Bruna Cristina Favoretto

**Estudo da participação dos receptores DC-SIGN e
MR nos mecanismos de supressão da resposta
imune induzida por componentes de alta massa
molecular do extrato de *Ascaris suum***

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
2014

Bruna Cristina Favoretto

**Estudo da participação dos receptores DC-SIGN e
MR nos mecanismos de supressão da resposta
imune induzida por componentes de alta massa
molecular do extrato de *Ascaris suum***

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 original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Favoretto, Bruna Cristina.

Estudo da participação dos receptores DC-SIGN e MR nos mecanismos de supressão da resposta imune induzida por componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum* / Bruna Cristina Favoretto. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunossupressão.

Versão do título para o inglês: Involvement of DC-SIGN and MR receptors in the mechanisms of immune suppression induced by high molecular weight components from *Ascaris suum* extract.

1. *Ascaris suum* 2. Receptores de reconhecimento 3. Células dendríticas 4. Imunorregulação 5. Carboidratos I. Mauro, Profa. Dra. Eliana Faquim de Lima II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0126/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruna Cristina Favoretto.

Título da Tese: Estudo da participação dos receptores DC-SIGN e MR nos mecanismos de supressão da resposta imune induzida por componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum*.

Orientador(a): Profa. Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da participação dos receptores de lectina tipo C nos mecanismos de supressão da resposta imune induzida por componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum*" protocolo nº 750/10, sob a responsabilidade de Eliana Faquim de Lima Mauro e Bruna Cristina Favoretto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/08/2010

We certify that the research entitled "Study of the involvement of C-type lectin receptors in the mechanisms of the extract of *Ascaris suum*", protocol nº 750/10, under the responsibility of Eliana Faquim de Lima Mauro and Bruna Cristina Favoretto, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 08/12/2010

Vigência do Projeto: 08/2010 - 07/2014	Nº de animais/espécie
Laboratório de Imunopatologia	318 camundongos Balb/c Machos 24 camundongos C57BL/6 wild type Machos 24 camundongos C57BL/6 TLR2 Machos 24 camundongos C57BL/6 TLR4 -/- Machos

São Paulo, 13 de agosto de 2010.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do 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 **115** nas fls. **92** do livro **02** 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 **Estudo da participação dos receptores de lectina tipo C nos mecanismos de supressão da resposta imune induzida por componentes de alta massa molecular do extrato de Ascaris suum** do qual participam o(s) alunos **Bruna Cristina Favoretto e o pesquisador Niels Olsen Saraiva Câmara**, 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 **27.10.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 28 de outubro de 2010.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

**A minha família pelo apoio,
dedicação e compreensão, com
certeza todo esse esforço valeu a
pena para minha formação.**

AGRADECIMENTOS

A toda Comunidade Científica, a confecção do presente trabalho não seria possível sem o conteúdo intelectual de inúmeros profissionais espalhados pelo mundo.

Agradeço de maneira destacada a minha orientadora Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro não só por nos transmitir exemplos de competência e profissionalismo, mas também pela confiança depositada durante estes nove anos, desde a iniciação científica.

Agradeço a todos os pesquisadores do Laboratório de Imunopatologia pelas ideias e discussões de resultados e aos funcionários que contribuíram durante todo o trabalho na preparação dos materiais utilizados e apoio científico.

A Dra. Jacqueline Jacysyn, da Universidade de São Paulo, pela amizade e ajuda na realização dos experimentos de citometria de fluxo, a Dra. Alicia Susana Couto e Dra. Adriana Casabuono, da Universidade de Buenos Aires, pela colaboração com os experimentos de cromatografia e espectrometria de massas, com certeza foi uma ótima experiência profissional. Dr. José Antonio Portes Junior, do Instituto Butantan, pela ajuda na realização das imunofluorescências. Aos componentes da banca de qualificação: Dra. Maria Notomi Sato, Dra. Ana Cláudia Trocoli Torrecilhas e Dra. Beatriz Stolf, pela disponibilidade e sugestões de aprimoramento para tese.

Agradeço as minhas irmãs (Elianetes): Priscila, Carol e Amanda pelo compartilhamento de trabalhos, sonhos e dificuldades e por tornar nosso Lab o mais divertido de todos. Ao Juninho que sempre esteve presente em todos os momentos, sempre foi meu amigo mais querido e, quem diria, agora foi promovido ao cargo de lindo. A todos os meus amigos do laboratório de imunopatologia pela ajuda em algum experimento ou qualquer conversa que torna nosso ambiente de trabalho muito mais agradável. A todos os demais que, mesmo sem a citação dos nomes, contribuíram com a realização desta tese.

Este projeto teve auxílio financeiro do CNPq e FAPESP (2010/10393-1).

RESUMO

FAVORETTO, B. C. **Estudo da participação dos receptores DC-SIGN e MR nos mecanismos de supressão da resposta imune induzida por componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum***. 2014. 77 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Substâncias com potencial imunomodulador têm sido alvo de estudos, visto que podem representar ferramentas úteis para o entendimento dos mecanismos envolvidos na ativação e controle das respostas imunes. Antígenos de alta massa molecular (PI) do extrato de *Ascaris suum* exercem efeito supressor sobre a resposta imune a antígenos próprios e heterólogos, como a ovalbumina (OVA). Os componentes do PI atuam diretamente sobre as células apresentadoras de antígenos (APCs), como as DCs, diminuindo a expressão das moléculas envolvidas na apresentação antigênica e assim, inibindo a proliferação de linfócitos T. Além disso, esse efeito é independente dos receptores do tipo *Toll* 2 e 4 (TLR2 e 4) e da molécula MyD88. Nesse trabalho analisamos o conteúdo de antígenos do PI contendo glicanos e a participação dos receptores de lectina tipo-C (CLRs), com enfoque no DC-SIGN e MR, na modulação da atividade das DCs. As análises por cromatografia de troca aniônica (HPAEC-PAD) e espectrometria de massas (UV-MALDI-TOF) mostram que componentes do PI contêm cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas de alta manose e do tipo complexa além de resíduos de fosforilcolina. Ensaio de incubação com lectinas mostraram ainda, que parte do PI apresenta afinidade à *Canavalia ensiformis* (ConA) porém não se liga à *Artocarpus integrifolia* (Jacalina) sugerindo que antígenos contendo *N*-glicanos são mais abundantes nestes componentes. Os resultados de citometria de fluxo permitiram verificar que componentes do PI que apresentam as cadeias glicosídicas *N*-ligadas inibem a maturação de DCs incubadas com LPS. No entanto, a pré-incubação de DCs com manana, anticorpo anti-DC-SIGN ou anti-MR foi capaz de bloquear parte do efeito modulador do PI sobre a maturação dessas células estimuladas com LPS. Além disso, resultados de citometria de fluxo e microscopia confocal mostraram que a alta ligação e internalização de PI-Alexa pelas DCs estiveram diminuídas quando as células foram previamente incubadas com manana ou anticorpos anti-DC-SIGN e/ou anti-MR. Também foi observado, que o bloqueio desses receptores foi capaz de abolir o efeito inibitório do PI sobre a resposta proliferativa de linfócitos T *in vitro*. Os resultados em conjunto mostram a participação dos receptores DC-SIGN e MR no reconhecimento de componentes glicosilados do PI e na sua ação imunomoduladora.

Palavras-chave: *Ascaris suum*. Receptores de reconhecimento. Células dendríticas. Imunorregulação. Carboidratos.

ABSTRACT

FAVORETTO, B. C. **Involvement of DC-SIGN and MR receptors in the mechanisms of immune suppression induced by high molecular weight components from *Ascaris suum* extract.** 2014. 77 p. Ph. D. thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Molecules with immunomodulatory properties have been investigated and represent useful tools for understanding the mechanisms involved in the activation and control of immune responses. High molecular weight components (PI) of *Ascaris suum* extract exert suppressive effect on the immune response to homologous and heterologous antigens, such as ovalbumin (OVA). The PI components exert direct effect on antigen presenting cells (APCs), as dendritic cells (DCs), inhibiting the expression of molecules involved in antigen presentation and thus, decreasing the T lymphocyte proliferation. In addition, this effect is independent of Toll-like receptors 2 and 4 (TLR2 and 4) as well as MyD88 molecule. In this work we studied the glycoconjugates in PI and the participation of C-type lectin receptors (CLRs), mainly the DC-SIGN and MR, in the modulation of the functional activity of DCs. The analysis of anion exchange chromatography (HPAEC-PAD) and mass spectrometry (UV-MALDI-TOF) show that PI components contain high mannose- and complex-type N-linked oligosaccharides and phosphorylcholine residues. The binding affinity with distinct lectins showed that part of PI presented affinity to *Canavalia ensiformis* (ConA), however did not bind to *Artocarpus integrifolia* (jacalina) suggesting that antigens containing N-linked glycans are abundant in PI. It was observed by flow cytometry that the PI components containing N-linked glycans inhibited the DCs maturation induced by LPS. On the other hand, the previous incubation of DCs with mannan, anti-DC-SIGN and/or anti-MR antibodies abolished the modulatory effect of PI on the DCs maturation. Furthermore, analysis of flow cytometry and confocal microscopy showed that the high binding and internalization of PI-Alexa by DCs was decreased when the cells were previously incubated with mannan, anti-DC-SIGN and/or anti-MR antibodies. It was also observed that the blockage of DC-SIGN and MR in DCs reversed the inhibitory effect of PI in the *in vitro* T cells proliferative response. Taking together these results show the involvement of DC-SIGN and MR in the recognition of N-glycosylated components of PI by DCs and in its modulatory effect.

Keywords: *Ascaris suum*. Antigen recognition receptors. Dendritic Cells. Immunoregulation. Carbohydrates.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAS-3 - Proteína alergênica de *Ascaris suum*

APC - Antigen-presenting cell (Células apresentadoras de antígeno)

ASC - Extrato bruto de *Ascaris suum*

Asn - Asparagina

BBS - Borate buffered saline (Solução salina tamponada com borato)

BrdU - Bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine)

BSA - Bovine albumin serum (Soro albumina bovina)

CFA - Complete Freund Adjuvant (Adjuvante completo de Freund)

CLR - C-type lectin receptors (Receptores de lectinas tipo C)

ConA - (Concanavalina A de *Canavalia ensiformis*)

CRD - Carbohydrate Recognition Domains (Domínio de reconhecimento de carboidratos)

DAPI - (4',6-amino-2phenylylindole, dihydrochloride)

DC - Dendritic cell (Célula dendrítica)

DC-SIGN - Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin

DMSO - Dimethylsulfoxid (Dimetilsulfóxido)

DTT - Ditiotritol

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilodiaminotetracético)

EGTA - Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (Ácido etiloglicoltetracético)

ELISA- Enzyme linked immunosorbent assay (Ensaio Imunoenzimático)

ES-62 - (Produtos excretórios/secretórios de filária)

FBS - Fetal bovine serum (Soro fetal bovino)

FITC - Fluorescein isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)

FSC - Forward-scattered light

Fuc - Fucose

Gal - Galactose

GalNAc - N-acetil-galactosamina

GlcNAc - N-acetil-glucosamina

GM-CSF - Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Fator estimulador de colônias – granulócitos e monócitos)

HF - Ácido hidrofúrico

GTPase - family of hydrolase enzymes

HIV - Human Immunodeficiency Virus

HPAEC-PAD - High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection

IFN- α - Interferon- α

IgE - Imunoglobulina E

I κ B - (inhibitor of NF- κ B kinase)

IL-10 - Interleucina-10

IL-12 - Interleucina-12

IL-4 - Interleucina-4

IL-6 - Interleucina-6

IL-5 - Interleucina-5

IL-8 - Interleucina-8

IRAKs - (IL-1 receptor-associated kinases)

ITAMs - (tyrosine-based activation motif)

LAL - *Limulus Amoebocyte Lysate*

LPS - Lipopolysaccharid (Lipopolissacarídeo)

Man – Manose

ME - Mercaptoetanol

MGL – Macrophage galactose lectin

MHC - Major histocompatibility complex (Complexo de histocompatibilidade principal)

MIF - Média de Intensidade de Fluorescência

MR - Mannose receptor

MyD88 - Myeloid differentiation factor 88

NaCl - Sodium chloride (Cloreto de sódio)

NF- κ B - factor nuclear kappa B

NP-40 - nonyl phenoxypolyethoxylethanol

OVA - Ovalbumin (Ovalbumina)

PAKs - activated protein kinases

PAMP - Pathogen-associated molecular patterns (Padrões moleculares associados aos patógenos)

Pam3-CSK4 - Lipopeptide tripalmitoyl-S-glycerylcysteine

PAS-1 – Proteína de *Ascaris suum*-1

PBS - Phosphate buffered saline (Solução salina tamponada com fosfato)

PBST - Phosphate buffered saline tween (Solução salina tamponada com fosfato + Tween 20)

PC - phosphorylcholine (Fosforilcolina)

PE - Phycoerythrin (Ficoeritrina)

PI - Pico I (Componentes de alta massa molecular do Asc)

PIII - Pico III (Componentes de baixa massa molecular do Asc)

PNGaseF - Peptide -N-Glycosidase F

Poly I:C - polyinosine-deoxycytidylic acid

Raf-1 - Família das proteínas quinases MAP

Ras - Família das proteínas quinases MAP

Rho – Família das GTPases

RPMI-S - Meio de cultura RPMI 1640 suplementado

SEA - *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen (Antígenos solúveis dos ovos de *S. mansoni*)

Ser – Serina

Sial - Ácido siálico

Src – Família das proteínas quinases

SSC - Side-scattered light

Thr - Treonina

TIR - *Toll/Interleukin-1 Receptor*

TIRAP - Molécula adaptadora associada com receptores do tipo *Toll*

TGF- β - (Transforming Growth Factor- β)

Th1 - T helper 1

Th2 - T helper 2

Th17 - T helper 17

TLR - Toll like-receptor (Receptores do tipo Toll)

TLR2^{-/-} - Camundongos geneticamente deficientes em TLR2

TLR4^{-/-} - Camundongos geneticamente deficientes em TLR4

TMB - Tetramethylbenzidine

TNF- α - Fator de necrose tumoral

TRAF6 - Fator associado ao receptor TNF

T reg - Célula T reguladora

TRIF - (TIR) domain-containing adaptor

TRIS - Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Hidroximetil aminometano)

Tyr - Tyrosine (Tirosina)

UV-MALDI-TOF - Matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

WT - Camundongos *Wild Type* (camundongos do tipo selvagem)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Helmintos e o sistema imune.....	19
1.2	Reconhecimento de patógenos pelas células dendríticas.....	20
1.2.1	<i>Receptores do tipo Toll.....</i>	<i>21</i>
1.2.2	<i>Receptores de lectinas tipo C.....</i>	<i>23</i>
1.3	Glicoconjugados presentes em patógenos.....	25
2	OBJETIVO DO PROJETO.....	29
2.1	Objetivos específicos.....	29
2.2	Delineamento experimental.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Camundongos.....	30
3.2	Antígenos e Adjuvantes.....	30
3.3	Preparo do extrato de <i>Ascaris suum</i>.....	30
3.4	Obtenção dos componentes de alta massa molecular do extrato de <i>Ascaris suum</i> (PI).....	31
3.5	Análise da contaminação de PI com LPS e eliminação com Polimixina B.....	31
3.6	Análise e separação de componentes glicosilados do PI por meio de afinidade às lectinas.....	31
3.6.1	<i>Canavalia ensiformis.....</i>	<i>31</i>
3.6.2	<i>Artocarpus integrifolia.....</i>	<i>32</i>
3.7	Preparo das amostras para obtenção dos oligossacarídeos N-ligados nos antígenos do PI.....	32

