

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEPG/UNICENTRO**

TAMARA NASCIMENTO FERREIRA

**POTENCIAL DAS TOXINAS RECOMBINANTES DO VENENO DE ARANHA
MARROM COMO FERRAMENTAS NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL E
IMUNOMODULAÇÃO**

PONTA GROSSA

2015

TAMARA NASCIMENTO FERREIRA

**POTENCIAL DAS TOXINAS RECOMBINANTES DO VENENO DE ARANHA
MARROM COMO FERRAMENTAS NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL E
IMUNOMODULAÇÃO**

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial à obtenção de título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Katia Sabrina Paludo
Co-orientador: Michel Fleith Otuki

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

F383 Ferreira, Tamara Nascimento
Potencial das toxinas recombinantes do
veneno de Aranha Marrom como ferramentas
na indução de tolerância oral e
imunomodulação/ Tamara Nascimento
Ferreira. Ponta Grossa, 2016.
77f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profª Drª Katia Sabrina
Paludo.

Coorientador: Prof. Dr. Michel Fleith
Otuki.

1.Tolerância de mucosas,. 2.Loxosceles
intemedica. 3.Foxp3,. 4.Rejeição ao
enxerto. 5.Toxinas recombinantes.
I.Paludo, Katia Sabrina. II. Otuki,
Michel Fleith. III. Universidade Estadual
de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências
Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.94



**Programa de
Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas**

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ata nº. 05/2015

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA TAMARA NASCIMENTO FERREIRA, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 25 DE FEVEREIRO DE 2015, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo quinto dia do mês de fevereiro de dois mil e quinze, às 14h00min, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Sala M 115 da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo, em sessão pública, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Tamara Nascimento Ferreira. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo (Presidente) / UEPG, Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura / UFPR e Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira / UEPG, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi **"POTENCIAL DAS TOXINAS RECOMBINANTES DO VENENO DE ARANHA MARROM COMO FERRAMENTAS NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL E MODULAÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES"**. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata Aprovada (Aprovada/Reprovada). Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Jessica Leme Cano, Jessica Leme Cano, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG.

Ponta Grossa, 25 de fevereiro de 2015

Observação (se necessária):

Profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo – UEPG

Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura – UFPR

Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira – UEPG

Bloco M - Sala M 48a – Univ. Est. de Ponta Grossa - Campus Uvaranas – Fone: (42) 3220-3337
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – CEP: 84030-900 – PONTA GROSSA – PR

A Deus, cuja presença foi sempre
sensível.

Aos meus pais, Leila e Zacarias, por tudo que fizeram por mim, pelo amor incondicional, pelos esforços sem medida e por me ensinarem que tudo na vida é uma questão de vontade, trabalho e determinação.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo,
pelo apoio constante e pelo enorme
carinho e parceria.

A você, Virgílio, por entender os momentos de ausência, pelos carinhos, compreensão e incentivo. Agradeço por todas as vezes que me ajudou a solucionar os problemas de uma maneira mais simples, por todas as palavras de motivação, pelo companheirismo, cuidado e amizade

Agradecimentos

Grata a Deus pelo dom da vida, pelo seu amor infinito, sem Ele nada sou.

Para realização deste trabalho, houve a participação de várias pessoas que me guiaram e incentivaram.

Agradeço aos meus pais, Leila e Zacarias, meus maiores exemplos. Obrigada por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, pela preocupação para que estivesse sempre andando pelo caminho correto. Aos meus irmãos, Thais, Izadora e João Manoel, por todo amor e carinho.

Ao meu namorado, Virgílio Zarpellon Ferreira, por todo amor, carinho, paciência e compreensão que tem me dedicado.

Gostaria de agradecer à minha queridíssima e competente orientadora, Prof. Dra. Katia Sabrina Paludo, pelas chances oferecidas, por sua habilidade em observar de maneira clara e simples o que parece ser enigmático. Por toda paciência em ensinar, repetir experimentos que deram ou não certo, pelo exemplo de ética e profissionalismo. À você minha gratidão pela competência e dedicação que foram imprescindíveis para realização deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Angeline Saucsen, Maicon Ramos, Murilo Delgobo e Rubens Gomes Junior por toda contribuição durante os experimentos e em especial pela amizade e estímulos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e crescimento pessoal. E garanto que com a ajuda de vocês tudo se tornou mais fácil. Valeu pessoal!

Às minhas queridas amigas e companheiras de mestrado, em especial Vanessa Kovalski, Juliana Berton e Thiana Quadros, pela parceria, risadas, amizade e por toda assistência indispensável durante todo o curso.

À querida Prof. Dra. Michele Dietrich, pela colaboração, competência, boa vontade em ajudar nos experimentos de *Western Blotting*. Suas valiosas sugestões contribuíram e muito, para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Giovani Favero, por sempre instigar a pensar e por todas ideias mirabolantes e pelas sugestões de grande contribuição para enriquecimento deste.

À técnica do laboratório de histologia, Camila Reis, por toda contribuição com as lâminas histológicas.

Às funcionárias do biotério, Maria e Marilene e à secretária do departamento Jessica, os seus trabalhos tornaram possível a realização desse estudo.

À minha família que sempre me incentivou e apoio em tudo.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado e por minha falha memória, não me lembrei de mencionar, os meus sinceros agradecimentos.

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de
Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Resumo

A tolerância oral é definida como uma supressão a respostas imunológicas específicas após imunização com um antígeno que foi previamente administrado por via oral. Esse método tem sido estudado, nas últimas décadas, como uma ferramenta na redução de respostas imunes humorais e celulares envolvidas em doenças autoimunes e alergias e parece ser uma alternativa para reduzir ou retardar a rejeição de transplantes. Neste estudo investigamos o potencial das toxinas dermonecróticas recombinantes do veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia* em induzir estado de tolerância de mucosas em modelo animal, avaliando os mecanismos celulares envolvidos e a resposta imune do animal tolerante frente a estímulos imunológicos específicos e inespecíficos. As toxinas recombinantes utilizadas para indução da tolerância oral foram a LiRecDT1 (com atividade dermonecrótica) e sua forma mutada, LiRecDT1H12A, (com atividade dermonecrótica residual). Para indução de tolerância oral foi utilizado protocolo com baixas doses de antígeno, onde foram tolerizados camundongos adultos Swiss, tratados oralmente com as toxinas recombinantes durante 21 dias, num total de 90µg por animal. Para investigar possíveis mecanismos envolvidos na tolerância oral, foi avaliada a expressão fator de transcrição Foxp3 e da citocina TGF-β. Após o protocolo de tolerização os linfonodos mesentéricos foram processados para ensaio de *western blotting* e a expressão do fator de transcrição Foxp3 e da citocina TGF-β foram avaliados. Os grupos tolerizados com ambas as toxinas mostraram um aumento na expressão dos dois componentes, demonstrando que um dos mecanismos de tolerância oral no nosso modelo pode envolver aumento na população de linfócitos T regulatórios. Esse resultado pode ser reforçado pela diminuição de edema de pata em camundongos naive que receberam, via intravenosa, esplenócitos de animais tolerizados com a toxina LiRecDT1 H12A (transferência adotiva). Além disso, pudemos observar que a tolerância induzida pela toxina LiRecDT1 H12A se estendeu a antígenos não relacionados (tolerância cruzada) com diminuição na produção de anticorpos IgG específicos e edema de pata em animais desafiados com veneno da vespa *Polybia paulista*. A tolerância oral induzida pela toxina LiRecDT1 H12A também permitiu aparente redução da resposta imunológica do animal tolerante frente ao enxerto alogênico de camundongos C57BL/6. Considerando os resultados obtidos é possível concluir que a tolerância oral induzida pelas toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A pode envolver aumento na população de linfócitos T regulatórios cuja produção de citocinas anti-inflamatórias, pelo menos na tolerância induzida pela toxina LiRecDT1 H12A, pode reduzir a resposta imune a antígenos específicos e inespecíficos na tolerância cruzada e na redução de rejeição a transplantes.

Palavras-chave: Tolerância de mucosas, *Loxosceles intermedia*, Foxp3, rejeição ao enxerto, toxinas recombinantes.

Abstract

Oral tolerance refers to physiologic induction of immunosuppression that occurs in mucosal induced by oral administration of an antigen. This method has been used to induce reduction of humoral and cellular responses involved in autoimmune diseases, allergies and may be an alternative to reduce transplant rejection. We investigated potential of dermonecrotic recombinant toxins of brown spider *Loxosceles intermedia* specie to induce a state of mucosal tolerance in a animal model. We did this by assessing the cellular mechanisms involved and the immune response of tolerant animals against specific and nonspecific immune stimulation. Dermonecrotic toxin LiRecDT1 and its mutated form, LiRecDT1 H12A (with residual dermonecrotic activity), has been used. Mice were treated with recombinant toxins, orally, for 21 days, with a total of 90µg per animal. After oral tolerance protocol, mesenteric lymph nodes were processed for western blotting and the expression of nuclear transcription factor Foxp3 and cytokine Tgf-β were analyzed. LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A tolerant groups showed an increase in expression of both proteins, which could be related to a increase in regulatory T-cells population. Adoptive transfer of splenocytes to naive mice from LiRecDT1 H12A tolerated group induced paw edema reduction, with supports this theory (adoptive transfer). Our results also demonstrated a bystander tolerance when LiRecDT1 H12A tolerated mice showed a decrease in IgG production and paw edema induction by *Polybia paulista* wasp venom. LiRecDT1 H12A tolerance also showed an apparent reduction in skin allograft rejection using C57BL/6 mice as donor and tolerated Swiss mice as receptor. Considering the results we concluded that oral tolerance induced by LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A toxins could be involve increase in Tregs and non-inflammatory cytokines, and LiRecDT1 H12A tolerance can reduce specific and non specific immunology responses and allografts transplants rejection.

Key-words: Mucosal tolerance, *Loxosceles intermedia*, Foxp3, allograft rejection. recombinant toxins

LISTA DE SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
ALFAC	Fixador histológico contendo álcool, formol e ácido acético
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> - Albumina do soro bovino
CD25	Cadeia alfa do receptor de interleucina 2
cDNA	DNA complementar
CD4	<i>Cluster</i> de diferenciação 4
DC	Células dendríticas
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i> - Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
FoxP3	Fator de transcrição com cabeça em garfo P3
GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i> – tecido linfóide associado ao trato digestório
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
iTreg	Célula T regulatória induzível
LiRecDT1 H12A	Toxina dermonecrótica recombinante mutada de <i>Loxosceles intermedia</i>
LiRecDT1	Toxina dermonecrótica recombinante 1 de <i>Loxosceles intermedia</i>
nTreg	Linfócito T regulatório natural
OPD	Ortofenileno-diamino
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> - Tampão fosfato salino
TCTP	<i>Translationally Controlled Tumor Protein</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i> - Fator de transformação do crescimento β
TGI	Trato Gastrointestinal
Th1 e Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 1 e T <i>helper</i> 2
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> - Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulatório

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismos de desenvolvimento de Tolerância Oral de acordo com a dose de antígeno administrada	21
Figura 2- Mecanismo de indução de tolerância oral: Células, citocinas e tecidos relacionados	23
Figura 3- Classificação de linfócitos T <i>helper</i> ativados	26
Figura 4- Linha do tempo do protocolo para indução de tolerância oral pela administração das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e demais experimentos/coleta de material.....	34
Figura 5- Indução de Tolerância oral com as toxinas dermonecróticas LirecDT1 e LiRecDT1 H12A aumenta a expressão do fator de transcrição Foxp3 nos linfócitos mesentérico.....	41
Figura 6- Indução de Tolerância oral com as toxinas dermonecróticas LirecDT1 e LiRecDT1 H12A aumenta a expressão da citocina anti inflamatória TGF- β 1 nos linfonodos mesentéricos.....	42
Figura 7- Transferência adotiva: Avaliação da redução do edema de pata.....	44
Figura 8- Transferência adotiva: Resultado produção de anticorpos.....	44
Figura 9- Avaliação tolerância cruzada: produção de anticorpos.....	46
Figura 10- Avaliação de tolerância cruzada: Redução de edema de pata.....	47
Figura 11- Técnica de Brown.....	48
Figura 12- Análise macroscópica dos enxertos de pele em camundongos Swiss.....	49
Figura 13a- Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Swiss tratados com PBS.....	51
Figura 13b- Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Swiss tratados com PBS.....	52
Figura 14a- Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Swiss tolerizados com a toxina LiRecDT1.....	53

Figura 14b- Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos *Swiss* tolerizados com a toxina LiRecDT1..... 54

Figura 15a- Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos *Swiss* tolerizados com a toxina LiRecDT H12A..... 55

Figura 15b- Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos *Swiss* tolerizados com a toxina LiRecDT H12A..... 56

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1 REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1 TOLERÂNCIA ORAL	18
1.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA ORAL....	20
1.3 TOXINAS DERMONECRÓTICAS DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	27
1.4 TOXINAS E INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL.....	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 CAMUNDONGOS	32
3.2 TOXINAS	32
3.3. INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL PELA ADMINISTRAÇÃO DAS TOXINAS LIRECDT1 E LIRECDT1 H12A	33
3.4 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE TOLERIZAÇÃO	34
3.4.1 Western blotting para análise do fator de transcrição FoxP3 e da citocina TGF-β	34
3.4.2 Avaliação do mecanismo por transferência adotiva.....	35
3.5 APLICAÇÕES DO MODELO DE TOLERÂNCIA ORAL	37
3.5.1 Avaliação da ocorrência de tolerância cruzada pela mensuração de edema de pata induzido pelo veneno da vespa <i>Polybia paulista</i>	37
3.5.2 Avaliação da ocorrência de tolerância cruzada pela mensuração da produção de anticorpos específicos contra o veneno da vespa <i>Polybia paulista</i>	37
3.5.3 Rejeição de transplante de pele.....	38
3.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	39
4 RESULTADOS	40
4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FOXP3 E TGF-B1 EM LINFONODOS MESENTÉRICOS.....	40
4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TRANSFERÊNCIA ADOTIVA	43
4.3 AVALIAÇÃO TOLERÂNCIA CRUZADA “BYSTANDER” COM O VENENO DE VESPA DA ESPÉCIE <i>POLYBIA PAULISTA</i>	45
4.4 REJEIÇÃO DE TRANSPLANTE	48
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	74

INTRODUÇÃO

A tolerância oral é uma das estratégias de regulação da resposta imune gerada a partir da exposição de um antígeno às mucosas, que representam a maior via natural de interseção do organismo com o meio ambiente. Desta forma, o trato gastrointestinal possui um mecanismo natural de supressão de respostas inflamatórias contra estes antígenos que entram em contato com a superfície das mucosas intestinais constantemente, revogando respostas inflamatórias prejudiciais e favorecendo um ambiente tolerogênico (WAKABAYASHI et al., 2006; WANG et al., 2012). O grande aporte antigênico presente no TGI contribui com uma distribuição estratégica de células envolvidas na captura, processamento e apresentação de antígenos, produção de anticorpos e secreção de citocinas (NOVAK et al., 2008).

