

Bruna Cristina Favoretto

**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***

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

SÃO PAULO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Bruna Cristina Favoretto

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*

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro

SÃO PAULO

2010

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.

Avaliação da participação dos receptores do tipo Toll e de lectinas tipo C na supressão na resposta imune induzida por componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum* / Bruna Cristina Favoretto. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Eliana Faquim de Lima Mauro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunorregulação.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the involvement of Toll like and C-type lectin receptors on the suppression of the immune response induced by high molecular weight components of *Ascaris suum* extract.

Descritores: 1. *Ascaris suum* 2. Células dendríticas 3. Receptores de antígenos 4. Imunossupressão 5. Componentes de alta massa molecular 6. Reconhecimento I. Mauro, Eliana Faquim de Lima II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB058/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruna Cristina Favoretto.

Título da Dissertação: Avaliação da participação dos receptores do tipo Toll e de lectinas tipo C na supressão na resposta imune induzida por componentes de alta massa molecular do extrato de *Ascaris suum*.

Orientador(a): Eliana Faquim de Lima Mauro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../.....,

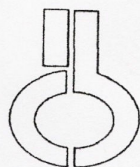
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

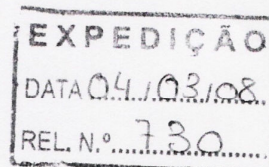
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **018** nas fls do livro **54** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Eliana Faquim de Lima Mauro, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Avaliação da participação dos receptores do tipo Toll e de lecitina tipo C na supressão da resposta imune anti-ovalbumina induzida por componentes de alta massa molecular do extrato de Ascaris suum**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Bruna Cristina Favoretto e a pesquisadora Jacqueline de Fátima Jacysyn** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **26.02.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2008.

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

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



**A minha família pelo amor, esforço,
dedicação e compreensão, em todos
os momentos desta e de outras
caminhadas.**

AGRADECIMENTOS

A confecção do presente trabalho não seria possível sem a participação dos inúmeros profissionais espalhados pelo mundo. A toda Comunidade Científica, meu reconhecimento e sinceros agradecimentos.

Agradeço de maneira destacada a Prof^a. Dr^a. Eliana Faquim de Lima Mauro, da Universidade de São Paulo - tradução de competência, disciplina e profissionalismo - pela orientação, atenção e amizade durante todo o tempo e pela confiança depositada desde a iniciação científica, mestrado e futuro doutorado.

Agradeço a Dra. Ana Moura, diretora do Laboratório de Imunopatologia, do Instituto Butantan, e a todos os seus pesquisadores, a Dra. Jacqueline Jacysyn, da Universidade de São Paulo, pela ajuda na realização dos experimentos de citometria de fluxo e discussão dos resultados, ao Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, da Universidade de São Paulo, por ceder os camundongos geneticamente modificados para realização dos experimentos e Dra. Nancy Starobinas do Laboratório de Imunogenética, Instituto Butantan, pela ajuda na realização do ELISA de TNF e aos doutores componentes da banca de qualificação: Maria Notomi Sato, Niels Olsen Saraiva Câmara e Anderson de Sá Nunes, pela disponibilidade e pelas sugestões de aprimoramento.

Agradeço, também, aos funcionários e responsáveis pelos biotérios de criação e experimentação do Instituto Butantan, aos funcionários da biblioteca ICB-USP, por todo auxílio na catalogação e revisão bibliográfica, aos docentes do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV, da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos, as secretárias Jotelma Leite Ribeiro e Maria Eni do Sacramento, Amarildo Utiana (*in memoria*) e Cleusa Aparecida, pela amizade e atenção dispensadas; e a todos os funcionários do Laboratório de Imunopatologia que contribuíram durante todo o trabalho na preparação dos materiais utilizados e apoio científico.

Agradeço as minhas irmãs científicas: Sandriana dos Ramos Silva, Renata Ricardi e Priscila Ranéia, no compartilhamento de trabalhos, sonhos e dificuldades, aos meus amigos Caio, Tamires, Daiana, Juninho, Cris Baldo, Podé, Stella, Cris, Louise, Thiago, Isa, Iara pela atenção, ajuda e oficinas 21 e a todos os demais que, mesmo sem a citação dos nomes, contribuíram com a realização deste projeto.

RESUMO

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 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os helmintos, assim como seus antígenos são potentes imunomoduladores. Trabalhos realizados com extrato de *Ascaris suum* mostraram que os componentes de alta massa molecular (PI) contidos nele suprimem a resposta imune induzida por ovalbumina (OVA). PI inibe a expressão das moléculas MHC-II e coestimuladoras nas células dendríticas (DCs) e sua capacidade de induzir proliferação de linfócitos T CD4⁺, por mecanismo dependente de IL-10. As APCs, como as DCs, por meio de receptores expressos na membrana celular reconhecem os padrões moleculares presentes em patógenos e direcionam a resposta imune efetora. Neste trabalho avaliamos a participação dos receptores do tipo *Toll* 2 e 4 (TLRs) e de lectina tipo C (CLRs) expressos nas APCs na supressão induzida por PI. Observamos que a imunização dos camundongos com OVA/CFA promoveu aumento progressivo da expressão de TLR1, 2 e 4 nas células linfóides com pico entre 5^o-6^o dia pós-imunização, exceto o TLR9 cuja expressão aumentou no 4^o dia e se manteve nos demais dias estudados. Entretanto, o PI foi capaz de inibir a expressão de TLR2 e 4 nas células CD11c⁺ e TLR1, 4 e 9 nas MHC-II⁺ purificadas dos camundongos imunizados 5 dias antes com OVA+PI. Experimentos realizados em camundongos deficientes em TLR4 ou 2 mostraram que o PI suprimiu a resposta celular e humoral OVA-específica bem como a expressão das moléculas de MHC-II e coestimuladoras nas células destes animais imunizados com OVA+PI mostrando, portanto que PI exerce seu efeito modulador independente destes receptores. Em ensaios *in vitro*, o PI inibiu a maturação de DCs diferenciadas com GM-CSF/IL-4 e incubadas com agonistas de TLR 2, 3 ou 4. Além disso, em outros ensaios realizados *in vitro* com ligante de CLRs (manana) permitem sugerir que estes receptores participam do reconhecimento do PI e assim do seu efeito imunomodulador.

Palavras-chave: Imunossupressão. Células dendríticas. (PI). Extrato de *Ascaris suum*. Receptores de antígenos. Reconhecimento.

ABSTRACT

FAVORETTO B. C. **Evaluation of the involvement of Toll like and C-type lectin receptors in the immunosuppression induced by high molecular weight components from *Ascaris suum* extract.** 2010. 78 p. Master thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Helminths, as antigens derived from them are potent immunomodulators. It has been shown that high molecular weight components (PI) from *Ascaris suum* extract exert a suppressive effect on immune response induced by ovalbumin (OVA). The PI components down-modulate the MHC class II and costimulatory molecules expression on dendritic cells (DCs) and the ability of these cells to induce TCD4⁺ proliferation, via an IL-10-dependent mechanism. The antigen-presenting-cells (APCs), as DCs, via membrane receptors, recognize molecular patterns found in distinct pathogens and modulate the effector immune response. In this work, we analyzed the participation of the toll like 2 and 4 (TLRs) and the C-type lectin receptors (CLRs) expressed by APCs in the suppression induced by PI. We observed that OVA/CFA immunization of mice promoted the progressive increase of TLR1, 2 e 4 expression on lymphoid cells with the peak between the 5th to 6th day after immunization, except for the TLR9 expression that increased on day 4th and was maintained for all days studied. However, the PI was able to inhibit the TLR2 and 4 expression on purified CD11c⁺ cells and the TLR1, 4 and 9 on MHC class II⁺ cells from mice immunized 5 days before with OVA plus PI. Experiments realized in TLR4 or 2 deficient mice showed that the PI suppressed the OVA-specific cellular and humoral responses as well as the MHC class II and costimulatory molecules expression on cells of these OVA plus PI immunized mice, showing that the PI components exert its modulator effect independent of these receptors. It was also observed that the PI inhibited the DCs maturation derived *in vitro* from bone marrow of BALB/c mice with GM-SCF/IL-4 and incubated with TLR2, 3 or 4 agonists. Moreover, other *in vitro* assays developed with CLRs ligand (mannan) suggest that these receptors participate in the PI recognition and thus its immunomodulator effect.

Key words: Immunosuppression. Dendritic cells. High molecular weight components (PI). *Ascaris suum* extract. Antigen receptor. Recognition.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC** - Antigen-presenting cell (Células apresentadoras de antígeno)
- ASC** - Extrato bruto de *Ascaris suum*
- BBS** - Borate buffered saline (Solução salina tamponada com borato)
- BCG** - Bacilo *Mycobacterium Bovis*
- 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)
- DC** - Dendritic cells (Células dendríticas)
- DC-SIGN** - Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin
- DMSO** - Dimethylsulfoxid (Dimetilsulfóxido)
- EDTA** - Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilodiaminotetracético)
- ELISA**- Enzyme linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)
- FBS** - Fetal bovine serum (Soro fetal bovino)
- FITC** - Fluorescein isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)
- GM-CSF** - Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Fator estimulador de colônias – granulócitos e monócitos)
- IFA** - Incomplete Freund Adjuvant (Adjuvante incompleto de Freund)
- IFN- γ** - Interferon- γ
- IL-10** - Interleucina-10
- IL-12** - Interleucina-12
- IL-4** - Interleucina-4
- IL-6** - Interleucina-6
- LAL** - Limulus Amoebocyte Lysate
- LPS** - Lipopolysaccharid (Lipopolissacarídeo)
- MHC** - Major histocompatibility complex (Complexo de histocompatibilidade principal)
- MyD88** - Myeloid differentiation factor 88
- NaCl** - Sodium chloride (Cloreto de sódio)
- OPD** - o-Phenylenediamine dihydrochloride
- OVA** - Ovalbumin (Ovalbumina)
- Pam3-Cys** - Lipopeptide tripalmitoyl-S-glycerylcysteine
- PBS** - Phosphate buffered saline (Solução salina tamponada com fosfato)

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

PE - Phycoerythrin (Ficoeritrina)

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

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

Poly I:C - polyinosine-deoxycytidylic acid

RPMI-S - Meio de cultura RPMI 1640 suplementado

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

TGF- β - (*Transforming Growth Factor- β*)

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

TRIS - Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Hidroximetil aminometano)

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Camundongos.....	21
3.2 Antígenos e adjuvantes.....	21
3.3 Preparo do extrato de <i>Ascaris suum</i>.....	22
3.4 Obtenção dos componentes de alta e baixa massa molecular do extrato de <i>Ascaris suum</i> (PI e PIII).....	22
3.5 Determinação e eliminação de endotoxinas nos diferentes antígenos..	22
3.6 Cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A (Con A) acoplada à Sepharose 4B.....	23
3.7 Protocolos de imunização.....	23
3.8 Obtenção e preparo de suspensões celulares a partir de órgãos linfóides de camundongos.....	25
3.9 Protocolo de purificação de células CD11c⁺ e TCD3⁺	26
3.10 Ensaio de células CD11c⁺ obtidas de camundongos imunizados com OVA e incubadas com OVA, OVA+PI, OVA+PI+Manana.....	26
3.11 Protocolo de diferenciação de células dendríticas <i>in vitro</i> e incubação com diferentes estímulos.....	27
3.12 Marcação de moléculas expressas na superfície celular com anticorpos fluorescentes e análise em citômetro de fluxo.....	27
3.13 Determinação da produção de anticorpos anti-OVA por ELISA.....	28
3.14 Desencadeamento da reação de hipersensibilidade tardia (HT).....	29
3.15 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IL-12.....	29
3.16 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IL-10 ou IL-6.....	30
3.17 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de TNF.....	30

3.18 Análise estatística.....	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Obtenção dos componentes de alta e baixa massa molecular do extrato de <i>Ascaris suum</i> por gel filtração.....	32
4.2 Cinética da expressão de TLRs na membrana de células totais de camundongos imunizados com OVA.....	33
4.3 Efeito do PI na expressão de TLR 1, 2, 4 e 9 em células dendríticas de camundongos imunizados com OVA, PI ou OVA+PI.....	34
4.4 Expressões de TLRs em células CD3 ⁺ e MHC de classe II ⁺ purificadas de camundongos imunizados com OVA ou OVA+PI.....	36
4.5 Análise da expressão das moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras em células de camundongos imunizados com OVA emulsificada em CFA ou IFA.....	38
4.6 Efeito do PI na expressão das moléculas envolvidas com a apresentação antigênica em células de camundongos imunizados com OVA ou OVA+PI emulsificados em CFA ou IFA.....	39
4.7 Estudo da participação de TLR2 ou TLR4 na supressão da resposta anti-OVA induzida pelos componentes do PI.....	41
4.7.1 Reação de hipersensibilidade tardia.....	41
4.7.2 Resposta imune humoral OVA-específica.....	42
4.7.3 Expressão das moléculas de MHC de classe II e coestimuladoras em células de camundongos imunizados com OVA ou OVA+PI.....	43
4.8 Avaliação do efeito do PI no processo de maturação de células dendríticas estimuladas <i>in vitro</i> com ligantes de TLR4 e TLR3 (LPS e Poly I:C).....	47
4.9 Avaliações do efeito dos componentes de baixa massa molecular do Asc (PIII) no processo de maturação de células dendríticas estimuladas <i>in vitro</i> com ligante de TLR4.....	51
4.10 Efeito do PI na expressão das moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras em células dendríticas de camundongos WT, TLR4 ^{-/-} ou TLR2 ^{-/-} diferenciadas <i>in vitro</i> e estimuladas com ligante de TLR 2, 3 e 4.....	52
4.11 Avaliações da presença de glicanos ligados aos componentes do PI e PIII.....	58
4.12 Estudos do papel de CLRs na modulação exercida pelo PI sobre as	59

células dendríticas.....	
4.13 Efeito do PI nas células CD11c⁺ purificadas e estudo do papel dos receptores de lectinas tipo C nesse processo.....	62
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Infecções por helmintos induzem em seu hospedeiro alta produção de anticorpos IgE, eosinofilia e mastocitose, características de resposta tipo Th2 (ISHIZAKA; ISHIZAKA; TADA, 1969; JARRET e MILLER, 1982; SHER e COLLEY 1989; STREET et al., 1990). Em modelos de infecções com estes parasitas associadas a imunizações com antígenos não-relacionados demonstrou-se a capacidade destes patógenos de modular a resposta imune heteróloga (ORR e BLAIR, 1969; BARRIGA e INGALLS, 1984; JARRET e STEWART, 1972; KOJIMA e OVARY, 1975; HAIG; LIMA; MOTA, 1980).

Estudos evidenciaram a relação inversa entre infecções por helmintos e o desenvolvimento de doenças alérgicas e inflamatórias, possivelmente mediada por mecanismo dependente de células T reguladoras geradas em resposta a estes parasitas (KHAN et al., 2002; ELLIOTT et al., 2003; ELLIOTT; SUMMERS; WEINSTOCK, 2005; MORREELS e PELCKMANS, 2005).

Assim como observado nas infecções helmínticas, extratos preparados a partir destes parasitas e seus antígenos solúveis são capazes de modular a resposta imune dirigida contra antígenos não relacionados (STROMBERG 1980; KOMATSU et al., 1979). Trabalhos realizados com o extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc) demonstram sua capacidade de supressão da resposta imune humoral e celular induzida por ovalbumina (OVA) ou micobactéria (SOARES; MACEDO; MOTA, 1987; MACEDO e BARBUTO, 1988; FERREIRA et al., 1995). Componentes de alta massa molecular desse extrato de Asc (PI) são os responsáveis pelo efeito imunomodulador, enquanto que os de baixa massa molecular (PIII), obtidos por gel filtração, promovem altos títulos de anticorpos IgE Asc-específicos (SOARES; MOTA; MACEDO, 1992).

Duas proteínas do extrato de Asc, denominadas PAS-1 e APAS-3, foram isoladas por cromatografia de afinidade em resina acoplada à anticorpos monoclonais anti-PI ou anti-PIII. 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 inflamação eosinofílica e hiperreatividade das vias aéreas (ITAMI et al., 2003; OSHIRO; MACEDO; MACEDO-SOARES, 2005).

O estudo do efeito dos componentes isolados do Asc na resposta anti-OVA revelou que somente o PI é capaz de suprimir as reações de hipersensibilidade e a produção de anticorpos OVA-específicos em animais previamente imunizados com a OVA associada ao PI ou PIII. Observou-se ainda, inibição da resposta proliferativa e secreção de citocinas nas culturas de células dos animais imunizados com OVA e PI quando estimuladas *in vitro* com OVA ou concanavalina A (Con A) (FAQUIM-MAURO e MACEDO, 1998).

Quando avaliada a resposta imune dirigida contra o PI ou PIII, foi constatada maior secreção de IL-4 e IL-10 e menor de IFN- γ e IL-2 pelas células dos animais imunizados com PI ou PIII em resposta a estimulação *in vitro* com os próprios antígenos ou a Con A (FAQUIM-MAURO e MACEDO, 1998).

Durante o processo de indução da resposta imune adaptativa, as citocinas secretadas no microambiente de ativação das células T modulam e direcionam o perfil de células T efetoras e produção de anticorpos que serão geradas (GAJEWSKI e FITCH, 1988; FERNANDEZ-BOTRAN et al., 1988; FIORENTINO et al., 1991; DING et al., 1993; PEARLMAN et al., 1993).

Com relação ao efeito modulador do Asc na resposta imune anti-OVA, MACEDO et al. (1998) demonstraram que a IL-4 e IL-10 estão envolvidas neste processo, visto que o Asc foi incapaz de suprimir a resposta imune OVA-específica em animais inoculados com anticorpos anti-IL-4 e anti-IL10 *in vivo* antes da imunização com OVA e Asc. No entanto, a neutralização destas citocinas *in vitro* em culturas de células dos camundongos imunizados com OVA e Asc não foi capaz de restaurar a resposta proliferativa e secreção de citocinas anti-OVA à mesma magnitude observada nas células de camundongos imunizados somente com a OVA. Estes resultados sugerem, portanto que o efeito supressivo do Asc ocorre na fase de indução da resposta imune OVA-específica (MACEDO et al., 1998). Além dessas observações, experimentos realizados pelo nosso grupo mostraram diminuição na frequência de células OVA-específicas na suspensão celular obtida de linfonodos de animais imunizados com OVA e Asc (dados não-publicados).

SOUZA; JACYSYN; MACEDO (2004) evidenciaram que a IL-4, induzida pelos componentes do PI (obtidos do Asc), é responsável pela inibição da síntese de

IgG2a OVA-específica e a IL-10, por sua vez, exerce ação inibitória tanto na resposta Th1 como Th2 anti-OVA.

A ativação dos linfócitos TCD4⁺ é dependente da interação do seu complexo TCR/CD3 que reconhece na membrana da célula apresentadora de antígeno (APCs) o peptídeo antigênico apresentado em molécula de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Além disso, é necessária a ligação entre as moléculas coestimuladoras (B7.1/B7.2 e CD40) expressas nas APCs com seus ligantes CD28 e CD40L na superfície dos linfócitos T (JUNE et al., 1994; PENG et al., 1996; KELSALL et al., 1996). Outra molécula que parece exercer papel relevante na coestimulação dos linfócitos T é a ICOS (*inducible costimulator*) que apresenta como ligante B7RP-1, ICOSL, GL50 ou LICOS, proteínas homólogas às B7 (BRODIE et al., 2000; LING et al., 2000; ARIMURA et al., 2002; WATANABE et al., 2005). Além do contato celular, citocinas presentes nos tecidos linfóides são fundamentais para a geração da resposta efetora dos linfócitos T (JUNE et al., 1994; PENG et al., 1996; KELSALL et al., 1996; DIEHL et al., 2000; MACDONALD, 2002; STRAW, 2003; O`SULLIVAN et al., 2003).

As células dendríticas (DCs) exercem papel de destaque nesse processo, visto que são especializadas na captura e processamento do antígeno, migração para os órgãos linfóides e apresentação dos peptídeos antigênicos em moléculas de MHC e a expressão das moléculas coestimuladoras (SHORTMAN e LIU, 2002; CHAIN, 2003; BOONSTRA et al., 2003).

O reconhecimento dos diferentes microorganismos pelas APCs, como as DCs, é feito por receptores expressos em sua membrana celular, os quais se ligam a padrões moleculares presentes em patógenos, como lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, ácidos nucléicos e carboidratos (MOLL, 2003). Dentre estes receptores estão os do tipo *Toll* (*Toll like receptor*-TLR) e os da família de receptores de lectina tipo C (*C-type lectin receptor*-CLR) que, ligados seletivamente, geram sinais intracelulares de ativação e maturação celular, seguida de produção de mediadores solúveis, os quais podem determinar, durante a apresentação antigênica, a polarização dos linfócitos TCD4⁺ para Th1, Th2, Th17 ou Treguladores (MOSMANN e SAD, 1996, GAUSE et al., 1999; SCHNARE et al., 2001; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; VAN KOOYK e GEIJTENBEEK, 2003).

D`OSTIANI et al. (2000) observaram que DCs incubadas com a forma de levedura de *Candida albicans* secretam IL-12 e assim, promovem a ativação e

diferenciação dos linfócitos T para Th1. Por outro lado, quando as DCs são incubadas com as hifas de *Candida albicans* induzem a geração de células Th2.