3.7.1	<i>Remoção de oligossacarídeos N-ligados por digestão enzimática utilizando N-Glicosidase F (PNGaseF).....</i>	33
3.8	Análise de carboidratos por cromatografia de troca aniônica de alta resolução acoplada a um detector de pulso amperimétrico (HPAEC-PAD).....	33
3.9	Análises de oligossacarídeos por espectrometria de massa UV-MALDI-TOF.....	34
3.10	Protocolo de conjugação do Alexa Flúor 488 ao PI ou BSA.....	34
3.11	Diferenciação de DCs <i>in vitro</i> a partir de medula óssea de camundongos.....	34
3.12	Marcação com anticorpos fluorescentes para análise em citômetro de fluxo.....	35
3.13	Estimulação de DCs <i>in vitro</i> para análise em citômetro de fluxo.....	35
3.13.1	<i>Incubação com PI e/ou com LPS e os diferentes ligantes de CLRs.....</i>	35
3.13.2	<i>Incubação das DCs com LPS e/ou componentes do PI ligados ou não às diferentes lectinas.....</i>	36
3.14	Ensaio de incubação de DCs imaturas com PI-Alexa-488 e análise em citômetro de fluxo.....	36
3.15	Ensaio de ligação e internalização de DCs com PI-Alexa-488 e análise em microscopia confocal.....	36
3.16	Obtenção e preparo de suspensões celulares a partir de órgãos linfoides de camundongos.....	37
3.17	Protocolo de purificação celular.....	38
3.18	Resposta proliferativa de linfócitos T OVA-específicos.....	38

3.19	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS.....	40
4.1	Obtenção dos componentes de alta massa molecular do extrato de <i>Ascaris suum</i> por filtração em gel.....	40
4.2	Análise da presença e obtenção de glicanos N- ou O-ligados em componentes do PI.....	41
4.3	Análise da presença de glicanos N-ligados no PI por meio de HPAEC-PAD.....	42
4.4	Análise da presença de ácido siálico no PI por HPAEC-PAD.....	43
4.5	Análise da presença de glicanos N-ligados no PI por espectrometria de massa UV-MALDI-TOF.....	45
4.6	Análise da expressão de DC-SIGN e MR em DCs diferenciadas e estimuladas <i>in vitro</i>	48
4.7	Estudo da capacidade de antígenos do PI ligados à ConA de modularem a maturação de DCs.....	50
4.8	Estudo da capacidade de antígenos do PI não-ligados à Jacalina de modularem a maturação de DCs.....	51
4.9	Análise por citometria de fluxo e microscopia confocal da ligação e internalização do PI-Alexa em DCs.....	53
4.10	Análise da participação de DC-SIGN e MR na ligação e internalização de PI-Alexa à DCs por citometria de fluxo.....	55
4.11	Análise da participação de DC-SIGN e MR na ligação de PI-Alexa à DCs por microscopia confocal.....	56
4.12	Estudo do papel de DC-SIGN e MR na modulação exercida pelo PI	

	sobre as DCs.....	58
4.13	Resposta proliferativa de linfócitos T OVA-específicos induzida por células CD11c ⁺ incubadas com OVA, PI, manana ou anti-DC- SIGN e MR.....	59
5	DISCUSSÃO.....	62
6	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Helmintos e o sistema imune

As infecções por helmintos, tais como *Ascaris suum*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heligmosomoides polygyrus* e *Schistosoma mansoni*, além de induzirem em seu hospedeiro resposta Th2 caracterizada pela alta produção de anticorpos IgE, secreção de IL-4 e IL-5, eosinofilia e mastocitose, também exercem potente efeito imunomodulador (revisado por FINKELMAN et al., 1991; HAIG et al., 1980; ISHIZAKA et al., 1969; ORR; BLAIR, 1969).

De maneira semelhante ao observado nas infecções, extratos preparados a partir dos parasitas e/ou antígenos solúveis liberados por eles também são capazes de modular a resposta imune induzida por antígenos heterólogos, doenças autoimunes e infecções por micobactérias (KOMATSU et al., 1979; revisado por SEWELL et al., 2002; STROMBERG, 1980). Neste contexto, os estudos mostraram a relação inversa entre infecções por helmintos e o desenvolvimento de doenças alérgicas e inflamatórias, possivelmente por mecanismo dependente de células T reguladoras geradas em resposta a estes parasitas (ELLIOTT et al., 2003; ELLIOTT; SUMMERS; WEINSTOCK, 2005; MORREELS; PELCKMANS, 2005).

Efeito supressor sobre a resposta celular e humoral dirigida contra antígenos heterólogos, como a ovalbumina (OVA) ou micobactéria, foi também descrito em trabalhos realizados com extrato bruto de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc). O envolvimento da IL-4 e IL-10 foi demonstrado nesse efeito imunomodulador exercido pelo extrato de Asc (FERREIRA et al., 1995; MACEDO; BARBUTO, 1988; MACEDO et al., 1998; SOARES et al., 1987).

Outros estudos realizados com os componentes isolados deste extrato de Asc permitiram evidenciar que seus antígenos de alta massa molecular (PI), obtidos por filtração em gel, são os responsáveis pelo efeito modulador sobre a resposta humoral e celular anti-OVA. Por outro lado, os componentes de baixa massa molecular (PIII) do Asc não alteram a resposta OVA-específica e ainda induzem altos títulos de IgE anti-Asc (FAQUIM-MAURO; MACEDO, 1998; SOARES et al., 1992).

Por meio de cromatografia de afinidade com anticorpos monoclonais anti-PI ou anti-PIII, foram isoladas duas proteínas do extrato de Asc, denominadas PAS-1 e

APAS-3, respectivamente. Em modelo murino de asma experimental, foi observado que PAS-1 apresenta atividade imunossupressora, enquanto que o APAS-3 induz a produção de IgE, intensa eosinofilia e hiperreatividade das vias aéreas. Foi visto também, que PAS-1 possui propriedades anti-inflamatórias, diminuindo a ativação do sistema imune pelo lipopolissacarídeo (LPS) (ITAMI et al., 2003; OSHIRO; MACEDO; MACEDO-SOARES, 2005).

Visto que as células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells*-APCs) desempenham papel de destaque na indução da imunidade adaptativa, Silva et al. (2006) mostraram que o PI inibe a expressão de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD86) e de MHC de classe II (MHC-II) tanto nas APCs totais como em DCs purificadas de camundongos imunizados com OVA e PI. Em ensaios *in vitro*, essas DCs foram incapazes de induzir a proliferação de linfócitos T OVA-específicos. Além disso, foi verificado que esse efeito do PI é dependente de IL-10. Portanto, os resultados demonstram que a supressão da resposta anti-OVA induzida por PI é resultado da capacidade destes antígenos de modular a atividade das APCs na fase de indução da imunidade específica.

1.2 Reconhecimento de patógenos pelas células dendríticas

O reconhecimento dos diferentes microorganismos pelas APCs, como as DCs, é feito por receptores expressos em sua membrana que interagem com padrões moleculares presentes em patógenos (PAMPs) como lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (MOLL, 2003). Dentre estes receptores estão os do tipo *Toll* (TLRs) e receptores de lectina tipo C (CLRs) que, ligados seletivamente, geram sinais intracelulares de ativação e maturação celular, seguida de produção de mediadores solúveis e aumento da expressão de moléculas coestimuladoras os quais podem determinar, durante a apresentação antigênica, a polarização dos linfócitos TCD4⁺ para Th1, Th2, Th17 ou Treg (GAUSE et al., 1999; revisado por HUBO et al., 2013; MOSMANN; SAD, 1996; SCHAMARE et al., 2001; TAKEDA et al., 2003; VAN KOOYK; GEIJTENBEEK, 2003).

1.2.1 Receptores do tipo Toll

TLRs interagem com diversas estruturas presentes em patógenos como mostra a figura 1. Os TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 e 11 são encontrados na membrana celular, enquanto que TLR 3, 7, 8, e 9 residem dentro de endossomos. A sinalização via estes receptores resulta na ativação de vários fatores de transcrição tais como o NF- κ B, o qual está diretamente envolvido no aumento da resposta inflamatória, indução da maturação das DCs e receptores de quimiocinas (AKIRA et al., 2003; VAN VLIET et al., 2007).

Figura 1- Ligantes reconhecidos pela família TLR.

A resposta de todos os ligantes, exceto dsRNA, são dependentes da molécula adaptadora MyD88 responsável por ativar a cascata de proteínas intracelulares, culminando no fator de transcrição NF- κ B. Fonte: Akira, Yamamoto e Takeda, 2003.

Os componentes citoplasmáticos dos TLRs contêm domínios conservados conhecidos como TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*), os quais podem interagir com até 4 moléculas adaptadoras (MyD88, TIRAP, TRAM e TRIF) para iniciar uma cascata de sinalização intracelular. Com exceção do TLR3, todos os demais sinalizam por meio da MyD88, porém não exclusivamente. Após a ativação do TLR, a molécula MyD88 é recrutada para o receptor através do seu domínio TIR, o qual interage com o domínio TIR do receptor que permite o recrutamento e ativação de uma família de

quinases chamadas de IRAKs (*IL-1 receptor-associated kinases*). Essas proteínas quinases interagem com a MyD88 através do seu domínio TIR, o que subsequentemente leva a ativação de TRAF6 e de outras quinases incluindo a IKK (*inhibitor of NF-κB kinase*) que libera o fator NF-κB. Com a liberação do NF-κB há a sua translocação para o núcleo, que por sua vez, promove a expressão de genes levando a respostas pró-inflamatórias (revisado por LIEW et al., 2005).

A família NF-κB é composta por várias subunidades que podem formar homodímeros e heterodímeros. A forma mais abundante de NF-κB é um heterodímero entre p65 e p50, no qual p65 é o componente transcricional ativo. Nas células não-estimuladas a p65 está na forma inativa no citosol complexada com algumas das proteínas IκB. Após a estimulação da célula, a proteína IκB é degradada e o dímero de p50-p65 transloca para o núcleo onde se liga a sequências alvo no DNA. Por exemplo, a sinalização via TLR4 desencadeada pelo LPS leva a ativação da p65 pelas vias dependentes tanto de MyD88 como de TRIF levando à transcrição de genes alvo incluindo os das citocinas e quimiocinas assim como maturação celular (revisado por LIEW et al., 2005).

Em vista disso, estudamos a expressão dos TLRs em APCs de camundongos primados com PI. Os resultados mostraram que esses antígenos do PI modulam negativamente a expressão de TLR1, 2, 4 e 9 nas DCs, durante a indução da resposta adaptativa (FAVORETTO et al., 2010).

Além disso, avaliamos a participação de TLR2 e 4 no mecanismo de supressão exercido pelo PI sobre a resposta adaptativa anti-OVA e ativação das DCs. Nossos dados permitiram descartar a participação desses receptores no mecanismo de ação do PI, visto que estes antígenos foram capazes de inibir a resposta celular e a humoral anti-OVA em camundongos deficientes em TLR2 ou 4 (TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-}). Somado a isso, verificamos que o PI inibiu a expressão das moléculas MHC-II, CD40, CD80 e CD86 nas DCs de camundongos TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} imunizados conjuntamente com a OVA, em relação aos animais primados somente com a OVA.

Em outros ensaios realizados *in vitro*, verificamos que o PI inibe a maturação das DCs estimuladas por LPS, Poly I:C ou Pam3CSK4. Este efeito do PI foi também observado em DCs de camundongos TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} ou MyD88^{-/-}. Portanto, essas observações descartam a participação do TLR2 ou 4 e a via de sinalização dependente da molécula adaptadora MyD88 na supressão exercida pelo PI (FAVORETTO et al., 2014).

1.2.2 Receptores de lectinas tipo C

Dentre outros receptores expressos em APCs e DCs, os CLRs podem participar da adesão célula-célula, migração celular bem como no reconhecimento tanto de antígenos próprios como de patógenos contendo oligossacarídeos na sua composição. Além disso, apresenta papel relevante na maturação das APCs e, portanto na geração da resposta imune específica (revisado por GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009; GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2003; MCGREAL et al., 2005; ZHOU et al., 2006).

Todos os CLRs possuem um sítio de interação com glicanos denominado domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e dependendo da sua sequência de aminoácidos, o CRD apresenta especificidade para uma ou outra estrutura contendo resíduos de manose (Man), fucose (Fuc), galactose (Gal), N-Acetil-Glucosamina (GlcNAc), N-Acetil-Galactosamina (GalNAc). O reconhecimento de estruturas glicanas por esses receptores é feita de maneira Ca^{2+} -dependente (ENGERING et al., 2002; GEIJTENBEEK et al., 2004).

Figura 2- Localização de CRDs em receptores de lectinas tipo C

Receptores de lectinas tipo C são divididos em dois tipos (I e II) de acordo com seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e são importantes para a captura de antígeno. Fonte: Figdor, Van Kooyk e Adema, 2002.

Dentre os CLRs, o DC-SIGN (CD209) reconhece preferencialmente estruturas glicanas altamente manosiladas como o complexo lipoarabinomanana manosilados (ManLAM) de *Mycobacterium*. Pode também ligar-se às estruturas glicanas como antígenos do grupo Lewis (Le) inicialmente descritas em células de mamíferos como eritrócitos, granulócitos e monócitos. Estes carboidratos são frequentemente característicos do tipo e fase de desenvolvimento celular. As estruturas Le a e b são compostas por $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 3\text{GlcNAc}\rightarrow \text{R}$ e $\text{fuc}\alpha 1\rightarrow 2\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\rightarrow \text{R}$, respectivamente, com outro resíduo de $\text{fuc}\alpha 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}$ para ambos os grupos. Os grupos Le x e y apresentam $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\rightarrow \text{R}$ e $\text{fuc}\alpha 1\rightarrow 3\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\rightarrow \text{R}$ com resíduo de fucose na posição $\alpha 1\rightarrow 3\text{GlcNAc}$, respectivamente. Resíduos de ácido siálico também podem estar adicionados aos grupos x e a e assim são designadas sialil Le^x ou sialil Le^a (FUKUDA, 1995; FUKUDA et al., 1999). A Langerina possui especificidade a glicanos contendo resíduos de manose, fucose (Le^y e Le^b) e GlcNAc. O receptor de manose (MR ou CD206) é capaz de reconhecer estruturas ricas em manose, fucose e GlcNAc. O receptor MGL liga-se a cadeias glicosídicas com terminais de GalNAc. Dectina-1, por sua vez, tem especificidade para β -1,3 glicanos expressos principalmente em leveduras e fungos como a *Candida albicans*.