Assim, a tolerância oral é definida como uma supressão a respostas imunológicas específicas após imunização com um antígeno que foi previamente administrado por via oral (VAZ et al., 1977; WANG et al., 2012). Acredita-se que a tolerância oral seja um mecanismo regulatório e protetor do organismo contra a hipersensibilidade causada pelos compostos não totalmente digeridos e absorvidos através do intestino.

No presente trabalho, a tolerância de mucosas por via oral foi induzida em camundongos *Swiss*, através da utilização de toxinas dermonecróticas recombinantes isoladas do veneno da aranha marrom da espécie *Loxosceles intermedia*. As toxinas dermonecróticas são fosfolipases-D, sendo as moléculas mais estudadas do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*. As toxinas dermonecróticas utilizadas nesse projeto foram produzidas de forma recombinante a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula da aranha marrom da espécie *L. intermedia* (CHAIM et al., 2006; DA SILVEIRA et al., 2006). Uma dessas toxinas, LiRecDT1, possui atividade dermonecrótica, já a outra toxina utilizada, LiRecDT1H12A, sofreu uma modificação através de uma mutação sítio dirigida, onde houve uma alteração de uma histidina da posição 12 por uma alanina, gerando uma toxina dermonecrótica com atividade fosfolipásica drasticamente reduzida (CHAIM et al., 2011).

A toxina LiRecDT1 possui a sua estrutura muito bem caracterizada e LiRecDT1 e LiRecDT1H12A possuem suas atividades biológicas muito bem descritas na literatura, são proteínas pequenas e bastante imunogênicas, características

importantes para a sua utilização como ferramentas na indução e estudo de um evento biológico como a tolerância oral. Em um trabalho anterior do grupo, essas duas toxinas foram capazes de induzir tolerância oral, o que foi comprovado pela diminuição drástica na produção de anticorpos em animais tratados e posteriormente imunizados com essas toxinas (DELGOBO, 2014). Apesar desse trabalho ter demonstrado a indução do evento de tolerância de mucosas, nenhum mecanismo ou aplicação do modelo foram sugeridos.

Considerando isso, o objetivo desse trabalho foi investigar o potencial das toxinas recombinantes da aranha marrom da espécie *Loxosceles intermedia* em induzir estado de tolerância oral. É importante esclarecer que esse trabalho não se propõe a delinear uma nova forma de tratamento para o Loxoscelismo (condição clínica causada pelo envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*), pois não faria sentido tolerizar uma população inteira, mesmo em áreas onde é considerado problema de saúde pública. O que queremos é propor ferramentas para a indução e estudo do evento de tolerância oral, demonstrar os mecanismos básicos envolvidos nesse evento quando induzido pelas toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e propor aplicações para esse modelo de tolerância de mucosas.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 TOLERÂNCIA ORAL

Dentre as possibilidades terapêuticas existentes hoje na clínica, talvez a indução da tolerância oral seja uma das mais interessantes, isso devido ao fato de ser uma terapia antígeno específica que permite que o resto do sistema imune não seja afetado. Isso difere das terapias imunossupressoras existentes hoje, que levam a uma grande queda da resposta imune como um todo (PERON, 2008).

A tolerância oral é uma forma de tolerância imunológica extra tímica induzida por antígenos que atenuam a resposta imunológica a proteínas imunogênicas previamente apresentadas à mucosa entérica (VAZ et al., 1977; WANG e TOES, 2008; WANG et al., 2012). Trata-se de um processo imunológico induzido, no qual a administração de determinado antígeno, via mucosas, induz um estado de hiporresponsividade imunológica. Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez no início do século XX, em analogia à tolerância natural que o organismo desenvolve a componentes próprios (FARIA e WEINER, 2005).

Através do trato gastrintestinal o nosso organismo entra em contato com diversas substâncias externas, como as provenientes da alimentação. O contato com tantos elementos representa um constante estímulo antigênico para o organismo e o resultado mais frequente destes contatos não é uma imunização, mas sim, uma tolerância, definida como uma redução da resposta imune específica após imunização com antígeno previamente contactado por via oral (CARVALHO et al., 2002).

A superfície da mucosa do TGI possui uma área total de aproximadamente 300 m², representando assim um dos maiores sítios de exposição antigênica do corpo humano. Diariamente entram em contato com o TGI uma grande variedade de antígenos, incluindo proteínas e constituintes alimentares, bactérias, produtos químicos e outros (SILVA, 2010). As mucosas representam a maior via natural de interseção do organismo com o meio ambiente. Desta forma, o TGI possui mecanismo natural de supressão de respostas inflamatórias contra estes antígenos que entram em contato com a superfície das mucosas intestinais constantemente, revogando respostas inflamatórias prejudiciais e favorecendo um ambiente tolerogênico (WAKABAYASHI et al., 2006; WANG et al., 2012). Estima-se que o trato gastrointestinal abrigue de 500 a 1000 espécies de diferentes micro-organismos. Este grande aporte antigênico contribui com uma distribuição estratégica de células

envolvidas na captura, processamento e apresentação de antígenos, produção de anticorpos e secreção de citocinas (NOVAK et al., 2008).

Acredita-se que a tolerância oral seja um mecanismo regulatório e protetor do organismo contra a hipersensibilidade causada pelos compostos não totalmente digeridos e absorvidos através do intestino. Existem evidências de que proteínas intactas entram na circulação após as refeições e deficiências na indução de tolerância podem causar, por exemplo, nefrites mediadas por IgA. A tolerância oral não se desenvolve, contudo, em situações de antígenos que persistem e replicam na mucosa intestinal, ou frente a viroses patogênicas e bactérias que invadem diretamente esse ambiente (WANG et al., 2012).

O mecanismo de tolerância oral tem início na mucosa intestinal como resultado do contato antigênico iniciado por via oral que possui efeitos locais e sistêmicos (FARIA e WEINER, 2005). A tolerância não é restrita ao tecido intestinal local, incluindo outros órgãos linfoides considerados importantes para a indução da tolerância oral como as placas de *Peyer*, onde células T secretam citocinas inibidoras (IL-10 e TGF- β) (FUJIHASHI et al., 2001; TSUJI et al., 2003).

A natureza do antígeno, a dose e sua frequência de administração influenciam a indução da tolerância oral (WEINER et al., 2011). Frequentemente, uma única administração oral de antígeno em alta concentração é suficiente para indução de tolerância em camundongos de linhagens suscetíveis, porém linhagens menos suscetíveis requerem a administração de múltiplas doses de antígenos em dias consecutivos. Além da frequência da administração, a forma pela qual o antígeno alcança a mucosa intestinal parece ter grande importância na indução da tolerância oral (FARIA et al., 2003).

Devido à ausência de toxicidade e fácil administração, a técnica de tolerância oral tem sido aplicada na prevenção de muitas respostas imunes indesejadas que causam uma grande variedade de doenças que geralmente envolvem tratamento complicado como hemofilia, diabetes, uveíte, encefalopatias autoimunes, intolerâncias alimentares, alergias a picadas de insetos e outras (AKDIS et al., 1996; ASTORI et al., 2000; HIGGINS e WEINER, 1988; PABST e MOWAT, 2012; RUHLMAN et al., 2007; VERMA et al., 2010; WANG et al., 2012).

Assim, a tolerância oral pode oferecer uma alternativa de terapia para doenças autoimunes e outras desordens imunológicas como alergias e rejeição tecidual em

transplantes, que até o momento são tratados com drogas imunossupressoras que além de muitas vezes serem ineficientes e necessitarem de administração contínua, apresentam efeitos supressores em outras células e tecidos e aumentam o risco de infecções oportunistas e aparecimento de tumores. Os benefícios da abordagem da tolerância oral são evidentes: os agentes são facilmente aplicados, não tóxicos e evocam uma resposta específica para o antígeno utilizado. Com efeito, a administração oral de autoantígenos pode prevenir ou melhorar o curso várias doenças, tendo melhoras evidenciadas nos sinais clínicos em modelos animais de doenças autoimunes como artrite induzida por colágeno e diabetes (MEYER et al., 2012). A tolerância oral previne o desenvolvimento de algumas doenças autoimunes experimentais (KHOURY et al., 1990; ZHANG et al., 1991), alergia (POMERANZ, 1970; VAN HOOGSTRAATEN et al., 1991) e asma experimental (RUSSO et al., 2001).

Portanto a tolerância oral é uma técnica promissora que desperta grande interesse como alternativa para prevenir ou tratar respostas imunitárias indesejadas que causam uma variedade de doenças ou que complicam o tratamento de uma doença. Muitos pesquisadores têm induzido tolerância oral para tratar de forma eficaz doenças autoimunes e inflamatórias em diversos modelos animais (WANG et al., 2012).

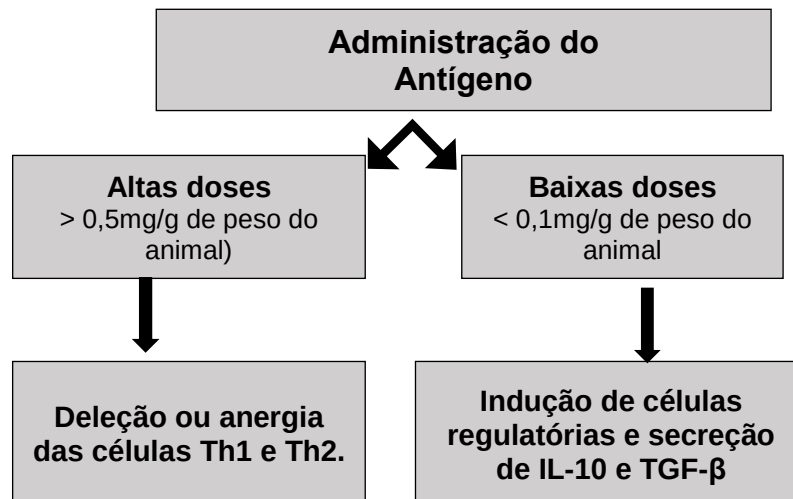
1.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA ORAL

Vários pesquisadores têm demonstrado que a tolerância oral é um processo ativo aparentemente regido por pelos menos dois grandes mecanismos distintos, isso dependendo da concentração do antígeno administrado. Doses mais elevadas administradas em uma única vez (aproximadamente $>0,5\text{mg/g}$ de peso do animal) leva anergia ou deleção e baixas doses (aproximadamente $<0,1\text{mg/g}$ de peso do animal) induzem uma resposta caracterizada por supressão ativa e produção de citocinas com caráter supressor, como IL10 e TGF- β , mediadas pelo favorecimento a indução da regulação de linfócitos T regulatórios (Tregs), como mostra a Figura 1 (WEINER et al., 1994; PERON, 2008; WANG et al., 2012).

BUENO e PACHECO (1999) relatam que existem evidências de que um dos mecanismos primários associados à tolerância oral é a supressão ativa, sendo que

mais recentemente a anergia clonal também tem sido proposta, havendo poucas evidências de que a tolerância oral ocorra por deleção clonal.

Figura 1 - Mecanismos de desenvolvimento de Tolerância Oral de acordo com a dose de antígeno administrada.



Fonte: Adaptado de Bueno e Pacheco, 1999.

A tolerância oral afeta vários aspectos da reatividade imunológica: ela reduz o aparecimento de células formadoras de anticorpos e de anticorpos circulantes; reduz a hipersensibilidade retardada e a proliferação antígeno específica de células T *"in vitro"* (TITUS et al., 1981). A redução do título de anticorpos geralmente é mais difícil de obter do que a redução de respostas celulares, sendo a redução dos títulos de IgE uma exceção a essa regra (MAIA et al., 1974; FARIA et al., 1999).