Em outro trabalho demonstrou-se que lipopolissacarídeos obtidos de duas bactérias distintas, *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis*, quando injetados com OVA ativam vias distintas de sinalização nas DCs, as quais culminam na geração de respostas polarizadas Th1 ou Th2 anti-OVA (PULENDRAM et al., 2001).

Os TLRs são diferenciados pelo tipo de antígeno que reconhecem, bem como pela sua localização e vias de sinalização intracelular. Na sua grande maioria, a ativação celular via TLR gera resposta inflamatória (AKIRA; YAMAMOTO; TAKEDA, 2003).

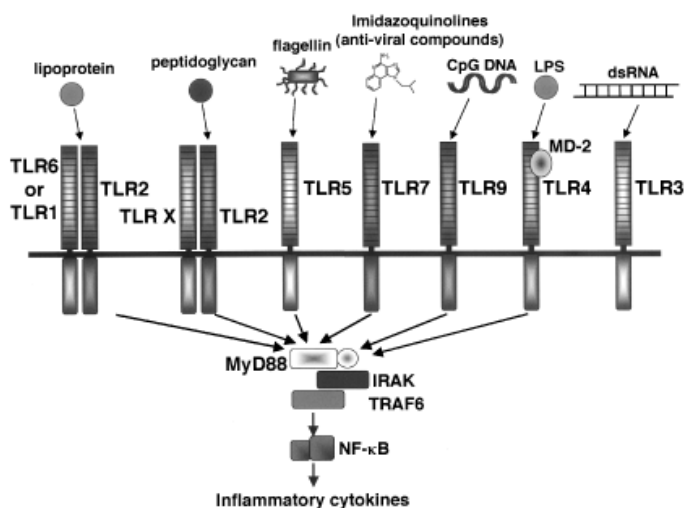


Figura 1- Sumário de ligantes reconhecidos pela família TLR. A resposta de todos os ligantes, exceto dsRNA, são dependentes da molécula adaptadora MyD88 responsável por ativar a cascata de proteínas intracelulares, culminando no fator de transcrição NF-κB.

Fonte: AKIRA; YAMAMOTO; TAKEDA, 2003.

Com relação aos CLRs, estes reconhecem carboidratos associados às moléculas de maneira Ca^{+} -dependente e também participam do processo de reconhecimento de antígenos, maturação das APCs e geração da resposta imune específica. Os receptores DC-SIGN e MGL são exemplos de CLRs que estão envolvidos no reconhecimento de glicanos presentes em patógenos/antígenos pelas DCs (MCGREAL, MILLER e GORDON, 2005; ZHOU et al., 2006).

Nas infecções por *Wolbachia* e *Schistosoma mansoni* foi mostrado que parte da inibição da resposta imune adaptativa é mediada pelo reconhecimento de antígenos destes parasitas via TLRs ou CLRs nas APCs e DCs que, por sua vez, promovem a indução de células T reguladoras e/ou secreção de citocinas inibitórias, como a IL-10

(BRATTING et al., 2004; VAN DER KLEIJ et al., 2002).

BABU et al. (2005) observaram inibição da expressão de TLR1, 2, 4 e 9 em linfócitos B e monócitos obtidos de pacientes acometidos de filariose linfática. Posteriormente, estes autores (2006) mostraram menor expressão destes mesmos receptores nos linfócitos T de pacientes infectados por *Brugia malay*. Em conjunto, estes resultados sugerem que a imunossupressão observada em pacientes infectados por estes parasitas seja, portanto resultante da deficiência no reconhecimento dos antígenos via esses receptores.

Vários trabalhos têm descrito que o reconhecimento de patógenos distintos por CLR's podem desencadear sinais inibitórios ou estimulatórios nas DCs, o que resulta na modulação da atividade funcional destas células (ENGERING et al., 2002; GEIJTENBEEK et al., 2004).

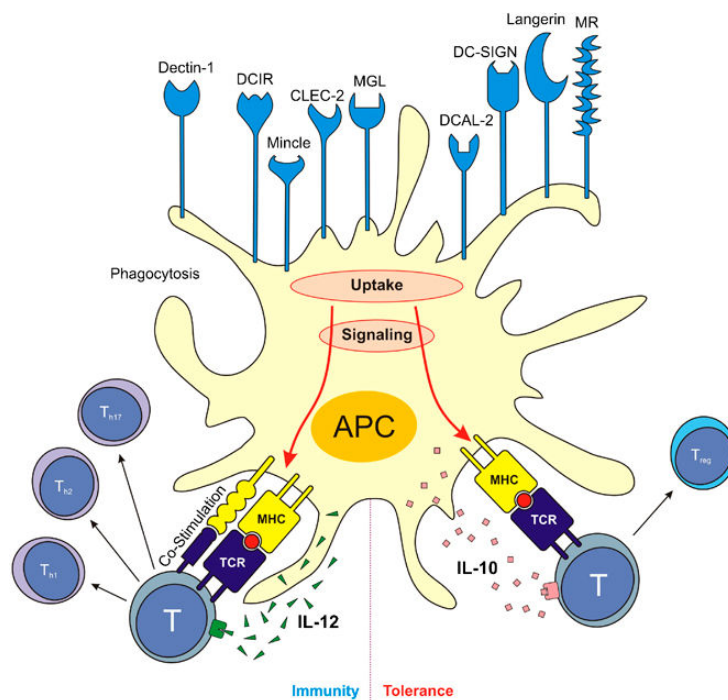


Figura 2- Função inata dos receptores de lectina tipo-C nos processos de captura de antígenos e sinalização intracelular em APCs. As APCs podem expressar vários CLR's que reconhecem estruturas específicas de carboidratos. Após a ligação os CLR's internalizam o antígeno para expressar em moléculas de MHC de classe I ou II para os linfócitos T. CLR's podem também ter função de molécula sinalizadora para a produção de citocinas. Na presença de sinalização via TLRs, moléculas coestimuladoras são positivamente reguladas e a captura por CLR's de antígeno e apresentação pode iniciar a estimulação de células T (Th1, Th2 e Th17). Na ausência de estímulos "de perigo" e coestimulação, a captura de antígeno pelos CLR's leva à apresentação para as células T e o desenvolvimento de tolerância através células T reguladoras.

Fonte: VAN VLIET; GARCIA-VALLEJO; VAN KOOYK, 2008.

VAN DIE et al. (2003) e VAN DIE e CUMMINGS (2006) mostraram que carboidratos presentes nos antígenos liberados pelos ovos do *Schistosoma mansoni* (SEA) são reconhecidos por receptores de lectina tipo C (DC-SIGN), receptores de manose e galactose expressos nas DCs e assim, inibem a ativação e maturação destas células induzida por ligantes de TLRs.

Com relação à modulação negativa da resposta imune por citocinas, nos últimos anos, a produção de IL-10 juntamente com a de TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) tem sido diretamente associada à indução de células T com atividade reguladora e inibição da atividade funcional das DCs (DOETZE et al., 2000; GRÜTZ, 2005).

Retomando a imunossupressão induzida pelos componentes de alta massa molecular do extrato de Asc (PI), SILVA et al. (2006) mostraram que esses antígenos inibem a expressão de moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras tanto nas APCs (células MHC classe II⁺) 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.

Experimentos realizados em camundongos geneticamente deficientes em IL-10 permitiram evidenciar que o PI foi incapaz de inibir a expressão das moléculas de classe II e coestimuladoras nas células destes animais imunizados com a OVA e PI. Ensaio *in vitro* também mostraram que CD11c⁺ purificadas de animais IL-10^{-/-} imunizados com OVA e estimuladas com OVA e PI foram eficientes em ativar linfócitos T OVA-específicos. Portanto, os resultados demonstram que a IL-10 é fundamental para que o PI exerça seu efeito nas células apresentadoras de antígeno e ainda, que a supressão da resposta anti-OVA induzida por PI é resultante da capacidade deste antígeno de modular a fase de indução da resposta imune específica. Considerando o papel central das APCs na geração da resposta adaptativa e ainda, que o reconhecimento dos patógenos/antígenos por estas células é um fator crucial na determinação do tipo de resposta imune que será gerada, fica evidente a importância em se estudar a participação destes receptores de membrana das APCs no processo de supressão da resposta imune induzida pelos componentes do PI.

2 OBJETIVOS

Estudar a participação dos TLRs e CLRs expressos pelas APCs na imunomodulação exercida pelos componentes do PI.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Comparar a expressão das moléculas envolvidas na apresentação antigênica em células de camundongos imunizados com OVA ou com OVA+PI em CFA ou IFA.
- ✓ Avaliar a expressão de TLR1, 2, 4 e 9 nas células de camundongos imunizados 5 dias antes com OVA ou OVA+PI.
- ✓ Estudar a participação de TLR2 e 4 na supressão da resposta anti-OVA induzida pelo PI. Para tanto, será avaliada a resposta imune celular e humoral bem como a expressão das moléculas de MHC de classe II e coestimuladoras (CD80 e CD86) nas células obtidas dos linfonodos destes camundongos TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} imunizados com OVA ou OVA+PI.
- ✓ Estudar a capacidade do PI de modular a ativação/maturação de células dendríticas diferenciadas *in vitro* com GM-CSF/IL-4 e incubadas com ligantes de TLR2, TLR3 e TLR4.
- ✓ Avaliar a presença de antígenos glicosilados no PI, utilizando a metodologia de cromatografia de afinidade a ConA
- ✓ Estudar a participação dos receptores de lectina tipo C no efeito supressivo do PI *in vitro* nas células CD11c⁺ de camundongos imunizados com OVA previamente incubadas com ligante de CLRs e pulsadas *in vitro* com OVA ou OVA+PI.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Para alguns protocolos experimentais foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan ou do Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas-USP. O uso dos animais de experimentação foi aprovado no Instituto de Ciências Biomédicas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA), registro nº 018 e pela Comissão de Ética no uso de Animais Instituto Butantan (CEUAIB) nº 455/08.

Outros experimentos foram realizados em camundongos da linhagem C57BL/6 do tipo selvagem (WT) ou geneticamente deficientes em TLR2 ou 4 (TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-}), obtidos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e gentilmente cedidos pelo Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, Prof Livre Docente do Depto de Imunologia, ICB-USP.

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*.

Componentes do PI foram obtidos a partir do fracionamento do extrato bruto de *Ascaris suum* em coluna de gel filtração (Sephacryl S200-GE/Pharmacia) e utilizados nos protocolos de imunização e experimentos *in vitro*.

Os adjuvantes Completo ou Incompleto de Freund (CFA; IFA- Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) foram emulsificados na proporção de 1:1 (vol/vol) com os diferentes antígenos e utilizados nos protocolos de imunização.

Manana de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma), LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*- Sigma), Poly I:C (Calbiochem–Merck, Darmstadt, Germany) e Pam3csk4 (InvivoGen, San Diego, CA, USA - gentilmente cedido pelo Dr. Gustavo Pessini

Amarante-Mendes) foram utilizados nos ensaios de estimulação das células dendríticas *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 18h/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 aliquoteado e liofilizado.

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

Extrato de *Ascaris suum* diluído em BBS 0,05 M; pH 8,0 foi submetido à cromatografia de gel filtração 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 aos picos I e III foram agrupadas, concentradas por centrifugação em Centriplus YM-100 e YM-10, respectivamente (Amicon – Bedford, MA., USA) e armazenadas a -20 °C.

3.5 Determinação e eliminação de endotoxinas nos diferentes antígenos

Antes da realização dos experimentos, o conteúdo de endotoxinas bacterianas (predominantemente-LPS) presente nas amostras de OVA, PI ou PIII foi avaliado em Ensaio Imunoenzimático LAL (Cambrex/Lonza), realizado no setor de produção do Instituto Butantan. O laudo técnico fornece a quantidade de endotoxinas presente em cada amostra e/ou no seu diluente, tendo como limite mínimo de detecção 0,125 VE/mL. Quando detectada a presença de endotoxinas nos diferentes antígenos, estes foram submetidos à coluna de polimixina para a remoção destes

contaminantes utilizando o protocolo estabelecido pelo fabricante (Thermo-Scientific, Rockford, USA). Em seguida, as amostras foram novamente avaliadas em ensaio de LAL. Na ausência de endotoxinas, os antígenos foram utilizados nos diferentes protocolos experimentais.

3.6 Cromatografia de afinidade em coluna de concanavalina A (ConA) acoplada à Sepharose 4B

Os componentes do PI ou PIII, assim como amostra de soro albumina bovina, (BSA - Sigma) foram testados quanto à sua afinidade de ligação à lectina Con A extraída de *Canavalia ensiformis* e acoplada à Sepharose (Sigma). Para tanto, amostras dos antígenos (1 mg/300 µL) foram aplicadas na coluna de ConA-Sepharose previamente equilibrada em tampão Tris 20 mM pH 7,4 contendo 0,5 M de cloreto de sódio (tampão Tris/NaCl). Após a aplicação, foram passados 25 mL de tampão Tris/NaCl, seguidos de aplicação da solução Tris/NaCl contendo 500 mM de α -metil-D-manopiranosídeo. O perfil cromatográfico foi determinado pela leitura das frações obtidas a 280 nm.

3.7 Protocolos de imunização

a) Cinética da expressão de TLRs em células dos linfonodos de camundongos imunizados com OVA

Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados com OVA (100 µg/animal) em CFA na base da cauda. Após 3, 4, 5 ou 6 dias da imunização os animais foram sacrificados e as suspensões celulares foram preparadas. Suspensão celular foi também obtida de linfonodos de camundongos não imunizados. Estas suspensões foram utilizadas para a análise da expressão dos diferentes TLRs em citômetro de fluxo.

b) Análise da expressão de TLRs em células dos linfonodos de camundongos imunizados com OVA ou OVA+PI

Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados com OVA (100 µg/animal) ou OVA (100 µg/animal) e PI (200 µg/animal) em CFA na base da cauda. Após 3, 4,

5 ou 6 dias da imunização os animais foram sacrificados e as suspensões celulares foram preparadas. Suspensão celular foi também obtida de linfonodos de camundongos não imunizados. Estas suspensões foram utilizadas para a análise da expressão de CD11c e dos diferentes TLRs em citômetro de fluxo.

c) Estudo da expressão de TLRs em células MHC de classe II⁺ ou CD3⁺ obtidas dos linfonodos de camundongos imunizados com OVA ou OVA+PI

Grupos de 6 camundongos BALB/c foram imunizados com OVA (100 µg/animal) ou OVA (100 µg/animal) + PI (200 µg/animal) em CFA na base da cauda. Após 5 ou 7 dias da imunização os animais foram sacrificados e as suspensões celulares foram preparadas. Suspensão celular foi também obtida de linfonodos de camundongos não imunizados. Estas suspensões foram utilizadas para a purificação das células MHC de classe II⁺ ou CD3⁺ e posterior análise da expressão dos diferentes TLRs em citômetro de fluxo.

d) Análise da expressão das moléculas envolvidas com a apresentação antigênica em camundongos imunizados com OVA em CFA ou IFA

Grupos de 5 camundongos BALB/c foram imunizados com OVA (100 µg/animal) em CFA ou IFA na base da cauda. Após 5 dias da imunização os animais foram sacrificados e as suspensões celulares foram preparadas. Suspensão celular foi também obtida de linfonodos de camundongos não imunizados. Estas suspensões foram utilizadas para a análise da expressão das moléculas de MHC de classe II, CD40, CD80 ou CD86 em citômetro de fluxo.

e) Indução de hipersensibilidade tardia (HT) e obtenção dos soros dos camundongos

Grupos de 5 camundongos C57BL/6 WT ou TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} foram imunizados com OVA (200 µg/animal), OVA (200 µg/animal) + PI (200 µg/animal) em CFA na base da cauda. Após 8 dias da imunização, os animais imunizados ou grupos de animais não imunizados foram desafiados no coxim plantar com OVA agregada e 24 horas pós-desafio, foi avaliada a espessura das patas, para a determinação da reação de hipersensibilidade tardia. Em seguida, os camundongos foram sangrados

pelo plexo oftálmico, para a obtenção dos soros e posterior análise da produção de anticorpos anti-OVA.

f) *Obtenção de células CD11c⁺*

Grupos de 6 camundongos BALB/c foram imunizados com OVA (200 µg/animal) em CFA na base da cauda. No 5º dia pós-imunização, os animais foram sacrificados para a retirada dos linfonodos e obtenção da suspensão celular. A partir desta suspensão, as células CD11c⁺ foram purificadas por seleção positiva em sistema MidiMACS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, USA).

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

Para o preparo das suspensões celulares, os diferentes grupos de camundongos foram sacrificados e os linfonodos inguinais e periaórticos retirados e colocados em placas de Petri contendo Colagenase tipo IV (Sigma), na concentração de 2mg/mL em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen). As placas foram mantidas por 1 h/37 °C em estufa com 5% de CO₂ umidificada. Após incubação, as suspensões de células foram preparadas com o auxílio de homogeneizador estéril em meio de cultura RPMI 1640, centrifugadas por 8 min/4 °C a 500 g e ressuspensas em 10,5 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 50 µM de 2-ME e 5% de soro fetal bovino (SFB) (RPMI-S). Em seguida, as células foram colocadas em gelo por 10 minutos para a sedimentação dos grumos. Após este período, 10,0 mL das suspensões foram transferidos para novos tubos e centrifugados por 5 minutos a 500 g. Todas as células foram ressuspensas em 10,0 mL de meio de cultura RPMI-S e feita a contagem em câmara de Neubauer, utilizando solução de Azul de Tripán 0,2 %.

3.9 Protocolo de purificação de células CD11c⁺ e CD3⁺

A partir das suspensões obtidas dos camundongos previamente imunizados as células CD11c⁺ ou CD3⁺ foram purificadas utilizando o sistema MidiMACS, segundo SUDOWE et al. (2000).

Cada suspensão foi ajustada para a concentração de 1×10^7 células/mL e incubada com anticorpo monoclonal anti-CD11c-biotinilado ou anti-CD3-biotinilado ($2 \mu\text{g}/10^6$ células) por 30 min/4 °C. Após este período, foram acrescentados 10,0 mL de meio RPMI-S e realizada centrifugação a 4 °C/8 min/500 g. As células foram ressuspensas em PBS contendo 0,5% de BSA-EDTA 2 mM, pH 7,2, e acrescentado o conjugado de estreptoavidina-microesferasmagnéticas ($20 \mu\text{L}/10^6$ células). Nova incubação de 20 min/4 °C foi realizada e, em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 4 °C/8 min. Em seguida, as células foram ressuspensas em 800 μL de tampão e aplicadas na coluna MidiMACS (Miltenyi Biotec) acoplada ao campo magnético. Células não-marcadas foram eluídas da coluna com a aplicação de 10,0 mL de tampão. Após este procedimento, a coluna foi retirada do campo magnético e a população CD11c⁺ ou CD3⁺ foi eluída com a aplicação de 10,0 mL do tampão à coluna. Após este procedimento, foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer. A determinação da pureza da suspensão obtida foi realizada após a incubação das células com anticorpo anti-CD11c-FITC ou anti-CD3-FITC e análise em citômetro de fluxo.

3.10 Ensaio de células CD11c⁺ obtidas de camundongos imunizados com OVA e incubadas com OVA, OVA+PI, OVA+PI+Manana

As células purificadas CD11c⁺ foram incubadas com OVA (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), OVA+PI (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), OVA+Manana (200 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou OVA+PI+Manana (200 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 18 hs, em estufa com 5% de CO₂ umidificada/37 °C. Após este período, foram centrifugadas por 5min/10 °C/1.000 g e o sobrenadante foi coletado. As células foram ressuspensas em meio RPMI, incubadas com os anticorpos anti-MHC de classe II ou moléculas coestimuladoras de camundongo marcadas com PE ou FITC e analisadas em citômetro de fluxo.

3.11 Protocolo de diferenciação de células dendríticas *in vitro* e incubação com diferentes estímulos

Camundongos BALB/c, C57BL/6 WT, TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} foram sacrificados e as células-tronco retiradas da medula óssea em meio RPMI. Após centrifugação, o *pellet* celular foi ressuspensão 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 foi adicionado novo meio RPMI com 10 ng/mL de GM-CSF e 5 ng/mL de IL-4. As culturas foram mantidas por mais 3 dias em estufa de 5% CO₂ umidificada e ao final deste período, as células não-aderentes foram coletadas. A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer. Suspensões contendo 5x10⁶ células foram estimuladas com LPS (1 ou 10 µg/mL), PI (200 µg/mL), LPS+PI, Manana (50 µg/mL), Poly I:C (10 ou 20 µg/mL) ou Pam3 (3 µg/ml) em estufa de 5% de CO₂ umidificada/37 °C, por 18 horas. Após a incubação, as células foram novamente coletadas e incubadas com anticorpos anti-MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86 conjugados com FITC ou PE e analisadas em citômetro de fluxo.