Apesar do reconhecimento dos CLRs indicar redundância na interação com as diferentes estruturas glicanas observa-se maior afinidade ou seletividade na interação entre esses receptores e determinados monossacarídeos nas cadeias presentes em patógenos. Além disso, a expressão diferencial destes CLRs nas populações celulares também restringe o reconhecimento destes patógenos. O MR é altamente expresso em macrófagos e diferentes subtipos de DCs, a Langerina é restrita às células de Langerhans e DC-SIGN é amplamente encontrado em DCs da derme assim como dos linfonodos e tecidos associados à mucosa. O reconhecimento via CLRs leva à internalização do patógeno, sua degradação e apresentação antigênica (revisado por GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009; GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2003; MCGREAL et al., 2005; ZHOU et al., 2006).

A sinalização pelos CLRs pode ser mediada por duas vias principais, sendo uma delas por moléculas adaptadoras contendo ITAMs (*tyrosine-based activation motif*) e outra via dependente de proteínas quinases ou fosfatases que diretamente ou indiretamente interagem com seus domínios citoplasmáticos. O DC-SIGN é um exemplo de CLR que ao reconhecer resíduos de manose ou fucose em patógenos

ativa a proteína quinase Raf-1 a qual induz a fosforilação na Ser276 da subunidade p65 do NF- κ B. A ativação de Raf-1 pelo DC-SIGN é independente da sinalização via TLR e envolve uma sequência complexa de eventos, o sinal gerado por esse receptor ativa as proteínas Ras que compreendem o 1º passo para a ativação de Raf-1. A fosforilação da Ser338 da Raf-1 é mediada pelas quinases PAKs, as quais são ativadas pelas GTPases da família Rho, enquanto que a fosforilação da Tyr340 e 341 da Raf-1 é mediada pelas quinases Src.

A fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B pela Raf-1 permite a ligação de acetiltransferases (CBP), as quais levam a acetilação de vários resíduos de lisina desta subunidade. A acetilação da p65 afeta a atividade do NF- κ B aumentando a sua afinidade ao DNA e assim prolongando a sua atividade nuclear. Em particular, o tipo de acetilação da p65 resultante da sinalização via DC-SIGN aumenta e prolonga a ativação transcricional dos promotores de IL-8 e IL-10, enquanto que a p65 acetilada via dectina-1 aumenta a transcrição de IL-6 e IL-12 dentre os outros genes de citocinas.

Essa acetilação da p65 do NF- κ B induzida pela sinalização via DC-SIGN tem um papel central na resposta imune induzida por inúmeros patógenos contendo manose, tais como *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *Candida albicans*, antígeno solúvel de ovos de *Schistosoma mansoni*, *Saccharomyces cerevisiae* e HIV dentre outros (DEN DUNNEN et al., 2009).

Estudos mostram ainda, que a sinalização gerada pelos CLRs pode modular a sinalização induzida pelo TLR. Foi observado que a intercomunicação dos sinais gerados por TLR e DC-SIGN depende da prévia ativação do NF- κ B que pode ter sido desencadeada por diferentes TLRs como 3, 4 ou 5. Sendo assim, esta comunicação entre TLR e CLR pode determinar o tipo de resposta que será gerada pela célula (DEN DUNNEN et al., 2009; revisado por GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009).

1.3 Glicoconjugados presentes em patógenos

A glicosilação de proteínas representa uma importante modificação pós-traducional que ocorre principalmente no complexo de Golgi e como resultado deste processo, inúmeras cadeias de oligossacarídeos podem ser geradas e ligadas às diversas proteínas. Esta adição de glicanos pode interferir tanto na atividade

A linha vermelha ressalta o *core* da cadeia que é composto por $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. A este motivo conservado podem ser adicionados outros monossacarídeos como manose, *N*-acetilglucosamina, galactose, fucose e ácido siálico.

Fonte: VARKI et al., 2009.

Diversos patógenos desenvolveram estratégias para evadir do reconhecimento do sistema imune e, assim, garantir sua sobrevivência no hospedeiro. Dados da literatura mostram o envolvimento de glicoconjugados nesse processo de supressão da resposta imune, como nas infecções por *Wolbachia* e *Schistosoma mansoni*. Nestes casos foi observado que parte da imunossupressão é resultante de oligossacarídeos presentes nestes parasitas ou em seus produtos excretórios/secretórios. Os trabalhos mostram que esses glicoconjugados são reconhecidos por TLRs ou CLRs nas DCs que, por sua vez, induzem a geração de células T regs secretoras de citocinas moduladoras como a IL-10 (BRATTING et al., 2004; VAN DER KLEIJ et al., 2002).

Análises por espectrometria de massas permitiram identificar oligossacarídeos *N*- e *O*-ligados em glicoproteínas presentes em diferentes estágios de vida de *S. mansoni* (cercária e ovos). Além disso, foi verificada a interação desses oligossacarídeos com CLRs distintos nas DCs (JANG-LEE, 2007; NYAMME, 1998). Em outro trabalho Erdmann et al. (2009) mostraram que a interação do receptor de lectina tipo-I (Siglec-E) com o ácido siálico na superfície de *T. cruzi* resulta em inibição da produção de IL-12 induzida por LPS.

Summers et al. (2005) mostraram que o tratamento de pacientes com doença de Crohn ou colite ulcerativa com ovos de *Trichuris suis* resultou em melhora dos sintomas clínicos. Recentemente foi demonstrado que glicoconjugados presentes em produtos secretados por estes parasitas, inibem a secreção de quimiocinas e citocinas inflamatórias induzidas por LPS (KLAVER et al., 2013).

Sabendo que o reconhecimento de patógenos pelas DCs é fator crucial na geração da resposta adaptativa e, em vista dos nossos resultados obtidos mostrando que PI inibe a maturação destas células por um processo independente de TLRs, fica evidente a importância em se estudar a participação dos CLRs na imunomodulação exercida por esses antígenos. Neste sentido, este estudo pode contribuir com o entendimento dos mecanismos desencadeados pelos helmintos para evadir do sistema imune, assim como pode ser relevante para a busca e

desenvolvimento de moléculas terapêuticas capazes de modular doenças autoimunes, alérgicas dentre outras.

2 OBJETIVO DO PROJETO

Identificar glicoconjugados presentes no PI e a participação de DC-SIGN e MR, expressos em células dendríticas, no reconhecimento do PI e na modulação da atividade dessas células induzida por esses componentes de *Ascaris suum*.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Identificação e caracterização de estruturas glicosídicas *N*-ligadas em componentes do PI;
- ✓ Avaliação da capacidade de antígenos *N*-ligados do PI de modular a maturação das DCs *in vitro* incubadas com LPS;
- ✓ Estudo da ligação e internalização de PI-Alexa-488 às DCs diferenciadas *in vitro*;
- ✓ Estudo do reconhecimento do PI-Alexa-488 pelos receptores DC-SIGN e MR em DCs previamente incubadas com manana ou anticorpos anti-CLRs;
- ✓ Avaliação do papel de DC-SIGN e MR na capacidade do PI de inibir a maturação das DCs incubadas com LPS;
- ✓ Análise de proliferação de linfócitos TCD3⁺ OVA-específicos incubados com DCs (CD11c⁺) purificadas de camundongos imunizados com OVA e estimuladas com OVA ou OVA+PI e bloqueadores de DC-SIGN ou MR.

2.2 Delineamento experimental

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Para os protocolos experimentais foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c com 6 semanas de idade, obtidos no Biotério Central do Instituto Butantan. O uso dos animais foi aprovado no Instituto de Ciências Biomédicas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA), registro nº 115 e pela Comissão de Ética no uso de Animais Instituto Butantan (CEUAIB) nº 750/10.

3.2 Antígenos e Adjuvantes

Ovalbumina grau V (OVA) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) foi utilizada nos protocolos de imunização de camundongos e nos ensaios de estimulação das células *in vitro*. O adjuvante Completo de Freund (CFA- Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) foi emulsificado na proporção de 1:1 (vol/vol) com OVA e utilizado nos protocolos de imunização.

Manana de *S.cerevisiae* e LPS de *E. coli* (Sigma-Aldrich) foram utilizados nos ensaios de estimulação das DCs *in vitro*. Componentes do PI foram obtidos a partir do fracionamento do extrato bruto de Asc em coluna de filtração em gel (FAQUIM; MACEDO, 1998) e utilizados nos experimentos *in vitro*.

3.3 Preparo do extrato de *Ascaris suum*

Vermes adultos vivos, obtidos de intestinos de suínos, foram lavados em solução salina (NaCl 0,15M) e homogeneizados em salina tamponada com tampão borato 0,1 M; pH 8,0 (BBS) no Ultra-TURRAX. O material obtido foi centrifugado por 1 hora a 10.000 g e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi ressuspenso em BBS e mantido por 18 h/4 °C, sob agitação constante. Posteriormente, o material foi centrifugado por 90 min/10.000 g e o sobrenadante obtido foi dialisado contra água destilada e novamente submetido à centrifugação. Após este procedimento, o sobrenadante foi aliquotado e liofilizado.

3.4 Obtenção dos componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum* (PI)

Extrato de *Ascaris suum* diluído em BBS 0,05 M; pH 8,0 foi submetido à cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200 (C16/100-GE Healthcare) com fluxo de 1,6 mL/min. Após a aplicação do extrato, foram coletadas frações de 1,6 mL em coletor automático acoplado a um espectrofotômetro. Frações correspondentes ao pico I foram agrupadas, concentradas por centrifugação em Centriplus YM-100 (Amicon – Bedford, MA., USA) e armazenadas a -20 °C.

3.5 Análise da contaminação de PI com LPS e eliminação com Polimixina B

Para a eliminação de endotoxinas, amostras de PI foram homogeneizadas por 1 h em agitação no gelo com resina polimixina B (Detoxi-Gel Endotoxin) previamente equilibrada com PBS. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 5 min/1000g/4 °C. O sobrenadante da amostra contendo PI foi coletado e armazenado para certificação da ausência de LPS.

O conteúdo de endotoxinas bacterianas (predominantemente LPS) presentes nas amostras de PI foi avaliado em Ensaio Imunoenzimático LAL, realizado no setor de produção do Instituto Butantan. O laudo técnico fornece a quantidade de endotoxinas presentes em cada amostra e/ou no seu diluente, tendo como limite mínimo de detecção 0,125 VE/mL. Na ausência de endotoxinas, o PI foi utilizado nos diferentes protocolos experimentais.

3.6 Análise e separação de componentes glicosilados do PI por meio de afinidade às lectinas

3.6.1 *Canavalia ensiformis*

Canavalia ensiformis acoplada à sepharose (ConA-Sepharose - Sigma) foi utilizada para a análise e separação de componentes do PI contendo estruturas glicanas N-ligadas (α Man/ α Glc/ α GlcNAc). Para tanto, amostras de PI (1,5 mg/mL) foram incubadas com 1,0 mL sepharose-ConA previamente equilibrada em tampão Tris 20mM pH7,4 contendo 0,5 M de NaCl durante 30 minutos. Após essa etapa, a resina foi centrifugada e o material não-ligado foi coletado. Em seguida, foi

acrescentado 1,0 mL do tampão de ligação, e feita nova centrifugação com coleta da amostra. Os componentes ligados à lectina foram eluídos acrescentando-se 1,0 mL de Tris/NaCl contendo 500 mM de α -metil-D-manopiranosídeo como açúcar competidor, seguida de centrifugação e coleta dos sobrenadantes. Esse procedimento foi repetido e os sobrenadantes armazenados (VARKI et al., 2009).

3.6.2 *Artocarpus integrifolia*

Artocarpus integrifolia acoplada à agarose (Jacalina-Agarose - Vector) foi utilizada para a análise da presença de componentes do PI contendo estruturas glicanas O-ligadas (Gal β 1,3GalNAc). Amostra de PI foi incubada com a lectina Jacalina-agarose previamente equilibrada em Tris 175 mM pH 7,5 durante 30 minutos. Após as etapas de centrifugação, os componentes ligados à lectina foram eluídos acrescentando-se 1,0 mL de tampão contendo 800 mM de galactose seguida de centrifugação e coleta dos sobrenadantes. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 280 nm (VARKI et al., 2009).

A concentração proteica das amostras obtidas foi determinada pela técnica de Bradford. Os diferentes antígenos obtidos após as diferentes purificações foram avaliados *in vitro* quanto à sua capacidade de inibir a maturação de DCs induzida por LPS.

3.7 Preparo das amostras para obtenção dos oligossacarídeos N-ligados nos antígenos do PI

A identificação e caracterização dos componentes glicosilados no PI foram feitas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detecção de pulso amperimétrico (HPAEC-PAD) e espectrometria de massa de dessorção a laser em matriz e análise por tempo de voo (*Ultraviolet-Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-time of flight*-UV-MALDI-TOF).

Estes experimentos foram realizados em estágio no laboratório de Química Orgânica sob a supervisão da Dra Alicia S. Couto, Profa. da Universidade de Buenos Aires, Argentina.

3.7.1 Remoção de oligossacarídeos N-ligados por digestão enzimática utilizando N-Glicosidase F (PNGaseF)

Amostras de PI (200 µg/mL) ou a fração de PI ligada à ConA (200 µg/mL) foram dialisadas contra água Milli-Q por 24 horas, liofilizadas e ressuspensas em solução 0,5% de SDS contendo 0,04M de DTT. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C/10 min. Para a obtenção dos oligossacarídeos *N*-ligados em GlcNAc-Asn foi adicionada a enzima *N*-Glicosidase F (PNGaseF) (New England Biolabs).

As digestões enzimáticas foram realizadas na proporção de 120 mU de enzima para 200 µg de glicoproteína diluída em tampão de digestão (500 mM de fosfato de sódio, pH 7,5, NP-40 1%) seguida de incubação por 18 h/37 °C (SILVA et al., 2008). Os oligossacarídeos foram isolados do PI por centrifugação em filtros (Ultrafree-MC filters MW 3kDa, Millipore) e posteriormente analisadas.

3.8 Análise de carboidratos por cromatografia de troca aniônica de alta resolução acoplada a um detector de pulso amperimétrico (HPAEC-PAD)

Para a análise dos oligossacarídeos *N*-ligados, amostras obtidas após a digestão com PNGaseF foram aplicadas em coluna CarboPac PA-200 acoplada a um sistema DX-300 Dionex BioLC com detector de pulso amperimétrico. A análise dos oligossacarídeos neutros *N*-ligados ao PI foi realizada com solução de hidróxido de sódio 100 mM por 5 minutos, seguida de gradiente de eluição contendo solução de hidróxido de sódio 100 mM e acetato de sódio de 0-50 mM por 60 minutos (fluxo de 1 mL/min).

Para a eluição dos oligossacarídeos ácidos *N*-ligados, após a aplicação das amostras no sistema, utilizou-se solução de hidróxido de sódio 50 mM contendo 100 mM de acetato de sódio por 5 minutos seguida de eluição com solução de 100 mM de hidróxido de sódio e gradiente de 50-170 mM de acetato de sódio durante 60 minutos (fluxo de 1 mL/min).

O perfil cromatográfico dos oligossacarídeos foi comparado ao previamente estabelecido com cadeias padrão como Man₃NAcGlc₂, Glc₃ e Man₉NAcGlc₂ para oligossacarídeos neutros e Monosialilados, Disialilados, Trisialilados e Tetrasialilados para oligossacarídeos ácidos.