Os mecanismos de tolerância oral têm sido estudados há mais de 40 anos. A identificação de proteínas Foxp3 como um fator chave de transcrição de células T reguladoras naturais derivadas do timo, e agora chamadas de Tregs e o reconhecimento do TGF-β como uma citocina chave na indução de Tregs, Foxp3 e outras subpopulações de células T, impulsionaram os estudos na área (WEINER et al., 2011). Atualmente o papel das células Tregs na tolerância oral e seu mecanismo de ação tem sido foco de grande atenção.

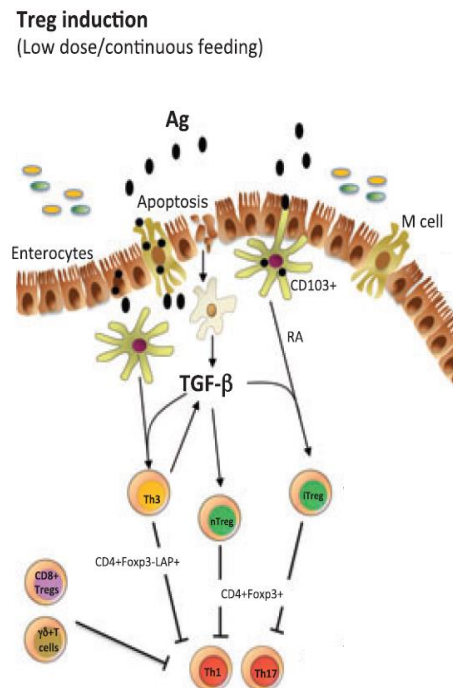
Os linfócitos T regulatórios (T CD4+ CD25+Foxp3+) têm se mostrado como um ponto de controle central na modulação de várias respostas imunológicas, incluindo respostas autoimunes, imunidade aos transplantes, alérgenos, tumores e aos micro-organismos infecciosos. Estas células estão presentes no sangue periférico, na medula óssea e em órgãos linfoides secundários. No sangue periférico representam

de 5 a 10% do total de linfócitos T CD4+. Sua origem foi atribuída inicialmente somente ao timo, onde são selecionadas com a intensidade de reconhecimento a antígenos próprios (SAKAGUCHI et al., 1995). Posteriormente observou-se que as células T regulatórias poderiam ser induzidas através de antígenos não próprios, a partir de linfócitos T CD4+ virgens, gerando os iTreg (WEINER, 2011). Atualmente os Tregs originários do Timo são chamados de Tregs naturais ou nTregs. Células nTreg uma vez que deixam o timo, sobrevivem na periferia prontas para a vigilância normal de autoantígenos, e evitam possíveis respostas autoimunes. Assim, estudos mostram que estas células são de extrema importância para a regulação da autoimunidade e também suprimem uma variedade de respostas inflamatórias (CIRIACO e PICCIRILLO, 2008).

Utilizando um modelo experimental de asma, Mucida e colaboradores (2005) mostraram que camundongos deficientes em nTregs são altamente suscetíveis à indução de tolerância oral. Esse trabalho mostra que a indução da tolerância oral não requer nTregs derivadas do timo já que Tregs com características similares são induzidas (iTreg) pela administração oral de antígeno. Tais resultados são consistentes com a idéia de que a administração oral de antígeno induz Tregs antígeno-específico num processo que requer TGF- β para indução de Foxp3 e, portanto, células T CD4+CD25+Foxp3+ periféricas (MUCIDA et al., 2007).

Para compreendermos de uma maneira melhor quais os mecanismos envolvidos no processo de tolerância de mucosa por via oral precisaram conhecer a anatomia do TGI e os fenômenos celulares encontrados durante a entrada dos antígenos após a ingestão oral (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismo de indução de tolerância oral: Células, citocinas e tecidos relacionados.



Fonte: adaptado de WEINER et al., 2011

Nota: O antígeno oral (Ag) atravessa a barreira do intestino delgado e acessa o GALT via células M (M cell) ou através dos enterócitos e alcança as células dendríticas CD103+ (DCs). As DCs na presença de ácido retinóico (RA) e TGF-beta induzem a diferenciação de linfócitos TCD4+ em Tregs CD4+ FoxP3+

Como já relatado, as mucosas representam a maior via natural de interseção do organismo com o meio ambiente. Essa imensa superfície é banhada cotidianamente por um grande aporte de antígenos da microbiota e da dieta (BRANDTZAEG, 1998).

Quando os antígenos adentram o organismo pela via oral, encontram um compartimento complexo de células e estruturas pertencentes ao tecido linfóide associado ao sistema gastrointestinal (GALT), que é composto de estruturas complexas como as chamadas Placas de Peyer. As placas de Peyer são compostas por um grande número de nódulos linfáticos presentes na submucosa do íleo e apresentam grandes quantidades de linfócitos TCD4+. O duodeno e o jejuno também apresentam nódulos linfáticos na sua submucosa, mas essas são particularmente abundantes no íleo. Além das placas de Peyer, células intraepiteliais, células dendríticas e células presentes na lâmina própria também compõem o GALT (PERON,

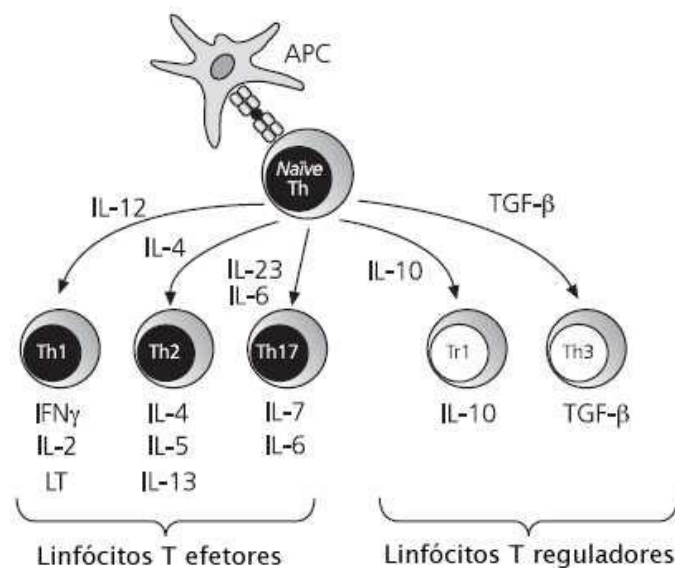
2008). No epitélio intestinal, entre os enterócitos, encontramos as chamadas células M. As células M não apresentam microvilosidades e se localizam principalmente no epitélio acima das placas de Peyer e de outros nódulos linfáticos. Essas células apresentam reentrâncias profundas no seu domínio basal e sua lâmina basal é descontínua. Essas características permitem a captura de antígenos presentes na luz do intestino delgado por endocitose e os transportam para macrófagos e linfócitos situados nas reentrâncias, facilitando, assim, o encontro desses antígenos com o GALT (ROSS e PAWLINA, 2012). Os próprios enterócitos são capazes de capturar antígenos solúveis e apresentá-los a células T (WEINER, 2001; KUNISAWA e KIYONO, 2005).

Antígenos provenientes das células M são capturados por células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) adjacentes, localizadas dentro do domínio das placas de Peyer ou na lâmina própria do intestino, como mostra a Figura 2. Macrófagos podem ser encontrados em grandes quantidades na mucosa intestinal, mas até o momento nenhuma evidência demonstra o seu envolvimento com o estímulo de Tregs e tolerância (MORTEAU, 2004). Atualmente o consenso é o de que as células dendríticas CD103+ (DCs) são as APCs que desempenham o papel mais importante na indução da tolerância oral (THOMÉ et al., 2012). As DCs são sem dúvida as melhores apresentadoras de antígenos, além de apresentarem uma maior capacidade de metabolizar vitamina A e gerar seu principal metabólito, o ácido retinóico que como veremos adiante, é fundamental para diferenciação de células Tregs. DCs são abundantes na mucosa intestinal e podem carrear o antígeno tolerogênico do intestino para linfócitos T CD4+ no GALT e fora dele (MORTEAU, 2004).

O intestino é um local importante de desenvolvimento de Tregs Foxp3+ e as células dendríticas intestinais especializadas promovem a expressão de Foxp3 em linfócitos T CD4+ através de um mecanismo que é dependente de TGF- β local e ácido retinóico, um metabólito da vitamina A (MUCIDA e CHEROUTRE, 2007; COOMBES, et al., 2007; SUN, et al., 2007). A mucosa intestinal é uma fonte rica de TGF- β e as células epiteliais dos intestinos produzem tanto o TGF- β quanto IL-10. Especificamente, a indução de Tregs no intestino está relacionada com as células dendríticas que possuem propriedades especiais, as quais resultam na indução preferencial de Tregs Foxp3+ e que estão ligados a ambos os TGF- β e ácido retinóico (WANG et al., 2013).

Células T CD4⁺ se diferenciam em Tregs na presença de TGF- β e ácido retinóico ou em células Th17 na presença de TGF- β e IL-6 (Silva, 2010) (Figura 3). Assim o ácido retinóico juntamente com a DCs induzem a conversão de células T CD4⁺ naíve em células T CD4⁺ FoxP3⁺, células estas fundamentais na indução tolerância oral, enquanto suprimem linfócitos Th17 pró-inflamatórios. Células T regulatórias Foxp3⁺ mostraram que são capazes de suprimir a proliferação de outras células *in vitro* e prevenir o desenvolvimento de doenças autoimunes e outras doenças inflamatórias em modelos animais (SAURER e MUELLER, 2009). Acredita-se que o principal efeito induzido pelas DCs na tolerância deve-se a expressão de TGF- β e IL-10 secretadas pelos Tregs que inibem a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-17.

Figura 3 - Classificação de linfócitos T *helper* ativados



Fonte: Adaptada de RAMIRO et al., 2008

Nota: O reconhecimento do antígeno e citocinas específicas determinam a diferenciação dos linfócitos T em subpopulações efetoras e reguladoras.

Thomé e colaboradores (2012) relatam que a evolução da doença autoimune está associada à infiltração de linfócitos T do subtipo *helper* 1 (Th1) no sítio alvo com secreção de citocinas como interleucina-2 (IL-2), IFN- γ , além do aumento de expressão do receptor de IL-2 (IL-2R). Por outro lado, a supressão da doença autoimune está ligada à presença de células Tregs Foxp3⁺ com secreção de

interleucina 10 (IL-10) e TGF- β . Como já relatado, a tolerância oral indica a incapacidade na montagem de resposta imune sistêmica a antígenos solúveis expostos previamente ao trato gastrointestinal, e apresentado posteriormente por outra via (WANG et al., 2012). Desta forma temos um aumento na secreção de citocinas com características anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , secretadas por Tregs Foxp3⁺ e uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-17.

A citocina anti-inflamatória TGF- β , como já mencionado, desempenha um papel central na tolerância oral, uma vez que medeia a indução e manutenção de Tregs Foxp3⁺ (Wang et al., 2012). A TGF- β é um polipeptídeo multifuncional envolvido em vários processos celulares, tais como a produção de matriz extracelular, angiogênese, diferenciação, proliferação, apoptose e imunomodulação (Wang et al., 2013). A TGF- β 1 é um mediador importante de diferenciação das células epiteliais e a troca de classe IgA e tem propriedades imunossupressoras potentes sobre os linfócitos (ROBERTS e SPORN, 1993).

O protocolo utilizado para demonstrar o desenvolvimento ou não de tolerância oral envolve a imunização com o antígeno - previamente administrado por via oral – na presença de adjuvante. Adjuvantes são usualmente definidos como compostos que podem aumentar e/ou modular a imunogenicidade intrínseca de um antígeno e, de acordo com o próprio significado da palavra, do latim *adjuvare*, tem como função ajudar. Esses compostos têm a habilidade não só de aumentar, mas de seletivamente direcionar a resposta imune de diferentes antígenos e essas propriedades têm sido consideradas em várias estratégias de vacinação para alcançar uma resposta imune celular ou humoral efetiva. Quando ocorre o desenvolvimento de tolerância oral a um antígeno, os títulos de anticorpos específicos produzidos contra esse antígeno diminuem (GUY, 2007; SILVA, 2010). Além da diminuição na produção de anticorpos, a tolerância oral também se caracteriza pela introdução de antígenos específicos pela via oral e posterior diminuição da resposta celular e patogenicidade frente ao mesmo antígeno quando este antígeno é reintroduzido por outra via como a subcutânea ou parenteral (PERON, 2008; WEINER, 2011). A falha nos mecanismos de indução de tolerância oral pode iniciar respostas como a hipersensibilidade e doenças autoimunes (SILVA, 2010).

A tolerância oral é uma metodologia promissora e, apesar de ser um fenômeno conhecido há mais de 50 anos, os eventos moleculares associados com a sua geração

e a habilidade de aplicá-la com sucesso no tratamento de respostas imunes indesejadas precisa ser ainda muito estudada e melhorada.