3.12 Marcação de moléculas expressas na superfície celular com anticorpos fluorescentes e análise em citômetro de fluxo

Suspensões celulares previamente obtidas ou as células MHC de classe II⁺, CD3⁺ ou CD11c⁺ purificadas foram distribuídas na concentração de 1x10⁶ células/poço em placas de 96 poços de fundo redondo. Todas as suspensões celulares foram primeiramente incubadas com anticorpo anti-receptor FcγRII/RIII (1 µg/10⁶ células) por 30 min/4 °C, seguido de adição de PBS contendo 2% de SFB e centrifugação.

a) Análise da expressão das moléculas envolvidas com a apresentação antigênica

Suspensões celulares ou as células purificadas foram incubadas com anticorpos monoclonais de cabra anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86–PE, anti-I-A^d (BALB/c) ou I-A^b (C57BL/6) de camundongo marcados com FITC na concentração de 0,5-1 µg/10⁶ células (BD Pharmingen – San Diego) em PBS contendo 2% de SFB, por 30 minutos/4 °C.

b) Marcação dos receptores do tipo *Toll* 1, 2, 4 e 9

Amostras de $0,5 \times 10^6$ células foram incubadas por 30 min/4 °C com anticorpos de rato anti-TLR1, TLR2 ou TLR4 de camundongo marcados com PE. Para estudar a expressão do TLR9, foi feita a incubação das células com solução de permeabilização (*cytoperm*-BD Pharmingem) por 10 minutos/4 °C. Ao final, as células foram centrifugadas e a solução fixadora (*cytofix*-BD Pharmingem) adicionada, na qual foi diluído o anticorpo anti-TLR9-PE (1 μ L/ 5×10^5 células) seguido de incubação de 30 min/4 °C.

Em todos os experimentos foram feitas incubações das células com anticorpos controle-isotípicos IgG1 ou IgG2a de rato ou cabra marcados com FITC ou PE. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS contendo 0,1% de paraformaldeído (Merck – Darmstadt, Germany). Todas as incubações foram feitas em duplicata e as amostras analisadas em citômetro de fluxo (10^4 eventos foram adquiridos por amostra) (FACScalibur, Becton Dickinson).

3.13 Determinação da produção de anticorpos anti-OVA por ELISA

Placas de 96 poços foram sensibilizadas (100 μ L/poço) com OVA (10 μ g/mL) diluída em tampão PBS pH 7,5 e incubadas por 18 hs/4 °C. As placas foram lavadas 3x com solução PBS+ 0,05% de Tween 20 (PBST) e em seguida bloqueadas com solução de PBST+3% de gelatina por 3hs/37 °C. Após esse período, as placas foram lavadas 3x com PBST e acrescentados os soros diluídos 1:10 ou 1:40 para a detecção de IgG2a ou IgG1, respectivamente, seguida de diluição seriada na razão 1:2 em solução PBST+0,5 % de gelatina (100 μ L/poço). As placas foram incubadas por mais 1 h/37 °C e ao término desse período foram lavadas 3x com PBST. Anticorpos de cabra anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo marcados com biotina diluídos 1:1000 em PBST (Southern Biotechnology Associates) foram acrescentados às placas (100 μ L/poço) e nova incubação foi feita por 1h/37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas e acrescentado o conjugado de estreptoavidina-peroxidase diluído em solução PBST+0,5% de gelatina (100 μ L/poço) e incubadas por 1h/37 °C. Novo ciclo de lavagens foi feito e a reação revelada pela adição do substrato contendo cromógeno OPD+H₂O₂ (30%) diluídos em tampão citrato 0,5 M pH 5,0. Após 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida com a adição de ácido

sulfúrico a 30%. A absorbância foi determinada a 492 nm em leitor de ELISA (Multiskan EX – Uniscience).

A produção de IgG1 e IgG2a anti-OVA foi determinada em soros obtidos dos animais de cada grupo de imunização e os resultados expressos como a média das densidades ópticas obtidas em 5 animais/grupo \pm desvio padrão.

3.14 Desencadeamento da reação de hipersensibilidade tardia (HT)

Camundongos WT, TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} imunizados com OVA ou OVA+PI foram desafiados no coxim plantar com solução de OVA agregada (30 μ L - 600 μ g/mL), no 8º dia pós-imunização e receberam PBS na pata contralateral. Como controle, grupos de camundongos não imunizados foram, da mesma forma, desafiados. A reação de hipersensibilidade tardia foi avaliada 24 horas pós-desafio pela medida da espessura das patas dos diferentes grupos experimentais com o auxílio de um espessímetro (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd). Os resultados foram expressos pela média das diferenças entre as espessuras das duas patas \pm erro padrão.

3.15 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IL-12

Placas de alta afinidade (ELISA) foram sensibilizadas com anticorpo anti-IL-12 na concentração de 4 μ g/mL em Tampão Bicarbonato 0,1M pH 9,0 (50 μ L/poço) e incubadas por 18 hs à temperatura ambiente (TA). Após esse período, as placas foram lavadas com solução PBS+0,05% Tween 20 (PBST; Sigma) e bloqueadas com 150 μ L/poço de solução PBST contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) por 30 minutos.

Ao final da incubação, foram realizadas 4 lavagens com PBST e, em seguida, adicionados 50 μ L/poço de IL-12 recombinante diluída na razão 1:2, em meio de cultura contendo 2% de SFB, e as amostras de sobrenadantes de culturas. As placas foram incubadas por 2 hs/TA e em seguida, foram lavadas em PBST. Anticorpo anti-IL-12-biotinilado foi adicionado às placas (200 ng/mL-50 μ L/poço) e realizada nova incubação de 1 h/TA. Outras quatro lavagens em PBST foram feitas e 75 μ L/poço do conjugado enzimático (estreptoavidina-peroxidase) diluído em PBST + 0,1% de BSA foram adicionados. Nova incubação de 1h/TA foi realizada. Outro ciclo de lavagens foi feito e a reação revelada pela adição de 100 μ L/poço do

substrato contendo o cromógeno TMB, água oxigenada 30% (Sigma) em tampão fosfato de sódio bibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,2 M pH 5,0. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 0,2 M e a leitura feita em leitor de ELISA a 450 nm. O cálculo da concentração de IL-12 presente nos sobrenadantes das culturas de células foi realizado a partir da curva-padrão de IL-12 recombinante (6 a 0,187 ng/mL).

3.16 ELISA para detecção de IL-10 ou IL-6

A presença de IL-10 ou IL-6 nos sobrenadantes das diferentes culturas celulares foi realizada por ELISA (R&Biosystems), seguindo as etapas acima descritas. Assim, placas foram sensibilizadas com anticorpo anti-IL-10 (4 µg/mL) ou anti-IL6 (2 µg/mL) diluídos em PBS (50 µL/poço) e incubadas por 18 hs/TA. Em seguida, as placas foram lavadas e bloqueadas com 150 µL/poço com solução PBS contendo 1% de BSA por 1 h. Ao final, foram novamente lavadas e adicionados 50 µL/poço de IL-10 ou IL-6 recombinante assim como as amostras das culturas. Nova incubação de 2hs foi realizada seguida de lavagens e adição do anticorpo anti-IL-10 (800 ng/mL) ou anti-IL-6 marcados com biotina (200 ng/mL-50 µL/poço). As placas foram incubadas por 2h/TA, lavadas e adicionados 100 µL/poço do conjugado enzimático (estreptoavidina-peroxidase). Seguiu-se outra incubação de 20 minutos/TA, lavagens e a reação revelada, como descrito no item acima. A leitura feita em leitor de ELISA a 450 nm e a concentração de IL-10 ou IL-6 presente nos sobrenadantes das culturas de células foi determinada a partir da curva-padrão das citocinas recombinantes (2 a 0,06 ou 1 a 0,03 ng/mL, respectivamente).

3.17 ELISA para detecção de TNF

Placas de ELISA foram sensibilizadas com anticorpo anti-TNF na concentração de 0,8 µg/mL em Tampão Fosfato de sódio 0,2M pH 6,5 (100 µL/poço) e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente (TA). Após esse período, as placas foram lavadas com solução PBS+0,05% Tween 20 (PBST; Sigma) e bloqueadas com 200 µL/poço com solução PBST contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) por 1 hora.

Ao final da incubação, foram realizadas 4 lavagens com PBST e, em seguida, adicionados 50 µL/poço de TNF recombinante diluído na razão 1:2 (2 ng/mL) em PBS contendo 10% de SFB e as amostras de sobrenadantes de culturas. As placas

foram incubadas por 2 horas/TA e em seguida, foram lavadas em PBST. Anticorpo anti-TNF-biotinilado foi adicionado às placas (200 ng/mL-100 µL/poço) e realizada nova incubação de 1 h/TA. Outras quatro lavagens em PBST foram feitas e 100 µL/poço do conjugado enzimático (estreptoavidina-peroxidase) diluído em PBST + 10% de SFB foram adicionados. Nova incubação de 30 minutos/TA foi realizada.

Em seguida, outro ciclo de 4 lavagens foi feito e a reação revelada pela adição de 100 µL/poço do substrato contendo o cromógeno TMB, água oxigenada 30% (Sigma) em tampão fosfato de sódio bibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,2 M pH 5,0. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 0,2 M e a leitura feita em leitor de ELISA a 450 nm. O cálculo da concentração de TNF presente nos sobrenadantes das culturas de células foi realizado a partir da curva-padrão de TNF recombinante (2 a 0,06 ng/mL).

3.18 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de comparações múltiplas, segundo o método de Tukey (ZAR, 1974).

4 RESULTADOS

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

Com o objetivo de obter os componentes de alta e baixa massa molecular do extrato de *Ascaris suum*, amostras deste extrato bruto foram submetidas à cromatografia de gel filtração, utilizando a metodologia descrita por Faquim e Macedo (1998).

A figura 3 mostra o perfil de eluição protéica 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 baixo peso molecular (SOARES; MOTA; MACEDO, 1992; FAQUIM e MACEDO, 1998).

Os componentes do PI, os quais são responsáveis pela capacidade de inibir a resposta imune heteróloga, assim como os do PIII foram coletados e concentrados para posterior utilização nos diferentes protocolos experimentais.

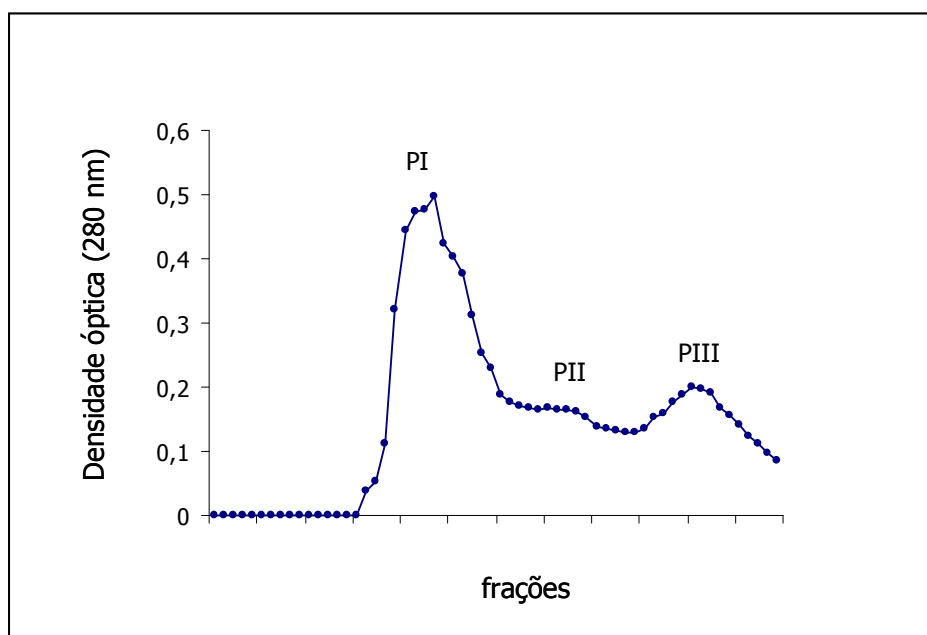


Figura 3. Perfil cromatográfico do extrato de *Ascaris suum* em coluna de gel filtração. O extrato de Asc (15 mg/mL) foi fracionado em coluna Sephacryl S-200. As frações foram coletadas e a concentração protéica analisada a 280 nm. Os picos I e III representam os componentes de alta e baixa massa molecular, respectivamente.

4.2 Cinética da expressão de TLRs na membrana de células totais de camundongos imunizados com OVA

O próximo objetivo foi avaliar a expressão dos TLRs nas células dos linfonodos de camundongos imunizados em diferentes dias. Para isto, grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com OVA na base da cauda. Após 3, 4, 5 e 6 dias da imunização, suspensões celulares foram preparadas a partir dos linfonodos inguinais e periaórticos e incubadas com anticorpos anti-TLR1, 2, 4 e 9 conjugados a FITC ou PE. Em seguida, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos foram comparados ao observado no grupo de camundongos não-imunizados.

Os resultados da figura 4 mostram que a porcentagem de células expressando os diferentes TLRs aumenta com o decorrer do tempo de imunização, apresentando, na maioria das vezes, pico máximo de expressão nos dias 5 e 6 pós-imunização quando comparado ao obtido nas células de camundongos não-imunizados.

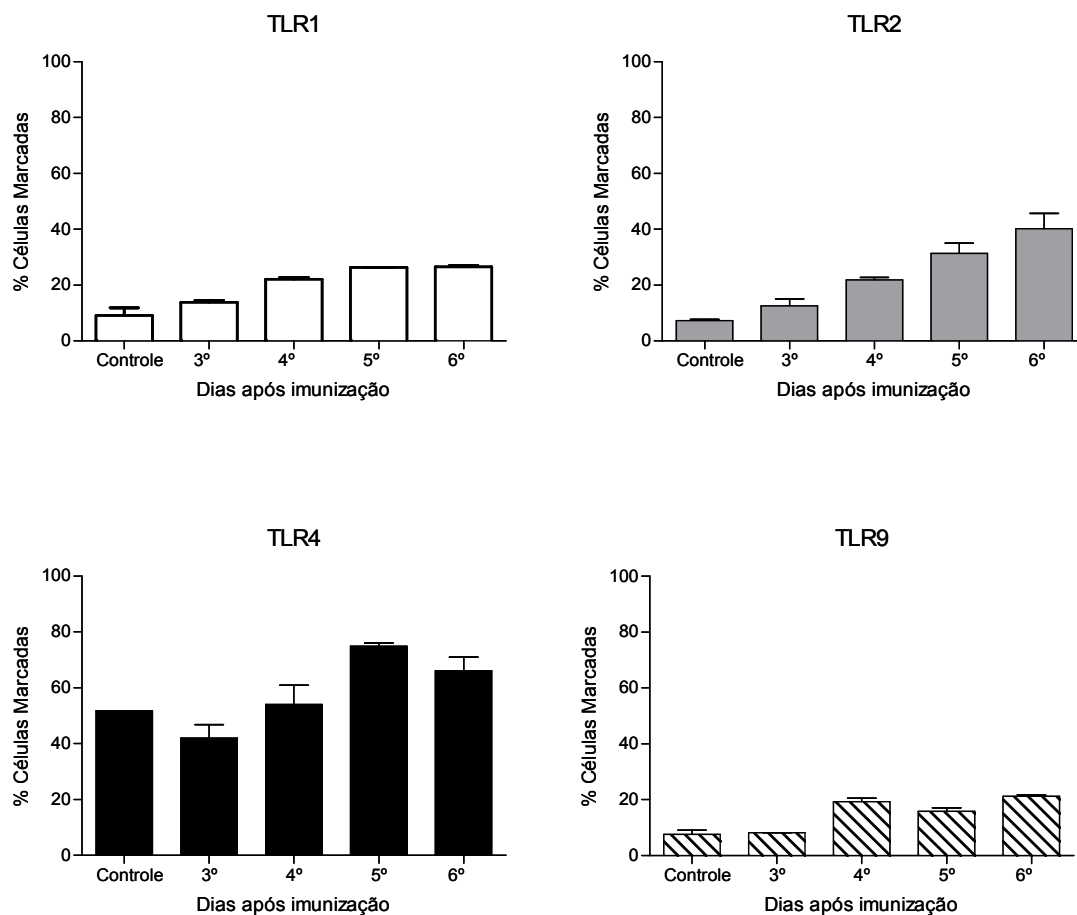


Figura 4. Porcentagem de células expressando TLR1, 2, 4 e 9 em células totais de camundongos imunizados com OVA.

Camundongos BALB/c foram imunizados com OVA (200 µg/animal). Após 3, 4, 5 e 6 dias de imunização, as suspensões celulares foram preparadas e incubadas com anticorpos anti-TLR1, TLR2, TLR4 e TLR9 ou controle isotípicos marcados com FITC ou PE e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos em média da porcentagem de células marcadas nas amostras em duplicata ± desvio padrão.

4.3 Efeito do PI na expressão de TLR 1, 2, 4 e 9 em células dendríticas de camundongos imunizados com OVA, PI ou OVA+PI

No contexto da imunossupressão induzida pelo PI, o próximo aspecto abordado foi estudar a capacidade desses componentes de modular a expressão dos diferentes TLRs nas células dendríticas. Para tanto, grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com OVA, OVA+PI ou PI em CFA. No 5º dia pós-imunização, as suspensões celulares foram preparadas a partir dos diferentes grupos experimentais e incubadas com anticorpo anti-CD11c-FITC e os anticorpos

anti-TLR1, 2, 4, ou TLR9-PE. Após a leitura das amostras em citômetro de fluxo, realizamos uma janela para selecionar a população CD11c⁺ e, então analisamos a expressão dos diferentes TLRs. Camundongos não-imunizados foram utilizados como controle.

Na figura 5 podemos observar aumento da expressão dos TLRs nas células dendríticas avaliadas de camundongos imunizados com OVA, quando comparada à obtida no grupo não-imunizado. Em contraste, com exceção do TLR 1 e 9 podemos verificar uma diminuição da expressão de TLR 2 e 4 nas células dos camundongos imunizados com OVA + PI ou PI comparado com o grupo imunizado somente com OVA.

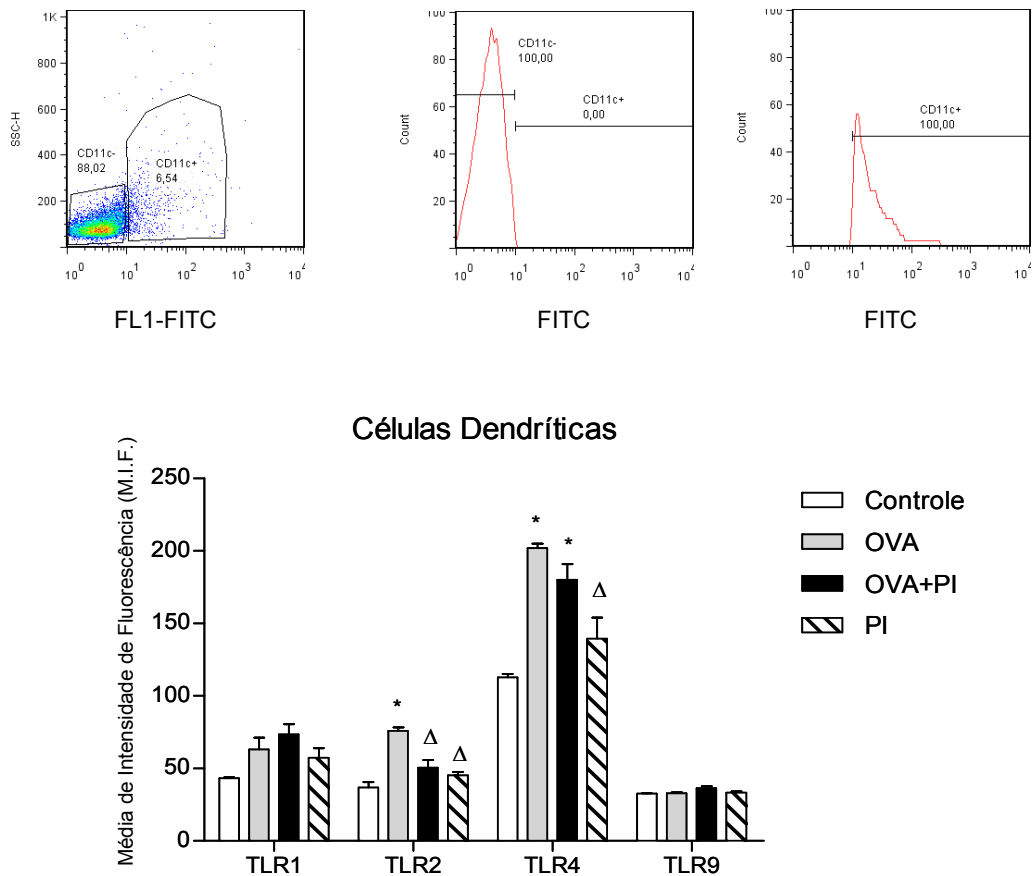


Figura 5. Expressão de TLR 1, 2, 4 ou 9 nas células CD11c⁺ de camundongos imunizados 5 dias antes com OVA, PI ou OVA+PI.

Camundongos BALB/c foram imunizados ou não com OVA (200 µg/animal), PI (200 ug/animal) ou OVA+PI (200 µg/animal) em CFA. No 5º dia pós-imunização, suspensões celulares foram preparadas e incubadas com anticorpos anti-CD11c-FITC e anti-TLR 1, 2, 4 ou 9-PE. Todas as amostras foram feitas em duplicata e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como a média geométrica da intensidade de fluorescência das amostras em duplicata \pm desvio padrão. Resultados representativos de 3 experimentos.

* p < 0,05 comparado ao grupo controle

Δ p < 0,05 grupo OVA+PI ou PI comparado ao grupo OVA.

4.4 Expressões de TLRs em células CD3⁺ e MHC de classe II⁺ purificadas de camundongos imunizados com OVA ou OVA+PI

Visto que a adição do PI na imunização dos camundongos com OVA inibiu o aumento da expressão de alguns TLRs na superfície das células dendríticas destes camundongos, decidimos avaliar se este efeito seria restrito às APCs ou se ocorreria também nos linfócitos T.