3.9 Análises de oligossacarídeos por espectrometria de massa UV-MALDI-TOF

Os oligossacarídeos separados do PI foram primeiramente submetidos a uma micro-coluna contendo resina catiônica Dowex 50 (H⁺) e resina Octadecyl-sílica gel previamente equilibrada com metanol e água para remoção das impurezas da amostra como detergentes e sais. Após esse procedimento, as amostras foram liofilizadas, diluídas em H₂O (analito) e preparadas com método *sandwich*. Para tanto, a ordem de agregado foi matriz:analito:matriz:matriz com uma relação final matriz:analito 3:1 (v/v). Para análises de espectrometria de massa foi utilizada nor-harmano (9H-pirido-3,4-b-indol, NH) como matriz. Os espectros foram realizados em modo positivo linear ou *reflectron*.

3.10 Protocolo de conjugação do Alexa Flúor 488 ao PI ou BSA

Amostras de PI ou BSA (5 mg/mL) foram dialisadas em tampão Bicarbonato de amônio 0,05M pH 8,0 a 4 °C/18 hs. Em seguida, foram liofilizadas e ressuspensas em 200 µL de tampão Bicarbonato de sódio 0,1M pH 8,3. O Alexa Flúor 488 (*Carboxylic Acid, Succinimidyl Ester*, Invitrogen) foi ressuspenso em 50 µL de DMSO e incubados por 1 h/TA sob agitação. Foram adicionados 10 µL da solução Alexa 488 nas amostras de PI ou BSA e realizada incubação por 1 h/TA sob agitação. As amostras foram submetidas à cromatografia de filtração em gel em coluna Sephadex G-25 previamente lavada com PBS pH 7,4 para a separação dos componentes conjugados ao Alexa. O material foi eluído em PBS e coletado 0,5 mL por tubo. O perfil cromatográfico foi determinado pela leitura das amostras a 280 e 495 nm.

3.11 Diferenciação de DCs *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos

Camundongos foram sacrificados e as células-tronco retiradas da medula óssea em meio RPMI1640. Após centrifugação, o botão celular foi ressuspenso em 10,0 mL de meio RPMI contendo 5% de soro fetal bovino (SFB). As células foram distribuídas em placas de 6 poços na concentração de 2x10⁶ céls/mL e adicionados 10 ng/mL de GM-CSF e 5 ng/mL de IL-4. No 4º dia de cultivo, os sobrenadantes das culturas foram retirados e adicionados novo meio RPMI-S com 10 ng/mL de GM-CSF e 5 ng/mL de IL-4 (Adaptado de SON et al., 2002). Após 3 dias, as células não-aderentes foram coletadas e a concentração celular foi determinada em câmara de

Neubauer. A análise por citometria de fluxo realizada com as células incubadas com anticorpo anti-CD11c-FITC revelou a presença de 85-90% de DCs.

3.12 Marcação com anticorpos fluorescentes para análise em citômetro de fluxo

Suspensões celulares previamente obtidas como descrito em 3.11 foram primeiramente incubadas com anticorpo anti-receptor FcγRII/RIII ($1\mu\text{g}/10^6$ céls) por 15 min/4 °C. Em seguida, $0,5 \times 10^6$ células foram incubadas com anticorpos anti-CD40, CD80, CD86 ou MHC-II-PE ($1\mu\text{g}/10^6$ céls) em PBS com 1% de BSA, por 30 min/4 °C. As células foram, ainda incubadas com anticorpo controle isotípico IgG1 ou IgG2a-FITC ou PE. Seguida as incubações, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS contendo 0,1% de paraformaldeído (Merck, Darmstadt, Germany). Todas as amostras foram feitas em duplicata e analisadas em citômetro de fluxo (10^4 eventos foram adquiridos por amostra em FACScalibur, Becton Dickinson). As células foram analisadas por tamanho/granulosidade (FSC/SSC). Em seguida a análise da expressão de moléculas foi feita pela média de intensidade de fluorescência (MIF) nas células incubadas com os anticorpos marcados com fluorocromo FITC ou PE.

3.13 Estimulação de DCs *in vitro* para análise em citômetro de fluxo

3.13.1 Incubação com PI e/ou com LPS e os diferentes ligantes de CLRs

As DCs (5×10^6) foram incubadas com LPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS+PI ($1 + 200\mu\text{g}/\text{mL}$) ou previamente incubadas por 1 h com manana ($50\mu\text{g}/\text{mL}$) ou os anticorpos anti-DC-SIGN ou anti-MR ($10\mu\text{g}/\text{mL}$) e posteriormente LPS+PI por 18 hs/37 °C em estufa de 5% de CO₂ umidificada. Ao final da incubação, as células foram coletadas e incubadas com anti-MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86 conjugados com FITC ou PE e analisadas em citômetro de fluxo.

3.13.2 Incubação das DCs com LPS e/ou componentes do PI ligados ou não às diferentes lectinas

As DCs (5×10^6) foram incubadas com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$), PI ($200 \mu\text{g/mL}$), PI ligado ou não a ConA ($200 \mu\text{g/mL}$) e PI não ligado a Jacalina ($200 \mu\text{g/mL}$) por 18 hs/ 37°C em estufa de 5% de CO_2 umidificada. Ao final da incubação, as células foram centrifugadas, os sobrenadantes coletados e $0,5 \times 10^6$ células foram incubadas com anticorpos anti-MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86 conjugados com PE. Após a marcação celular foi feita a análise em citômetro de fluxo.

3.14 Ensaio de incubação de DCs imaturas com PI-Alexa-488 e análise em citômetro de fluxo

DCs obtidas a partir do protocolo de diferenciação *in vitro* foram previamente incubadas com anticorpo anti-receptor Fc γ RII/RIII ($1 \mu\text{g}/10^6$ céls) por 15 min/ 4°C seguida de lavagem com PBS contendo 1% de BSA e centrifugação. As células foram distribuídas na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/poço em placas de 96 poços de fundo redondo (Costar) e incubadas com PI-Alexa-488 ($3 \mu\text{g/mL}$). Amostras de células foram também previamente incubadas com manana ($1 \mu\text{g/mL}$), anticorpo anti-DC-SIGN ou anti-MR ($1 \mu\text{g/mL}$), EGTA (5mM) ou Sucrose (0,75M) por 30 min/ 37°C seguida de incubação com PI-Alexa por 45 min/ 4°C ou 37°C . Os anticorpos utilizados anti-DC-SIGN ou anti-MR na incubação das DCs apresentam a capacidade de bloquear a interação com os ligantes desses receptores (AMPEL et al., 2005; CANARD et al., 2011).

Como controle, amostras de células foram incubadas com anticorpo controle isotípico, BSA-Alexa-488 ou não marcadas. Todas as amostras foram lavadas e ressuspensas em PBS contendo 0,1% de paraformaldeído (Merck). As amostras foram feitas em duplicata e analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson).

3.15 Ensaio de ligação e internalização de DCs com PI-Alexa-488 e análise em microscopia confocal

DCs obtidas a partir do protocolo de diferenciação *in vitro* foram previamente incubadas com anticorpo anti-receptor Fc γ RII/RIII ($1 \mu\text{g}/10^6$ céls) por 15 min/ 4°C seguida de lavagem com PBS contendo 1% de BSA e centrifugação. As células (1×10^5) foram incubadas com $3 \mu\text{g}$ de PI-Alexa-488 por 30 min a 4°C ou 37°C . Ao final deste período, as células foram lavadas com PBS contendo 1% de BSA,

centrifugadas e fixadas por 10 min./TA com solução PBS contendo 2% de paraformaldeído (Merck). Como controle, amostras foram incubadas com BSA-Alexa-488 ou controle isotópico. Amostras de 1×10^5 células foram também previamente incubadas com manana ($1 \mu\text{g/mL}$), anti-DC-SIGN ou anti-MR ($1 \mu\text{g/mL}$) por 30 min/ 37°C seguida de incubação com PI-Alexa por 30 min/ 4°C e posterior fixação. O núcleo das células foram marcados com DAPI (4',6-amino-2phenuyllindole, dihydrochloride – Molecular Probes) diluído 1/1000 em PBS, 30 min/TA. DAPI se une às sequências de adenina e timina no DNA. Após a marcação do núcleo as células foram centrifugadas e ressuspensas em 0,1% de paraformaldeído e em seguida submetidas à citocentrifugação (5 min/800 rpm) para fixação nas lâminas. Todas as amostras foram analisadas por microscopia confocal, segundo descrito por Van Liempt et al., (2007) e Sorvillo et al., (2012).

3.16 Obtenção e preparo de suspensões celulares a partir de órgãos linfóides de camundongos

Para o preparo das suspensões celulares, camundongos foram sacrificados e os linfonodos inguinais e periaórticos retirados e colocados em placas de Petri contendo Colagenase tipo IV (Sigma), na concentração de 2 mg/mL em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen). As placas foram mantidas por 1 h/ 37°C em estufa com 5% de CO_2 umidificada. Após incubação, as suspensões de células foram preparadas com o auxílio de homogeneizador estéril em meio de cultura RPMI 1640. Em seguida, as células foram colocadas em gelo por 5 minutos para a sedimentação dos grumos. Após este período, as suspensões foram transferidas para novos tubos para a contagem em câmara de Neubauer, utilizando solução de Azul de Tripan 0,2 %. Após a contagem, as células foram centrifugadas por 5 min/ $1200g/4^\circ\text{C}$ e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 2 mM de L-glutamina, $50 \mu\text{M}$ de 2-ME e 5% de soro fetal bovino (SFB) (RPMI-S).

3.17 Protocolo de purificação celular

Para a purificação das células CD11c^+ , camundongos Balb/c foram imunizados com OVA ($200 \mu\text{g/mL}$), após 5 dias de imunização os linfonodos inguinais e periaórticos foram retirados e as suspensões celulares obtidas em 3.16 foram

incubadas com anti-CD11c-biotinilados ($2 \mu\text{g}/10^6$ céls). Para a purificação das células TCD3⁺, camundongos Balb/c foram imunizados com OVA ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$), após 8 dias de imunização os linfonodos inguinais e periaórticos foram retirados e as suspensões celulares foram incubadas com anti-CD3-biotinilados ($2 \mu\text{g}/10^6$ céls) por 30 min/4 °C. Após este período, foram acrescentados 5,0 mL de PBS contendo 0,5% de BSA-EDTA 2mM pH 7,2 seguida de centrifugação por 5 min/1500g/4 °C. Foram ressuspensas em PBS+BSA-EDTA e acrescentado conjugado de estreptoavidina-microbeads-magnéticos ($20 \mu\text{L}/10^7$ céls), seguida de incubação por 30 min/4 °C e posterior centrifugação por 5 min/1500g/4 °C. As células foram ressuspensas em 800 μL de tampão e aplicadas na coluna MidiMACS (Miltenyi Biotec) acoplada ao campo magnético. Células não marcadas com os beads-magnéticos foram eluídas da coluna com a aplicação de 5,0 mL de tampão. Após isto, a coluna foi retirada do campo magnético, células CD11c⁺ ou TCD3⁺ foram eluídas com 5,0 mL do tampão à coluna e realizada a contagem em Câmara de Neubauer.

3.18 Resposta proliferativa de linfócitos T OVA-específicos

As células purificadas CD11c⁺ foram incubadas com OVA ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$) ou OVA+PI ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$). Outro grupo de células foram previamente incubadas com Manana ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$), anti-DC-SIGN ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) ou anti-MR ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) por 1 h/37 °C e posteriormente com OVA+PI ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$) por 18h, em estufa com 5% de CO₂ umidificada/37 °C. Após este período, foram centrifugadas por 5min/1000g/10 °C, ressuspensas em meio RPMI e irradiadas 2500 rads.

As células CD11c⁺ ($0,6 \times 10^5$) foram distribuídas em placas de 96 poços, incubadas com 3×10^5 células T-OVA purificadas/poço e as culturas mantidas por 48 ou 72 hs/37 °C em estufa de 5% de CO₂ umidificada. As diferentes incubações foram feitas em triplicata.

A resposta proliferativa dos linfócitos T foi avaliada utilizando-se o Kit *Cell proliferation ELISA Biotrak System version 2* (Amersham GE Healthcare). BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) foi adicionado na cultura na diluição 1/10 e incorporado no DNA de células em processo de mitose. Após 48 ou 72 hs de incubação, as células foram fixadas e bloqueadas por 30 min/TA, o sobrenadante foi descartado e adicionado anti-BrdU-peroxidase na diluição 1/100 durante 90 min/TA. Foram feitos

3 ciclos de lavagens com tampão específico e a reação foi revelada pela adição de 100 μL /poço do substrato contendo o cromógeno TMB. A reação resultante foi interrompida com 25 μL /poço da solução de ácido sulfúrico 1M e lida a 450 nm em espectrofotômetro.

3.19 Análise estatística

A análise estatística das amostras foi feita pelo teste one-way ANOVA seguida do método de Tukey (ZAR, 1984), para a análise de variância e comparações múltiplas entre os grupos experimentais, realizado no programa GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção dos componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum* por filtração em gel

Com o objetivo de obter os componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum*, amostras deste extrato bruto foram submetidas à cromatografia de filtração em gel, utilizando a metodologia descrita por FAQUIM; MACEDO, 1998.

A figura 5 mostra o perfil de eluição proteica dos componentes presentes no extrato após fracionamento, onde podemos observar a presença de três picos, sendo dois deles mais proeminentes. Conforme previamente descrito, o primeiro pico corresponde aos componentes de alta massa molecular (PI) do extrato e o terceiro pico contém os de baixa massa molecular (FAQUIM; MACEDO, 1998; SOARES; MOTA; MACEDO, 1992). Os componentes do PI, os quais são responsáveis pela capacidade de inibir a resposta imune heteróloga, foram coletados e concentrados para posterior utilização nos diferentes protocolos experimentais.

Figura 5- Perfil cromatográfico do extrato de *Ascaris suum* em coluna de filtração em gel.

O extrato de Asc (15 mg/mL) foi fracionado em coluna Sephacryl S-200. As frações foram coletadas e a concentração proteica analisada a 280 nm. Os picos I e III representam os componentes de alta e baixa massa molecular, respectivamente.

4.2 Análise da presença e obtenção de glicanos *N*- ou *O*-ligados em componentes do PI

Com o intuito de avaliar e isolar componentes do PI contendo estruturas glicosídicas *N*- e *O*-ligadas, amostras do antígeno foram incubadas com ConA-Sepharose ou Jacalina-Agarose e posteriormente foram separadas as frações ligadas e não-ligadas às lectinas, conforme descrito no Material e Métodos. Podemos observar na figura 6 que a maior parte do PI apresenta afinidade de ligação a ConA (63%). Também foi visto que uma pequena fração de PI se ligou na lectina Jacalina (6%). Amostra de BSA (antígeno não-glicosilado) foi usada como controle negativo nos ensaios e não se ligaram a nenhuma das lectinas. Esses componentes foram isolados, dialisados em PBS e utilizados nos experimentos seguintes.

Figura 6- Porcentagem de componentes do PI que se ligaram à ConA ou Jacalina.