1.3 TOXINAS DERMONECRÓTICAS DE *LOXOSCELES INTERMEDIA*

O veneno produzido pelas aranhas do gênero *Loxosceles* (aranhas marrons) é uma mistura essencialmente protéica de compostos biologicamente ativos, com a presença abundante de enzimas em sua composição (SILVA et al., 2004; APPEL et al., 2005). A partir de análises eletroforéticas pode-se constatar a presença predominante de proteínas e peptídeos de baixa massa molecular (3-45 KDa) (MARTINEZ-VARGAS, 1987; SILVA et al., 2004; SWANSON e VETTER, 2006). As fosfolipases-D, metaloproteases, hialuronidases, serino-proteases, inibidor de serino-proteases, peptídeos inseticidas TCTP e alérgenos, estão entre as proteínas que compõem o veneno que já foram descritas (MACHADO et al., 2005; GREMSKI et al., 2010; CHAIM et al., 2011).

As fosfolipases-D são as moléculas mais estudadas do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*. Na literatura, estas toxinas eram referidas como esfingomielinases-D, devido à sua primeira descrição bioquímica como enzimas capazes de hidrolisar substrato de esfingomielina (CHAIM et al., 2006; CHAIM et al., 2011). Atualmente, com base nas recomendações da IUBMB, estas moléculas são bioquimicamente classificadas como esfingomielinas fosfodiesterases D (EC 3.1.4.41). O termo “Toxina dermonecrótica” é um termo amplamente aplicado por pesquisadores, devido à característica biológica induzida por essas toxinas que desencadeiam dermonecrose *in vivo* (CHAIM et al., 2006, 2011).

A toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 é de 34 kDa, capaz de reproduzir a maioria das manifestações clínicas do veneno da aranha marrom. Vários trabalhos já demonstraram os efeitos causados isoladamente por essa enzima: dermonecrose (CHAIM et al., 2006) hemólise (CHAVES-MOREIRA et al., 2009); agregação plaquetária (DA SILVEIRA et al., 2006; APPEL et al., 2008), distúrbios renais e nefrotoxicidade (LUCIANO et al., 2004; KUSMA et al., 2008), citotoxicidade (KUSMA et al., 2008) alterações na permeabilidade vascular e edema (DA SILVEIRA et al., 2006; APPEL et al., 2008; PALUDO et al., 2009) e massiva resposta inflamatória (PALUDO et al., 2009). Tais efeitos biológicos são muito interessantes uma vez que

sua inibição pode ser utilizada como ferramenta de verificação da ocorrência de tolerância oral em um modelo animal.

Já foi reportado por Murakami e colaboradores (2006) que o aminoácido Histidina da posição 12 das toxinas dermonecróticas tem papel importante na atividade catalítica das fosfolipases-D das aranhas do gênero *Loxosceles*. A Histidina da posição 12 doa um átomo de hidrogênio para o substrato intermediário penta-coordenado gerado, formando a colina. A Histidina 12 então, desprotonada, retira um próton de uma molécula de água, num segundo ataque nucleófilo sobre este intermediário da reação, formando e liberando a então ceramida-1-fosfato como subproduto da reação.

Kusma e colaboradores (2008) reportaram a produção de uma forma recombinante da isoforma LiRecDT1 com uma mutação sítio-dirigido na Histidina da posição número 12, substituindo pelo aminoácido Alanina. A então proteína recombinante mutada, LiRecDT1 H12A, mostrou possuir atividade catalítica praticamente anulada, corroborando com a hipótese sugerida por Murakami e colaboradores (2006) sobre a importância deste aminoácido na atividade destas toxinas dermonecróticas. A toxina LiRecDT1 H12A, assim como a LiRecDT1, também apresenta 34kDa e também foi utilizada nesse trabalho. A presença de atividade enzimática apenas residual torna essa toxina uma ferramenta interessante na indução do evento de tolerância oral, pois pode ser administrada por via oral ou parenteral com maior segurança.

As toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A possuem suas atividades biológicas e bioquímicas muito bem caracterizadas e a toxina LiRecDT1 possui sua estrutura bem caracterizada (LUCIANO et al., 2006; DA SILVEIRA et al., 2006; APPEL et al., 2008; KUSMA et al., 2008; CHAVES-MOREIRA et al., 2009; KUSMA et al., 2009; PALUDO et al., 2009) o que é muito importante para a sua utilização como ferramenta biológica.

Desde sempre, a ovoalbumina tem sido utilizada como a ferramenta padrão ouro para indução e estudo do evento de tolerância oral (MILLER, LIDER e WEINER, 1991; KARLSSON, et al., 2000; NISHIMURA et al., 2004). Entretanto, as toxinas dermonecróticas podem ser mais interessantes que a ovoalbumina. Além de serem mais imunogênicas que a ovoalbumina, o par LiRecDT1/LiRecDT1 H12A apresenta uma toxina com efeitos biológicos bastante nítidos e característicos, que podem ser inibidos pela tolerância induzida pela outra toxina (a mutada) que por apresentar

poucos efeitos biológicos é segura para ser administrada. Mas para que essas toxinas venham a ser utilizadas com este fim, a tolerância oral induzida pelas toxinas dermonecróticas precisa ser bem caracterizada, o que é o objetivo desse trabalho.

1.4 TOXINAS E INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL

Poucos trabalhos na literatura utilizaram toxinas de animais peçonhentos como antígenos na indução de tolerância oral. Os poucos relatos encontrados demonstram que toxinas de animais peçonhentos têm sido utilizadas na indução de tolerância oral para a profilaxia ou tratamento de reações alérgicas. A utilização de venenos de insetos tem sido empregada na indução de tolerância via oral e nasal. Winkler e colaboradores (2003) através da administração de sua principal toxina alérgenana forma recombinante (rVes 5) foi capaz de induzir tolerância via mucosa por supressão com elevação na expressão de IL-10 e TGF β . Tal tolerância pode ser transferida de camundongos tolerizados para camundongos *naive* via células esplênicas, demonstrando mais uma vez que a via da tolerização foi a supressão. A tolerização utilizando o alérgeno recombinante de vespa (rVes 5) também inibiu resposta imune contra a forma recombinante do maior alérgeno do pólen da planta *Bétula fontinalis occidentalis* (*water birch*), o rBet v1, numa clara tolerância cruzada a um antígeno não relacionado (*bystander*). Outros estudos utilizando fosfolipase-A₂ do veneno de abelha também demonstraram indução de tolerância, mas a tolerância cruzada não foi investigada (AKDIS et al., 1996; ASTORI et al., 2000). Até a confecção desse projeto não haviam sido encontrados na literatura relatos de trabalhos utilizando o veneno de aranhas ou suas toxinas na indução de tolerância oral.

Experimentos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstrou que as toxinas dermonecróticas recombinantes na sua forma selvagem (LiRecDT1) e mutada (LiRecDT1H12A) foram capazes de induzir tolerância oral (DELGOBO, 2014), isso pode ser verificado pela drástica redução na produção de anticorpos específicos em animais tolerizados e posteriormente imunizados com as toxinas citadas. Também foi possível verificar uma redução significativa na mortalidade dos animais tolerizados com as toxinas dermonecróticas recombinantes, resultados que demonstram que esta ocorrendo tolerância oral. Entretanto os mecanismos envolvidos na indução dessa tolerância não foram analisados. Considerando isso, neste trabalho, queremos

investigar os mecanismos celulares básicos envolvidos e a resposta imunogênica do animal tolerante frente a estímulos imunológicos específicos e inespecíficos e uma possível aplicação desse modelo para estudos que envolvem eventos de tolerância oral.

As toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1H12A tem as características ideais para que um antígeno induza tolerância de mucosa (via oral): são proteínas pequenas, solúveis e bastante imunogênicas. Além disso, como já mencionado, essas toxinas possuem atividades biológica e bioquímica muito bem caracterizadas o que facilita a sua utilização como ferramentas de indução e estudo do evento de tolerância oral. Entretanto, para que essas moléculas realmente venham a ser utilizadas com este fim, é importante que os mecanismos envolvidos na indução de tolerância sejam esclarecidos. Além disso, alguns ensaios preliminares devem ser realizados para verificar o seu potencial de inibição de respostas imunes indesejadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial das toxinas recombinantes isoladas do veneno de aranha marrom da espécie *Loxosceles intermedia* em induzir estado de tolerância de mucosas (via oral) em modelo animal, avaliando os mecanismos celulares envolvidos e a resposta imunogênica do animal tolerante frente a estímulos imunológicos específicos e inespecíficos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir processo de tolerância oral em camundongos *Swiss* com as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A;
- Analisar os mecanismos celulares básicos implicados na tolerância oral induzida pelas toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A em camundongos *Swiss*;
- Verificar se a tolerância induzida pelas toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A pode ser transferida para outro animal não tolerizado;
- Utilizando o modelo de tolerância oral às toxinas do veneno, verificar a ocorrência de tolerância cruzada (*bystander*), ou seja, tolerância a antígenos não específicos como o veneno de vespa da espécie *Polybia paulista*;
- Analisar se a tolerância induzida pelas toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A pode diminuir a rejeição de transplante de pele em camundongos *Swiss* com pele de camundongos C56BL/6.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

H₂O₂ (Sigma, St. Louis, EUA), H₂SO₄, Tris-HCL (Vetec®), SDS, leite em pó(Molico®), cloreto de sódio (Biotec®), cloreto de potássio(Biotec®), acrilamida, bis-acrilamida, reagente de Bradford (Sigma, St. Louis, EUA), NaOH, BSA da Inlab (São Paulo), OPD da Amresco (Solon, USA), Tween 20 (Vetec®) e Acido acético glacial (Alfhatec®),

3.2 CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos jovens adultos da raça *Swiss* para todos os ensaios descritos abaixo. Esses animais foram provenientes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e mantidos no Biotério Central da UEPG, todos do mesmo sexo (fêmeas) e com idade entre 6 a 8 semanas. Para o ensaio de transplante de pele foram também utilizados camundongos da raça C57BL/6, adultos, provenientes do Biotério do Instituto Carlos Chagas de Curitiba (ICC/FIOCRUZ PARANÁ) e também mantidos no biotério Central da UEPG. Os animais foram mantidos com alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos seguiram as normas de conduta de instituições internacionais de pesquisa animal. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEPG (CEUA) (números do protocolo de aprovação: 3433/12 e 6557/14).

3.3 TOXINAS

A toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 (*Loxosceles Intermedia Recombinant Dermonecrot Toxin 1*) e a toxina dermonecrótica LiRecDT1 H12A utilizadas nesse trabalho, foram clonadas e produzidas pelo grupo do Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga da Universidade Federal do Paraná – UFPR (CHAIM et al., 2006), ambas as toxinas apresentam 34kDa.

A clonagem, expressão, purificação e atividade fosfolipásica da toxina dermonecrótica recombinante (LiRecDT1) e sua forma mutada (LiRecDT1 H12A)

foram realizadas no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de venenos da Universidade Federal do Paraná (UFPR) como descrito por Kusma e colaboradores (2008) e Vuitika e colaboradores (2013). Essas toxinas foram cedidas através de convênio científico firmado entre a UEPG e a UFPR segundo publicação em diário oficial da União (14 de setembro de 2012, no. 179, seção 3, página 78).

O veneno de vespa da espécie *Polybia paulista* foi cedido pela Prof. Marcia Regina Paes de Oliveira do Departamento DEBIOGEM da UEPG.

3.3 INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL PELA ADMINISTRAÇÃO DAS TOXINAS LiRecDT1 E LiRecDT1 H12A

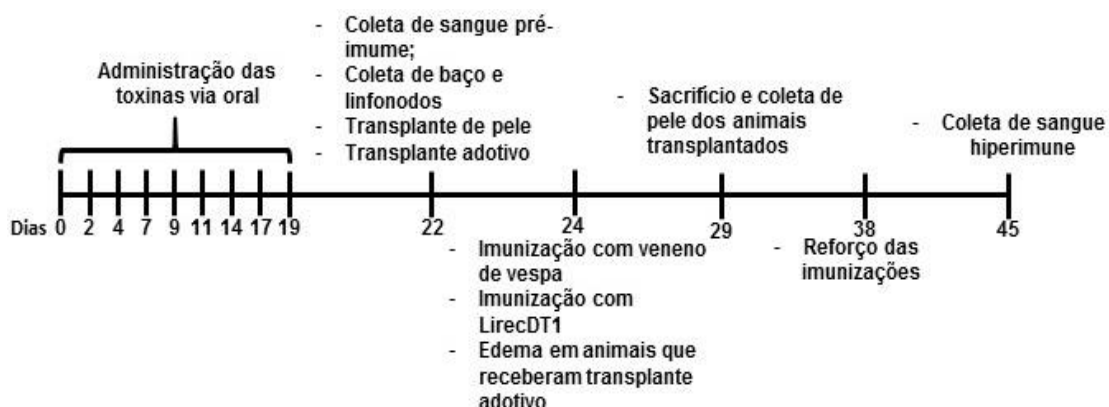
Camundongos da raça *Swiss* foram tratados três vezes por semana, durante três semanas com 10µg/animal das toxinas dermonecroticas recombinantes - LiRecDT1, com atividade fosfolipásica (CHAIM et al., 2006) e LiRecDT1 H12A (mutada, com atividade enzimática residual) (CHAIM et al., 2011), por via oral (gavagem). Considerando isso, cada animal recebeu, no total, 90µg de toxina.