Camundongos BALB/c foram imunizados com OVA ou OVA+PI (200 µg/animal) e após 5 dias foram preparadas suspensões celulares a partir dos linfonodos inguinais e periaórticos. A partir destas suspensões, células TCD3⁺ foram purificadas por seleção positiva, utilizando anticorpo-biotinilado anti-CD3 e o conjugado de estreptoavidina-microesferas-magnéticas em coluna MidiMACS. A pureza da suspensão obtida foi avaliada em citômetro de fluxo e revelou a presença de 90% de células CD3⁺.

Células não-ligadas à coluna foram avaliadas em citômetro de fluxo quanto à expressão de moléculas de MHC de classe II e a análise mostrou a presença de 85% de células MHC-II⁺ nesta suspensão. Considerando estes resultados, estas duas populações foram, então incubadas com os anticorpos anti-TLR1, 4 ou 9-PE e a expressão dos receptores analisada por citometria de fluxo. Vale ressaltar, que não foi possível analisar a presença de TLR2 nessas células por falta do anticorpo anti-TLR2-PE no momento da realização do experimento.

Como pode ser visto na figura 6, células MHC de classe II⁺ de camundongos imunizados com OVA 5 dias antes apresentam alta expressão de TLR1, 4 e 9 em relação ao observado em células dos camundongos não-imunizados. Por outro lado, a expressão dos diferentes TLRs nas células MHC de classe II⁺ obtidas de camundongos imunizados com OVA e PI esteve semelhante à das células dos camundongos não-imunizados.

Analisando as células CD3⁺, verificamos que a expressão de todos os TLRs nesta população celular é muito menor em relação à observada nas células MHC de classe II⁺. Somado a isto, não pudemos observar diferença significativa na expressão de qualquer um destes receptores nas células CD3⁺ purificadas dos diferentes grupos experimentais em relação ao observado nas células de camundongos não-imunizados.

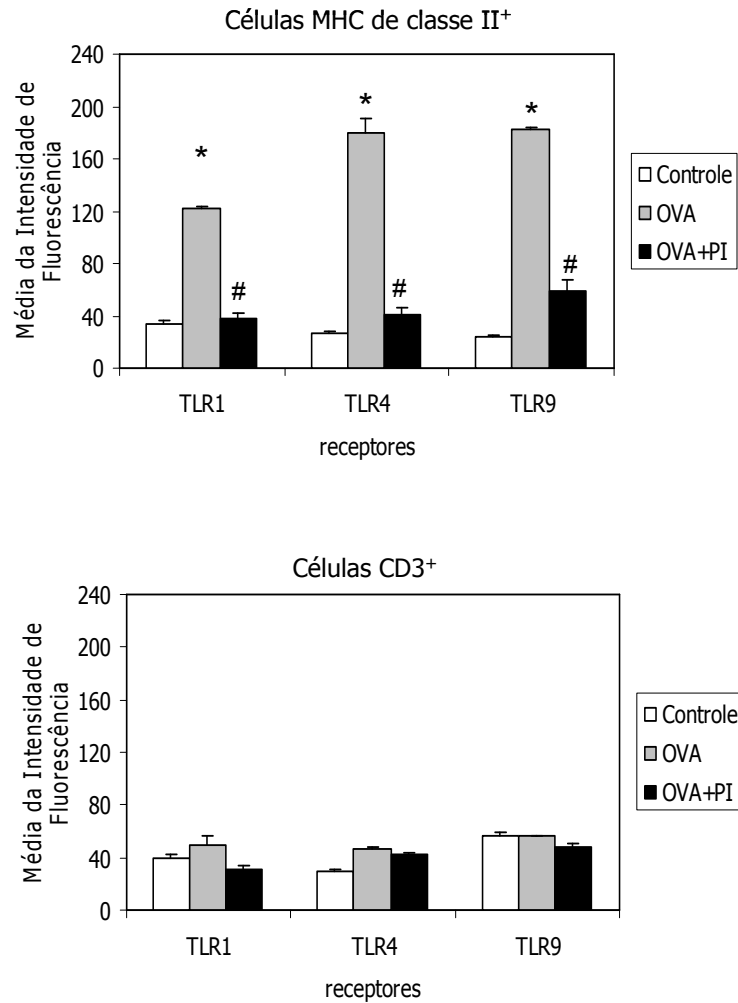


Figura 6. Expressão de TLR1, TLR4 e TLR9 em células MHC de classe II⁺ ou TCD3⁺ obtidas de camundongos imunizados ou não com OVA ou OVA+PI. Camundongos BALB/c foram imunizados com OVA ou OVA+PI e após 5 dias foi feita purificação das populações TCD3⁺ e MHC de classe II⁺. Estas células foram incubadas com anticorpos anti-TLR1, TLR4 e TLR9 –PE e analisadas em citômetro de fluxo. As amostras foram feitas em duplicata e os resultados expressos como a média da intensidade de fluorescência das amostras em duplicata ± desvio padrão. * p < 0,05 comparado ao grupo não-imunizado # p < 0,05 grupo OVA+PI comparado ao grupo de OVA.

4.5 Análise da expressão das moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras em células de camundongos imunizados com OVA emulsificada em CFA ou IFA

Considerando que adjuvantes utilizados nos diferentes modelos experimentais podem modular e direcionar a resposta imune e ainda, que o efeito do PI na resposta anti-OVA foi observado em camundongos imunizados com este antígeno emulsificado em CFA, realizamos um experimento para comparar o papel do CFA e IFA na expressão das moléculas MHC de classe II e coestimuladoras nas células obtidas dos camundongos imunizados com a OVA.

A figura 7 mostra os resultados obtidos, onde pode ser observado que a imunização dos camundongos com OVA emulsificada tanto com o CFA como o IFA induziu de forma semelhante aumento na expressão de moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras nas células obtidas destes animais em relação ao observado em células de camundongos não-imunizados.

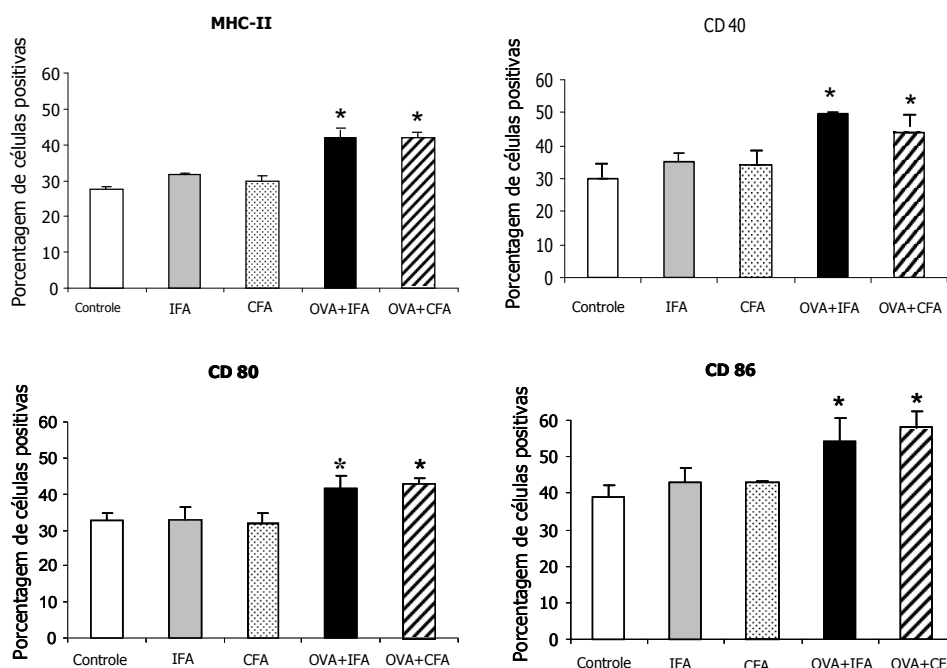


Figura 7. Expressão das moléculas MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86 nas células de camundongos BALB/c imunizados com OVA em CFA ou IFA.

Grupos de camundongos foram imunizados ou não com OVA em CFA ou IFA. Outros grupos receberam apenas os adjuvantes. Após 5 dias 1×10^6 células foram incubadas com anti-CD40, CD80, CD86 - PE ou anti-MHC-II-FITC e analisadas em citômetro de fluxo. Todas as amostras de células foram feitas em duplicata e os resultados expressos como a média da porcentagem de células positivamente marcadas \pm desvio padrão.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo não-imunizado

4.6 Efeito do PI na expressão das moléculas envolvidas com a apresentação antigênica em células de camundongos imunizados com OVA ou OVA+PI emulsificados em CFA ou IFA

O objetivo seguinte foi avaliar o efeito do PI na resposta anti-OVA induzida pela imunização dos camundongos com OVA+PI emulsificados em CFA ou IFA. No 5º dia de imunização, as suspensões celulares foram preparadas, incubadas com anticorpos anti-CD80, CD86-PE ou anti-MHC-II-FITC e analisadas em citômetro de fluxo.

Células de camundongos imunizados com OVA em CFA ou IFA apresentaram alta expressão de moléculas coestimuladoras em relação ao obtido nas células dos grupos não-imunizado ou imunizados apenas com os adjuvantes. Em contraste, verificamos menor expressão destas moléculas nas células dos camundongos imunizados com OVA+PI independentemente do adjuvante utilizado (Figura 8). Estes resultados ressaltam, portanto que o PI foi capaz de modular negativamente a expressão das moléculas de MHC de classe II e coestimuladoras nas células dos camundongos imunizados com os antígenos associados aos dois adjuvantes estudados.

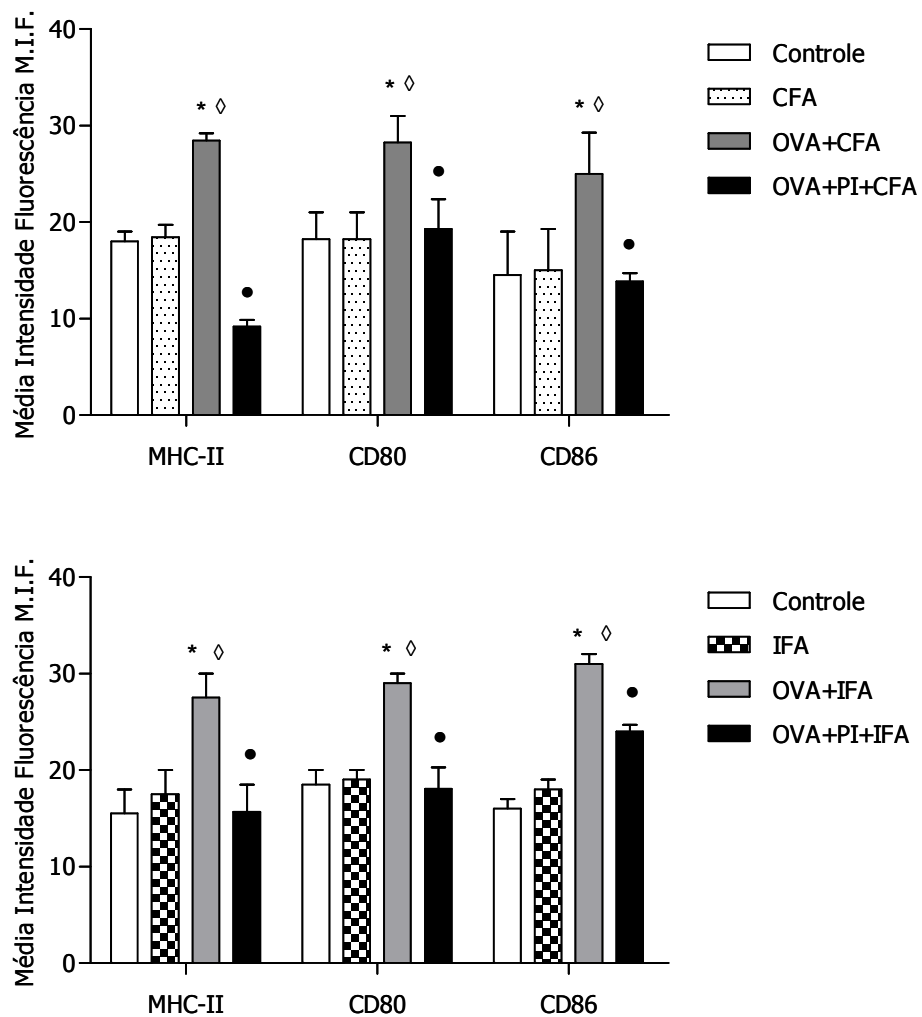


Figura 8. Expressão das moléculas de MHC de classe II, CD80 e CD86 nas células de camundongos BALB/c imunizados ou não com OVA ou OVA+PI em CFA ou IFA.

Suspensões celulares preparadas após 5 dias da imunização dos camundongos foram incubadas (10^6 células) com anti-CD80 ou CD86-PE ou anti-MHC-II-FITC e analisadas em citômetro de fluxo. Todas as amostras de células foram feitas em duplicata e os resultados expressos como a média da intensidade de fluorescência \pm desvio padrão. Resultados representativos de 2 experimentos.

* $p < 0,05$ grupo OVA comparado ao grupo Controle

● $p < 0,05$ grupo OVA+PI comparado ao grupo OVA

◇ $p < 0,05$ grupo OVA comparado ao grupo CFA ou IFA

4.7 Estudo da participação de TLR2 ou TLR4 na supressão da resposta anti-OVA induzida pelos componentes do PI

4.7.1 Reação de hipersensibilidade tardia

Com o objetivo de avaliar *in vivo* o efeito supressivo do PI na resposta imune celular a OVA, camundongos WT ou TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} foram imunizados na base da cauda com OVA ou OVA+PI. Passados 8 dias da imunização, os animais foram desafiados no coxim plantar com OVA agregada e avaliada a reação de hipersensibilidade tardia (HT) 24 horas após o desafio (FERREIRA, 1995).

A figura 9 mostra a resposta anti-OVA desencadeada nos diferentes grupos de imunização, onde observamos maior reação nos grupos de camundongos WT, TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} imunizados com OVA quando comparado aos grupos controles não-imunizados e somente desafiados com OVA. Pudemos verificar também, que tanto a reação tardia esteve diminuída em todos os grupos de camundongos que receberam OVA+PI quando comparado aos grupos imunizados somente com OVA.

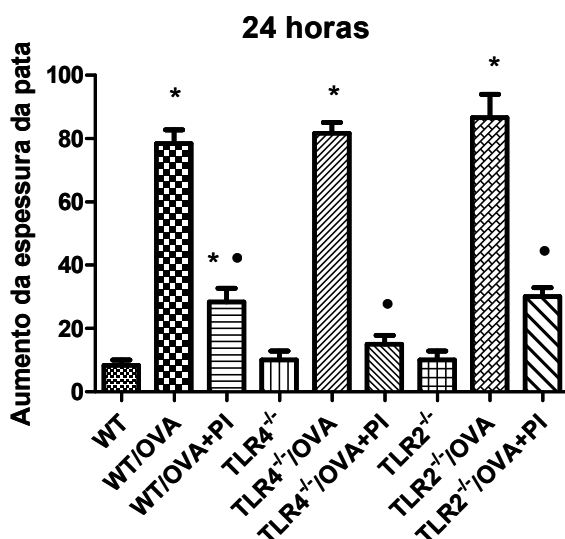


Figura 9. Reação de hipersensibilidade tardia anti-OVA em camundongos C57BL/6 WT, TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} imunizados com OVA ou OVA+PI.

Grupos de camundongos foram imunizados ou não com OVA (100 µg/animal) ou OVA+PI (200 µg/animal) em CFA s.c na base da cauda. No 8º dia pós-imunização, todos os grupos foram desafiados com OVA agregada no coxim plantar direito e receberam PBS no contralateral. A espessura das patas foi medida 24 horas pós-desafio. Os resultados representam a média da diferença entre as medidas das patas obtida de 5 animais/grupo ± desvio padrão.

* p <0,05 grupos OVA ou OVA+PI comparados ao grupo Controle

● p <0,05 grupos OVA+PI comparados aos grupos OVA

4.7.2 Resposta imune humoral OVA-específica

Visto que PI foi capaz de suprimir a resposta celular anti-OVA tanto nos camundongos WT como deficientes em TLR2 ou TLR4, analisamos a produção de anticorpos anti-OVA nos soros dos camundongos. Para tanto, após a medida das patas dos grupos experimentais 24 horas pós-desafio, estes foram sangrados para a posterior avaliação dos anticorpos produzidos em resposta a OVA.

Na figura 10 podemos verificar altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA nos soros dos animais imunizados com este antígeno em relação ao observado nos animais não-imunizados. Por outro lado, verificamos níveis menores destes anticorpos OVA-específicos nos grupos de camundongos WT, TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} imunizados com OVA+PI.

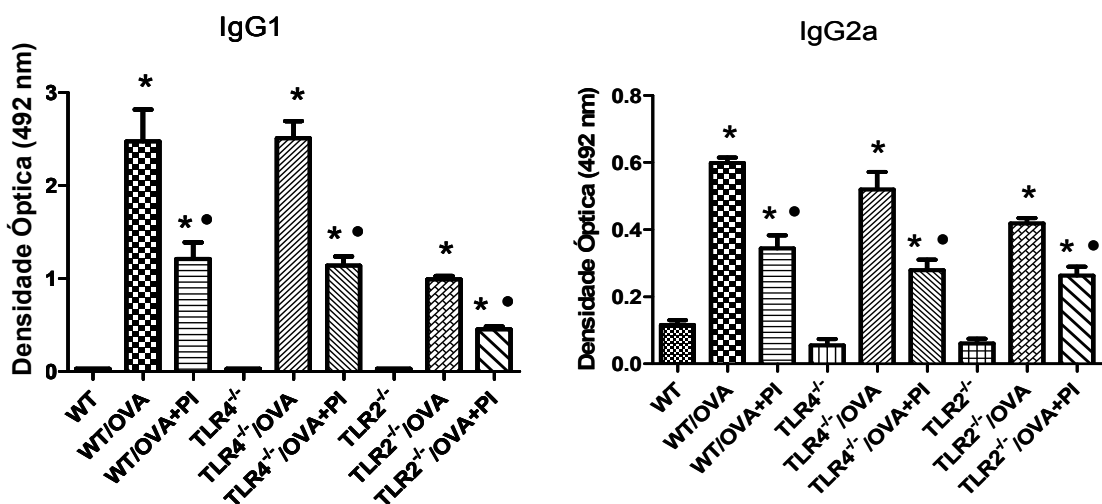


Figura 10. Produção de anticorpos IgG1 e IgG2a em soros de camundongos C57BL/6 WT, TLR2 ou TLR4 imunizados com OVA ou OVA+PI em CFA. Camundongos C57BL/6 WT, TLR4^{-/-} ou TLR2^{-/-} previamente imunizados com OVA (100 µg/animal) ou OVA+PI (200 µg/animal) em CFA, na base da cauda, foram sangrados 8 dias após a imunização pelo plexo oftálmico. A produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA foi avaliada por ELISA. Os resultados representam a média da densidade óptica (D.O.) obtida dos 5 animais/grupo ± desvio padrão.

* p < 0,05 grupos OVA ou OVA+PI comparados ao grupo controle

• p < 0,05 grupos OVA+PI comparados aos grupos OVA

4.7.3 Expressão das moléculas de MHC de classe II e coestimuladoras em células de camundongos imunizados com OVA ou OVA+PI

Com o objetivo de investigar se TLR4 ou TLR2 expressos na superfície das APCs estariam envolvidos no efeito modulador do PI, imunizamos camundongos WT, TLR4^{-/-} TLR2^{-/-} com OVA ou OVA+PI em CFA. No 5º dia pós-imunização, os camundongos foram sacrificados e suspensões celulares foram preparadas a partir dos linfonodos inguinais e periaórticos. Nestas suspensões avaliamos a expressão das moléculas de classe II do MHC, CD80 e CD86 nas células, utilizando o citômetro de fluxo. Suspensão celular de camundongos não imunizados foi também preparada e da mesma forma analisada por citometria de fluxo.

Podemos observar na figura 11 aumento da expressão das moléculas MHC de classe II e coestimuladoras nas células de camundongos WT imunizados com OVA quando comparado ao verificado nas células dos camundongos não-imunizados. No entanto, não observamos este aumento na expressão destas moléculas nas células de camundongos WT imunizados com OVA+PI.

Com relação à imunização dos camundongos TLR4^{-/-}, observamos aumento da expressão de todas as moléculas avaliadas nas células dos camundongos imunizados com OVA comparada com a obtida nas células dos animais não-imunizados. Além disso, pudemos verificar que a adição do PI na imunização com a OVA foi capaz de inibir a expressão de todas as moléculas envolvidas com a apresentação antigênica nas células dos camundongos, como mostra a figura 11. Em conjunto, estes resultados demonstram a ação inibitória do PI na expressão destas moléculas nas células tanto de camundongos WT como TLR4^{-/-} sugerindo assim, que este efeito independe da presença deste receptor neste modelo experimental.

