK, D. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v. 65 p.1675-82,1997.

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

JIA, L.; TIAN, P.; DING, C..Immunoregulatory effects of indoleamine 2, 3-dioxygenase in transplantation. **Transpl. Immunol.**, v. 21 p.18-22, 2009.

JOHNSON-LÉGER, C.; CHRISTENSEN, J.; KLAUS, G. G. CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. **Inter. Immunol.**, v. 8 p.1083-91, 1998.

JUNE, C. H.; LEDBETTER, J. A.; GILLESPIE, M. M.; LINDSTEN, T.; THOMPSON, C. B. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. **Mol. Cell Biol.**, v. 12 p. 4472-81. 1987.

JUNE, C. H. The B7 and CD28 receptor families. **Immunol. Today**, v. 15, p. 321-331, 1994.

KELSALL, B. L. Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 795, p. 116-26, 1996.

KOZLOV, V.; POVESHCHENKO, A.; GROMYKHINA, N. Some mechanisms involved in the prostaglandin E2 immunosuppressive effect in (CBA x C57BL)F1 mice in vivo. **Cell Immunol.**, v. 128 p. 242-9, 1990.

KUBACH, J.; BECKER, C.; SCHMITT, E.; STEINBRINK, K.; HUTER, E.; TUETTENBERG, A.; JONULEIT, H. Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance. **Int. J. Hematol.**, v. 81 p. 197-203, 2005.

LAEMMLI, U. K.; MOLBERT, E.; SHOWE, M.; KELLENBERGER, E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biol.** v. 14 p. 99-113, 1970.

LANDUCCI, E. C.; CONDINO-NETO, A.; PEREZ, A. C.; HYSLOP, S.; CORRADO, A. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; ANTUNES, G. Crotoxin induces aggregation of human washed platelets **Toxicon.**, v. 32, p. 217-226, 1994.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F.; Regulation of T cell immunity by dendritic cells. **Cell.** v. 106 p. 263-6. 2001. Review

LEBMAN, D. A.; COFFMAN, R. L. The effects of IL-4 and IL-5 on the IgA response by murine Peyer's patch B cell subpopulations. **J. Immunol.**, v. 141 p. 2050-6, 1988.

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 p. 402-8, 2001.

LOHR, J.; KNOECHEL, B.; CARRETTO, D.; ABBAS, A. K. Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells. **Microbes Infect.**, v. 5 p. 589-93. 2009. Review.

MCARTHUR, J. G.; RAULET, D. H. CD28-induced costimulation of T helper type 2 cells mediated by induction of responsiveness to interleukin 4. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 1645-53. 1993

MACDONALD, A. S.; STRAW, A. D.; DALTON, N. M.; PEARCE, E. J. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. **J. Immunol.**, v. 172: 1833-1838, 2002.

MACEDO, M. S. et al. Immunomodulation induced by *Ascaris suum* extract in mice: effect of anti-interleukin-4 and interleukin-10 antibodies. **Scand. J. Immunol.**, v. 47, p. 10-18, 1998.

MAHNKE, K.; BEDKE, T.; ENK, A. H. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. **Cell Immunol.** v. 250 p. 1-13, 2008

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature Immunol.**, v. 9 p. 816-22, 2001

MELLOR, A. L.; MUNN, D.; CHANDLER, P.; KESKIN, D.; JOHNSON, T.; MARSHALL, B.; JHAVER, K.; BABAN, B. Tryptophan catabolism and T cell responses. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 527 p. 27-35. 2003

MELLOR, A.; MUNN, D. IDO Expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews**, v. 4 p. 762-772. 2004

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Acidentes por Animais Peçonhentos

Guia de Vigilância Epidemiológica: Caderno 14 Secretaria de Vigilância em Saúde/MS

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

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

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

MOURA-GONÇALVES, J.; VIEIRA, L. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. **Acad. Bras. Ciênc.**, v. 22 p. 141-146, 1950.

MULLER, G.; MULLER, A.; TUTING, T.; STEINBRINK, K.; SALOGA, J.; SZALMA, C.; KNOP, J.; ENK, A. H. Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naïve and sensitized T cells in vivo. **J. Invest. Dermatol.**, v. 119 p. 836-841, 2002.

MUNN, D. H.; SHAFIZADEH, E.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; PASHINE, A.; MELLOR, A. L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **J. Exper. Med.**, v. 189 p.1363-72, 1999.