Os camundongos foram então divididos em 4 grupos:

1. Naive: Animais controle tratados oralmente com o veículo das toxinas, ou seja, tampão fosfato-salino (PBS);
2. LiRecDT1 H12A: animais tolerizados com a toxina LiRecDT1 H12A;
3. LiRecDT1: animais tolerizados com a toxina LiRecDT1 e;
4. Imunizado: animais imunizados subcutaneamente com duas aplicações subcutâneas de 10µg da toxina LiRecDT1 ou veneno da vespa *Polybia paulista* e óleo mineral como adjuvante.

O protocolo de tolerização e a curva do tempo para realização dos experimentos e coleta de material estão representados na Figura 4:

Figura 4 - Linha do tempo do protocolo para indução de tolerância oral pela administração das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e demais experimentos/coleta de material



Fonte: A autora.

3.4 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE TOLERIZAÇÃO

3.4.1 Western blotting para análise do fator de transcrição FoxP3 e da citocina TGF- β

Para avaliar se o mecanismos de indução de tolerância oral é através da proliferação de linfócitos Treg FoxP3, linfonodos mesentéricos retirados de animais tolerizados, não tolerizados e imunizados foram lisados com o tampão de extração RIPA (HARLOW E LANE, 1988) complementado com inibidores de proteases (composição no anexo 1). Os linfonodos foram homogeneizados nesse tampão com auxílio de um homogeneizador de tecidos, em gelo. Em seguida o material deixado no gelo por 40 minutos foi centrifugado por 10 minutos a 20.590g. O sobrenadante foi coletado, as proteínas extraídas foram mensuradas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e em seguida resolvidas por separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10% com SDS. Depois as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente em uma solução tampão de Tris-HCl (pH 7,4) contendo o detergente não iônico Tween 20 (0,05%) e leite desnatado (5%), (TBS-T leite). Após o bloqueio os seguintes anticorpos primários diluídos em TBS-T leite foram adicionados:

- Anti-Foxp3 (SAB2700362, Sigma-Aldrich®), diluição de 1:1000;
- Anti-TGF-beta1 (AV37156, Sigma-Aldrich®), diluição de 1:1000;
- Anti-actina, utilizado como normalizador, (A5060, Sigma) diluição de 1:1000.

Os anticorpos primários foram incubados *overnight*, sob agitação, a 4°C sobre as membranas. Após a incubação, as membranas de nitrocelulose foram lavadas cinco vezes de 5 minutos com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-Rabbit acoplado com peroxidase (SA1-9510, Thermo Scientific®) por 1 hora, em temperatura ambiente, sob agitação. Após a incubação as membranas foram lavadas novamente 5 vezes de 5 minutos com TBS-T. A reação foi detectada por autorradiografia quimioluminescente, utilizando como substrato para a enzima peroxidase uma solução contendo H₂O₂ e Luminol (Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). É importante ressaltar que as 3 marcações eram realizadas sobre a mesma membrana. Entre a marcação de uma proteína e outra os anticorpos ligados eram removidos através da incubação da membrana, durante 2 minutos, em solução de NaOH 1 M (*stripping*).

Após a revelação das membranas, as bandas formadas na altura esperada de cada proteína foram densitometradas com o auxílio do programa editor de imagens *Image J*®. (Software de domínio público desenvolvido pelo NIH – *National institutes of Health*, Bethesda, E.U.A)

3.4.2 Avaliação do mecanismo por transferência adotiva

A avaliação do mecanismo de transferência adotiva também nos permite avaliar qual mecanismo a tolerância está se desenvolvendo, permite também verificar se a tolerância está se desenvolvendo via linfócitos Treg FoxP3, uma vez que, se a tolerância não for via Treg, ela não pode ser transferida.

Assim, animais tolerizados com as toxinas LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e PBS foram sacrificados, os baços retirados e colocados em meio de cultura RPMI (Cultilab, Campinas) em banho de gelo. Em seguida os baços foram macerados em placas de Petri com o auxílio de um êmbolo de seringa para formação de uma suspensão celular. Essa suspensão foi incubada com tampão de lise de eritrócitos, por 5 minutos, com agitação manual ocasional e centrifugada a 1500g, também por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células no sedimento foram ressuspensas em meio RPMI e contadas em câmara de Neubauer. 1×10^7 esplenócitos foram inoculados na veia caudal de camundongos Swiss não tolerizados.

Após 24 horas os camundongos que receberam os esplenócitos foram desafiados com uma aplicação de 10µg da toxina LiRecDT1 na pata traseira esquerda. A toxina LiRecDT1 apresenta atividade inflamatória e nessa concentração é capaz de induzir edema intenso com pico em 10 minutos (PALUDO *et al*, 2009). A outra pata de cada camundongo foi desafiada com o veículo da toxina LiRecDT1, ou seja, PBS. Após 10 minutos a espessura das patas foi mensurada com auxílio de um micrometro digital para determinação da formação de edema. Os animais tolerizados com LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foram desafiados apenas com a primeira toxina pois a toxina mutada apresenta atividade biológica drasticamente reduzida, não sendo capaz de causar edema.

Realizado o edema de pata, os animais que receberam os esplenócitos foram então imunizados com a toxina LiRecDT1 H12A por via subcutânea e óleo mineral como adjuvante (em iguais proporções). Após 7 dias da imunização, amostras de sangue dos animais foram coletados para realização da dosagem dos níveis de anticorpos IgG anti-LiRecDT1 H12A, nos soros dos camundongos, por ELISA. Para tanto, microplacas de poliestireno de 96 poços (Costar, doação Hospital de Clínicas de Curitiba), foram sensibilizadas *overnight*, a 4°C, com uma solução de 10µg/ml da toxina LiRecDT1 H12A em tampão fosfato-salino pH 7,4. No dia seguinte a solução contendo a toxina foi desprezada e em seguida os poços bloqueados com 200µl PBS-BSA 1% e incubadas por duas horas à 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 0,1% e incubadas com o soro dos camundongos diluídos 1:200 em PBS-BSA1%, durante duas horas, à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 0,1% e incubadas com 100µl de uma solução contendo anticorpos anti-igG de camundongo (Sigma Aldrich, AV5278) conjugados com peroxidase em uma diluição de 1:3000, por duas horas, a temperatura ambiente. Depois as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 0,1% e uma vez com 200µl de tampão peroxidase (tampão pH 5,2 com citrato de sódio e ácido cítrico). A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 2µl/ml de H₂O₂ e 0,2mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD), em tampão peroxidase, por cinco minutos em temperatura ambiente. As reações foram interrompidas pela adição de 100 µl/poço de uma solução de H₂SO₄ 1M. Absorbância foi medida a 490nm através de leitor de microplaca (Biotek, modelo Synergy H1) sendo os níveis de anticorpos expressos em valores de densidade óptica

(OD) após subtração dos valores basais do soro pré-imune respectivo a cada camundongo.

3.5 APLICAÇÕES DO MODELO DE TOLERÂNCIA ORAL

3.5.1 Avaliação da ocorrência de tolerância cruzada pela mensuração de edema de pata induzido pelo veneno da vespa *Polybia paulista*

Após o protocolo de tolerização, animais tolerizados ou não foram desafiados pela aplicação subcutânea de 10µg do veneno total da vespa *Polybia paulista* em uma das patas traseiras. Após 10 minutos a espessura das patas foi mensurada com auxílio de um micrômetro digital para determinação da formação de edema.

3.5.2 Avaliação da ocorrência de tolerância cruzada pela mensuração da produção de anticorpos específicos contra o veneno da vespa *Polybia paulista*

Animais tolerizados com as toxinas dermonecróticas ou com o PBS (controle) foram imunizados com 2 aplicações subcutâneas do veneno de vespa da espécie *Polybia paulista* (10µg) e óleo mineral como adjuvante (em volumes iguais). As aplicações ocorreram em intervalos de duas semanas e sete dias após a última aplicação os camundongos foram sacrificados e amostras de sangue coletadas para mensuração de anticorpos específicos.

A avaliação dos anticorpos da classe IgG específicos para as proteínas do veneno de vespa presentes no soro dos camundongos foi realizada através do método ELISA como descrito anteriormente na secção 3.4.2. Entretanto, a sensibilização dos poços foi realizada com uma solução de 10µg/ml do veneno da vespa *Polybia paulista*.

3.5.3 Rejeição de transplante de pele

Na literatura podem ser encontradas várias formas de se realizar transplante de pele entre camundongos. Antes da realização dos ensaios de rejeição de transplantes, 3 métodos foram testados: fixação por pontos cirúrgicos simples, fixação por bandagem e adaptação curativo sob pressão descrito por Brown, sendo a última técnica escolhida por apresentar melhor fixação do transplante.

1. Adaptação curativo sob pressão descrito por Brown:

- a. Os animais doadores (C57BL/6) foram sacrificados por meio de deslocamento cervical e, logo em seguida, seu dorso foi depilado e desinfetado com solução alcoólica a 70%;
- b. Com um bisturi lâmina 10 foi feita a incisão na pele do dorso do animal e a retirada do maior tamanho possível de pele;
- c. Essa pele, que será enxertada no outro animal, foi acomodada em uma placa contendo solução de Krebs gelada para mantê-la viável até o momento de enxertá-la;
- d. Os camundongos Swiss (receptores) foram anestesiados com aplicação intraperitoneal de xilazina e quetamina sendo a dose daquela 125mg/kg de peso do animal e desta 70mg/kg peso do animal;
- e. O dorso do animal receptor também foi depilado e degermado e a incisão com o bisturi foi de aproximadamente 1 cm². Obs: A pele retirada do doador sempre deve ser maior já que a ferida do leito receptor se abre após a incisão;
- f. A área livre deixada pela incisão então foi ocupada pela pele do doador que anteriormente estava na solução de Krebs. Obs: Essa pele, para ser enxertada, deve ser preparada de forma a retirar toda a gordura subcutânea para que o enxerto se viabilize. Isso é realizado porque nos primeiros dias não há vascularização do enxerto, então o enxerto deve ser nutrido apenas por difusão celular;
- g. Foi realizado ponto cirúrgico simples na pele do animal receptor sem afetar o enxerto e deixado um fio longo saindo do ponto (Figura 11);
- h. Então foi colocado uma gaze umidificada com soro fisiológico e dobrado em 4 partes no enxerto;

- i. O fio longo que sai do primeiro ponto então foi fixado na extremidade oposta de forma a fixar a gaze no leito do enxerto;
- j. Repetiu-se os passos 1g-1i de forma a formar uma 'cruz' com o fio em cima da gaze (Figura 11C)

Após a realização do procedimento a pele transplantada foi analisada por observação direta avaliando se houve respostas típicas da rejeição como vermelhidão, edema e calor devido ao processo inflamatório, até a possível necrose do tecido enxertado, representado por enrijecimento e escurecimento do enxerto. Após a escolha do melhor método de transplante de pele, camundongos foram tolerizados com as toxinas dermonecróticas e PBS, conforme o item 3.3 e após o protocolo de tolerização os animais tolerizados foram submetidos ao transplante de pele.

Uma semana depois os enxertos foram analisados macroscopicamente e em seguida retirados e processados para análise histológica. Resumidamente os enxertos foram fixados em solução ALFAC (Anexo II) por 16 horas, transferidos para álcool 70% e submetido às etapas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina a 50°C. Após a inclusão realizaram-se cortes histológicos com uso do Micrótomo na espessura de 6µm. Esses cortes foram então corados com HE (Hematoxilina e Eosina) para avaliações histológicas qualitativas.