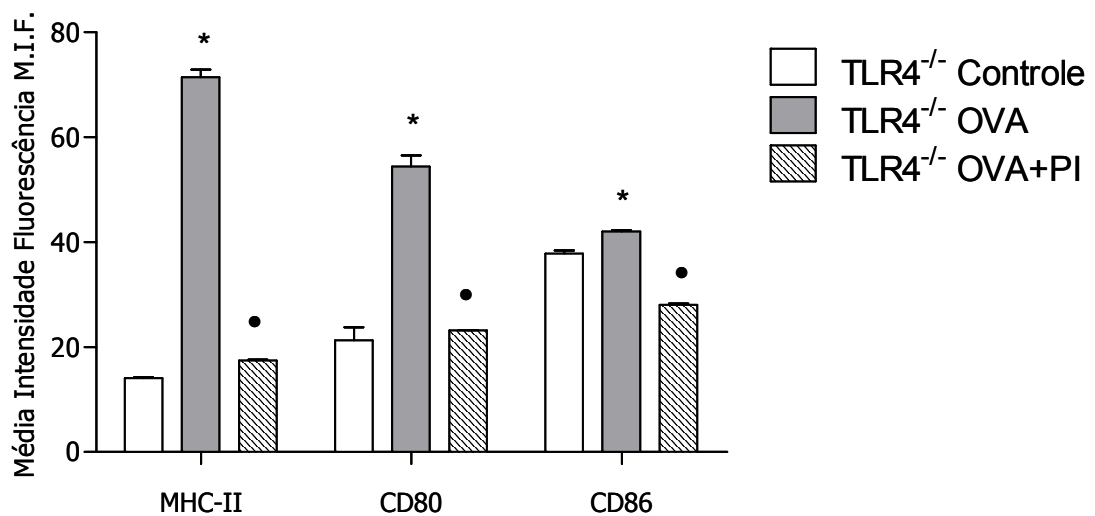
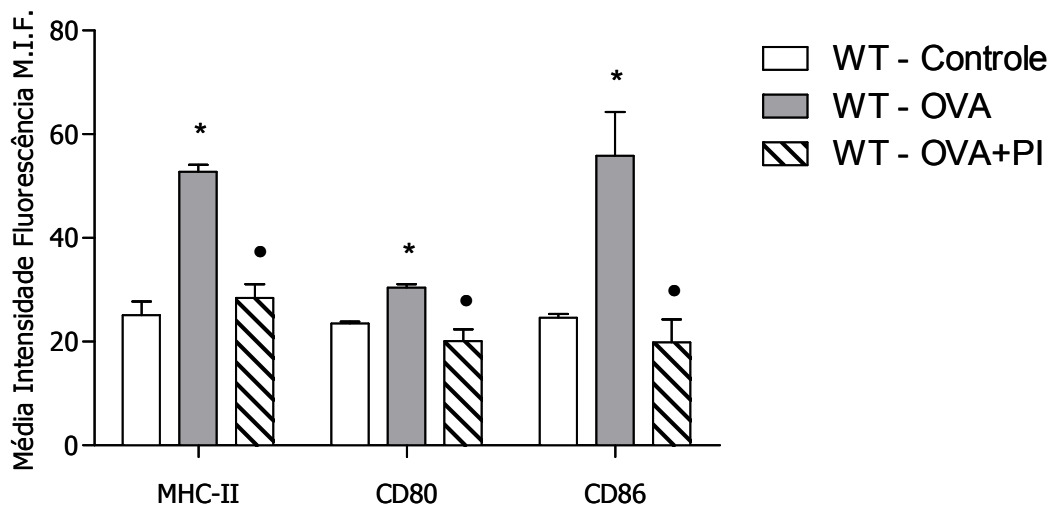


Figura 11. Expressão das moléculas de MHC-II, CD80 e CD86 nas células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT ou TLR4^{-/-} imunizados com OVA ou OVA+PI em CFA. Após 5 dias da imunização, suspensões celulares foram preparadas destes animais e incubadas (10⁶ células) com anticorpos anti-MHC-II-FITC, anti-CD80 e anti-CD86-PE ou controle isotípicos-FITC e PE. As amostras foram feitas em duplicata e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados representam a média da intensidade de fluorescência ± desvio padrão. Resultados representativos de 3 experimentos.
 * p < 0,05 grupo OVA comparado ao grupo Controle
 • p < 0,05 grupo OVA+PI comparado ao grupo OVA

A participação do TLR2 no efeito do PI sobre as APCs também foi estudada. Pudemos observar na figura 12 que a imunização de camundongos WT com OVA induziu o aumento da expressão de MHC-II e moléculas coestimuladoras nas células dos camundongos quando comparado com células de camundongos não-imunizados. Por outro lado, verificamos novamente que o PI quando injetado juntamente com a OVA impediu esse aumento da expressão das moléculas de MHC de classe II, CD80 e CD86 pelas células linfóides dos camundongos WT.

Quanto à análise da expressão destas moléculas nas células dos camundongos TLR2^{-/-}, evidenciamos que a imunização com OVA+PI resultou em menor expressão das moléculas estudadas nas células obtidas destes camundongos em relação à observada nas células de camundongos imunizados com a OVA (Figura 12). Estas observações indicam, portanto que o TLR2 não participa desse processo de modulação induzido pelo PI na expressão das moléculas envolvidas na apresentação antigênica nas APCs.

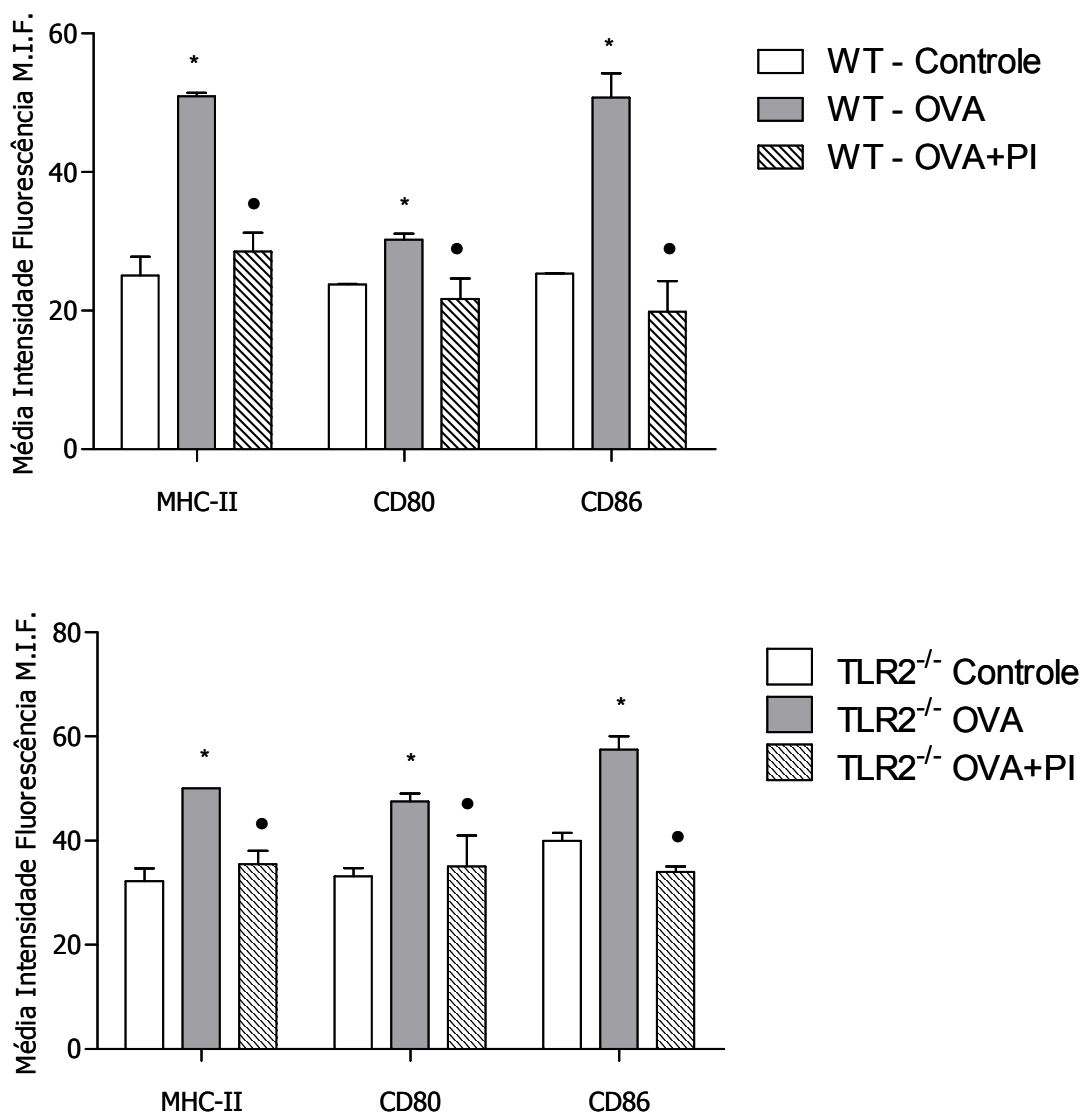


Figura 12. Expressão das moléculas envolvidas na apresentação antigênica nas células dos linfonodos de camundongos C57BL/6 WT ou TLR2^{-/-} imunizados com OVA ou OVA+PI em CFA.

Suspensões celulares foram preparadas a partir dos linfonodos de camundongos imunizados ou não com OVA ou OVA+PI (200 µg/animal) em CFA 5 dias antes e foram (10⁶ células) incubadas com os anticorpos anti-MHCII-FITC, anti-CD80 e anti-CD86-PE. As amostras foram feitas em duplicata e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados representam a média da intensidade de fluorescência ± desvio padrão. Resultados representativos de 3 experimentos.

* p < 0,05 grupo WT ou TLR2^{-/-} OVA comparado ao grupo controle WT ou TLR2^{-/-}

• p < 0,05 grupo WT ou TLR2^{-/-} OVA+PI comparado ao grupo WT ou TLR2^{-/-} OVA

4.8 Avaliação do efeito do PI no processo de maturação de células dendríticas estimuladas *in vitro* com ligantes de TLR4 e TLR3 (LPS e Poly I:C)

Visto que as células dendríticas são fundamentais para a geração da resposta adaptativa, estudamos o efeito do PI no processo de maturação destas células diferenciadas *in vitro* com GM-CSF e IL-4 a partir de medula óssea de camundongos BALB/c. Estas células imaturas foram estimuladas *in vitro* com dois ligantes de TLRs: o LPS (TLR4) e Poly I:C (TLR3) (YOUNG-IK, 2002; GEIJTENBEEK, 2003).

A ativação/maturação das células dendríticas foi avaliada considerando o aumento da expressão das moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras. Também foi estudada a secreção de IL-12, IL-6, TNF- α e IL-10 nestas culturas celulares.

Quanto às características fenotípicas das células diferenciadas *in vitro* com GM-CSF/IL-4, pudemos verificar em nossos experimentos, que cerca de 90% delas expressam os marcadores CD11c e CD11b, os quais são característicos de células dendríticas (VAN LIEMPT, 2007). Além disso, observamos a expressão de moléculas de classe II do MHC, CD40, CD80, CD83, CD86 e de TLR1, 2, 4 e DC-SIGN na superfície destas células, como mostra a figura 13. A baixa expressão de CD83 ressalta o estado imaturo destas células, conforme revisado por Lechmann (2002).

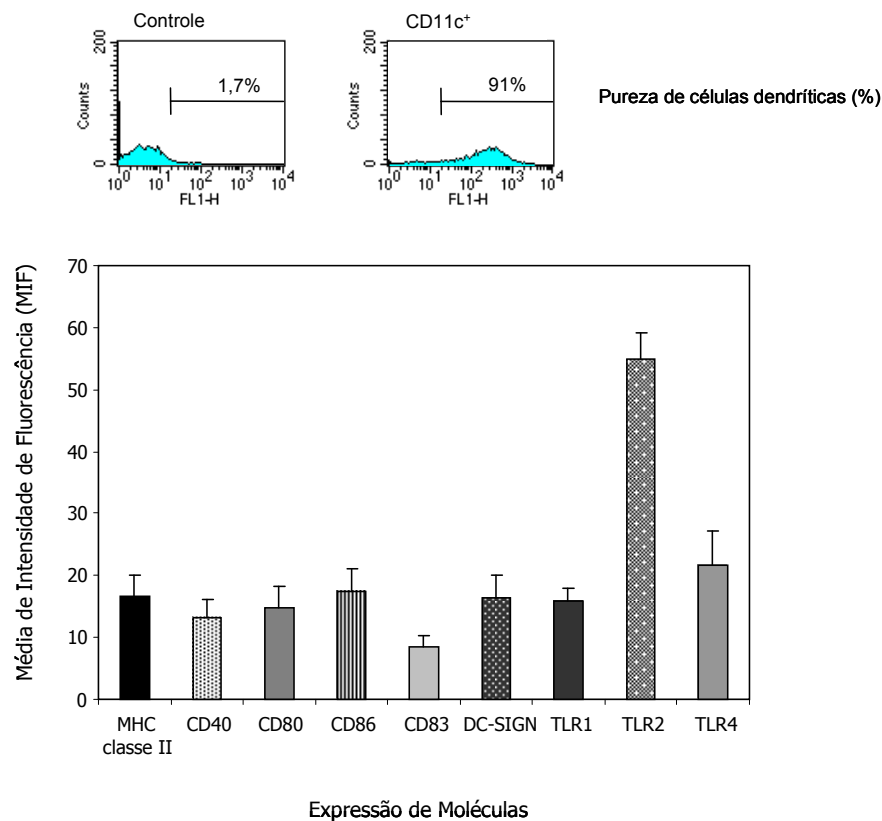


Figura 13- Fenótipo das células imaturas diferenciadas *in vitro* por 7 dias com GM-CSF/IL-4.

Células dendríticas foram diferenciadas *in vitro* com GM-CSF e IL-4 (10 e 5 ng/mL) a partir de medula óssea de camundongos BALB/c. Ao final deste período, 1×10^6 células foram incubadas com anticorpos anti-MHC-II-FITC, anti-CD40, CD80, CD86, CD83, DC-SIGN, TLR1, TLR2 ou TLR4 marcados com PE. As amostras foram feitas em duplicata e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados representam a média da intensidade de fluorescência \pm desvio padrão.

Podemos verificar na figura 14, que a incubação destas células por 18 horas com LPS promoveu aumento da expressão das moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras quando comparado ao observado nas células não-estimuladas. Além disso, foi possível verificar que tanto 1 como 10 μ g deste ligante de TLR4 foi capaz de induzir a maturação destas células.

Na estimulação com Poly I:C (ligante de TLR3), também observamos aumento na expressão das moléculas avaliadas nas células dendríticas, o que novamente demonstra a ativação celular e diferenciação em células maduras.

Com respeito ao efeito do PI no processo de maturação destas células observamos na figura 14, que houve menor expressão de moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras nas células que foram estimuladas com LPS+PI em relação

à incubação somente com o LPS. Vale ressaltar, que o efeito inibitório do PI foi observado nas células incubadas tanto com 1 como com 10 µg/mL de LPS.

Pudemos verificar ainda, que o PI não induziu aumento da expressão de todas as moléculas avaliadas nas células dendríticas, o que sugere que a adição destes componentes não promove a sua maturação mantendo-as, portanto no estado imaturo.

Em relação ao estímulo com Poly I:C, foi visto que o PI não teve capacidade de inibir o processo de ativação destas células induzida pelo Poly I:C e com isso observamos aumento da expressão das moléculas CD40, CD80 e CD86. . Estes resultados foram obtidos com as células estimuladas com 20 µg/mL de Poly I:C, no entanto quando incubamos as células com 10 µg/mL do ligante de TLR3, verificamos que o PI inibiu a expressão de todas as moléculas estudadas nas células dendríticas.

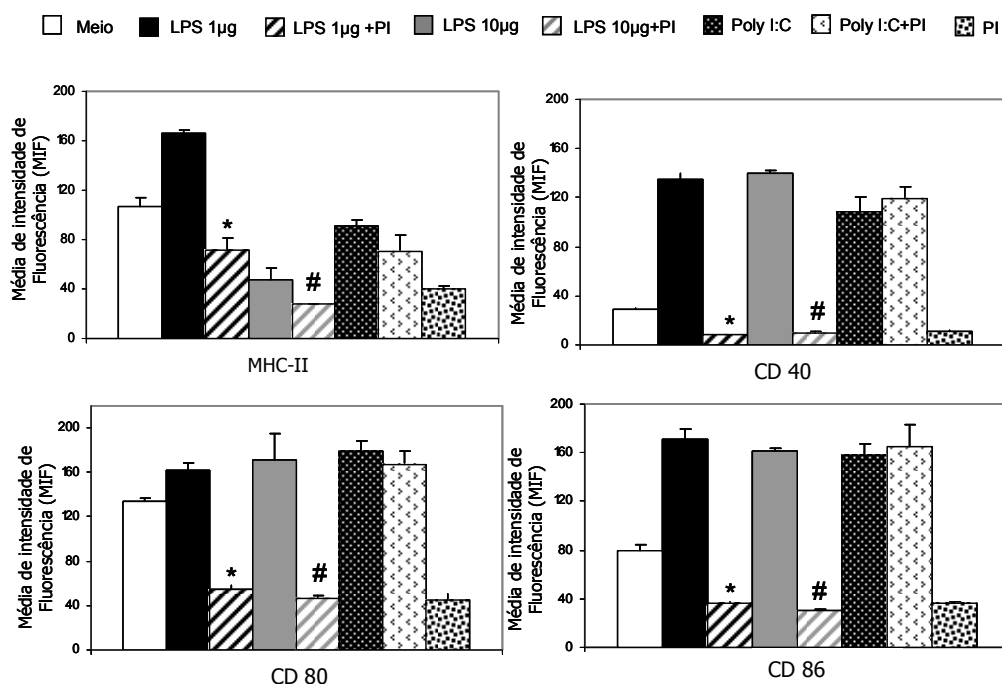


Figura 14- Efeito do PI na expressão das moléculas MHC-II e coestimuladoras em células diferenciadas *in vitro* e estimuladas com ligantes de TLR3 e TLR4. Células imaturas diferenciadas *in vitro* foram estimuladas com LPS (1 ou 10 µg/mL), LPS+PI (1, 10 + 200 µg/mL), Poly I:C (20 µg/mL), Poly I:C+PI (20 + 200 µg/mL) e PI (200 µg/mL) por 18hs. Após esse período, 1×10^6 células foram incubadas com os anti- MHC-II-FITC, anti-CD40, CD80 e CD86-PE. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados expressos como a média de intensidade de fluorescência (MIF) \pm desvio padrão. Resultados representativos de 3 experimentos
 * $p < 0,05$ grupo LPS 1 µg+PI comparado ao grupo LPS (1 µg)
 # $p < 0,05$ grupo LPS 10 µg +PI comparado ao grupo LPS (10 µg)

Quanto à presença de IL-12, IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes das culturas das células dendríticas, observamos que o LPS (1 µg/mL) induziu aumento significativo na secreção destas citocinas *in vitro*. O LPS também promoveu aumento da secreção de TNF-α pelas células dendríticas, porém a adição de PI à cultura não alterou a secreção deste mediador pró-inflamatório (dados não-mostrados). Em contraste, quando o PI foi adicionado juntamente com o LPS à cultura celular, a secreção tanto de IL-12 como IL-6 e IL-10 estiveram diminuídas (Figura 15).

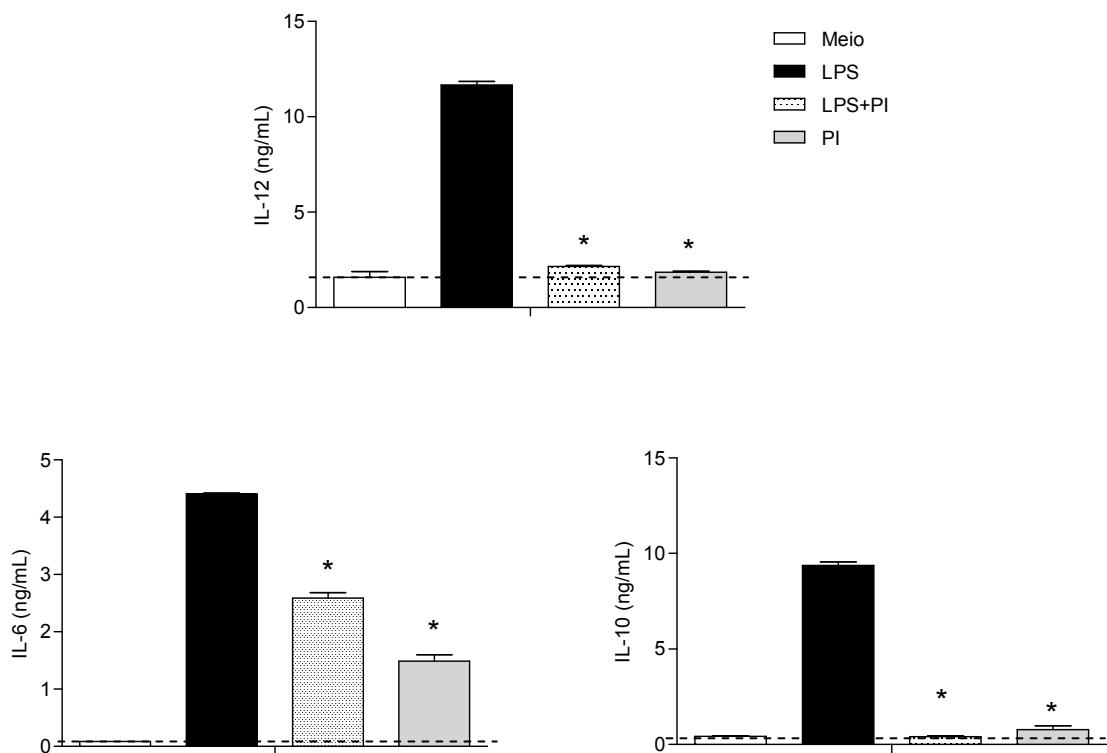


Figura 15- Produção de IL-6, IL10 e IL-12 nas culturas de células dendríticas diferenciadas *in vitro* e estimuladas com LPS, PI ou LPS+PI.