Amostras de PI ou BSA (1,5 mg/mL) foram incubadas em ConA-Sepharose previamente equilibrada em tampão Tris 20 mM pH 7,4 contendo 0,5 M de cloreto de sódio (tampão Tris/NaCl) ou Jacalina-Agarose equilibrada em Tris 175 mM pH 7,5. Os componentes ligados às lectinas ConA ou Jacalina foram eluídos com solução Tris/NaCl contendo 500 mM de α -metil-D-manopiranosídeo ou Tris 175 mM contendo 800 mM de galactose, respectivamente. O perfil de eluição das amostras foi determinado pela leitura a 280 nm.

4.3 Análise da presença de glicanos *N*-ligados no PI por meio de HPAEC-PAD

Visto que parte dos componentes do PI apresenta afinidade à ConA sugerindo, portanto, a presença de oligossacarídeos *N*-ligados e manosilados, avaliamos a presença de estruturas glicosídicas *N*-ligadas no PI, como resíduos de glucose e manose, por meio de HPLC. Para tanto, amostras de PI total ou a fração ligada à ConA foram submetidas à deglicosilação enzimática com PNGaseF para a obtenção dos oligossacarídeos *N*-ligados seguida das análises em condições neutras ou acídicas em HPAEC-PAD.

A figura 7 representa o perfil de eluição da amostra de PI em condições neutras o que permite observar diferentes picos indicando a presença de cadeias de oligossacarídeos de alta manose, visto que o tempo de eluição destes esteve muito próximo aos padrões: Man₃NAcGlc₂, 2- Glc₃, 3- Man₉NAcGlc₂ utilizados na corrida.

Perfil cromatográfico semelhante foi observado na análise da fração do PI ligada à ConA (Figura 8). Esses resultados indicam, portanto que as estruturas glicanas obtidas da digestão enzimática das glicoproteínas na amostra de PI total são correspondentes à fração que apresenta afinidade à ConA.

Figura 7- Análise por HPAEC-PAD dos oligossacarídeos liberados do PI por digestão com PNGaseF em condições neutras.

Amostra de PI foi submetida à digestão enzimática com PNGaseF conforme descrito em material e métodos. Oligossacarídeos removidos do PI foram aplicados em coluna CarboPac PA-200 em solução de hidróxido de sódio 100 mM por 5 minutos a 1 mL/min, seguida de gradiente de eluição de solução de hidróxido de sódio 100 mM e acetato de sódio de 0-50 mM por 60 minutos. Utilizou-se como padrão de oligossacarídeos 1- Man₃NAcGlc₂, 2- Glc₃, 3- Man₉NAcGlc₂.

Figura 8- Análise por HPAEC-PAD dos oligossacarídeos liberados do PI-ConA após a digestão com PNGaseF em condições neutras.

Amostra de PI foi submetida à cromatografia de afinidade a coluna Con-A e a fração ligada à lectina submetida à digestão enzimática com PNGaseF. Oligossacarídeos removidos do PI foram aplicados em coluna CarboPac PA-200 em solução de hidróxido de sódio 100 mM por 5 minutos a 1 mL/min, seguida de eluição em gradiente composto de solução de hidróxido de sódio 100 mM contendo acetato de sódio de 0-50 mM por 60 minutos. Utilizou-se como padrão de oligossacarídeos: 1- Man₃NAcGlc₂, 2- Glc₃, 3- Man₉NAcGlc₂.

4.4 Análise da presença de ácido siálico no PI por meio de HPAEC-PAD

Sabendo que resíduos de ácido siálico localizam-se na porção terminal das cadeias glicanas em glicoproteínas, o próximo passo foi avaliar a presença de oligossacarídeos acídicos no PI. Para isso, as amostras foram tratadas com PNGaseF e analisadas em HPAEC-PAD em condições ácidas. Os resultados mostram um perfil com tempos de retenção coincidentes com oligossacarídeos mono-, di- e tri- sialilados obtidos de um padrão de fetuína tratado nas mesmas condições (Figura 9).

Na figura 10 pudemos verificar também, este mesmo perfil de oligossacarídeos sialilados na amostra de PI-ConA. Esses resultados mostram, portanto, a presença de componentes sialilados no PI. Vale ressaltar que os maiores picos com tempo de

retenção em 62 min. em PI e 60,1 min. em PI-ConA foram diminuídos quando as amostras foram tratadas com ácido hidrófluórico (HF), o qual é responsável pela remoção das ligações fosfodiéster sugerindo que estes picos são característicos de fosforilcolina (dados não mostrados).

Figura 9- Análise por HPAEC-PAD dos oligossacarídeos liberados do PI por digestão com PNGaseF em condições ácidas.

Amostra de PI foi submetida à digestão com a enzima PNGase F conforme descrito em material e métodos. Os oligossacarídeos removidos do PI foram aplicados em coluna CarboPac PA-200 em solução de hidróxido de sódio 50 mM contendo 100 mM de acetato de sódio por 5 minutos seguida de gradiente de eluição com solução de 100 mM de hidróxido de sódio e 50-170 mM de acetato de sódio durante 60 minutos com fluxo de 1 mL/min. A comparação do perfil obtido para a presença de glicanos sialilados foi feita com o perfil obtido de padrões de fetuína. 1- Monosialilados, 2- Disialilados, 3- Trisialilados e 4- Tetrasialilados.

Figura 10- Análise por HPAEC-PAD dos oligossacarídeos liberados do PI-ConA por digestão com PNGaseF em condições ácidas.

PI foi submetido à cromatografia de afinidade a coluna Con-A e a fração ligada à lectina submetida à digestão com a enzima PNGase F. Os oligossacarídeos removidos do PI foram aplicados ao sistema. Foi passada solução de hidróxido de sódio 50 mM contendo 100 mM de acetato de sódio por 5 minutos e em seguida de gradiente de eluição com solução de 100 mM de hidróxido de sódio e 50-170 mM de acetato de sódio durante 60 minutos com fluxo de 1 mL/min. A comparação do perfil obtido para a presença de glicanos sialilados foi feita com o perfil obtido de padrões de fetuína. 1- Monosialilados, 2- Disialilados, 3- Trisialilados e 4- Tetrasialilados.

4.5 Análise da presença de glicanos *N*-ligados no PI por meio de espectrometria de massa UV-MALDI-TOF

Considerando as análises de HPAEC-PAD mostrando a presença de antígenos contendo oligossacarídeos *N*-ligados no PI, tivemos o objetivo de analisar de forma detalhada essas estruturas glicosídicas utilizando a técnica de espectrometria de massa (UV-MALDI-TOF). Para tanto, os oligossacarídeos *N*-ligados foram removidos do PI com PNGaseF e as amostras foram preparadas de acordo com o protocolo descrito em material e métodos. Os oligossacarídeos obtidos foram submetidos à metodologia de remoção de sais, detergentes e outras impurezas.

A figura 11 mostra o espectro obtido da análise em modo *reflectron* de oligossacarídeos liberados do PI. Os valores de massa esperados e observados assim como a composição proposta dos oligossacarídeos para cada valor de *m/z* obtido dos espectros estão detalhados na tabela 1.

Os picos observados com valores de m/z 933.69, m/z 1095.68 e m/z 1241.73 correspondem a oligossacarídeos de tipo alta manose com estruturas NAcGlc₂Man₃, NAcGlc₂Man₄ e NAcGlc₂Man₄Fuc, respectivamente. Somado a isso, verificamos que os picos m/z 1079.70 e m/z 1320.9 correspondem a estruturas NAcGlc₂Man₃Fuc e NAcGlc₂Man₅Fuc. A estrutura deste último pico (1320.9) foi determinada pelo cálculo de $[M+Na - 2 \times 42]^+$ correspondente a uma perda *in source* característica de grupo acetila ($\Delta 42$) das unidades de N-Acetilglucosamina do *core* da cadeia.

Figura 11- Análise por espectrometria de massa UV-MALDI-TOF em modo *reflectron* dos oligossacarídeos *N*-ligados obtidos do PI.

Espectrometria de massa UV-MALDI-TOF em modo *reflectron* dos oligossacarídeos liberados do PI por PNGaseF. Utilizou-se *nor*-harmano (9H-pirido-3,4-b-indol, NH) como matriz.

Tabela 1. Valores de m/z e composição de oligossacarídeos *N*-ligados liberados do PI e passados por resina.

m/z calculado $[M+Na]^+$	m/z medido $[M+Na]^+$	Composição proposta
933.32	933.69	NAcGlc ₂ Man ₃
1079.38	1079.70	NAcGlc ₂ Man ₃ Fuc
1095.37	1095.68	NAcGlc ₂ Man ₄
1241.42	1241.73	NAcGlc ₂ Man ₄ Fuc
1319,48	1320,91	NAcGlc ₂ Man ₅ Fuc $[M+Na - 2 \times 42]^+$

A figura 12 mostra o espectro obtido da análise em modo linear positivo de oligossacarídeos liberados do PI tratado com PNGase F. Os valores de massa esperados e observados, assim como a composição proposta dos oligossacarídeos para cada valor de m/z obtido dos espectros, estão detalhados na tabela 2.

Os picos observados com valores de m/z 1229.46, m/z 1463.70 e m/z 2326.59 correspondem às estruturas onde encontramos PC (*phosphorylcoline*) na composição.

Os picos com valores de m/z 1751.71 e 2041.05 correspondem a cadeias de oligossacarídeos com a presença de ácido siálico com estruturas NAcGlc₂Man₄NAcGlcGalSial e NAcGlc₂Man₄NAcGlcGalSial₂, respectivamente. Estes resultados estão em concordância com os obtidos previamente por HPAEC-PAD mostrando a presença de oligossacarídeos sialilados. Além disso, pôde ser observado um íon m/z 2617.9 atribuído à uma estrutura contendo fosforilcolina e ácido siálico.

Figura 12- Análise por espectrometria de massa UV-MALDI-TOF em modo linear positivo dos oligossacarídeos *N*-ligados do PI.

Espectrometria de massa UV-MALDI-TOF em modo linear positivo dos oligossacarídeos liberados do PI por PNGase F. Utilizou-se nor-harmano (9H-pirido-3,4-b-indol, NH) como matriz.

Tabela 2. Valores de *m/z* e composição de oligossacarídeos liberados do PI por PNGaseF.

<i>m/z</i> calculado [M+Na] ⁺	<i>m/z</i> medido [M+Na] ⁺	Composição proposta
1011,62	1010.62	NAcGlc ₃ Man ₂ PC [M+Na - 42] ⁺
1053,62	1053,29	NAcGlc ₃ Man ₂ PC
1095,37	1095,85	NAcGlc ₃ Man ₄ [M+Na] ⁺
1140.39	1140.60	NAcGlc ₃ Man ₂ PC
1173.80	1173.60	NAcGlc ₃ Man ₅ [M+Na - 2 x 42] ⁺
1228.43	1229.46	NAcGlcMan ₃ Fuc PC
1464.51	1463.70	NAcGlc ₂ Man ₄ NAcGlc PC
1750.4	1750.71	NAcGlc ₂ Man ₄ NAcGlcGal S
2041.4	2041.05	NAcGlc ₂ Man ₄ NAcGlcGal S ₂
2326.85	2326.59	NAcGlc ₂ Man ₃ Fuc ₂ (NAcGlcGal) ₂ NAcGlcPC
2617.94	2618.90	NAcGlc ₂ Man ₃ Fuc ₂ (NAcGlcGal) ₂ NAcGlcPC S
S=ácido siálico / PC=fosforilcolina		

Os resultados obtidos com as análises por cromatografia de troca aniônica (HPAEC-PAD) e espectrometria de massa (UV-MALDI-TOF) nos permitem confirmar a presença e identificar as estruturas glicanas *N*-ligadas em uma fração de glicoproteínas presentes no PI.

4.6 Análise da expressão de DC-SIGN e MR em DCs diferenciadas e estimuladas *in vitro*

Sabendo da relevância dos CLRs no reconhecimento dos antígenos glicosilados, o próximo passo foi determinar a expressão destes receptores em DCs imaturas assim como ativadas *in vitro*. Para isto, DCs foram geradas *in vitro* e estimuladas ou não com LPS ou LPS+PI por 18 hs. Após a incubação, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes anti-DC-SIGN ou anti-MR e analisadas em citômetro de fluxo.

A figura 13A representa a estratégia de *gate* feita em todas as análises de citometria de fluxo mostrando a pureza das DCs obtidas, considerando a expressão da molécula CD11c. A figura 13B mostra alta expressão de DC-SIGN e MR nas diferentes culturas de DCs. Além disso, não observamos diferença significativa na

expressão destes receptores entre as culturas de DCs imaturas ou estimuladas com LPS ou LPS+PI.

Figura 13- Expressão de DC-SIGN e MR em DCs diferenciadas *in vitro*.

Células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos BALB/c e analisadas em citômetro de fluxo. **(A)** Análise de tamanho e granulosidade (*dot plot*) e histograma das células marcadas com anti-CD11c-PE (linha azul) ou controle isotópico (linha preta). **(B)** DCs estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) ou LPS+PI (1 e 200 $\mu\text{g/mL}$) por 18 hs. Após este período, as células foram incubadas com anticorpos anti-DC-SIGN ou anti-MR conjugados a PE. Os resultados foram expressos em média de intensidade de fluorescência das amostras em duplicata analisadas em citômetro de fluxo $\pm$ desvio padrão (DP). Os resultados são representativos de 4 experimentos.

4.7 Estudo da capacidade de antígenos do PI ligados à ConA de modularem a maturação de DCs

Visto que parte dos componentes do PI se ligam à ConA e apresentam cadeias *N*-ligadas, decidimos avaliar a capacidade desses antígenos de modular a ativação das DCs. Para isso, antígenos ligados ou não-ligados à ConA foram obtidos e incubados com as DCs na presença de LPS por 18 horas. Após esse período, as células foram marcadas com anticorpos anti-MHC-II, anti-CD40, anti-CD80 ou anti-CD86 e analisadas em citômetro de fluxo.

A figura 14 mostra aumento da expressão das moléculas coestimuladoras nas células estimuladas com LPS comparadas às DCs mantidas em meio de cultura. Verificamos também, menor expressão dessas moléculas nas DCs incubadas com LPS+PI. Quando as DCs foram incubadas com antígenos do PI não-ligados a ConA observamos expressão semelhante de CD40 e menor das moléculas MHC-II, CD80 e CD86 em relação à observada somente com LPS. No entanto, em relação ao obtido nas DCs incubadas com LPS+PI, verificamos que a expressão dessas moléculas foi maior.

Em contraste, DCs incubadas com antígenos ligados a ConA apresentaram a expressão destas moléculas diminuídas em relação ao grupo LPS e muito semelhante ao grupo LPS+PI, o que sugere que o efeito modulador observado com PI seja predominantemente exercido pelos componentes que apresentam afinidade à ConA.

Figura 14- Expressão das moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs estimuladas com LPS e as frações do PI ligadas ou não à ConA.

Células dendríticas foram diferenciadas *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos BALB/c e estimuladas com LPS (1 µg/mL), LPS+PI (1 e 200 µg/mL), LPS+PI não-ligado a ConA ou LPS+PI-ConA (1 e 200 µg/mL) por 18 hs. Após este período, as células foram incubadas com anticorpos anti-MHC-II, anti-CD40, anti-CD80 ou anti-CD86-PE. Os resultados foram expressos em média de intensidade de fluorescência das amostras em duplicata ± DP. Os resultados são representativos de 3 experimentos.