3.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software Graphpad Prisma* versão 5.0 (*Graphpad software* INC, San Diego, USA). Foram utilizados os testes de ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FOXP3 E TGF- β EM LINFONODOS MESENTÉRICOS

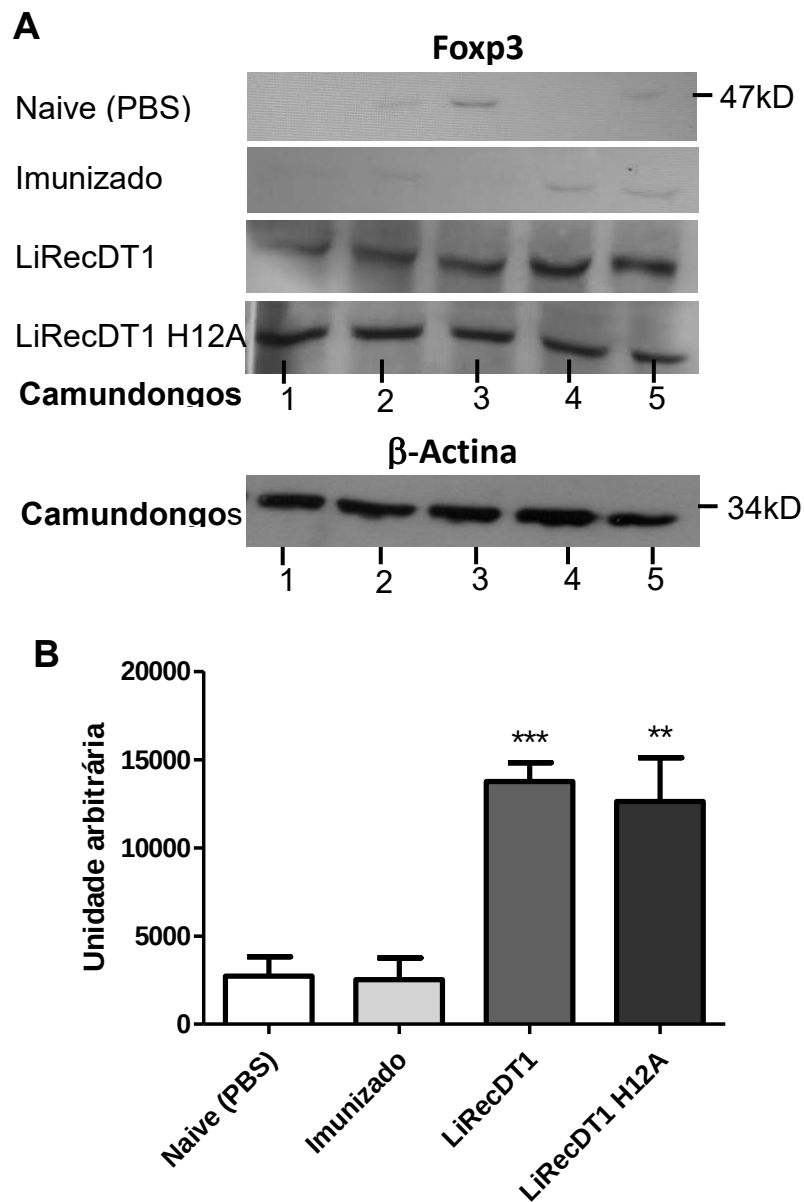
Linfócitos T regulatórios desempenham papel crítico na revogação da autoimunidade e na manutenção da autotolerância. Para avaliar o mecanismo pelo qual a tolerância oral é induzida com toxinas dermonecróticas, avaliamos a expressão do fator de transcrição nuclear FoxP3 e da citocina TGF- β 1, fundamental para indução de diferenciação de linfócitos Tregs. Até o momento Foxp3 é considerado o marcador de linfócitos Treg mais específico e confiável.

Para avaliar a expressão de Foxp3 e TGF- β 1, animais foram tolerizados e um grupo imunizado. Ao término do protocolo de tolerização e imunização, os linfonodos mesentéricos foram retirados, processados e, através da técnica de *Western blotting* foi realizada a sua quantificação.

A Figura 5 mostra um aumento significativo de Foxp3 nos linfonodos mesentéricos dos animais tolerizados com ambas as toxinas em relação ao grupo naíve e imunizado. Isso sugere que pelo menos um dos mecanismos de tolerância induzido através da administração oral das toxinas dermonecróticas envolve a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ naíves em linfócitos Treg Foxp3⁺.

Um dos avanços mais significativos no conceito da tolerância oral tem sido a demonstração de que a citocina TGF- β desempenha um papel central na indução da tolerância imunológica. TGF- β é uma molécula imunorreguladora, com propriedades imunossupressoras sobre os linfócitos (CHRIST M, et al., 1994), sendo essencial para a diferenciação de linfócitos Treg Foxp3⁺. Assim, a Figura 6 mostra que também houve um aumento significativo nos níveis de TGF- β 1 no linfonodo mesentérico dos animais do grupo tolerizados, sendo observado um aumento maior e estatisticamente significativo do grupo tolerizado com a toxina LiRecDT1 em relação a toxina mutada LiRecDT1 H12A.

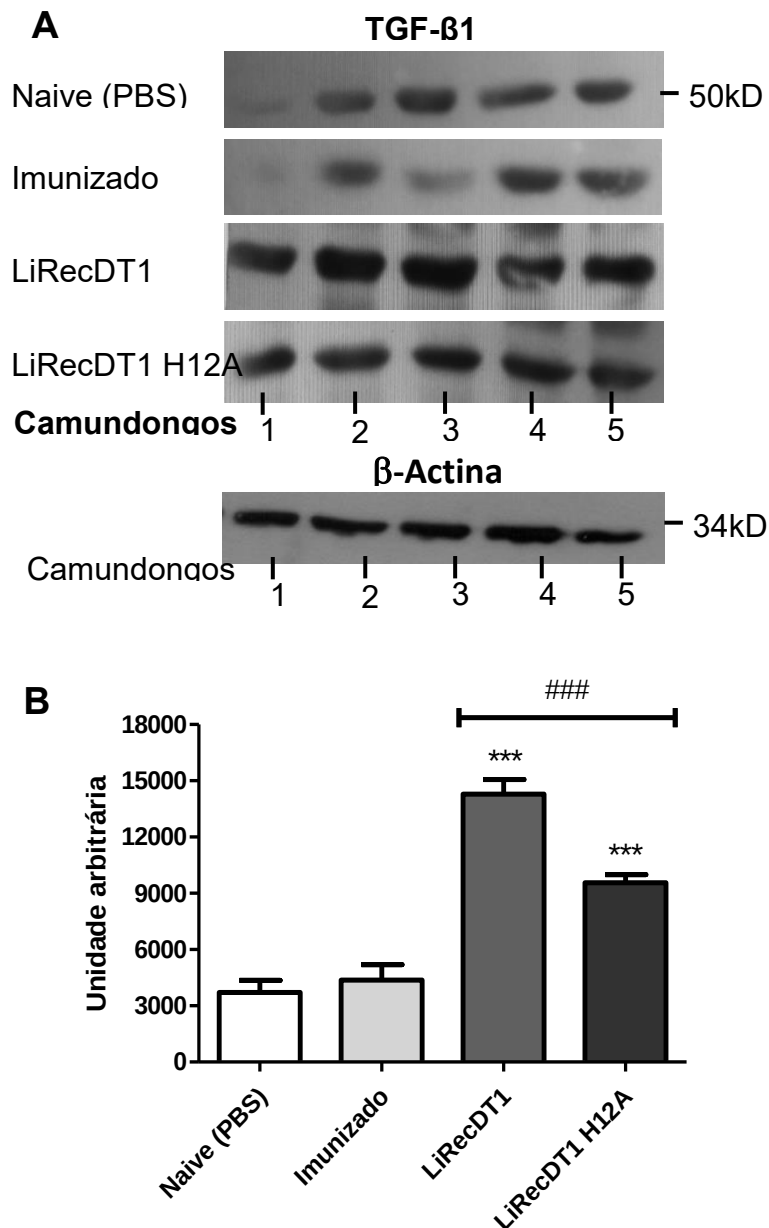
Figura 5 - Indução de Tolerância oral com as toxinas dermonecróticas LirecDT1 e LiRecDT1 H12A aumenta a expressão do fator de transcrição Foxp3 nos linfócitos mesentéricos.



Fonte: A autora

Nota: Naive: animais não tolerizados. Imunizados: animais que receberam toxina LiRecDT1 H12A via subcutânea apenas. LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A: animais tolerizados oralmente com essas respectivas toxinas. A - Imagens do *western blotting* feito com extrato dos linfonodos mesentéricos e incubado com anticorpo anti-Foxp3 e actina. B – análise estatística feita pela densitometria das bandas do *western blotting* utilizando o programa *ImageJ*. Anova de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao naive. $n = 5$ animais/grupo.

Figura 6 - Indução de Tolerância oral com as toxinas dermonecróticas LirecDT1 e LiRecDT1 H12A aumenta a expressão da citocina anti inflamatória TGF- β 1 nos linfonodos mesentéricos.



Fonte: A autora

Nota: Naive: animais não tolerizados. Imunizados: animais que receberam toxina LiRecDT1 H12A via subcutânea. LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A: animais tolerizados oralmente com essas respectivas toxinas. A -Imagens dos *western blottings* feitos com extrato dos linfonodos mesentéricos e incubados com anticorpo anti-TGF beta1 e actina. B – análise estatística feita pela densitometria das bandas do *western blotting* utilizando o programa *ImageJ*. Anova de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao naive. #### $p < 0,001$ da toxina LirecDT1 H12A em relação a toxina LiRecDT1. $n = 5$ animais/grupo

4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TRANSFERÊNCIA ADOTIVA

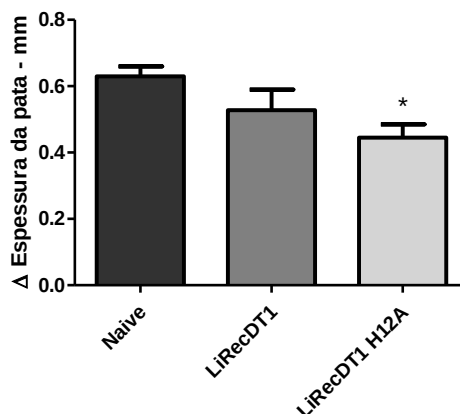
A transferência adotiva pode ser definida como a transferência de imunidade através da transferência de células do sistema imune de um indivíduo para outro. A literatura tem apresentado várias teorias para a indução de tolerância oral: anergia clonal, deleção clonal e supressão mediada por células regulatórias (WHITACRE et al., 1991). Quando a transferência adotiva resulta na diminuição de respostas inflamatórias ou produção de anticorpos em animais naive receptores isso pode sinalizar que o mecanismo de tolerância pode envolver células regulatórias.

Para avaliar os efeitos da transferência adotiva um *pool* de células esplênicas (1×10^7 /camundongo) retiradas de animais tolerizados foi injetado, por via intravenosa, em animais não tolerizados (naives). No dia seguinte após o tratamento com as células esplênicas, os camundongos foram desafiados recebendo uma aplicação subcutânea de 10ug da toxina LiRecDT1 na pata direita. A outra pata foi tratada com o veículo da toxina LiRecDT1, ou seja, PBS. 10 minutos depois o edema de pata foi mensurado. Em seguida os animais foram imunizados subcutaneamente com a toxina LiRecDT1 H12A e adjuvante e 14 dias depois a produção de anticorpos específicos da classe IgG foi mensurada por ELISA.

Após a transferência de esplenócitos de camundongos tolerizados com a toxina mutada (LiRecDT1 H12A) para camundongos naive, houve redução da formação de edema nos animais que receberam esses esplenócitos, após aplicação da toxina dermonecrótica LiRecDT1 na pata, como mostra a Figura 7. Entretanto os animais naive que receberam os esplenócitos de camundongos tolerizados com a toxina LiRecDT1 não apresentaram redução na formação do edema, apesar de uma tendência ter sido observada.

Apesar de uma diminuição na formação do edema ter sido observado nos animais que receberam os esplenócitos de animais tolerizados com a toxina LiRecDT1 H12A, a produção de anticorpos após imunização com a toxina dermonecrótica mutada não foi reduzida (Figura 8).

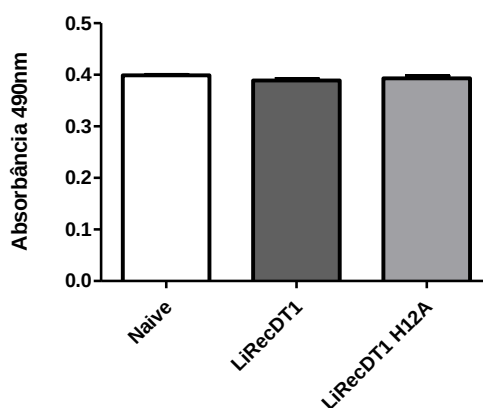
Figura 7 - Transferência adotiva: Avaliação da redução do edema de pata



Fonte: A autora

Nota: Transferência de esplenócitos de camundongos tolerizados com a toxina mutada (LiRecDT1 H12A) para camundongos naive reduz a formação de edema após aplicação da toxina dermonecrótica na pata (transferência adotiva). Esplenócitos (1×10^7) de camundongos ($n=5/\text{grupo}$) tolerizados com a toxina dermonecrótica (LiRecDT1) e dermonecrótica mutada (LiRecDT1 H12A) foram transferidas para camundongos naive por via intravenosa na veia caudal e 24h depois os animais receptores foram desafiados com a aplicação da toxina dermonecrótica (10ug) na pata esquerda. Cada coluna representa a média e desvio padrão da diferença de espessura do edema formado na pata (esquerda) onde foi aplicado o veneno em relação a pata direita onde foi aplicado o veículo (PBS). Teste de Anova uma via seguido de pós teste de Tukey, $*p<0,05$ em relação ao naive.

Figura 8 - Transferência adotiva: Resultado produção de anticorpos



Fonte: A autora

Nota: A transferência de esplenócitos de camundongos tolerizados com a toxina LiRecDT1 H12A ou LiRecDT1 para camundongos naive – Transferência Adotiva. Ensaio de transferência adotiva (transferência de esplenócitos de camundongos tolerizados com a toxina LiRecDT1 H12A ou LiRecDT1 para camundongos naive) não inibe a produção de anticorpos após imunização com a toxina dermonecrótica mutada. Naive: animais que receberam aplicação intravenosa de esplenócitos de animais tolerizados com o veículo (PBS). LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A: animais que receberam aplicação intravenosa de esplenócitos de animais tolerizados com essas respectivas toxinas. Todos os grupos foram imunizados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 H12A e 7 dias depois o sangue foi coletado e a produção de anticorpos anti-LiRecDT1 H12A foi mensurada por ELISA. $n=5$ animais/grupo.