Células de medula óssea de camundongos BALB/c foram diferenciadas *in vitro* com GM-CSF/IL-4 durante 7 dias e estimuladas com LPS (1 µg/mL), PI (200 µg/mL) ou LPS+PI (1 e 200 µg/mL) por 18 hs. A concentração de IL-6, IL-10 e IL-12 presente nos sobrenadantes das culturas celulares foi avaliada por ELISA e determinadas a partir da curva-padrão das citocinas recombinantes. Resultados representativos de 4 experimentos.

* p < 0,05 grupo LPS+PI e PI comparados ao grupo LPS

4.9 Avaliações do efeito dos componentes de baixa massa molecular do Asc (PIII) no processo de maturação de células dendríticas estimuladas *in vitro* com ligante de TLR4

A fim de comprovar que a capacidade de modular a maturação das células dendríticas induzida por ligantes de TLRs é uma propriedade dos componentes do PI, realizamos experimento *in vitro* onde incubamos as células imaturas com LPS, LPS+PIII ou somente o PIII e avaliamos a expressão das moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras nestas células.

Os resultados obtidos mostram aumento de expressão de todas as moléculas estudadas nas células que foram incubadas com LPS e também nas células incubadas com PIII, com exceção da molécula CD86. Além disto, verificamos que a adição do PIII na cultura de células dendríticas estimuladas com LPS não alterou o efeito deste ligante de TLR4, como mostra a figura 16.

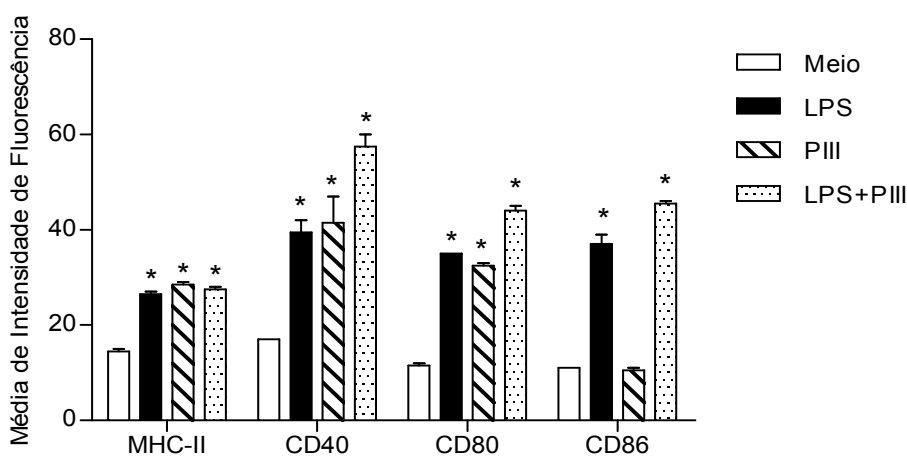


Figura 16- Efeito do PIII na expressão das moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras em células dendríticas estimuladas *in vitro* com ligante de TLR4

Células de medula óssea de camundongos BALB/c diferenciadas *in vitro* por 7 dias com GM-CSF/IL-4 foram estimuladas com LPS (1 µg/mL), PIII (200 µg/mL) ou LPS+PIII (1 e 200 µg/mL) por 18hs. Após esse período, 1×10^6 células foram incubadas com os anticorpos anti-MHC de classe II-FITC, anti-CD40, CD80 e CD86-PE. Todas as incubações foram feitas em duplicata e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados expressos como a média de intensidade de fluorescência (MIF) \pm desvio padrão.

* $p < 0,001$ grupo LPS, LPS+PIII ou PIII comparados ao meio

4.10 Efeito do PI na expressão das moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras em células dendríticas de camundongos WT, TLR4^{-/-} ou TLR2^{-/-} diferenciadas *in vitro* e estimuladas com ligante de TLR 2, 3 e 4

Considerando o objetivo do projeto de estudar os mecanismos envolvidos no efeito do PI nas células dendríticas, avaliamos o papel do TLR4 neste processo.

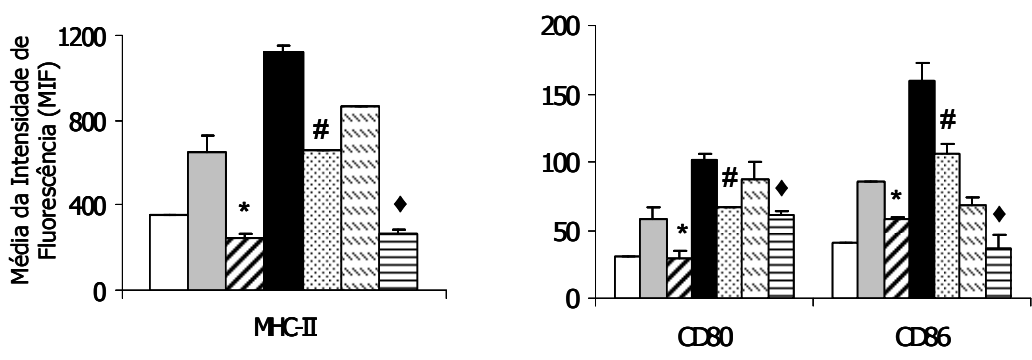
Células dendríticas foram diferenciadas *in vitro* a partir da medula óssea de camundongos WT, TLR4^{-/-} ou TLR2^{-/-} e estimuladas com LPS, Pam3, Pam3+PI, Poly I:C ou Poly I:C+PI, por 18 hs. Após este período, todas as células foram coletadas, incubadas com os anticorpos anti-MHC de classe II-FITC, CD80 e CD86-PE e em seguida analisadas por citometria de fluxo.

A figura 17 mostra as análises de expressão destas moléculas nas células estimuladas com os agonistas de TLR4, 2 e 3 na presença ou não de PI. Pudemos observar que o LPS, Pam3 e Poly I:C foram capazes de promover aumento da expressão de todas as moléculas avaliadas nas células diferenciadas de camundongos WT. Entretanto, quando foi adicionado o PI às culturas juntamente com estes ligantes de TLR2, 3 e 4 este aumento não foi observado.

Nas culturas de células dendríticas diferenciadas a partir de medula óssea de camundongos TLR4^{-/-}, tanto o Pam3 como o Poly I:C (ligantes de TLR2 e 3) induziram a maturação destas células. Em contrapartida, o PI foi capaz de inibir este efeito dos ligantes de TLR2 e 3 mesmo na ausência do TLR4 (Figura 17).

Estes resultados reforçam, portanto que o PI exerce importante efeito modulador nas células dendríticas, via mecanismo independente de TLR4.

WT- Meio
 WT- LPS
 WT- LPS+PI
 WT-Pam3
 WT-Pam3+PI
 WT- Poly I:C
 WT- Poly I:C+PI



TLR4^{-/-} Meio
 TLR4^{-/-} Pam3
 TLR4^{-/-} Pam3+PI
 TLR4^{-/-} Poly I:C
 TLR4^{-/-} Poly I:C+PI

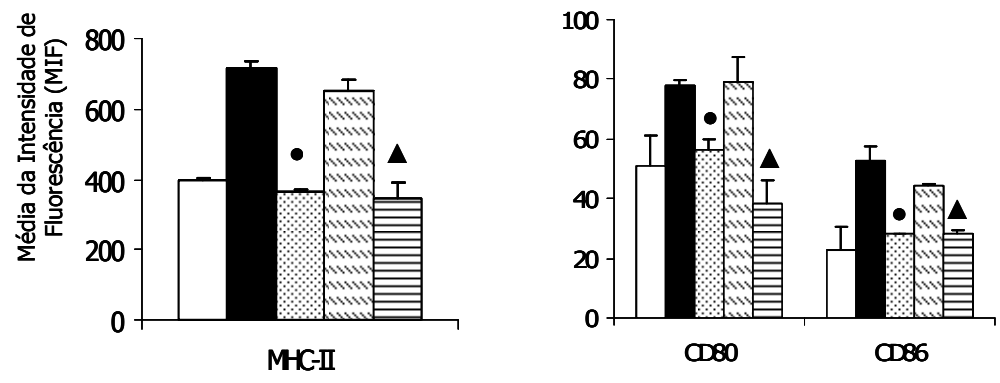


Figura 17- Efeito do PI na expressão das moléculas envolvidas na apresentação antigênica em células dendríticas de camundongos WT ou TLR4^{-/-} diferenciadas *in vitro* e estimuladas com ligantes de TLR2, TLR3 e TLR4.

Células de medula óssea de camundongos WT ou TLR4^{-/-} diferenciadas *in vitro* com GM-CSF e IL-4 foram estimuladas com LPS (1 µg/mL), Pam3 (3 µg/mL), Pam3+PI (3 e 200 µg/mL), Poly I:C (10 µg/mL) ou Poly I:C+PI (10 e 200 µg/mL), por 18 hs. Após este período, foram incubadas (1x10⁶) com os anticorpos anti- MHC de classe II-FITC, CD80 e CD86-PE. Todas as incubações foram feitas em duplicata e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados expressos como média da intensidade de fluorescência ± desvio padrão.

Resultados representativos de 2 experimentos.

* p < 0,05 grupo LPS+PI comparado ao grupo LPS (WT)

p < 0,05 grupo Pam3+PI comparado ao grupo Pam3 (WT)

◆ p < 0,05 grupo Poly I:C+PI comparado ao grupo Poly I:C (WT)

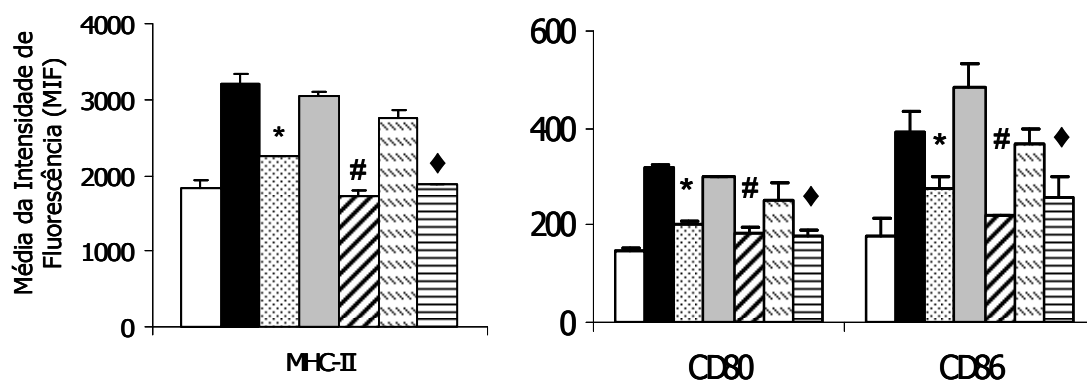
● p < 0,05 grupo Pam3+PI comparado ao grupo Pam3 (TLR4^{-/-})

▲ p < 0,05 grupo Poly I:C+PI comparado ao grupo Poly I:C (TLR4^{-/-})

Em outro experimento realizado com as células diferenciadas *in vitro* a partir de medula óssea de camundongo WT ou TLR2^{-/-} e estimuladas com agonistas de TLR2, 3 e 4, evidenciamos novamente alta expressão de todas as moléculas avaliadas nas células de camundongos WT que foram incubadas com LPS, Pam3 ou Poly I:C (Figura 18). Em contraste, nas culturas celulares incubadas com o PI e os ligantes de TLR2, 3 e 4, não foi observado este aumento na expressão das moléculas de MHC-II e coestimuladoras nas células.

Nas culturas de células de camundongos TLR2^{-/-}, pôde ser verificado aumento da expressão de todas as moléculas estudadas quando estas células foram incubadas com LPS ou Poly I:C. Além disto, verificamos que a adição de PI juntamente com o LPS ou o Poly I:C às culturas resultou na baixa expressão das moléculas de MHC-II e coestimuladoras pelas células TLR2^{-/-}, indicando assim que mesmo na ausência do TLR2, o PI foi capaz de interferir no processo de maturação das células dendríticas (Figura 18).

WT- Meio
 WT-Pam3
 WT-Pam3+PI
 WT- LPS
 WT- LPS+PI
 WT- Poly I:C
 WT- Poly I:C+PI



TLR2^{-/-} Meio
 TLR2^{-/-} LPS
 TLR2^{-/-} LPS+PI
 TLR2^{-/-} Poly I:C
 TLR2^{-/-} Poly I:C+PI

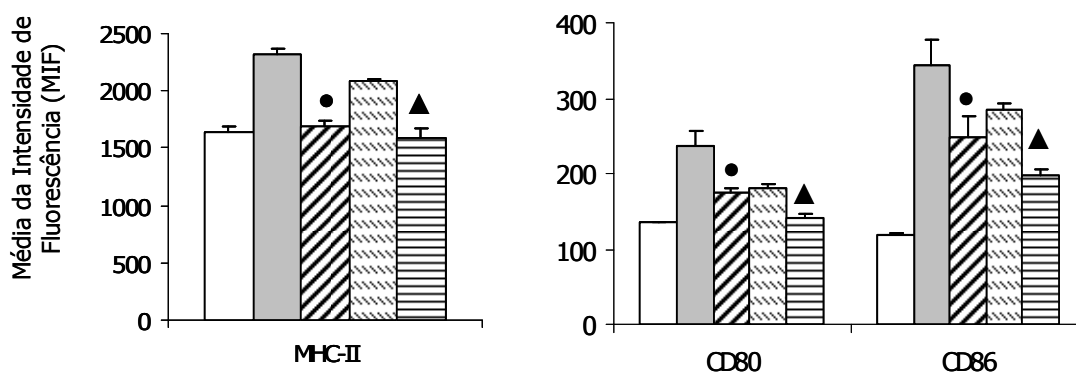


Figura 18- Efeito do PI na expressão das moléculas de classe II do MHC e coestimuladoras nas células dendríticas de camundongos WT ou TLR2^{-/-} diferenciadas e estimuladas *in vitro* com ligantes de TLR2, 3 e 4.

Células dendríticas diferenciadas *in vitro* com GM-CSF/IL-4 foram estimuladas com LPS (1 µg/mL), Pam3 (3 µg/mL), LPS+PI (1 e 200 µg/mL) ou Pam3+PI (3 e 200 µg/mL) Poly I:C (10 µg/mL) ou Poly I:C+PI (10 e 200 µg/mL) por 18 hs. Em seguida, 1x10⁶ células foram incubadas com os anticorpos anti- MHCII-FITC, anti-CD40, CD80 e CD86-PE. Todas as incubações foram feitas em duplicatas e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como a média da intensidade de fluorescência ± desvio padrão. Resultados representativos de 3 experimentos.

* p < 0,05 grupo Pam3+PI comparado ao grupo Pam3 (WT)

p < 0,05 grupo LPS+PI comparado ao grupo LPS (WT)

♦ p < 0,05 grupo Poly I:C+PI comparado ao grupo Poly I:C (WT)

● p < 0,05 grupo LPS+PI comparado ao grupo LPS (TLR2^{-/-})

▲ p < 0,05 grupo Poly I:C+PI comparado ao grupo Poly I:C (TLR2^{-/-})

Na figura 19 estão representados os resultados de detecção das diferentes citocinas nos sobrenadantes das culturas de células estimuladas com os diversos ligantes de TLRs. Podemos observar aumento da produção de IL-12 e IL-6 nas células dos camundongos WT incubadas com LPS, Pam3 e Poly I:C em relação ao obtido nas células mantidas somente com meio de cultura. Por outro lado, a adição do PI à estas culturas de células juntamente com LPS, Pam3 e Poly I:C resultou na menor secreção tanto de IL-12 como de IL-6.

Com relação a IL-10, observa-se maior produção desta citocina pelas células estimuladas com os ligantes de TLR4, 2 e 3 em relação ao obtido nas células imaturas. Aumento na secreção desta citocina foi observado quando o PI foi adicionado juntamente com o Poly I:C ou Pam3 às células. Por outro lado, nas culturas de células incubadas com LPS e PI observamos menor produção de IL-10 quando comparada à obtida nas células somente estimuladas com o LPS.

Nas culturas das células dendríticas diferenciadas de camundongos TLR2^{-/-} verificamos que a incubação com LPS resultou no aumento da produção de IL-10, IL-6 e IL-12 comparada à das células mantidas em meio de cultura. Além disso, pôde ser observado aumento da produção de IL-10 e diminuição de IL-6 e IL-12 nas culturas de células TLR2^{-/-} incubadas com o PI e LPS em relação ao obtido nas células estimuladas somente com o LPS.

Quando avaliada a secreção das citocinas nas culturas de células TLR4^{-/-}, verificamos que a incubação com Poly I:C induziu a produção de IL-10, IL-6 e IL-12 em relação às células imaturas (mantidas em meio de cultura). Nas culturas incubadas com Poly I:C e PI verificou-se aumento de IL-10 e diminuição de IL-6 e IL-12 quando comparada à produção obtida nas células estimuladas somente com o Poly I:C, como mostra a figura 19.

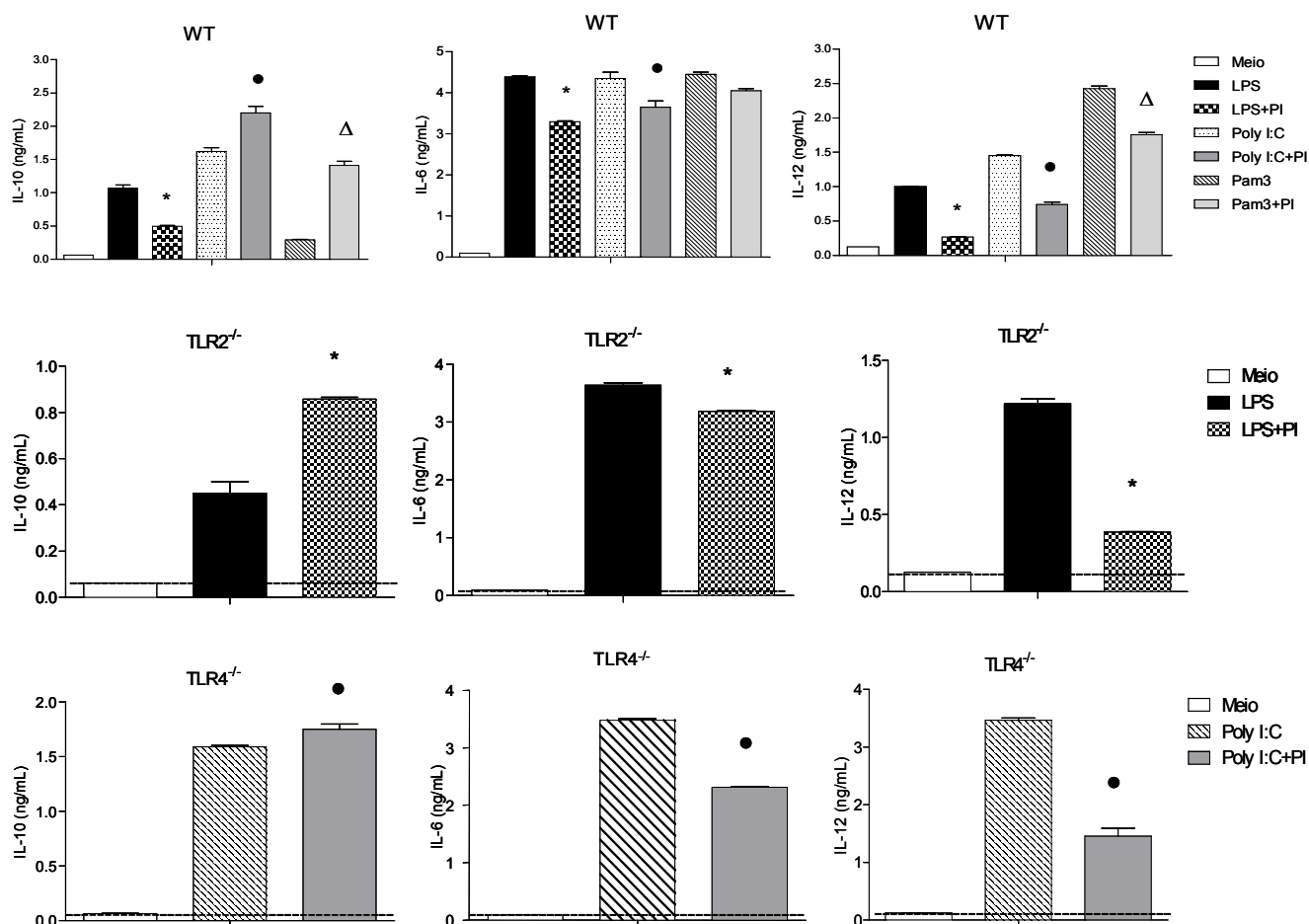


Figura 19- Produção de IL-10, IL-6 e IL-12 em sobrenadantes de culturas de células dendríticas de camundongos WT, TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} diferenciadas e estimuladas *in vitro* com LPS, LPS+PI, Pam3, Pam3+PI, Poly I:C ou Poly I:C+PI.

Células de medula óssea dos camundongos foram diferenciadas *in vitro* com GM-CSF/IL-4 durante 7 dias e estimuladas com LPS (1 µg/mL), LPS+PI (1 e 200 µg/mL), Pam3 (3 µg/mL), Pam3+PI (3 e 200 µg/mL), Poly I:C (10 µg/mL) ou Poly I:C+PI (10 e 200 µg/mL) por 18 hs. A presença de IL-10, IL-6 e IL-12 nos sobrenadantes das culturas celulares foram avaliadas por ELISA e as concentrações determinadas a partir da curvas-padrão das citocinas recombinantes. Resultados representativos de 3 experimentos.