* $p < 0,05$ grupos comparados ao grupo LPS

• $p < 0,05$ grupos LPS+PI não-ligado ou LPS+PI ligado a ConA comparado ao grupo LPS+PI.

Δ $p < 0,05$ grupo LPS+PI ligado a ConA comparado ao LPS+PI não-ligado.

4.8 Estudo da capacidade de antígenos do PI não-ligados à Jacalina de modularem a maturação de DCs

Considerando o efeito das frações do PI ligadas e não-ligadas à ConA sobre as DCs e a possível participação de antígenos contendo O-ligados no efeito do PI sobre as DCs, submetemos o PI à afinidade de ligação à jacalina (O-glicanos) e avaliamos a capacidade da fração não-ligada à Jacalina de modular a maturação dessas células. Para tanto, as DCs foram incubadas *in vitro* com o LPS, LPS+PI-ConA ou

LPS+PI não-ligado à Jacalina por 18 hs. Após esse período, as células foram marcadas com anticorpos anti-MHC-II, anti-CD40, anti-CD80 ou anti-CD86 e analisadas em citômetro de fluxo.

Como podemos observar na figura 15, o PI-ConA (componentes com estruturas *N*-ligadas) foi capaz de inibir a expressão das moléculas coestimuladoras e MHC-II nas DCs incubadas com LPS comparada à observada nas células incubadas somente com o LPS. Efeito inibitório sobre a maturação das DCs incubadas com LPS também foi observado quando estas células foram incubadas com a porção do PI não-ligada na Jacalina (antígeno *N*-ligado). Assim sendo, estes resultados confirmam os obtidos com PI-ConA mostrando que antígenos *N*-ligados são capazes de modular a ativação das DCs. Vale ressaltar que não houve incubação de DCs com a porção do PI ligado à Jacalina, pois não obtivemos concentração suficiente da fração de componentes Jac-ligados.

Figura 15- Expressão das moléculas coestimuladoras e MHC-II em DCs estimuladas com LPS e as frações do PI ligada à ConA ou não-ligada à Jacalina.

Células dendríticas foram diferenciadas *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos BALB/c e estimuladas com LPS (1 µg/mL), LPS+PI-ConA (1 e 200 µg/mL) ou LPS+PI não ligado na Jacalina (1 e 200 µg/mL) por 18 hs. Após este período, as células foram incubadas com anticorpos anti-MHC-II, anti-CD40, anti-CD80 ou anti-CD86-PE. Os resultados foram expressos em média de intensidade de fluorescência das amostras em duplicata $\pm$ DP. Os resultados são representativos de 3 experimentos. * $p < 0,05$ grupos comparados ao grupo LPS

4.9 Análise por citometria de fluxo e microscopia confocal da ligação e internalização do PI-Alexa em DCs

Com o intuito de visualizar a ligação e internalização do PI nas DCs, realizamos experimentos de incubação das células com PI acoplado com Alexa-488 (PI-Alexa).

Para isso, as DCs diferenciadas *in vitro* foram incubadas com diferentes concentrações de PI-Alexa durante 30 minutos a 4 °C ou 37 °C e em seguida as células foram analisadas em citômetro de fluxo ou microscopia confocal. Os resultados de citometria de fluxo permitiram verificar relação direta entre concentração do PI-Alexa utilizada na incubação com as DCs à 37° C com a fluorescência obtida nas amostras analisadas (dados não-mostrados). Em vista desses resultados a porcentagem de internalização do PI foi calculada a partir dos resultados de média de intensidade de fluorescência das DCs incubadas com PI-Alexa (3 µg/mL) a 4° ou 37 °C por 45 minutos (SORVILLO et al., 2012) tendo como 100% a maior média de fluorescência obtida.

Na figura 16A podemos verificar que a incubação das DCs com PI-Alexa a 37 °C resultou em maior intensidade de fluorescência em relação à incubação com 4 °C. Considerando os resultados obtidos por citometria de fluxo, as DCs foram incubadas com o PI-Alexa durante 30 minutos a 4° ou 37 °C seguida de análise em microscópio confocal.

A figura 16B mostra DCs incubadas com controle isotópico, BSA-Alexa (controle negativo) ou com PI-Alexa. O núcleo das células foi marcado com DAPI. Verificamos que não houve ligação de BSA-Alexa na superfície das DCs. Por outro lado, observamos a presença do PI-Alexa na superfície das células quando foram incubadas a 4 °C. Além disso, pudemos observar a presença de PI no interior das DCs mostrando assim, que a incubação à 37 °C resulta na internalização do antígeno.

Figura 16- Ligação e internalização de PI-Alexa-488 à DCs diferenciadas *in vitro*.

Células dendríticas foram diferenciadas *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos BALB/c. As incubações das DCs com o PI-Alexa-488 foram realizadas em duas temperaturas diferentes de 4

°C e 37 °C. (A) O gráfico representa a porcentagem de internalização de PI-Alexa considerando como 100% de internalização a média de intensidade de fluorescência obtida das DCs incubadas com os antígenos a 37 °C analisadas em citômetro de fluxo. (B) DCs incubadas com controle isotópico, BSA-Alexa (3 µg/mL) ou PI-Alexa (3 µg/mL) por 30 minutos a 4° ou 37 °C. O núcleo das células foi marcado com DAPI a 37 °C/TA por 30 min e analisadas em microscópio confocal. Resultado representativo de 4 experimentos.

4.10 Análise da participação de DC-SIGN e MR na ligação e internalização de PI-Alexa à DCs por citometria de fluxo

Para estudar a participação do DC-SIGN e MR no reconhecimento do PI, realizamos novamente experimentos de incubação de DCs com PI-Alexa.

As DCs foram incubadas com PI-Alexa ou os controles durante 30 minutos a 4 °C ou 37 °C e em seguida as células foram analisadas em citômetro de fluxo.

Para determinar o envolvimento dos CLRs neste processo de reconhecimento, as DCs foram pré-incubadas com manana ou anticorpos anti-DC-SIGN e anti-MR durante 30 min/37 °C e em seguida, as células foram incubadas com PI-Alexa por mais 30 min/4° ou 37 °C. DCs foram também incubadas com EGTA ou sucrose para avaliar a inibição da ligação e internalização do PI-Alexa, respectivamente.

A figura 17 representa os resultados obtidos de incubação de DCs a 4 °C ou 37 °C, onde observamos alta ligação de PI-Alexa à estas células quando comparada ao controle de DCs incubadas com BSA-Alexa (antígeno não-glicosilado). Por outro lado, houve diminuição desta ligação em DCs previamente incubadas com manana, anti-DC-SIGN, anti-MR ou os anticorpos em conjunto (anti-DC-SIGN+MR). A inibição da internalização pôde ser observada no experimento realizado a 37 °C.

Além disso, pudemos observar que a ligação e internalização do PI foi diminuída com a pré-incubação das DCs com EGTA ou sucrose, respectivamente.

Figura 17- Ligação e internalização de PI-Alexa às DCs pré-incubadas com manana ou anti-DC-SIGN e anti-MR analisadas em citômetro de fluxo

Células dendríticas foram diferenciadas *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos BALB/c. As incubações das DCs com o PI-Alexa-488 foram realizadas em duas temperaturas diferentes de 4 °C e 37 °C. DCs foram incubadas ou não com manana (1 µg/mL) ou anticorpos anti-DC-SIGN, anti-MR ou anti-DC-SIGN+MR (1 µg/mL), 10mM de EGTA ou 0,75 M de sucrose por 30 minutos seguida de incubação com PI-Alexa-488 (3 µg/mL). DCs foram também incubadas com BSA-Alexa-488 (3 µg/mL) ou controle isotípico. As amostras de células foram feitas em duplicata e analisadas por citometria de fluxo.

° p < 0,05 grupo PI-Alexa-488 comparado ao grupo BSA-Alexa-488

* p < 0,05 grupos comparados ao PI-Alexa-488

4.11 Análise da participação de DC-SIGN e MR na ligação de PI-Alexa à DCs por microscopia confocal

Nosso próximo objetivo foi analisar e comparar o envolvimento dos CLRs nesse processo de reconhecimento do PI por microscopia confocal.

Para isso, as DCs foram pré-incubadas com manana ou anticorpos anti-DC-SIGN ou anti-MR durante 30 min/37 °C e em seguida, as células foram incubadas com PI-Alexa por mais 30 min/4 °C e analisadas por microscopia confocal.

A figura 18 representa os resultados obtidos de incubação de DCs à 4 °C, onde observamos alta ligação de PI-Alexa à superfície destas células quando comparada

ao controle. Por outro lado, houve diminuição desta ligação em DCs previamente incubadas com manana, anti-DC-SIGN, anti-MR ou os anticorpos em conjunto mostrando que os bloqueadores destes receptores inibem parcialmente a ligação do PI. Novamente, esses resultados estão de acordo com os de citometria de fluxo mostrando a inibição da ligação do PI-Alexa em DCs previamente incubadas com manana ou anticorpos anti-DC-SIGN ou anti-MR.

Figura 18- Ligação de PI-Alexa às DCs pré-incubadas com manana ou anti-DC-SIGN ou anti-MR analisadas em microscópio confocal

Células dendríticas foram diferenciadas *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos BALB/c. DCs foram incubadas com controle isotópico ou PI-Alexa (3 μg/mL) por 30 minutos a 4 °C. Estas células também foram pré-incubadas com manana (1 μg/mL), anti-DC-SIGN ou anti-MR (1 μg/mL) durante 30 minutos a 37 °C e posteriormente PI-Alexa por 30 minutos a 4 °C e analisadas em microscópio confocal. Resultado representativo de 4 experimentos.

4.12 Estudo do papel de DC-SIGN e MR na modulação exercida pelo PI sobre as DCs

Com o intuito de avaliar o envolvimento dos CLRs no reconhecimento do PI e sua capacidade de suprimir a maturação das DCs, os receptores DC-SIGN e MR foram bloqueados utilizando novamente a manana ou os diferentes anticorpos específicos. Assim, DCs foram diferenciadas *in vitro* e estimuladas com LPS e LPS+PI ou previamente incubadas com manana ou anti-DC-SIGN e anti-MR e posteriormente LPS+PI por 18 hs. Após esse período de incubação, as células foram marcadas com anticorpos anti-MHC-II, anti-CD40, anti-CD80 ou anti-CD86 e analisadas em citômetro de fluxo.

A figura 19 mostra aumento da expressão das moléculas coestimuladoras nas DCs estimuladas com LPS comparadas às células mantidas em meio de cultura. Verificamos também, menor expressão dessas moléculas nas DCs incubadas com LPS+PI comparado com LPS. Em contraste, quando as DCs foram pré-incubadas com manana e estimuladas com LPS+PI, a expressão das moléculas MHC-II, CD40, CD80 e CD86 foi semelhante à observada nas células estimuladas somente com LPS mostrando, portanto, que o bloqueio de DC-SIGN e MR pela manana interfere com a capacidade do PI de suprimir a maturação das DCs.

Vale ressaltar que a manana não induziu ativação das DCs, uma vez que, a intensidade de fluorescência observada nessa cultura celular foi semelhante à obtida em DCs mantidas somente em meio de cultura (dados não mostrados).

Observamos ainda neste experimento, que a incubação das DCs com os anticorpos específicos para os diferentes CLRs preveniu parcialmente o efeito do PI sobre as DCs incubadas com LPS.

Figura 19- Expressão de MHC-II, CD40, CD80 ou CD86 em DCs estimuladas com LPS, LPS+PI ou pré-incubadas com manana ou anticorpos bloqueadores de DC-SIGN e MR.

DCs diferenciadas *in vitro* foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) ou LPS+PI (1 e 200 µg/mL) por 18 hs. Estas DCs também foram pré-incubadas com manana (50 µg/mL), anti-DC-SIGN e MR ou os dois anticorpos em conjunto (10 µg/mL) por 1 h e posteriormente LPS+PI (1 e 200 µg/mL) por 18 hs. Após este período, as células foram incubadas com MHC-II, CD40, CD80 ou CD86-PE. Os resultados foram expressos em média de intensidade de fluorescência das amostras em duplicata analisadas em citômetro de fluxo ± desvio padrão.

• $p < 0,05$ grupo LPS+PI comparado ao grupo LPS

* $p < 0,05$ grupos manana e anti-CLRs comparado ao grupo LPS+PI.

4.13 Resposta proliferativa de linfócitos T OVA-específicos induzida por células CD11c⁺ incubadas com OVA, PI, manana ou anti-DC-SIGN e MR

Sabendo que as DCs são cruciais para a ativação dos linfócitos T antígeno-específicos, avaliamos a participação destes CLRs no reconhecimento do PI e consequente capacidade de inibir a resposta proliferativa dos linfócitos T OVA-

específicos. Para isso, realizamos um ensaio *in vitro* com linfócitos T OVA-específicos estimulados por DCs previamente incubadas em diferentes condições.

Células CD11c⁺ (DCs) foram purificadas dos linfonodos inguinais e periaórticos de camundongos BALB/c não-imunizados ou imunizados com OVA. Estas células foram incubadas *in vitro* com OVA, OVA+PI, manana+OVA+PI, anti-DC-SIGN ou anti-MR+OVA+PI por 18 hs. Após este período, estas células foram irradiadas e cultivadas *in vitro* com linfócitos TCD3⁺ purificados de camundongos imunizados com OVA (8º dia). A proliferação dos linfócitos T OVA-específicos foi avaliada após 72 hs de cultura (FAVORETTO et al., 2014).

Como pode ser observado na figura 20, DCs obtidas de camundongos não-imunizados mesmo quando incubadas *in vitro* com OVA não foram capazes de promover proliferação de linfócitos T OVA-específicos, enquanto que DCs obtidas de camundongos imunizados com OVA e incubadas com OVA *in vitro* induziram alta proliferação das células T. Em contraste, menor proliferação de linfócitos T foi observada nas culturas com DCs vindas de camundongos imunizados com OVA e previamente pulsadas com OVA+PI.

No entanto, a pré-incubação das DCs com manana ou os anticorpos anti-DC-SIGN ou anti-MR seguida de incubação com OVA+PI promoveu resposta proliferativa dos linfócitos T semelhante à observada na cultura com DCs pulsadas somente com OVA.

Figura 20- Resposta proliferativa de linfócitos T OVA-específicos incubados ou não com PI.

Células CD11c⁺ de camundongos imunizados ou não com OVA foram estimuladas *in vitro* com OVA (200 µg/mL), OVA+PI (200 µg/mL), OVA+PI+Manana (200 e 50 µg/mL), OVA+PI+anti-DC-SIGN (200 µg/mL e 10 µg/mL) e OVA+PI+anti-MR (200 µg/mL e 10 µg/mL), por 18 hs. Após este período, estas células foram irradiadas (2500 rads) e cultivadas *in vitro* com linfócitos TCD3⁺ purificados de camundongos imunizados com OVA (8º dia). Após 72 hs de cultura foi avaliada a proliferação dos linfócitos T OVA-específicos por incorporação de BrdU. Os resultados foram expressos em densidade óptica (450nm) das amostras em triplicata ± desvio padrão.