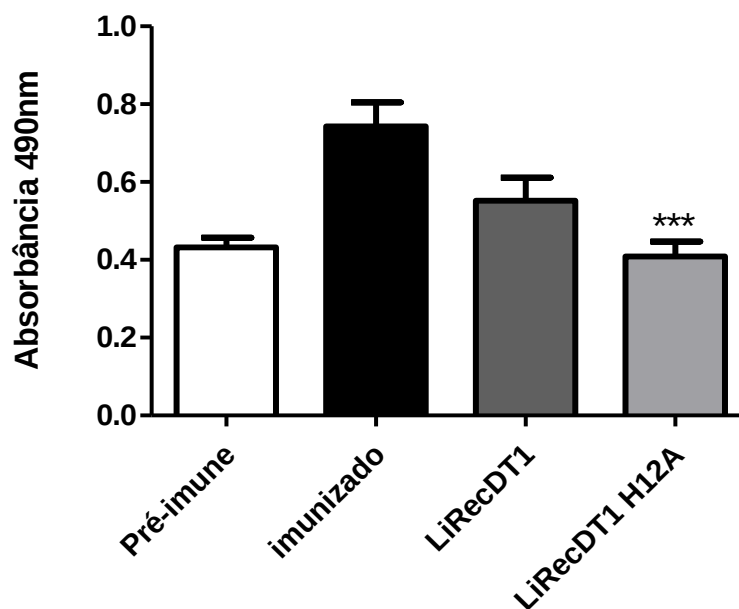
4.3 AVALIAÇÃO TOLERÂNCIA CRUZADA “BYSTANDER” COMO VENENO DE VESPA DA ESPÉCIE *POLYBIA PAULISTA*.

Independente dos mecanismos imunológicos envolvidos na indução da tolerância pelas mucosas, uma questão importante é o grau de especificidade e de eficiência deste fenômeno (BORDUCCHI, 2009). A indução de tolerância pode levar a geração de células Tregs de maneira antígeno-específica e, uma vez geradas, essas células podem suprimir respostas imunes de uma maneira geral quando encontram um antígeno tolerante no órgão alvo, fenômeno este conhecido como tolerância cruzada (FARIA e WEINER, 2006). Este fenômeno pode ser explicado pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β .

Para análise da tolerância cruzada animais tolerizados foram imunizados com 2 aplicações subcutâneas do veneno da vespa *Polybia paulista* (10 μ g/aplicação). As aplicações foram realizadas com intervalos de duas semanas. Sete dias após a última aplicação os camundongos foram sacrificados e amostras de sangue coletadas para avaliação de produção de anticorpos das classes IgG específicos para os componentes do veneno de vespa *Polybia paulista*.

A Figura 9 mostra que a indução de tolerância oral utilizando a toxina LiRecDT1 H12A reduziu os níveis de produção de anticorpos de forma estatisticamente significativa em animais imunizados com veneno da vespa *Polybia paulista*. Isso demonstra a ocorrência de *tolerância cruzada*, ou seja, a tolerância oral induzida pela toxina LiRecDT1 H12A suprimiu a produção de anticorpos de antígenos não relacionados, como os do veneno da vespa. Entretanto, este evento não foi observado com a toxina dermonecrótica LiRecDT1, apesar de uma tendência poder ser observada.

Figura 9 - Avaliação tolerância cruzada: produção de anticorpos

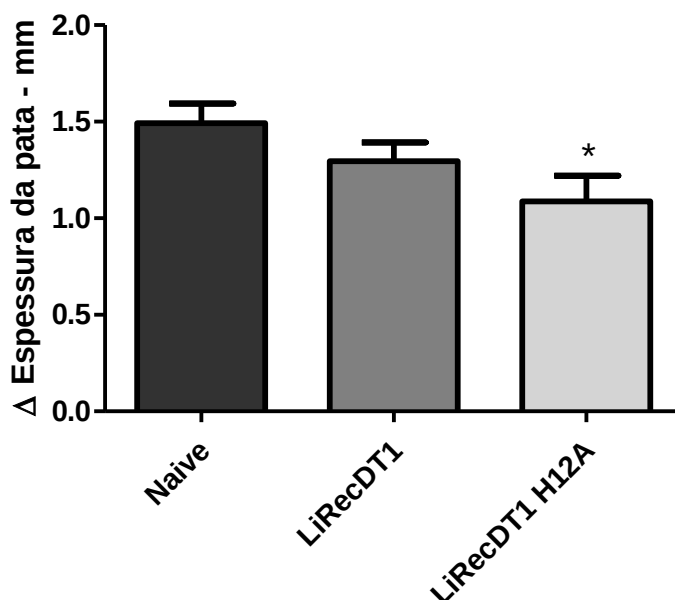


Fonte: A autora

Nota: A indução de Tolerância oral com a toxina dermonecrótica LiRecDT1 H12A reduz os níveis da produção de anticorpos em animais imunizados com veneno da vespa *Polybia paulista* (tolerância cruzada). Pré-imune: animais antes da imunização com o veneno da vespa. Imunizado: animais não tolerizados e imunizados com o veneno de vespa. LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A: animais tolerizados com essas respectivas toxinas e imunizados com o veneno de vespa. Teste de Anova de uma via seguido de pós-teste de Tukey, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo imunizado. $n=5$ animais/grupo.

Além da avaliação dos níveis de anticorpos, a tolerância induzida pela toxina LiRecDT1 H12A também reduziu o edema induzido pelo veneno da vespa *Polybia paulista* (tolerância cruzada) na pata de camundongos Swiss, como mostra a Figura 10. Da mesma forma que na produção de anticorpos, a tolerância induzida pela toxina LiRecDT1 não foi capaz de inibir esse evento biológico.

Figura 10 - Avaliação de tolerância cruzada: Redução de edema de pata.



Fonte: A autora

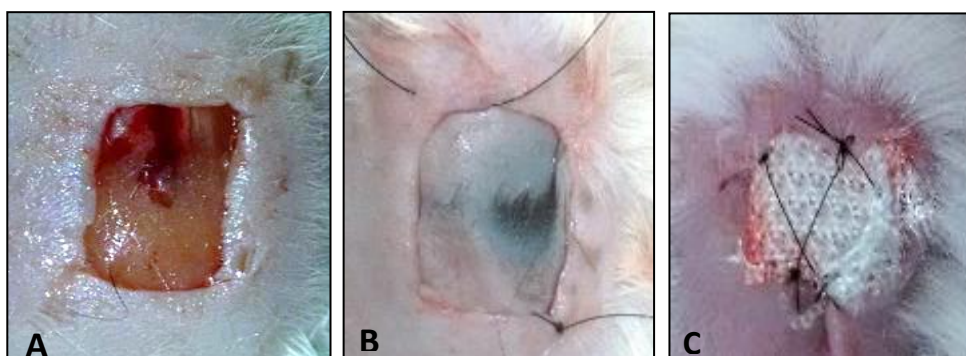
Nota: A Indução de Tolerância oral com a toxina dermonecrótica LiRecDT1 H12A reduz o edema induzido pelo veneno da vespa *Polybia paulista* (tolerância cruzada) na pata de camundongos Swiss. Naive: animais não tolerizados e desafiados com 10ug do veneno de vespa. LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A: animais tolerizados com essas respectivas toxinas e desafiados com o veneno de vespa. Cada coluna representa a média e desvio padrão da diferença de espessura do edema formado na pata (esquerda) onde foi aplicado o veneno em relação a pata direita onde foi aplicado o veículo (PBS). Teste de Anova uma via seguido de pós teste de Tukey, * $p < 0,05$ em relação ao naive. $n=5$ animais/grupo.

4.4 REJEIÇÃO DE TRANSPLANTE

Os camundongos C57BL/6 adultos (doadores) foram sacrificados por meio de deslocamento cervical e, logo em seguida, o dorso dos animais foi depilado e submetido à desinfecção com álcool 70%. Com um bisturi foi feita a incisão na pele do dorso do animal e a retirada do maior tamanho possível de pele. Esse fragmento de pele foi acomodado em uma placa contendo solução de Krebs gelada para mantê-la viável. Os camundongos *Swiss* (receptores) foram anestesiados com aplicação intraperitoneal de xilazina e quetamina. O dorso do animal também foi depilado e desinfetado e a incisão com o bisturi foi de aproximadamente 1cm². A área livre deixada pela incisão então foi ocupada pela pele do doador e fixada com bandagem (técnica de bandagem), ou com pontos cirúrgicos (técnica de pontos cirúrgicos) ou com o curativo sob pressão (técnica de Brown) com fio nylon 4-0.

A fixação do enxerto com pontos cirúrgicos apresentou boa aderência e o seu centro ficou viável, mas era observado reação inflamatória na periferia devido à maceração da pele durante a fixação dos pontos cirúrgicos. O método apenas com a bandagem teve bons resultados, mas o enxerto podia se mover no leito até sua fixação adequada, o que levou a ocorrência de necrose no enxerto de vários animais. Já na técnica adaptada de Brown houve excelente fixação com o mínimo de maceração do tecido enxertado e por isso, foi à técnica escolhida para a continuação dos experimentos (Figura 11).

Figura 11 - Técnica de Brown

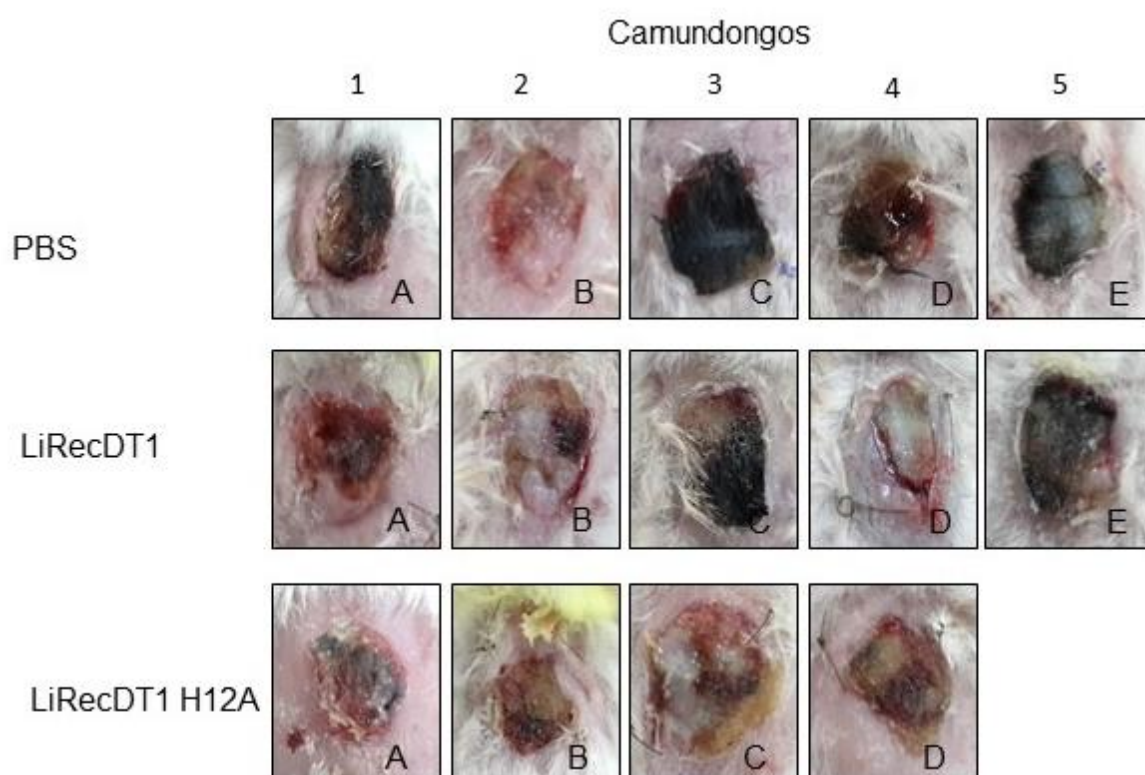


Fonte: A autora

Nota: a técnica padronizada e escolhida para este trabalho a partir da técnica de Brown. A – área livre após incisão no dorso do camundongo *Swiss*, B - imagem do enxerto no leito da lesão e C - o curativo de Brown pronto.

Utilizando a técnica de Brown para a confecção dos transplantes, um grupo de animais foi tolerizado utilizando a toxina recombinante LiRecDT1 e outro grupo com sua forma mutada, LiRecDT1 H12A. Como controle um grupo de animais foram tratados apenas com PBS. Após sete dias foi possível observar que os camundongos tolerizados com as toxinas apresentaram enxerto com melhor adesão e menor reação inflamatória (Figura 12). No grupo controle (PBS), dos 5 animais, 3 apresentaram enxerto inviável (rígido e escuro, compatível com necrose) (A, B e C). No grupo LiRecDT1, dos 5 animais, 2 apresentaram enxerto inviável (C e E). No grupo LiRecDT1 H12A, todos os enxertos foram viáveis na análise macroscópica, apesar de o grupo apresentar 1 animal a menos, que morreu durante a anestesia.

Figura 12 - Análise macroscópica dos enxertos de pele em camundongos *Swiss*.