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

• p < 0,05 grupo Poly I:C+PI comparado ao grupo Poly I:C

Δ p < 0,05 grupo Pam3+PI comparado ao grupo Pam3

4.11 Avaliações da presença de glicanos ligados aos componentes do PI e PIII

Tendo em vista os resultados mostrando que o TLR2 e TLR4 não estão envolvidos no efeito modulador do PI sobre a atividade funcional das APCs, o próximo objetivo foi avaliar a presença de carboidratos, como resíduos de glucose e manose, no PI que poderiam ser reconhecidos por receptores de lectina tipo C. Para tanto, utilizamos como estratégia experimental, a afinidade de ligação das glicoproteínas às diversas lectinas (DEBRAY; MONTREUIL; FRANZ, 1994). Amostras de PI e PIII foram, então submetidas à cromatografia de afinidade em coluna de ConA acoplada à Sepharose. Amostras de soro albumina bovina (proteína aglicosilada) foram da mesma forma, submetidas ao mesmo protocolo experimental e utilizadas como controle.

Na figura 20 podemos observar que a albumina bovina (BSA) e os componentes do PIII passaram pela coluna de ConA sem interagir com a lectina. Em contraste, verificamos que os componentes do PI somente foram eluídos da coluna de ConA quando aplicado o açúcar competidor, o que demonstra a presença de componentes glicosilados, ou seja, contendo resíduos de manose/glucose na amostra de PI.

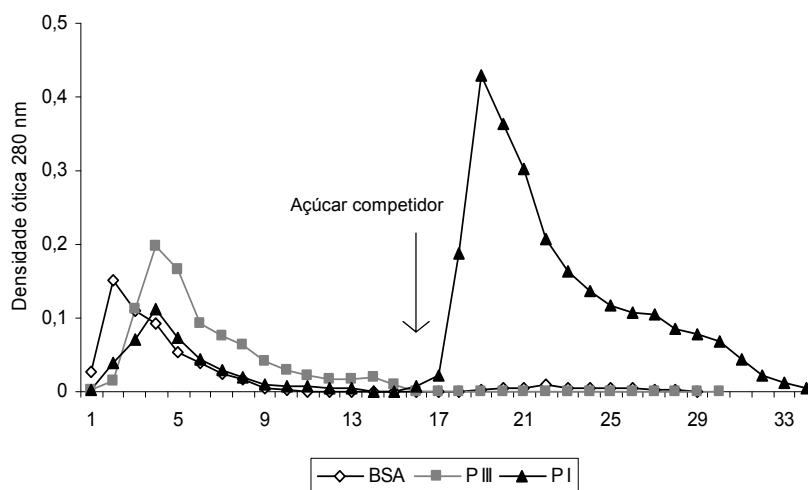


Figura 20- Perfil cromatográfico de PI, PIII e albumina bovina em coluna de concanavalina A (ConA) acoplada à Sepharose.

Amostras de PI, PIII ou BSA (1 mg) foram aplicadas na coluna de ConA-Sepharose previamente equilibrada em tampão Tris 20 mM pH 7,4 contendo 0,5 M de cloreto de sódio (tampão Tris/NaCl). Os componentes ligados à coluna foram eluídos com solução Tris/NaCl contendo 500 mM de α -metil-D-manopiranosídeo. O perfil de eluição das amostras foi determinado pela leitura a 280 nm.

4.12 Estudos do papel de CLRs na modulação exercida pelo PI sobre as células dendríticas

Sabendo que o PI apresenta componentes glicosilados, decidimos estudar a participação dos receptores de lectinas tipo C na capacidade destes antígenos de modular a maturação de células dendríticas induzida por LPS. Para estudar o papel desses receptores na supressão induzida por PI, utilizamos a manana como bloqueador destes receptores expressos nas DCs.

Células dendríticas foram geradas *in vitro* e estimuladas com LPS, LPS+PI, Manana ou manana+LPS+PI por 18hs. Após a incubação, as células foram marcadas com anticorpos anti-MHC de classe II, anti-CD80 ou anti-CD86 e analisadas em citômetro de fluxo.

A figura 21 mostra maior expressão das moléculas MHC-II e coestimuladoras nas células estimuladas com LPS em comparação à observada em células mantidas em meio de cultura. Verificamos menor expressão dessas moléculas na população celular incubada com LPS+PI. Por outro lado, quando as células foram pré-incubadas com manana e estimuladas com LPS+PI, observamos aumento da expressão de MHC-II, CD80 e CD86 quando comparado à observada nas células incubadas com LPS+PI.

Verificamos ainda, que a manana não induziu ativação das células dendríticas, uma vez que, a intensidade de fluorescência observada nestas células foi semelhante à obtida nas células mantidas somente em meio de cultura (Figura 21).

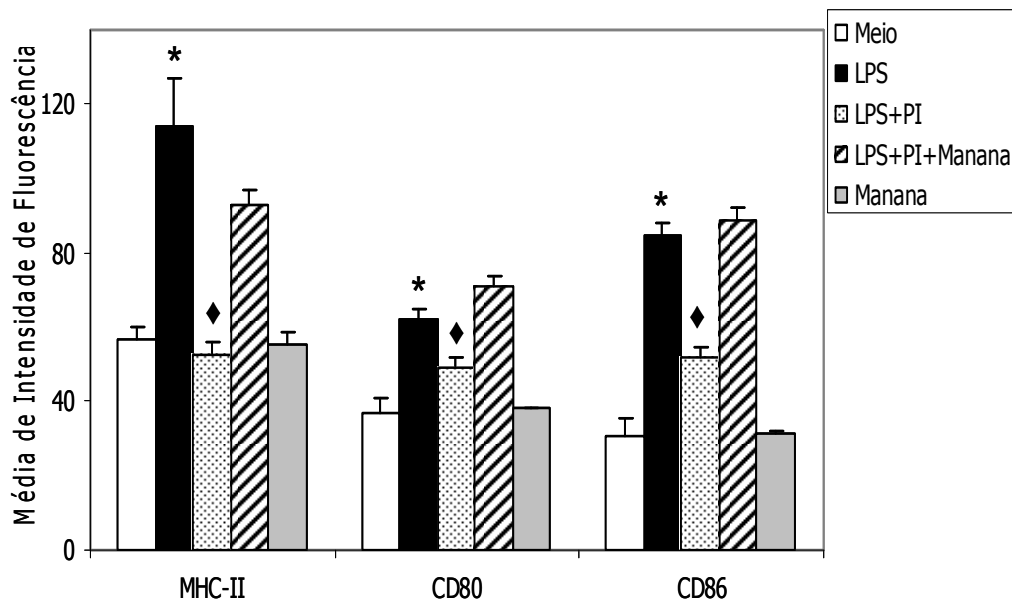


Figura 20- Expressão das moléculas de MHC de classe II, CD80 ou CD86 em células dendríticas estimuladas com LPS, PI, manana, manana+LPS+PI.

Células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos BALB/c com GM-CSF/IL-4 foram estimuladas com LPS (1 µg/ml), LPS+PI (1 e 200 µg/ml), Manana (50 ug/mL), LPS+PI+manana (1, 200 e 50 µg/mL, respectivamente) por 18hs. Após este período, as células foram incubadas com anti-MHC-II-FITC, CD80 ou CD86 conjugados a PE. Os resultados foram expressos em média de intensidade de fluorescência das amostras analisadas em citômetro de fluxo ± desvio padrão.

* $p < 0,05$ grupo estimulado com LPS comparado ao grupo não-estimulado

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

A quantificação de IL-6, IL-10 e IL-12 nos sobrenadantes destas culturas de células permitiu verificar maior secreção destas citocinas pelas células incubadas com o LPS. Por outro lado, quando o PI foi adicionado à cultura com o LPS, observamos diminuição da secreção destas, como pode ser observado na figura 21.

A pré-incubação das células com manana e posterior adição de LPS+PI promoveu maior secreção destas citocinas em relação à observada na cultura de células estimuladas com LPS+PI, porém este aumento não foi significativo. Além disso, no sobrenadante da cultura de células incubadas somente com manana não detectamos a presença de citocinas estando, portanto abaixo do nível de detecção do ensaio utilizado (Figura 21).

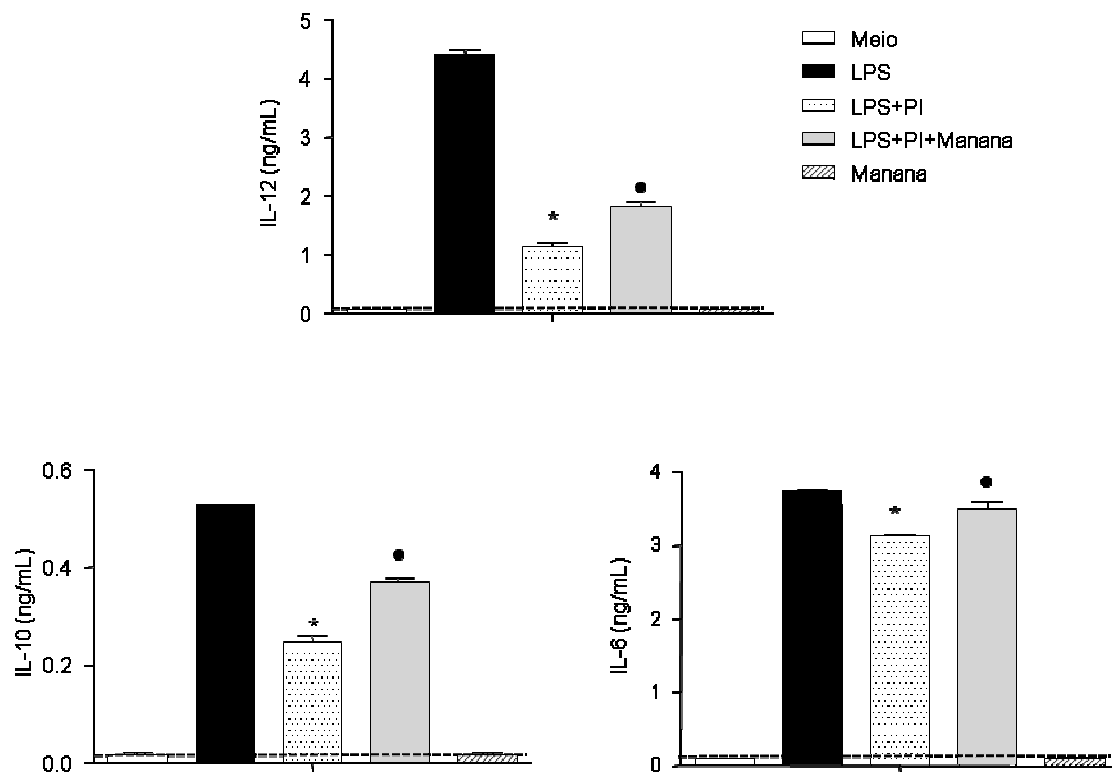


Figura 21- Produção de IL-12, IL-10 e IL-6 detectada em sobrenadantes de culturas de células dendríticas diferenciadas *in vitro* e estimuladas com LPS ou LPS e PI. Células dendríticas foram diferenciadas *in vitro* a partir de medula óssea de camundongos BALB/c com GM-CSF/IL-4 durante 7 dias e estimuladas com LPS (1 µg/ml), LPS+PI (1 e 200 µg/ml), Manana (50 µg/mL), LPS+PI+manana (1, 200 e 50 µg/mL) por 18hs. Após este período, os sobrenadantes das culturas foram coletados e a secreção das citocinas analisadas por ELISA. A concentração de IL-12, IL-10 e IL-6 presente nos sobrenadantes das culturas foi calculada a partir das curvas-padrão das citocinas recombinantes.

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

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

4.13 Efeito do PI nas células CD11c⁺ purificadas e estudo do papel dos receptores de lectinas tipo C nesse processo

Visto que os receptores de lectina tipo C parecem estar envolvidos na capacidade do PI de modular a maturação de células dendríticas *in vitro*, o próximo aspecto avaliado foi o papel destes receptores no efeito modulador do PI nas células dendríticas obtidas de camundongos previamente imunizados.

Para tanto, utilizamos o mesmo protocolo experimental descrito por SILVA et al. (2006). Camundongos BALB/c imunizados 5 dias antes com OVA foram sacrificados e a suspensão celular preparada a partir dos linfonodos inguinais e periaórticos. Desta suspensão, células CD11c⁺ foram purificadas (90% de pureza) e incubadas *in vitro* com OVA, OVA+PI ou manana+OVA+PI por 18 horas. Após este período, todas as células foram marcadas com anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo.

A figura 22 mostra a expressão das moléculas de MHC-II e coestimuladoras nas células CD11c⁺ de camundongos imunizados com OVA não-pulsadas ou pulsadas *in vitro* com os diferentes antígenos. Pode-se verificar, menor expressão das moléculas CD40, CD80 e CD86 nas células CD11c⁺ estimuladas com OVA+PI comparada com a observada em células que foram estimuladas apenas com a OVA. No entanto, não foi evidenciada diferença significativa na expressão de moléculas de MHC de classe II nos dois grupos analisados.

Com relação à expressão destas moléculas nas células CD11c⁺ que foram incubadas com manana+OVA+PI, verificamos que o efeito do PI foi somente parcial sobre a expressão das moléculas envolvidas na apresentação antigênica (Figura 22).

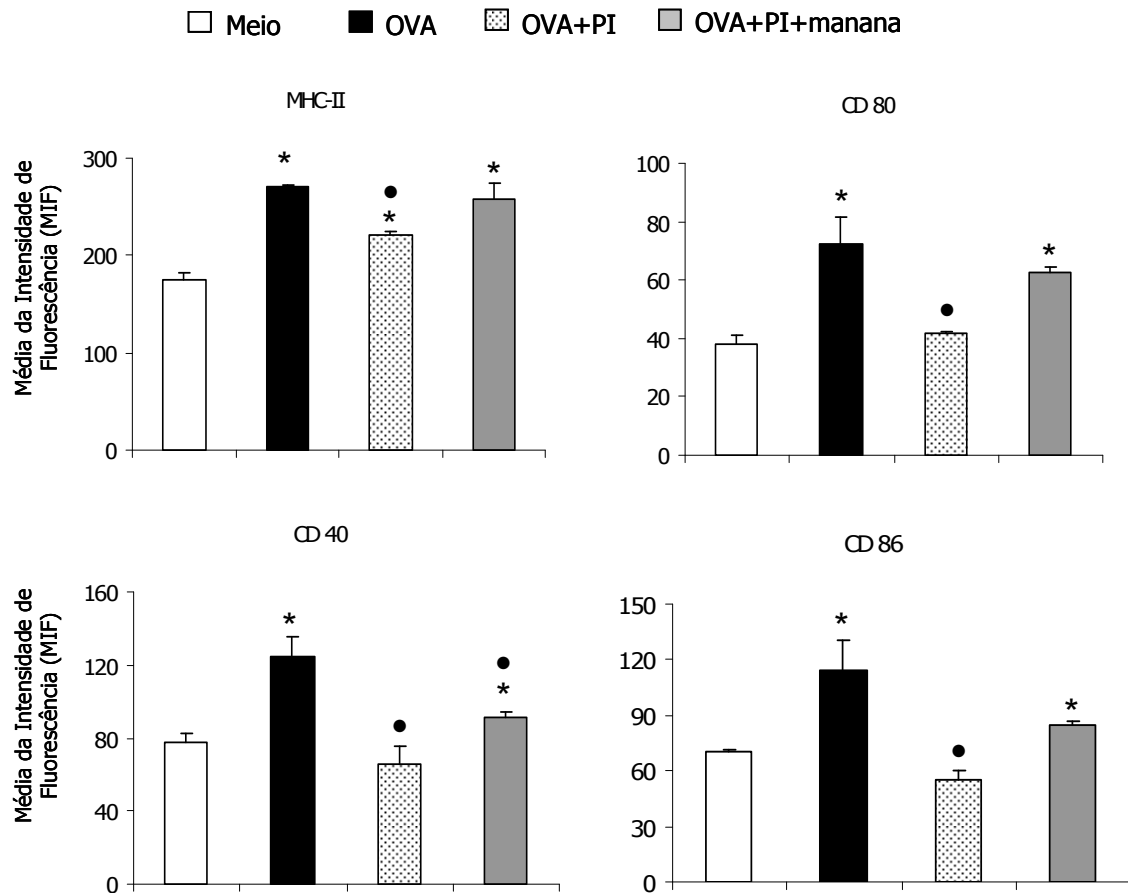


Figura 22- Expressão das moléculas de MHC de classe II e coestimuladoras nas células CD11c⁺ purificadas de camundongos imunizados com OVA e estimuladas *in vitro* com OVA, OVA+PI ou manana+OVA+PI.

Após 5 dias da imunização, foi preparada suspensão celular a partir dos linfonodos inguinais e periaórticos destes animais e esta foi utilizada para a purificação das células CD11c⁺ por seleção positiva, em sistema MidiMacs. As células CD11c⁺ obtidas foram estimuladas *in vitro* com OVA (200 µg/ml), OVA+PI (200 µg/ml) ou OVA+PI+Manana (50 µg/ml) por 18 horas e em seguida incubadas com anti-CD40, CD80 e CD86-PE ou anti-MHC-II-FITC. Os resultados expressos como a média da intensidade de fluorescência das amostras em duplicata analisadas em citômetro de fluxo ± desvio padrão.

* p < 0,05 grupos comparados ao grupo de células não-estimulada *in vitro*

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

5 DISCUSSÃO

Os helmintos e alguns de seus produtos exercem importante efeito modulador no sistema imune (ORR e BLAIR, 1969; BARRIGA e INGALLS, 1984; JARRET e STEWART, 1972; KOJIMA e OVARY, 1975; HAIG; LIMA; MOTA, 1980). Neste contexto de imunossupressão, foi evidenciado que os componentes de alta massa molecular (PI) isolados do extrato de *Asc* inibem a capacidade das DCs de apresentar antígenos de forma efetiva aos linfócitos T e, assim gerar a resposta adaptativa adequada a um antígeno heterólogo como a OVA (SILVA et al., 2006).

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).

Considerando, portanto, a importância destas células no direcionamento e geração da resposta imune adaptativa e ainda, os resultados anteriores comprovando que o PI exerce o seu efeito nestas células, neste trabalho buscamos entender os mecanismos de ação destes antígenos nas APCs, principalmente nas DCs.

Visto que os TLRs estão envolvidos no reconhecimento de grande variedade de patógenos pelas APCs e ainda, que alguns microorganismos são capazes de inibir a expressão destes receptores como estratégia de evasão do sistema imune (VENUGOPAL; NUTMAN; SEMNANI, 2009), nós avaliamos a capacidade do PI de modular a expressão de alguns TLRs.

Verificamos em nossos experimentos que a imunização dos camundongos com OVA resultou em aumento da expressão de TLR1, 2, 4 e 9 nas células obtidas dos linfonodos que drenam o sítio da imunização. No entanto, com a adição do PI na imunização dos camundongos esse aumento não foi observado. A análise da expressão desses receptores nas células CD11c⁺ dos camundongos previamente imunizados permitiu verificar que o PI inoculado com a OVA é capaz de modular nesta população celular a expressão dos TLRs.

Resultados semelhantes foram publicados por BABU et al. (2005) quando estudaram a imunossupressão observada em pacientes cronicamente infectados com a microfilaria *Brugia malay*. Neste trabalho, eles verificaram que as DCs e linfócitos B destes pacientes apresentavam menor expressão de diversos TLRs na

sua superfície celular comprometendo assim, o reconhecimento dos patógenos por estas células. Em 2006, estes mesmos autores mostraram que esta menor expressão de TLRs também ocorria nos linfócitos T dos indivíduos cronicamente infectados com a microfilária. Como conclusão, foi proposto pelos autores que o estado de imunossupressão detectado nestes indivíduos seja reflexo da deficiência tanto no reconhecimento dos patógenos pelas DCs como na ativação dos linfócitos T, que em algumas situações pode ser potencializada pelos TLRs.

Considerando este último trabalho, tivemos como objetivo avaliar no nosso modelo experimental, se o PI também poderia modular a expressão dos TLRs nos linfócitos T. A análise destes receptores nas populações de células isoladas de camundongos imunizados com OVA ou OVA+PI permitiu observar que a expressão de TLRs esteve aumentada somente nas células MHC de classe II⁺ e ainda, que o PI foi capaz de inibir essa expressão. Em contraste, a expressão dos TLRs nas células CD3⁺ dos camundongos imunizados tanto com a OVA como com OVA+PI foi semelhante à observada nas células dos camundongos não-imunizados. Estes resultados mostram, novamente, que o PI exerce efeito inibitório nas células que são capazes de apresentar os antígenos para os linfócitos T. Portanto, os nossos resultados corroboram os descritos por BABU et al. (2005) quanto ao efeito supressivo da microfilária nas APCs.

Quanto aos TLRs expressos nos linfócitos TCD3⁺, trabalhos relatam que o aumento da sua expressão ocorre em linfócitos T previamente ativado (MACLEOD e WETZLER, 2007; KABELITZ, 2007). Em outro trabalho, PRABHA; RAJASHREE; SULOCHANA (2008) verificaram que a expressão de TLRs é regulada diferencialmente nas subpopulações de células T e que depende do estado de ativação celular. Na resposta imune à tuberculose, estes autores observaram maior expressão de TLR2 e 4 em células TCD4⁺ ativadas e secretoras de IFN- γ comparada à obtida em linfócitos TCD4⁺ produtores de IL-4.