MUNN, D.; SHARMA, M.; LEE, J.; JHAVER, K.; JOHNSON, T.; KESKIN, D.; MARSHALL, B.; CHANDLER, P.; ANTONIA, S.; BURGESS, R.; SLINGLUFF, C.; MELLOR, A. Potencial Regulatory function of human dendritic cells expressing Indoleamine 2,3- dioxygenase. **Science**, v. 297 p. 1867-1870, 2002.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIC, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 102 p. 55-69, 1986. Review

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

OROPEZA-RENDON, R. L.; BAUER, H. C.; FISCHER, H. Effect of prostaglandin E1 on the level of cAMP in bone marrow macrophages. Inhibition of phagocytosis and cell shape changes. **J Immunopharmacol.**, v. 2 p. 133-47, 1980.

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, p. 1621-1627, 1996.

PODOJIL, R.; MILLER, S. D. Molecular mechanisms of T-cell receptor and costimulatory molecule ligation/blockade in autoimmune disease therapy. **Immun. Review**, v. 229 p. 337-55, 2009.

PRADO- FRANCESCHI, J.; VITAL BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 19, p.875-887. 1981

QU, Y.; ZHANG, B.; ZHAO, L.; LIU, G.; MA, H.; RAO, E.; ZENG, C.; ZHAO, Y. The effect of immunosuppressive drug rapamycin on regulatory CD4+CD25+Foxp3+T cells in mice. **Transpl. Immunol.**, v. 17 p. 153-61, 2007

RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D. F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 44. p. 609-616, 2004

ROLIM-ROSA, R.; VIERA, E. G. J.; SILLES-VILLARROEL, M.; SIRACUSA, Y. Q.; IIZUKA, H. Análise comparativa pelo Instituto Butantan (1957-1979). **Mem. Inst. Butantan.**, v. 44/45 p. 259-67, 1980-81.

ROMAGNANI, S. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the natural immune response? **Immunol. Today**, v. 13 p. 379-380, 1992.

RÚBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacological of the crotoxin complex. I-subfraction and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v. 270 p. 274, 1971.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v. 155 p. 1151-64, 1995.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**, v. 26 p. 455-8, 2000.

SALVINI, T. F. et al. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v. 39, p. 1141-1149, 2001.

SAMPAIO, S. C.; CURI, R.; CURY, Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J. Leuk. Bio.**, v. 70 p. 551-8, 2001.

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

SAMPAIO, S. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; PERES, C. M.; CURI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A₂ isoletad from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 45 p. 671-676, 2005

SAMPAIO, S. C.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R. G.; SANTOS, E. C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v. 47 p. 313-321, 2006

SAMPAIO, S. C.; NUNES, P. B. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 15 p. 1090-1098, 2008.

SANO-MARTINS, I. S. et al. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **Quart. J. Med.**, v. 94, p. 551-559, 2001.

SANTOS, M. C.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R.; DIAS DA SILVA, W. Influence of *Crotalus* venom on the response to sheep red blood cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 19 p. 636, 1986.

SATOGUINA, J.; MEMPEL, M.; LARBI, J.; BADUSCHE, M.; LOLIGER, C.; ADJEI, O.; GACHELIN, G.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis). **Micro. Infec.**, v. 4 p. 1291-300, 2002.

SCHNARE, M.; BARTON, G. M.; HOLT, A. C.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; MEDZHITO, V. R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nat. Immunol.**, v. 2: 947-950, 2001.

SCHWARTZ, B. R.; WAYNER, E. A.; CARLOS, T. M.; OCHS, H. D.; HARLAN, J. M. Identification of surface proteins mediating adherence of CD11/CD18-deficient lymphoblastoid cells to cultured human endothelium. **J. Clin. Invest.**, v.85 p. 2019-2022, 1990

SCHWARTZ, O. M.; CANELLES, M.; PARK, M. L.; FOWLKES, B. J. The influence of the thymic environment on the CD4-versus-CD8 T lineage decision. **Nat. Immunol.**, v. 8 p. 756-64. 2003

SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 18, p. 235- 247, 1980.

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

SHEVAC, E. M. Suppressor T cells: Rebirth, function and homeostasis. **Curr. Bio.**, v. 10 p. 572-5. 2000

SILVA, S. R. et al. Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells *via* an IL-10-mediated mechanism. **J. Immunol.**, v. 36, p. 3227-37, 2006.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos.4. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. But.**, v. 12 p. 505-510, 1938.

SMITH, J.; PROSS, S.; NAKANO, Y.; WIDEN, R.; RODRIGUEZ, A.; NEWTON, C.; FRIEDMAN, H..Suppressive effect of tetrahydrocannabinol on specific T cell subpopulations in the thymus. **Thymus**, v. 21 p. 47-53.1992

SOERENSEN, B. Produção de soros antipeçonhentos e características imunológicas de cada soro. Anavenos. On. SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos-reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros e tratamento dos envenenamentos.** Rio de Janeiro/São Paulo, Atheneu, 91-107, 1990.