* p < 0,05 OVA+PI comparado ao grupo OVA

• p < 0,05 OVA+PI+Man ou anti-DC-SIGN ou MR comparados ao grupo OVA+PI

5 DISCUSSÃO

Os helmintos e alguns de seus produtos exercem importante efeito modulador no sistema imune (FAQUIM-MAURO; MACEDO, 1998; revisado por FINKELMAN et al., 1991; HAIG; LIMA; MOTA, 1980; SILVA et al., 2006). Neste contexto, nós temos estudado o mecanismo imunomodulador de antígenos de alta massa molecular do extrato de Asc (FAVORETTO et al., 2014).

Como elemento fundamental de ligação entre a imunidade inata e adaptativa, as DCs têm a capacidade de reconhecer tanto antígenos próprios como não-próprios por meio de receptores expressos na sua membrana celular, tais como TLRs e CLRs (MOLL, 2003).

Com relação a estes receptores, demonstramos que PI modula negativamente a expressão de TLR1, 2, 4 e 9 nas DCs, durante a indução da resposta adaptativa. Além disso, o PI inibe a resposta celular e humoral anti-OVA, e expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II envolvidas na apresentação antigênica nas APCs de camundongos TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} imunizados com OVA ou OVA+PI. Em ensaios realizados *in vitro*, verificamos que o PI inibe a maturação de DCs incubadas com LPS, Poly I:C ou Pam3CSK4 e este efeito foi também independente de TLR2, TLR4 ou MyD88 (FAVORETTO et al., 2014).

Considerando estas observações e relatos descrevendo o papel de diversos receptores na superfície nas DCs para a interação patógeno-hospedeiro, neste trabalho buscamos entender os mecanismos de ação destes antígenos de Asc nas DCs e o envolvimento do DC-SIGN e MR (CLRs) nesse processo.

A literatura ressalta que os CLRs participam do reconhecimento tanto de antígenos próprios como de patógenos contendo oligossacarídeos na sua composição. Além disso, apresenta papel relevante na maturação das APCs e, portanto na geração da resposta imune específica (revisado por GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2009; GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2003; McGREAL et al., 2005; ZHOU et al., 2006).

Trabalhos relatam que antígenos contendo glicanos na superfície de helmintos ou em seus produtos secretados estão envolvidos na modulação do sistema imune e assim a sobrevivência desses parasitas no hospedeiro (CUMMINGS et al., 2006; KHOO et al., 2001; KLAVER et al., 2013).

Os CLRs possuem um sítio de interação com glicanos denominado domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) que apresenta especificidade para diferentes estruturas contendo Man, Fuc, GlcNAc, GalNAc. Além disso, a interação/sinalização mediada por esses receptores é Ca^{2+} -dependente (ENGERING et al., 2002; GEIJTENBEEK et al., 2004).

Em vista dessas observações, inicialmente analisamos a presença de estruturas glicanas nos componentes do PI. Por meio da afinidade à ConA pudemos observar e isolar componentes do PI contendo estruturas glicosídicas *N*-ligadas. Além disso, pequena fração do PI apresentou afinidade à Jacalina que representa componentes com estruturas *O*-ligadas. Portanto, evidenciamos maior conteúdo de componentes com oligossacarídeos *N*-ligados no PI em relação aos *O*-ligados. Em vista dessas observações, focamos os estudos no papel destes componentes contendo estruturas *N*-ligadas do PI sobre as DCs.

Neste sentido, utilizamos técnicas mais sensíveis como HPAEC-PAD e espectrometria de massas para análise e identificação de oligossacarídeos *N*-ligados em componentes do PI. Os resultados de HPAEC-PAD mostraram a presença de cadeias de oligossacarídeos de alta manose tanto em PI total como na fração ligada à ConA sugerindo, portanto, que grande parte dos glicoconjugados com cadeias *N*-ligadas que foram detectadas na amostra de PI correspondem à fração que se liga à ConA.

Além disso, pudemos observar no perfil de eluição dos glicanos obtidos do PI ou PI-ConA em HPAEC-PAD que os tempos de retenção foram coincidentes com oligossacarídeos mono-, di- e tri- sialilados, os quais foram confirmados no padrão de fetuína, o que demonstra a presença de ácido siálico nestas cadeias glicosídicas.

Resíduos de ácido siálico têm fundamentalmente uma localização terminal na cadeia de açúcares das glicoproteínas. Esses resíduos podem desempenhar diferentes funções como nas interações célula-célula, promovendo a ligação com proteínas como receptores na superfície celular (VARKI, 1997). Diversos estudos mostram que glicoproteínas que podem apresentar resíduos de ácido siálico desempenham papel fundamental no mecanismo de invasão da célula hospedeira pelo *T. cruzi* e ainda participam dos mecanismos de evasão do sistema imune (ALVES et al., 1986; revisado por DUSCHAK; COUTO, 2009; PIRAS et al., 1987).

Outros estudos de análise glicômica compararam oligossacarídeos *N*- e *O*-ligados derivados de glicoproteínas presentes em diferentes estágios de vida de *S.*

mansoni (cercária e ovos). Nestes trabalhos foram observadas várias estruturas glicanas como LDN (GalNAc β 1-4GlcNAc) e LDNF (GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4[Fuc α 1 $\rightarrow$ 3]GlcNAc) em alguns estágios do ciclo do parasita, além da presença de antígenos Le^x em todos os estágios de vida do parasita (JANG-LEE, 2007; NYAME, 1998).

Em contraste com esses trabalhos, nas nossas análises não observamos a presença de estruturas LDN ou LDNF, entretanto identificamos estruturas semelhantes às de antígenos Le^y e Le^b. Além disso, verificamos a predominância de estruturas NAcGlc₂Man₃, NAcGlc₂Man₄ na sua composição, que correspondem a oligossacarídeos do tipo alta manose, e do tipo complexas como NAcGlc₂Man₃Fuc, NAcGlc₂Man₅Fuc.

Pudemos observar também estruturas semelhantes às obtidas por Pörtl et al. (2007). Neste trabalho os autores demonstraram por *LC/electrospray ionization* (ESI)-Q-TOF-MS/MS a presença de *N*-glicanos híbridos, bi- e triantênários sendo alguns com modificações no *core* com resíduos α 1,6-fucose e fosforilcolina (PC) em extrato preparado de vermes adultos de *Ascaris suum*.

Como evidenciado para *Ascaris suum*, outros nemátodos apresentam abundantes níveis de fosforilcolina (PC) na sua composição. Trabalhos têm demonstrado a presença de PC em estruturas glicanas *N*-ligadas em antígenos de *Acanthocheilonema viteae*, *Trichinella spiralis* e *Caenorhabditis elegans*. A presença de estruturas *N*-ligadas do tipo LDN (GalNAc β 1-4GlcNAc) contendo fosforilcolina (PC) em antígenos de *Trichinella spiralis* foi também evidenciada por Morelle em 2000 após análises por espectrometria de massas. Além disso, foi mostrado que produtos excretórios/secretórios de filaria (ES-62) que apresentam motivos de PC possuem propriedades imunomoduladoras (revisado por HARNETT, 2010).

Vale ressaltar que nas nossas análises pudemos identificar a presença de resíduos de ácido siálico em algumas estruturas como: NAcGlc₂Man₄NAcGlcGalSial e NAcGlc₂Man₄NAcGlcGalSial₂. Este resultado é intrigante, uma vez que algumas observações sugerem que a maioria dos helmintos não apresentam atividades de sialiltransferases (PRASANPHANICH et al., 2013).

Pudemos concluir que componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum* (PI) apresentam oligossacarídeos *N*-ligados na sua composição com açúcares do tipo alta manose e do tipo complexa com resíduos de fucose, ácido siálico e fosforilcolina (PC).

Portanto, visto que o PI possui antígenos contendo estruturas glicanas e capazes de interagir com os CLRs, investigamos a participação desses receptores na modulação da atividade das DCs. Dados da literatura mostram que os CLRs encontram-se altamente expressos em células imaturas e sua expressão diminui quando as células são ativadas e sofrem processo de maturação. Além disso, a localização das DCs no tecido e o estado de diferenciação celular podem ainda interferir na expressão dos CLRs (Revisado por GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, Y, 2003). No entanto, observamos alta expressão de DC-SIGN e MR tanto nas DCs imaturas como nas estimuladas com LPS ou LPS+PI.

Nos modelos de diferenciação de DCs *in vitro*, as células derivadas da medula óssea de camundongos quando incubadas *in vitro* com GM-CSF e IL-4 tendem a se diferenciar em DCs que expressam receptores como DC-SIGN em sua superfície. Por outro lado, células incubadas com GM-CSF quando na presença de IFN- α diferenciam-se em DCs com fenótipo mais inflamatório com baixa expressão de DC-SIGN (GAGLIARDI, 2005). Levando em consideração essas observações, podemos sugerir que além do componente antigênico, a presença de fatores como as citocinas no ambiente de diferenciação e ativação das DCs podem atuar como moduladores da expressão desses CLRs. Sendo assim, nos nossos resultados obtidos *in vitro*, podemos sugerir que o protocolo de diferenciação das DCs com GM-CSF/ IL-4 seguida de incubação com LPS ou LPS+PI não foi capaz de modular a expressão dos CLRs.

Em vista dessas observações avaliamos a capacidade dos antígenos ligados ou não-ligados às lectinas de modular a maturação de DCs incubadas com LPS. O conjunto de resultados permitiu verificar, que o maior efeito modulador do PI sobre as DCs estimuladas com LPS esteve presente na fração ligada à ConA em relação à não-ligada a esta lectina. Corroborando esses resultados, verificamos que a fração não-ligada à Jacalina exerceu efeito modulador sobre as DCs incubadas com LPS. Portanto, esses resultados mostraram que os componentes do PI contendo *N*-glicanos exercem o efeito supressor sobre as DCs. Nesse sentido, esses antígenos contendo resíduos de manose poderiam interagir com DC-SIGN e MR expressos nestas células e assim modular a ativação celular pelo LPS via TLR4.

Dados da literatura mostram que incubações das DCs com os antígenos à 4° ou 37 °C por 45 minutos resultam na ligação e internalização destes, respectivamente (SORVILLO et al., 2012). Em vista disso, realizamos experimentos nessas duas

condições de incubação das DCs com o PI marcado com Alexa (PI-Alexa). Assim como descrito na literatura, verificamos por microscopia confocal alta fluorescência na superfície das DCs incubadas com PI-Alexa à 4 °C e a presença de PI-Alexa no citoplasma das DCs quando incubadas a 37 °C com o antígeno.

A partir desses resultados estudamos a participação dos CLRs na ligação e internalização desses componentes nas DCs. As análises de citometria de fluxo mostraram alta fluorescência nas DCs quando incubadas à 4° ou 37 °C com PI-Alexa em relação ao obtido com as DCs incubadas com BSA-Alexa (antígeno não-glicosilado). Sabendo que a ligação dos CLRs aos carboidratos é Ca^{+} dependente (revisado por SVAJGER et al., 2010) avaliamos a fluorescência das DCs incubadas com EGTA e PI-Alexa. Os resultados mostraram diminuição da ligação de PI-Alexa nestas células indicando a dependência de Ca^{+} para ligação/internalização do PI pelas DCs, o que sugere novamente a participação desses receptores no reconhecimento do PI. Além disso, houve diminuição desta fluorescência em DCs previamente incubadas com manana ou anticorpos anti-CLRs. O bloqueio da ligação e internalização de PI-Alexa pelas DCs previamente incubadas com manana ou anticorpos anti-DC-SIGN ou MR foi também verificado nas análises das células em microscopia confocal. Esses resultados em conjunto confirmam o papel do DC-SIGN e MR na ligação e internalização de componentes do PI.

A captura de antígenos pelas DCs pode ocorrer via endocitose ou macropinocitose. Os CLRs são receptores endocíticos e sua expressão é crucial para o reconhecimento e internalização de antígenos glicosilados (VAN KOOYK et al., 2003), sendo assim, a internalização do PI foi diminuída com a pré-incubação das DCs com sucrose, o que indica que PI é internalizado por endocitose via CLRs em DCs. Esses resultados confirmaram, mais uma vez, que DC-SIGN e MR estão envolvidos no processo de ligação e internalização dos antígenos glicosilados presentes no PI.

Segundo van Liempt (2006 e 2007), antígenos solúveis dos ovos (SEA) de *S. mansoni* contendo estruturas distintas de carboidratos interagem com DC-SIGN, MR ou MGL nas DCs e inibem a maturação dessas células induzida por ligantes de TLRs.

Assim sendo, utilizamos também anticorpo para bloquear os receptores MGL1/2 que são envolvidos com a interação de antígenos do tipo O-glicanos (VAN DIE et al., 2010). Nossos dados mostraram que o bloqueio de MGL não interferiu com a

capacidade do PI de se ligar nas DCs e consequente internalização (dados não-mostrados).

O reconhecimento feito somente por CLR_s pode induzir o estado de tolerância suprimindo a resposta imune, além disso, está relatado que a sinalização mediada pelos CLR_s pode modular uma resposta desencadeada por TLR na DC. Portanto, o estado de ativação DCs e consequente desencadeamento da resposta imune ou indução de tolerância é resultante do balanço entre os sinais gerados pelo reconhecimento de antígenos por TLR_s e CLR_s (VAN KOOYK; GEIJTENBEEK et al., 2003).

Neste contexto, trabalhos mostraram a participação do DC-SIGN expresso nas DCs no reconhecimento de antígenos manosilados como do vírus HIV, citomegalovírus e *Mycobacterium tuberculosis* e consequente modulação da atividade funcional dessas células como a capacidade de apresentação antigênica para os linfócitos TCD4⁺ (ENGERING et al., 2002; GEIJTENBEEK et al., 2000; GEIJTENBEEK et al., 2003; HALARY et al., 2002; VAN DIE; CUMMINGS, 2006).

Com o intuito de avaliar o envolvimento dos CLR_s (DC-SIGN e MR) no reconhecimento do PI e sua capacidade de modular a maturação das DCs via TLR4, realizamos experimentos de bloqueio dos CLR_s com a manana ou os diferentes anticorpos específicos contra DC-SIGN e MR. Os resultados obtidos mostraram a participação desses receptores no efeito imunomodulador do PI sobre a expressão das moléculas envolvidas na apresentação antigênica pelas DCs quando incubadas com LPS, uma vez que, o bloqueio desses receptores aboliu grande parte do efeito do PI sobre as DCs incubadas com LPS.

Como mencionado anteriormente, os CLR_s podem desencadear nas DCs duas vias principais de sinalização, segundo Gringhuis et al. (2007), o reconhecimento do antígeno e sinalização pelo DC-SIGN ativa a via de sinalização dependente da quinase Raf-1 que pode influenciar a ativação das DCs induzida por LPS e assim regulam a transcrição de outros genes das células, modulando negativamente a sua atividade funcional.

Antígenos do tegumento da *Fasciola hepática* (FhTeg) modulam a maturação de DCs induzidas por LPS, suprimindo a fosforilação das moléculas ERK, JNK e p38 da via das MAPK, as quais participam da ativação das DCs (VUKMAN et al., 2013). Foi visto também, que produtos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* (TcES)

induzem a fosforilação de cRaf interferindo com a ativação de NF-kBp65 e p38 e, assim, a modulação de DCs induzidas por LPS (TERRAZAS et al., 2013).