Baseados nestes trabalhos mostrando que a modulação de TLRs nos linfócitos T ocorre quando estas células estão ativadas, podemos sugerir que a expressão baixa destes receptores observada nas células TCD3⁺ dos diferentes grupos experimentais pode ser devido ao tempo precoce desta análise, ou seja, 5º dia pós-imunização. Para comprovar esta hipótese seria necessário estudar esses receptores nas células TCD3⁺ de animais imunizados há mais tempo com a OVA ou OVA e PI.

Trabalhos mostram que dentre as várias formulações de substâncias com caráter adjuvante, produtos microbianos (bacterianos ou virais, dentre outros) quando adicionados a um antígeno pouco imunogênico apresentam efeito potencializador do sistema imune. Este efeito é mediado pelo seu reconhecimento por TLRs ou outros receptores nas APCs que promovem a ativação destas células e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TSUJI, 2000; SHIBAKI e KATZ, 2002; PETROVSKY e AGUILAR, 2004). O Adjuvante Completo de Freund (CFA), formulação de óleo e produtos do *Mycobacterium bovis*, há muito tempo tem sido utilizado como ativador da resposta imune específica a diversos antígenos. Neste sentido, LIM (2003) demonstrou que a ação adjuvante do CFA é mediada pela ligação do *Mycobacterium* ao TLR2 nas APCs, que por sua vez, resulta na ativação destas células e a potencialização da resposta imune antígeno-específica.

De acordo com estas observações sobre a ação dos adjuvantes nas APCs e ainda, os trabalhos relatando o efeito do PI na resposta anti-OVA induzida pela imunização com a OVA emulsificada em CFA, várias estratégias experimentais foram consideradas neste trabalho. Assim sendo, testamos a capacidade do Adjuvante Incompleto de Freund (IFA), que não contém os produtos bacterianos, de promover resposta OVA-específica na mesma magnitude da induzida pela imunização com a OVA em CFA.

Pudemos constatar que o IFA foi tão potente quanto o CFA em induzir aumento da expressão das moléculas envolvidas na apresentação antigênica nas células dos camundongos imunizados com as formulações de OVA/IFA ou OVA/CFA. Portanto, estes resultados corroboram com os publicados por SHIBAKI e KATZ (2002) demonstrando que as células de camundongos imunizados com OVA/IFA ou OVA/CFA foram capazes de proliferar na mesma amplitude quando estimuladas *in vitro* com a OVA. No entanto, estes autores evidenciaram que a imunização com a OVA em CFA promoveu resposta OVA-específica por período mais prolongado que a inoculação da OVA em IFA nos camundongos.

Outro aspecto abordado foi a possibilidade do PI competir com os produtos bacterianos contidos no CFA pela ligação aos TLRs nas APCs e, assim resultar na menor expressão das moléculas de MHC de classe II e coestimuladoras observada nas células dos camundongos. Assim, a utilização do IFA em paralelo ao CFA na imunização dos camundongos com OVA e PI permitiu descartar esta possibilidade,

visto que o PI ainda exerceu o seu efeito modulador nas APCs obtidas dos animais imunizados com os antígenos associados tanto ao CFA como IFA.

Avaliando a participação de TLR2 e TLR4 na imunossupressão exercida pelo PI, verificamos em experimento realizado em camundongos WT, TLR4^{-/-} ou TLR2^{-/-} imunizados com a OVA ou OVA+PI, que o PI inibiu a reação de hipersensibilidade tardia OVA-específica desencadeada no coxim plantar dos diferentes grupos de camundongos. Observamos ainda, que a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA também esteve diminuída nos soros dos camundongos tanto WT como TLR4^{-/-} ou TLR2^{-/-} que receberam o PI na imunização com a OVA.

Estes resultados estão de acordo com os publicados por FERREIRA et al. (1995) e FAQUIM-MAURO e MACEDO (1998) mostrando que o extrato bruto de Asc assim como os componentes do PI possuem a capacidade de suprimir a resposta imune tanto humoral como celular induzida pela imunização com a OVA.

Além dessas observações, constatamos que o PI exerceu efeito inibitório sobre a expressão de todas as moléculas envolvidas com a apresentação antigênica nas células dos camundongos WT, TLR4^{-/-} ou TLR2^{-/-}. Esses dados mostram que tanto o TLR2 como TLR4 não estão envolvidos na modulação da resposta imune exercida pelos componentes do PI.

Contrário aos nossos resultados, VAN DER KLEIJ et al. (2002) demonstraram que DCs imaturas ao reconhecerem uma fosfatidilserina isolada de *Schistosoma mansoni* (lisofosfatidilserina) via TLR2 sofrem o processo de maturação e promovem a geração de resposta Th2.

GOODRIDGE et al. (2005) evidenciaram que uma glicoproteína contendo fosforilcolina (ES-62) secretada pela filária *Acanthocheilonema viteae* é capaz de modular a atividade funcional das APCs inibindo a secreção de IL-12 e TNF- α e portanto, impedindo a geração de resposta do tipo Th1. Além disso, observaram que este efeito é dependente tanto do TLR4 como da molécula adaptadora MyD88.

Por outro lado, trabalhos realizados com produtos solúveis de ovos de *Schistosoma mansoni* (SEA) ou na infecção por *Wolbachia* mostraram que estes antígenos exercem efeito supressor nas APCs via TLRs e ainda receptores de lectina tipo C expressos nessas células (VAN DER KLEIJ et al., 2002; VAN DIE et al., 2003; BRATTING et al., 2004; VAN DIE e CUMMINGS, 2006).

A sinalização via TLR é iniciada pela dimerização desses receptores na superfície celular, que por sua vez, recrutam proteínas adaptadoras como a MYD88,

exceto para o TLR3, as quais desencadeiam a ativação de outras proteínas quinases culminando com a ativação de fatores de transcrição gênica e, portanto com a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e de ativação celular (AKIRA; YAMAMOTO; TAKEDA, 2003; LIEW; BRINT; O'NEILL, 2005).

A resposta de células T é induzida através de sinais importantes como, por exemplo, as citocinas secretadas pelas DCs ativadas (XIA, 2007). Neste sentido, está bem estabelecido que a IL-12 secretada por DCs maduras tem papel importante na geração da resposta imune adaptativa induzindo a polarização de linfócitos TCD4⁺ para o subtipo Th1. A IL-6 é outro exemplo de citocina pró-inflamatória predominantemente secretada por macrófagos ativados, fibroblastos e células endoteliais de tecidos inflamados. A sua secreção é induzida por LPS, TNF- α e interferons (MÖLLER e VILLIGER, 2006).

Com o intuito de estudar se o PI seria também capaz de modular a maturação de DCs, vários experimentos foram realizados com células diferenciadas *in vitro* com GM-CSF/IL-4 e incubadas com agonistas de TLRs na presença ou não dos componentes do PI. Nesta série de experimentos pudemos observar que o PI foi capaz de inibir a expressão das moléculas de MHC-II e coestimuladoras nas DCs estimuladas com LPS, Poly I:C e, ainda o Pam3csk. Somado a isso, o PI inibiu a produção de IL-12 e IL-6 por estas células sugerindo, portanto que os antígenos do PI as manteriam no estado imaturo.

Vale ressaltar, que outros experimentos foram realizados com objetivo de determinar a concentração de PI capaz de exercer esse efeito modulador nas DCs. Além disso, estudamos se o PI seria eficiente em inibir a ativação das DCs previamente incubadas com LPS. Os resultados obtidos mostraram que 50 μ g de PI ainda foram eficientes em inibir a maturação de DCs incubadas com LPS, porém com menor intensidade que a concentração utilizada nos experimentos relatados. Em outro experimento verificamos que o PI não foi capaz de modular a maturação de DCs pré-incubadas com LPS (dados não-mostrados).

Reportando-nos ainda à concentração de PI necessária para inibir a maturação das DCs, é importante mencionar que não está estabelecida qual a proporção dos componentes que apresentam essa atividade moduladora no PI como um todo.

Além disso, em experimentos realizados com DCs diferenciadas a partir de medula óssea de camundongos TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} foi possível descartar a participação destes receptores na ação inibitória do PI sobre as DCs, uma vez que

observamos inibição da expressão de moléculas coestimuladoras e MHC-II por essas células incubadas com o PI na presença de Pam3CSK4, LPS ou Poly I:C, assim como diminuição da secreção de IL-12 e IL-6 e aumento de IL-10.

Resultados semelhantes foram publicados em trabalho realizado com SEA de *Schistosoma mansoni* no qual se observou que DCs imaturas quando pulsadas *in vitro* com esses antígenos não sofrem o processo de maturação convencional induzido por ligantes de TLRs, como o LPS e Poly I:C. Estes antígenos (SEA) suprimiram ainda, a produção de IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-10 pelas DCs, e assim a capacidade destas células de ativar e induzir a diferenciação de linfócitos T para Th1(VAN LIEMPT, 2007).

Como já mencionado, relatos da literatura ressaltam que receptores de lectinas tipo C reconhecem carboidratos na estrutura de antígenos próprios ou componentes de patógenos. O reconhecimento feito somente por CLR pode promover o estado de tolerância suprimindo a resposta imune, já a comunicação entre CLR e TLR no reconhecimento de um patógeno pode ativar a DC e assim promover a geração de resposta imune adaptativa. Isto indica que receptores TLR e CLR se comunicam o que resulta no balanço entre a ativação e supressão da resposta imune (GEIJTENBEEK et al., 2004).

Evidências ressaltam a modulação da atividade funcional de DCs por antígenos glicosilados, os quais são reconhecidos pelos CLR (VAN DIE e CUMMINGS, 2006). Neste contexto, alguns trabalhos mostraram a participação do receptor DC-SIGN expresso nas DCs para a captura de antígenos manossililado como o vírus HIV, citomegalovirus e *Mycobacterium tuberculosis* e posterior apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos TCD4⁺ indicando, portanto papel deste receptor como modulador da atividade funcional das APCs (ENGERING et al., 2002; GEIJTENBEEK et al., 2000; HALARY et al., 2002; GEIJTENBEEK et al., 2003).

Na infecção por *Schistosoma mansoni* foi observado que carboidratos ligados aos antígenos do SEA interagem com receptores de lectina tipo C como o DC-SIGN, receptor de manose e galactose nas DCs e inibem a maturação dessas células e ativação por ligantes de TLRs (VAN LIEMPT et al., 2007).

Sendo assim, em nossos experimentos pudemos verificar que PI possui resíduos de carboidratos em sua composição, o que nos estimulou a estudar a participação dos CLR na capacidade destes componentes de suprimir a atividade das APCs. Para tanto, realizamos uma série de experimentos onde utilizamos a manana como

bloqueador de todos os CLRs.

Os resultados obtidos nestes experimentos de pré-incubação das DCs com a manana seguida de incubação com o PI e LPS permitem sugerir que os CLRs participam no processo de imunossupressão exercido pelos componentes do PI, uma vez que, o efeito do PI foi parcialmente bloqueado nestas células onde a manana foi adicionada.

Sabendo que o PI *in vitro* é capaz de inibir a expressão das moléculas de MHC-II e coestimuladoras em células CD11c⁺ obtidas de camundongos imunizados com OVA, decidimos avaliar se o bloqueio dos CLRs nestas células impediria a ação do PI. Nestes experimentos verificamos novamente que a adição de manana nas células CD11c⁺ inibiu parcialmente o efeito do PI nestas células.

Em conjunto, estes resultados levam a supor que a manana esteja competindo com o PI pelos CLRs e, conseqüentemente, impedindo-o de se ligar e exercer o seu efeito nestas células. Vale ressaltar, que estes dados foram obtidos utilizando somente uma única concentração da manana e com a pré-incubação por 30 minutos com as células. Novos experimentos devem ser realizados variando tanto a concentração como o tempo de incubação das DCs com o monossacarídeo.

Assim como os nossos resultados que sugerem a participação dos CLRs na modulação exercida pelo PI sobre as DCs, VAN LIEMPT (2007) relatou que a ação inibitória do SEA sobre as DCs foi parcialmente bloqueada quando as DCs foram previamente incubadas com a manana e estimuladas com o SEA e LPS ou Poly I:C. Neste trabalho foi mostrado ainda, que o SEA é rapidamente internalizado pelas DCs imaturas via DC-SIGN, receptor de glucose e manose.

Em vista destas observações pretendemos aprofundar nossos estudos sobre a participação destes receptores de lectina tipo C na imunomodulação exercida pelo PI.

6 CONCLUSÕES

- ✓ PI é capaz de modular a expressão de receptores envolvidos com o reconhecimento de patógenos e antígenos microbianos (TLRs).
- ✓ PI exerce efeito inibitório na expressão das moléculas MHC de classe II e coestimuladoras em resposta a imunização com OVA em CFA ou IFA.
- ✓ TLR 2 e TLR4 não estão envolvidos no efeito modulador do PI sobre as células apresentadoras de antígeno.
- ✓ PI inibe a maturação de células dendríticas diferenciadas *in vitro* e estimuladas com agonistas de TLR2, 3 e 4.
- ✓ Receptores de lectina tipo C parecem desempenhar papel relevante na modulação da atividade das DCs induzida por PI.

REFERÊNCIAS *

AKIRA, S.; YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Role of adapters in toll-like receptor signalling. **Bioch. Soc.**, v. 31, p. 637-642, 2003.

ARIMURA, Y. et al. A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in T(h) cells and regulates their responses. **Int. Immunol.**, v. 14, p. 555-566, 2002.

BABU, S. et al. Cutting edge: Diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. **J. Immunol.**, v. 176, p. 3885-3889, 2006.

BABU, S. et al. Diminished expression and function of TLR in lymphatic filariasis: a novel mechanism of immune dysregulation. **J. Immunol.**, v. 175, p. 1170-1176, 2005.

BARRIGA, O. O; INGALLS, W. L. Potentiation of an IgE-like response to *Bordetella bronchiseptica* in pigs following *Ascaris suum* infection. **Vet. Parasitol.**, v. 16, p. 343-5, 1984.

BOONSTRA, A. et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential Toll-like receptor ligation. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 101-109, 2003.

BRATTIG, N. W. et al. The major surface protein of Wolbachia endosymbionts in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4. **Immunology**, v. 173, p. 437-45, 2004.

BRODIE, D. et al. LICOS, a primordial costimulatory ligand? **Curr. Biol.**, v. 10, p. 333-336, 2000.

CHAIN, B. M. Current issues in antigen presentation-focus on the dendritic cell. **Immunol. Lett.**, v. 89, p. 237-241, 2003.

DEBRAY, H.; MONTREUIL, J.; FRANZ, H. Fine sugar specificity of the mistletoe (*Viscum album*) lectin I. **Glycoconj J.**, v. 11, p. 550-7, 1994.

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

DIEHL, L. et al. The role of CD40 in peripheral T cell tolerance and immunity. **J. Mol. Med.**, v. 78, p. 363-371, 2000.

DING, L. et al. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **J. Immunol.**, v. 151, p. 265-75, 1993.

DOETZE, A. et al. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infections is mediated by T (h)3/T (r) 1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T (h) to T(h)2 shift. **Int. Immunol.**, v. 12, p. 623-630, 2000.

D`OSTIANI, C. F. et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 1661-74, 2000.

ELLIOTT, D. E. et al. Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. **Am. J. Physiol. Gastroint. Liv. Physiol.**, v. 3, p. 385-391, 2003.

ELLIOTT, D. E.; SUMMERS, R. W.; WEINSTOCK, J. V. Helminths and the modulation of mucosal inflammation. **Curr. Opin. Gastroent.**, v. 21, p. 51-58, 2005.

ENGERING, A. et al. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. **Blood**, v. 100, p. 1780-6, 2002.

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. 245-51, 1998.

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

FERREIRA, A. P. et al. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. **Cell. Immunol.**, v. 162, p. 202-10, 1995.

FIORENTINO, D. F. et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 clones. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3444-51, 1991.

GAJEWSKI, T. F.; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J. Immunol.**, v. 140, p. 4245-52, 1988.

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.

GOODRIDGE, H. S. et al. Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. **J. Immunol.**, v. 174, p. 284-293, 2005.

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

HAIG, D. M.; LIMA, G. C.; MOTA, I. Antibody suppression in mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Parasite Immunol.**, v. 2, p.175-87, 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. 653-64, 2002.

ISHIZAKA, K; ISHIZAKA, T.; TADA, T. Immunoglobulin E in the monkey. **J. Immunol.**, v. 103, p. 445-53, 1969.

ITAMI , D.M. et al. Immunoglobulin E is not required for but enhances airway inflammation and hyperresponsiveness. **Allergy**, v. 58, p. 1117-24, 2003.

JARRET, E. E.; MILLER, H. R. P. Production and activities of IgE in helminth infections. **Prog. Allergy**, v. 31, p. 178-233, 1982.

JARRET, E. E.; STEWART, D. Potentiation of the rat reaginic (IgE) antibody by helminth infection. Simultaneous potentiation of separate regains. **Immunology**, v. 23, p. 749-755, 1972.

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

KABELITZ, D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, p. 39-45, 2007.

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

KHAN, W. I. et al. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. **Infect. Immun.**, v. 11, p. 5931-5937, 2002.

KOJIMA, S.; OVARY, Z. Effect of *Nippostrongylus brasiliensis* infection on anti-hapten IgE antibody response in the mouse. II. Mechanism of potentiation of the IgE antibody response to a heterologous hapten-carrier conjugate. **Cell Immunol.**, v. 17, p. 383-91, 1975.

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. 158-68, 1979.

LECHMANN, M. et al. Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. **Int Arch. Allerg. Immunol.**, v. 129, p.113-8, 2002.

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.

LIM, SK. Freund adjuvant induces TLR2 but not TLR4 expression in the liver of mice. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3, p. 115-8, 2003.

LING, V. et al. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. **J. Immunol.**, v. 164, p. 1653-1657, 2000.

MACDONALD, A. S. et al. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. **J. Immunol.**, v. 172, p. 1833-1838, 2002.

MACEDO, M. S.; BARBUTO, J. A. M. Murine delayed hypersensitivity is suppressed by *Ascaris suum* extract. Brazilian **J. Med. Biol. Res.**, v. 21, p. 523-25, 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.

MACLEOD, H.; WETZLER, L. M. T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response. **Sci. Sign.** v. 402, p. 1-2, 2007

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.

MOLLER, B.; VILLIGER, P. M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases. **Spring. Sem. Immunopathol.**, v. 27, p. 391-408, 2006.

MOREELS, T.G.; PELCKMANS, P.A. Gastrointestinal parasites: potential therapy for refractory inflammatory bowel diseases. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 11, p. 178-84, 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.

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.1073-7, 1969.

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

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.

PEARLMAN, E. et al. Modulation of murine cytokine responses to Mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell responses. **J. Immunol.**, v. 151, p. 1857-64, 1993.

PENG, X. et al. Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon-gamma production. **Eur J Immunol.**, v. 26, p. 1621-1627, 1996.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunol Cell Biol.**, v. 82, p. 488-96, 2004.

PRABHA, C., RAJASHREE, P., SULOCHANA, D. D. TLR2 and TLR4 expression on the immune cells of tuberculous pleural fluid. **Immunol. Lett.** v. 117, p. 26-34, 2008.

PULENDRAN, B. et al. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. **J. Immunol.** v. 167, p. 5067-76, 2001.

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

SHER, A.; COLLEY, D. G. Immunoparasitology. **Fundament. Immunol.**, v. 2, p. 957-983, 1989.

SHIBAKI, A.; KATZ, S. I. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freud's adjuvant. **Experiment. Dermatol.**, v. 11, p. 126-134, 2002.

SHORTMAN, K.; LIU, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat. Rev Immunol.**, v. 3, p. 151-61, 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. 3227-37, 2006.

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. 203-11, 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.

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

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

STREET, N. E. et al. Heterogeneity of mouse helper T cells: evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. **J. Immunol.**, v. 144, p. 1629-1639, 1990.

STROMBERG, E. E. Potentiation of a reagenic (IgE) antibody response to ovalbumin in the guinea pig with a soluble metabolic product from *Ascaris suum*. **J. Immunol.**, v. 125, p. 833-36, 1980.

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

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

TSUJI, S. et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. **Infect Immunol.**, v. 68, p. 6883-90, 2000.

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 DER KLEIJ, D. et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. **J. Bio. Chem.**, v. 277, p. 48122-48129, 2002.

VAN DIE, I. et al. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. **Glycobiology.**, v. 13, p. 471-478, 2003.

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

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

VAN VLIET, S.J., GARCIA-VALLEJO, J.J., VAN KOOYK, Y. Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. **Immunol Cell Biol.**, v. 86, p. 580-587, 2008.

VENUGOPAL, P. G.; NUTMAN, T. B.; SEMNANI, R. T. Activation and regulation of toll-like receptors (TLRs) helminth parasites. **Immunol. Res.**, v. 43, p. 252-263, 2009.

WATANABE, M. et al. A distinct role for ICOS-mediated co-stimulatory signaling in CD4+ and CD8+ T cell subsets. **Int. Immunol.**, v. 17, p. 269-278, 2005.

XIA, C. et al. Dendritic cells post-maturation are reprogrammed with heightened IFN- γ and IL-10. **Bioch. and Biophys. R.C.**, v. 352, p. 960-965, 2007.

YOUNG-IK, SON. et al. Anovel bulk-culture for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. **J. Immunol. Methods**, v. 262, p. 145-157, 2002.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Printitice-Hall, 1974.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)