SOUZA-E-SILVA, M.C.C.; GOLÇALVEZ, L.R.C.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnake inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. **Med. Inflammation.**, v. 5, p. 18-23, 1996

SOUZA, V. M.; JACYSYN, J. F.; MACEDO, M. S. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*. **Cytokine**, v. 28, p. 92-100, 2004.

STEINBRINK, K.; GRAULICH, E.; KNOP, J.; ENK, A.H. CD4(+) and CD8 (+) anergic T cells induced by interleukin IL-10 treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. **Blood**, v. 99 p. 2468-2476, 2002.

STOCKLER, S.; RING, E.; ZOBEL, G.. Clearance of toxic metabolites during therapy for inborn errors of metabolism. **J. Immunol.**, v. 52 p. 245-254, 1990

STRAUSS, L.; BERGMANN, C.; WHITESIDE, T. Human Circulating CD4_CD25highFoxp3_Regulatory T Cells Kill Autologous CD8_ but Not CD4_ Responder Cells by Fas-Mediated Apoptosis. **J. Immunol.**, v. 182 p. 1469–1480, 2009

STRAW, A. D. et al. CD154 plays a central role in regulation dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. **J. Immunol.**, v. 170, p. 727-734, 2003.

STREET, N. E.; SCHUMACHER, J. H.; FONG, T. A.; BASS, H.; FORENTINO, D. F.; LEVERAH, J. A. & MOSMANN, T. R. Heterogeneity of mouse helper T cells: evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. **J. Immunol.**, v. 144 p. 1629-1655, 1999

SURI-PAYER, E.; AMAR, A. Z.; THORNTON, A. M.; SHEVAC, E. M. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. **J. Immunol.**, v. 160 p.1212-8, 1998.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21 p. 335-376, 2003.

THOMPSON, C. B.; LINDSTEN, T.; LEDBETTER, J. A.; KUNKEL, S. L.; YOUNG, H. A.; EMERSON, S. G.; LEIDEN, J. M.; JUN, C. H. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, .v. 86 p.1333-7, 1989.

TRINCHIERI, G. Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection. **J. Exp. Med.**, v. 194 p. 53-7, 2001

VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3 p. 697-709, 2003.

VAN LIEMPT, E.; VAN VLIET, S. J.; ENGERING, A.; VALLEJO, J. J. G.; BANK, C. M. C.; SANCHEZ-HERNANDEZ, M.; KOOYK, Y.; & DIE, I. *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 p. 2605-2615, 2007.

VARGAFTIG, B. B.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CHIGNARD, M.; LEFORT, J.; MARLAS, G. Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 19 p.451-64 1980

WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cyto. Gro. Fac. Rev.**, v. 14 p. 361-8. 2003. Review

XU, B.; WAGNER, N.; PHAM, L. N.; MAGNO, V.; SHAN, Z.; BUTCHER, E. C.; MICHIE, S. A. Lymphocyte homing to bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is mediated by L-selectin/PNAd, alpha4beta1 integrin/VCAM-1, and LFA-1 adhesion pathways. **J. Exper. Med.**, v. 197 p. 1255-67, 2003.

YAMAZAKI, S.; BONITO, A. J.; SPISEK, R.; DHODAPKAR, M.; INABA, K.; STEIMAN, R. M. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- β for the differentiation of Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells from peripheral Foxp3⁻ precursors. **Blood**. v. 15 p. 4293-302. 2007 Review

ZHANG, D.; ZHANG, D.; REN, H.; ZHOU, W. Recombinant human growth hormone downregulates the apoptosis of HepG(2) cells induced by LPS. **Chin. J. Hepat.**, v. 9 p. 100-2, 2001.

WIETEN, L.; BERLO, S. E.; TENBRINK, C. B.; VAN KOOTEN, P. J.; SINGH, M.; VANDER ZEE, R.; GLANT, T. T.; BROERE, F.; VAN EDEN, W. IL-10 is critically involved in mycobacterial HSP70 induced suppression of proteoglycan-induced arthritis. **PLoS One**, v. 4. p. 41-48, 2009.

WILCZYNSKI, R. J. Th1/Th2 cytokines balance—*yin* and *yang* of reproductive immunology **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 122 p.136-43 2005. Review

ZAR, F.A.; LOLANS, V.; JACKSON, G. G.; MACARTHUR, R. D.. Biphasic, concentration-dependent and rate-limited, concentration-independent bacterial killing by an aminoglycoside antibiotic. **J. Exp. Med.**, v. 124 p. 198-203, 1984.