Sabendo, portanto, que as DCs após reconhecerem os antígenos via diferentes receptores exercem um papel crucial na indução da resposta imune adaptativa via ativação e diferenciação dos linfócitos T antígeno-específicos (GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2003; HUBO et al., 2013; SILVA et al., 2006), e que PI inibe a capacidade de células CD11c⁺ estimuladas com OVA de ativar linfócitos T OVA-específicos *in vitro*, avaliamos se o bloqueio dos CLRs inibiria esse efeito do PI.

No nosso ensaio de indução de resposta proliferativa de linfócitos T-OVA específicos incubadas com as DCs previamente pulsadas com antígenos e/ou manana ou anticorpos anti-DC-SIGN ou MR, permitiram verificar, mais uma vez, a dependência do DC-SIGN e MR para o efeito modulador do PI. O bloqueio desses receptores aboliu o efeito inibitório do PI sobre a capacidade das DCs de induzir a proliferação dos linfócitos T.

Neste sentido, Everts et al. (2012) mostraram que o reconhecimento do omega-1, um componente secretado pelos ovos de *S. mansoni*, pelo MR nas DCs resulta na ativação de diferenciação dos linfócitos Th2, típico de resposta desencadeada por helmintos.

Dados da literatura também mostram a relação entre helmintos e o desenvolvimento de resposta supressora com indução de células T reguladoras (Treg). Estas células expressando Foxp3 têm estado correlacionadas com a inibição da imunidade do hospedeiro durante a infecção crônica (JACKSON, 2009). Alguns helmintos como, por exemplo, *H. polygyrus* e *Teladorsagia circumcincta*, secretam produtos capazes de induzir diretamente Treg Foxp3⁺ (GRAINGER et al., 2010).

Outros estudos realizados com extrato de *Ascaris suum* ou com diferentes estágios larvais deste parasita demonstraram a presença de uma proteína imunomoduladora secretada/excretada (PAS-1) capaz de inibir a inflamação induzida por LPS. Além disso, foi mostrado que essa proteína é capaz de modular a hiperreatividade das vias aéreas induzida por OVA por um mecanismo que pode ser dependente da geração de células T CD25⁺Foxp3⁺ (ANTUNES et al., 2014; de ARAÚJO et al., 2010). Os trabalhos de isolamento e caracterização de PAS-1 (ITAMI et al., 2003, OSHIRO; MACEDO; MACEDO-SOARES 2005) e os nossos resultados de obtenção do PI indicam que esta proteína está contida nos componentes de alta massa molecular do Asc. No entanto, outros estudos precisam ser realizados para o

estabelecimento da correlação entre os resultados obtidos neste trabalho com a atividade desta proteína PAS-1.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho pudemos acrescentar informações relevantes sobre o mecanismo modulador exercido pelos componentes de alta massa molecular de *Ascaris suum* sobre a resposta imune inata e adaptativa. Neste sentido, identificamos as estruturas glicanas *N*-ligadas nos componentes do PI e evidenciamos que estes componentes estão envolvidos diretamente no efeito do PI sobre a maturação das DCs. Somado a isso, demonstramos que os receptores DC-SIGN e MR estão envolvidos nesse processo.

Vale ressaltar, que este trabalho abre novas perspectivas de estudos dentre elas a análise da via de sinalização desencadeada pela interação entre o DC-SIGN e MR e sua interferência sobre a via dos TLRs nas DCs.

6 CONCLUSÕES

- ✓ PI possui predomínio de componentes contendo estruturas N-glicanas em relação as O-glicanas;
- ✓ As cadeias N-ligadas encontradas no PI foram do tipo alta manose ou complexa podendo apresentar resíduos terminais de ácido siálico e fosforilcolina;
- ✓ Os componentes contendo *N*-glicanos estão diretamente envolvidos com o efeito modulador do PI sobre a maturação das DCs incubadas com LPS;
- ✓ DC-SIGN e MR participam do reconhecimento do PI pelas DCs;
- ✓ Receptores DC-SIGN e MR estão envolvidos na imunomodulação exercida pelos antígenos de Asc sobre as DCs e assim sua capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T antígeno-específicos.

REFERÊNCIAS*

- ALVES, M. J. et al. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 21, p. 75-82, 1986.
- AKIRA, S.; YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Role of adapters in toll-like receptor signalling. **Bioch. Soc.**, v. 31, p. 637-642, 2003.
- AMPEL, N. M. et al. The mannose receptor mediates the cellular immune response in human coccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2554-2555, 2005.
- ANTUNES, M. F. et al. Immunosuppressive PAS-1 is an excretory/secretory protein released by larval and adult worms of the ascarid nematode *Ascaris suum*. **J. Helminthol.**, v. 7, p. 1-8, 2014.
- BRATTIG, N. W. et al. The major surface protein of *Wolbachia endosymbionts* in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4. **J. Immunol.**, v. 173, p. 437-445, 2004.
- CANARD, B. et al. Generation of anti-DC-SIGN monoclonal antibodies capable of blocking HIV-1 gp120 binding and reactive on formalin-fixed tissue. **Immunol. Lett.**, v. 135, p. 165-172, 2011.
- DE ARAÚJO, C. A. et al. PAS-1, an *Ascaris suum* protein, modulates allergic airway inflammation via CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+CD25+FoxP3+ T cells. **Scand. J. Immunol.**, v. 72, p. 491-503, 2010.
- DEN DUNNEN J. et al. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 58, p. 1149-1157, 2009.
- DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: A sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. **Curr. Med. Chemistry**, v. 16, p. 3174-3202, 2009.
- ELLIOTT, D. E. et al. Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 284, p. 385-391, 2003.
- ELLIOTT, D. E. SUMMERS, R. W.; WEINTOCK, J. V. Helminths and the modulation of mucosal inflammation. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 51-58, 2005.

*De acordo com:

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

ENGERING, A. et al. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. **Blood**, v. 100, p. 1780-1786, 2002.

EVERTS, B. et al. Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. **J. Exp. Med.**, v. 209, p. 1753-1767, 2012.

ERDMANN, H. et al. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). **Cell Microbiol.**, v. 11, p. 1600-1611, 2009.

FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 114, p. 245-251, 1998.

FAVORETTO, B. C. **Avaliação da participação dos receptores do tipo Toll e lectinas tipo C na supressão da resposta imune induzida por componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum*.** 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FAVORETTO, B. C. et al. TLR2- and 4-independent immunomodulatory effect of high molecular weight components from *Ascaris suum*. **Molecular Immunol.**, v. 58, p. 17-26, 2014.

FERREIRA, A. P. et al. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. **Cell. Immunol.**, v. 162, p. 202-210, 1995.

FIGDOR, C. G.; VAN KOOYK, I.; ADEMA, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 77-84, 2002.

FINKELMAN, F. D. et al. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. **Immunology Today**, v. 12, p. 62-66, 1991.

FUKUDA, M. et al. C-type lectins and sialyl Lewis X oligosaccharides. Versatile roles in cell-cell interaction. **J. Cell Biol.**, v. 147, p. 467-470, 1999.

GAGLIARDI, M. C. et al. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production. **J. Leukoc. Biol.**, v. 78, p. 106-113, 2005.

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

GEIJTENBEEK, T.B. et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. **Cell**, v. 100, p. 587-597, 2000.

GEIJTENBEEK, T. B. H. et al. *Mycobacteria* target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **J. Exp. Medicine**, v. 197, p. 7-17, 2003.

GEIJTENBEEK, T. B. H. et al. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 33-54, 2004.

GEIJTENBEEK, T. B. H.; GRINGHUIS, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 465-479, 2009.

GEYER, H.; GEYER, R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, p. 1853-1869, 2006.

GRAINGER, J. R. et al. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway. **J. Exp. Med.**, v. 11, p. 2331-2341, 2010.

GRINGHUIS, S. I. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. **Immunity**, v. 5, p. 605-616, 2007.

HAIG, D. M.; LIMA, G. C.; MOTA, I. Antibody suppression in mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Parasite Immunol.**, v. 2, p.175-187, 1980.

HALARY, F. et al. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. **Immunity**, v. 17, p. 653-664, 2002.

HARNETT, W.; RZEPECKA, J.; HOUSTON, K. M. How do nematodes transfer phosphorylcholine to carbohydrates? **Trends Parasitol.**, v. 26, p. 114-118, 2010.

HEBERT, D. N.; GARMAN, S. C.; MOLINARI, M. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. **Trends Cell Biol.**, v. 15, p. 364-370, 2005.

HUBO, M. et al. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. **Front Immunol.**, v. 82, p.1-14, 2013.

ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T.; TADA, T. Immunoglobulin E in the monkey. **J. Immunol.**, v. 103, p. 445-453, 1969.

ITAMI, D. M. et al., Immunoglobulin E is not required for but enhances airway inflammation and hyperresponsiveness. **Allergy**, v. 58, p. 1117-1124, 2003.

JACKSON, J. A. et al. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? **Immunology**, v. 126, p. 18-27, 2009.

JANG-LEE, J. et al. Glycomics analysis of *Schistosoma mansoni* egg and cercarial secretions. **Mol. Cell Proteomics**, v. 6, p. 1485-1499, 2007.

JENKINS, N.; CURLING, E. M. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 354-364, 1994.

KHOO, K.H.; DELL, A. Glycoconjugates from parasitic helminths: structure diversity and immunobiological implications. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 491, p. 185-205, 2001.

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

KOBATA, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, p. 483-501, 1992.

KOMATSU, T. et al. *Ascaris suum*: suppression of the reaginic and hemagglutinating antibody responses in the mouse by crude extract and maintenance fluid. **Exp. Parasitol.**, v. 47, p. 158-168, 1979.

LIEW, F. Y.; XU, D.; BRINT, E. K. O'NEILL, L. A. J. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. **Nature**, v. 5, p. 446-458, 2005.

MACEDO, M. S.; BARBUTO, J. A. M. Murine delayed hypersensitivity is suppressed by *Ascaris suum* extract. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 21, p. 523-525, 1988.

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.

MCGREAL, E. P; MILLER, J. L.; GORDON, S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. **Cur. Op. Immunol.**, v. 17, p. 18-24, 2005.

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

MOREELS, T. G.; PELCKMANS, P. A. Gastrointestinal parasites: potential therapy for refractory inflammatory bowel diseases. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 11, p. 178-184, 2005.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v. 17, p. 138-146, 1996.

NYAME, A. K. et al. Expression of Lex antigen in *Schistosoma japonicum* and *S.haematobium* and immune responses to Lex in infected animals: lack of Lex expression in other trematodes and nematodes. **Glycobiology**, v. 8, p. 615-624, 1998.

ORR, T. S. C.; BLAIR, A. M. J. N. Potentiated reagin response to egg albumin and conalbumin in *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. **Life Sci.**, v. 8, p.1073-1077, 1969.

OSHIRO, T. M.; MACEDO, M. S.; MACEDO-SOARES, M. F. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. **Inflamm. Res.**, v. 54, p.17-21, 2005.

PIRAS, M. M.; HENRÍQUEZ, D.; PIRAS, R. The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the *in vitro* penetration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes into fibroblastic cells. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 22, p. 135-143, 1987.

PÖLTL, G. et al. N-glycans of the porcine nematode parasite *Ascaris suum* are modified with phosphorylcholine and core fucose residues. **FEBS J.**, v. 274, p. 714-726, 2007.

PRASANPHANICH, N. S. et al. Glycoconjugates in host-helminth interactions. **Front. Immunol.**, v. 4, p. 1-22, 2013.

RAJU, T.S.; LERNER, L.; O'CONNOR, J. V. Glycopinon: biological significance and methods for the analysis of complex carbohydrates of recombinant glycoproteins. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 3, p. 191-194, 1996.

SATOMI, Y.; SHIMONISHI, Y.; TAKAO, T. N-glycosylation at Asn(491) in the Asn-Xaa-Cys motif of human transferrin. **EBS Lett.**, v. 576, p. 51-56, 2004.

SCHNARE, M. et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 947-950, 2001.

SEWELL, D. L. et al. Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. **Immunol. Lett.** v. 82, p. 101-110, 2002.

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. 3227-3237, 2006.

SILVA, S. R. et al. Sialic acid residues are essential for the anaphylactic activity of murine IgG1 antibodies. **J. Immunol.**, v. 181, p. 8308-8314, 2008.

SOARES, M. F. M.; MACEDO, M. S.; MOTA, I. Suppressive effect of *Ascaris suum* extract on IgE and IgG antibody responses in mice. **Brazilian J. Biol. Res.**, v. 20, p. 203-211, 1987.

SOARES, M. F. M.; MOTA, I.; MACEDO, M. S. Isolation of *Ascaris suum* components which suppress IgE antibody responses. **Int. Archs. Allergy Immunol.**, v. 97, p. 37-43, 1992.

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, p. 145-157, 2002.

SORVILLO, N. et al. The macrophage mannose receptor promotes uptake of ADAMTS13 by dendritic cells. **J. Blood.**, v. 119, p. 3828-3835, 2012.

STROMBERG, E. E. Potentiation of a reaginic (IgE) antibody response to ovalbumin in the guinea pig with a soluble metabolic product from *Ascaris suum*. **J. Immunol.**, v. 125, p. 833-836, 1980.

SUMMERS, R. W. et al., Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. **Gastroenterology**, v. 128, p. 825-832, 2005.

SVAJGER, U. et al. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. **Cell. Signal.**, v. 10, p. 1397-1405, 2010.

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

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, p. 4547-4560, 2013.

VANCE, B. A. et al. Multiple dimeric forms of human CD69 result from differential addition of N-glycans to typical (Asn-X-Ser/Thr) and atypical (Asn-X-cys) glycosylation motifs. **J. Biol. Chem.**, v. 37, p. 23117-23122, 1997.

VAN DIE, I.; CUMMINGS, R. D. Glycans modulate immune responses in helminth infections and allergy. **Chem. Immunol. Allergy.**, v. 90, p. 91-112, 2006.

VAN DIE, I. et al. Structural and functional analysis of glycosphingolipids of *Schistosoma mansoni*. **Methods Enzymol.**, v. 480, p. 117-140, 2010.

VAN DER KLEIJ, D. et al. Triggering of innate immune responses by schistosome egg glycolipids and their carbohydrate epitope GalNAc beta 1-4(Fuc alpha 1-2Fuc alpha 1-3)GlcNAc. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 531-539, 2002.

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

VAN LIEMPT, E. Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. **FEBS Lett.**, v. 580, p. 6123-6131, 2006.

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, p. 2605-2615, 2007.

VAN KOOYK, Y.; APPELMELK, B.; GEIJTENBEEK, T.B. A fatal attraction: Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. **Trends Mol. Med.**, v. 4, p. 153-159, 2003.

VAN VLIET, S. J. et al. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 4, p. 435-440, 2007.

VARKI, A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. **FASEB J.**, v. 4, p. 248-255, 1997.

VARKI, A. et al. **Essentials of glycobiology**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

VUKMAN, K. V. et al. *Fasciola hepatica* tegumental coat antigen suppresses MAPK signalling in dendritic cells and up-regulates the expression of SOCS3. **Parasite Immunol.**, v. 35, p. 234-238, 2013.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1974.

ZHOU, T. et al. DC-SIGN and Immunoregulation. **Cel. Mol. Immunol.**, v. 3, p. 279-283, 2006.