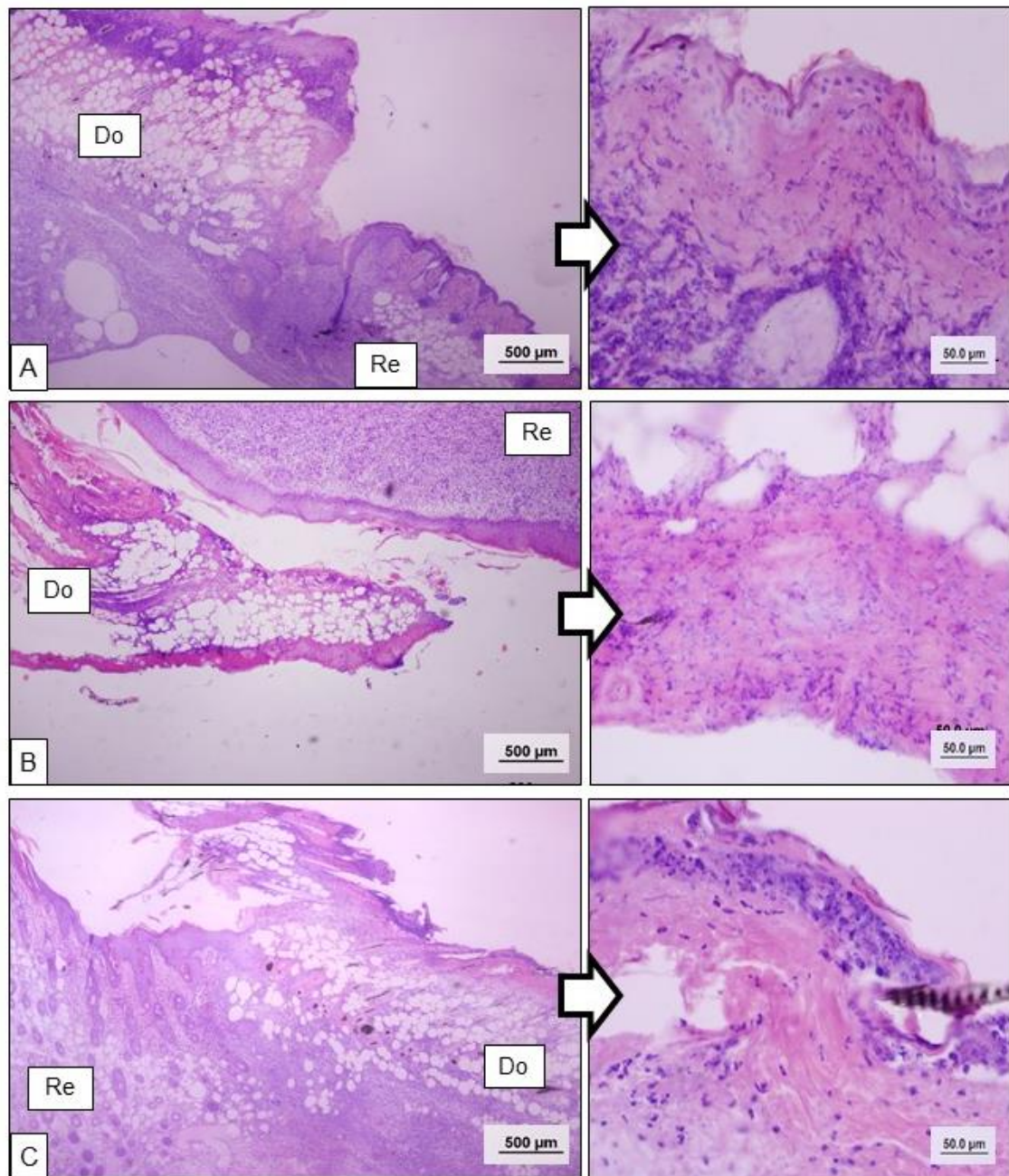
Fonte: A autora

Nota: A análise microscópica foi realizada sete dias após a cirurgia. No grupo controle encontramos três animais com enxerto com aspecto necrótico (A, C e E). No grupo LiRecDT1 dois enxertos com aspecto inviável (C e E) e nenhum no grupo LiRecDT1 H12A.

Analisando as lâminas histológicas de cada um dos enxertos foi possível confirmar que a técnica cirúrgica empregada foi adequada, pois em todas as imagens com aumento de 40x é possível observar continuidade tecidual entre a pele do doador e do receptor. Observando as imagens em maior aumento (400x) é possível observar que todos os enxertos do grupo PBS foram rejeitados (Figura 13). É possível observar perda completa de integridade tecidual da epiderme e derme, sendo difícil distinguir entre as duas estruturas. O mesmo pode ser observado para todos os enxertos do grupo LiRecDT1 (Figura 14).

Em relação ao grupo LiRecDT1 H12A é possível observar ausência de rejeição no enxerto do primeiro camundongo (inserto da Figura 15a). Os núcleos das células da derme e epiderme apresentam-se preservados. Em relação às figuras 15b, 15c e 15d é possível observar início de rejeição com comprometimento dos núcleos celulares, mas ainda é possível distinguir a derme da epiderme, ou seja, provavelmente ocorreu um retardo na rejeição tecidual.

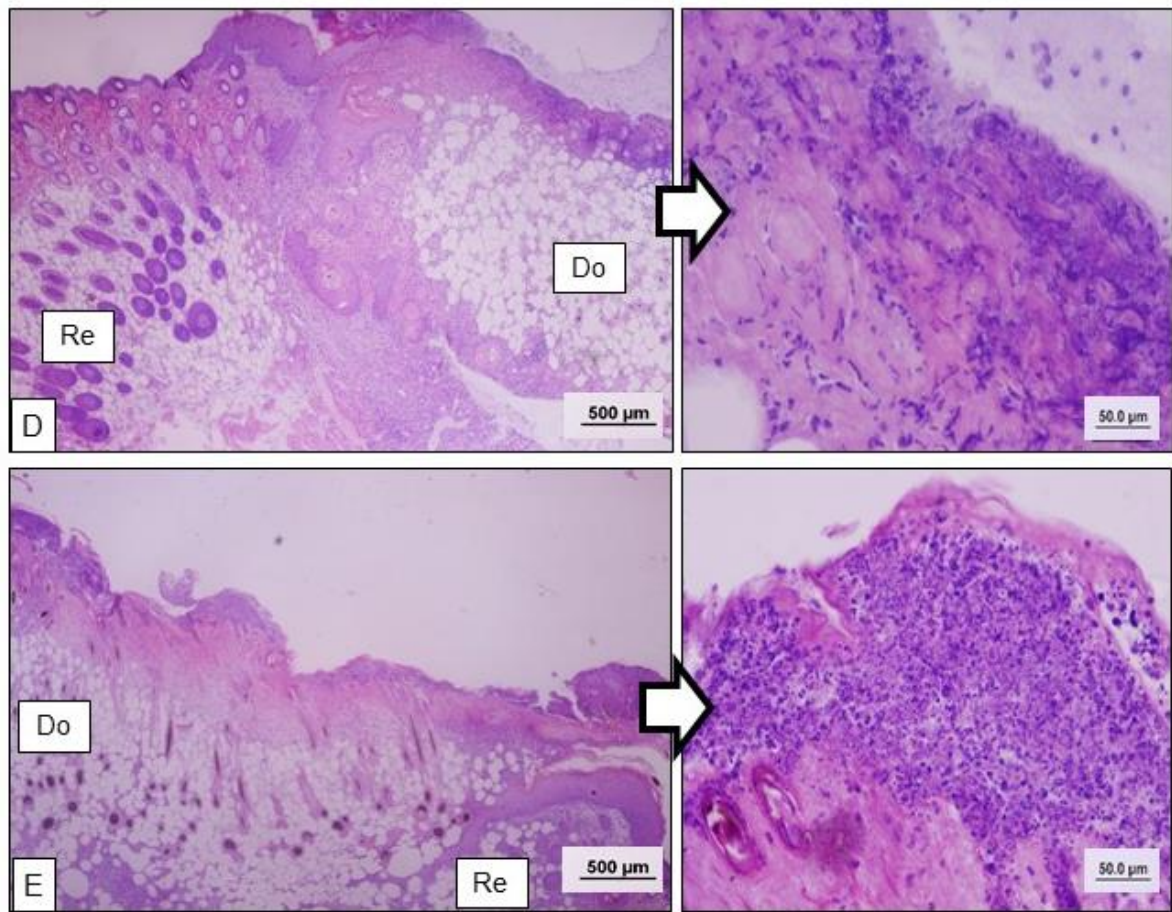
Figura 13a - Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Swiss tratados com PBS.



Fonte: A autora

Nota: O processamento histológico foi realizado sete dias após a cirurgia. A a C – camundongos 1, 2 e 3 controles (tolerizados com PBS), aumento de 40X. Re – pele do animal receptor (Swiss). Do – pele do animal doador (C57BL/6). As setas grandes entre as imagens indicam inserto da imagem imediatamente a esquerda com aumento de 400x mostrando detalhes da epiderme e derme da pele do animal doador (enxerto). É possível perceber a ocorrência de morte (rejeição) do tecido, sendo difícil até mesmo distinguir entre a derme da epiderme. **Continua na próxima página.**

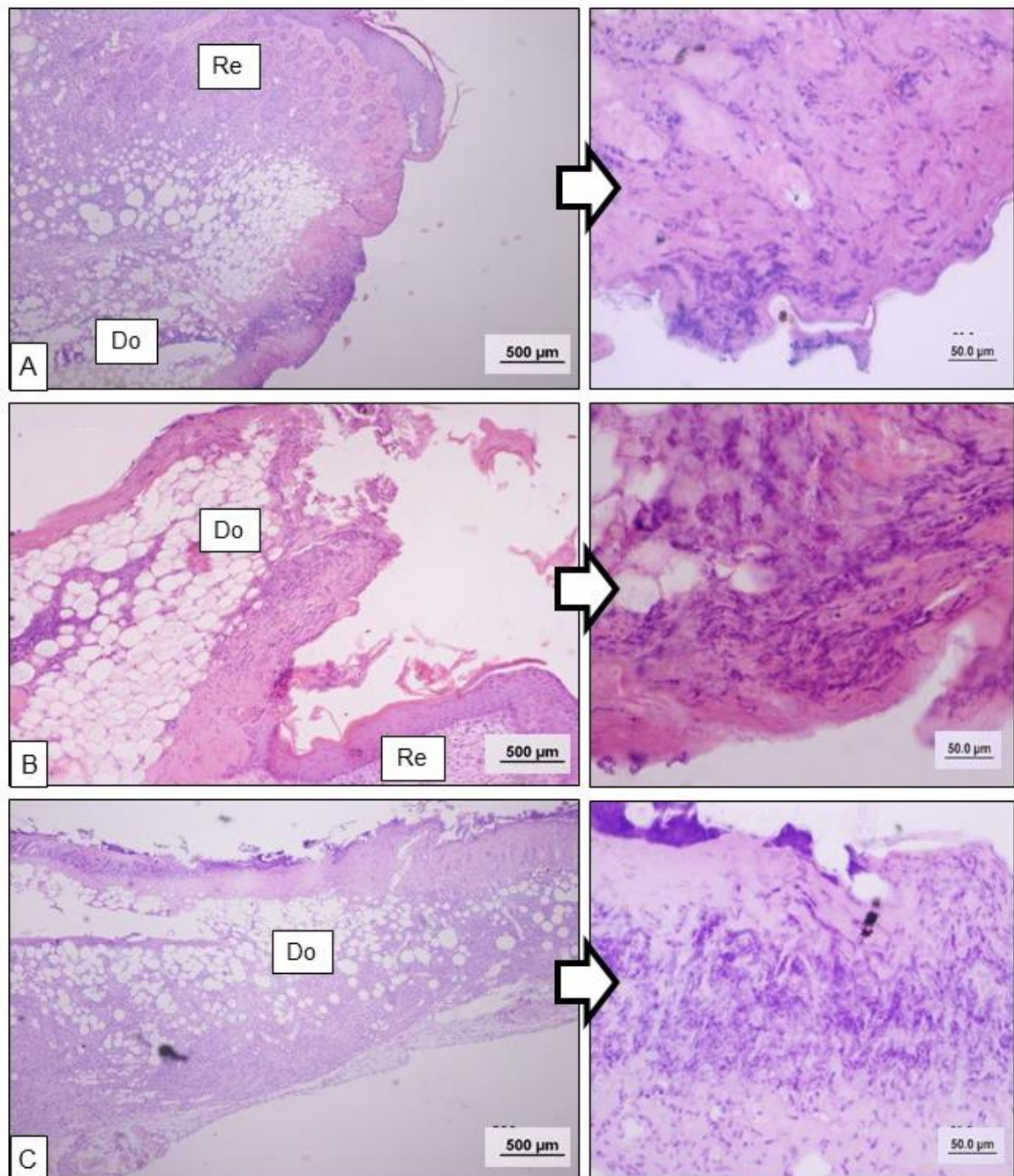
Figura 13b - Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Swiss tratados com PBS.



Fonte: A autora

Nota: O processamento histológico foi realizado sete dias após a cirurgia. D e E – camundongos 4 e 5 controles (tolerizados com PBS), aumento de 40X. Re – pele do animal receptor (*Swiss*). Do – pele do animal doador (C57BL/6). As setas grandes entre as imagens indicam inserto da imagem imediatamente a esquerda com aumento de 400x mostrando detalhes da epiderme e derme da pele do animal doador (enxerto). É possível perceber a ocorrência de morte do tecido (rejeição), sendo difícil até mesmo distinguir entre a derme da epiderme.

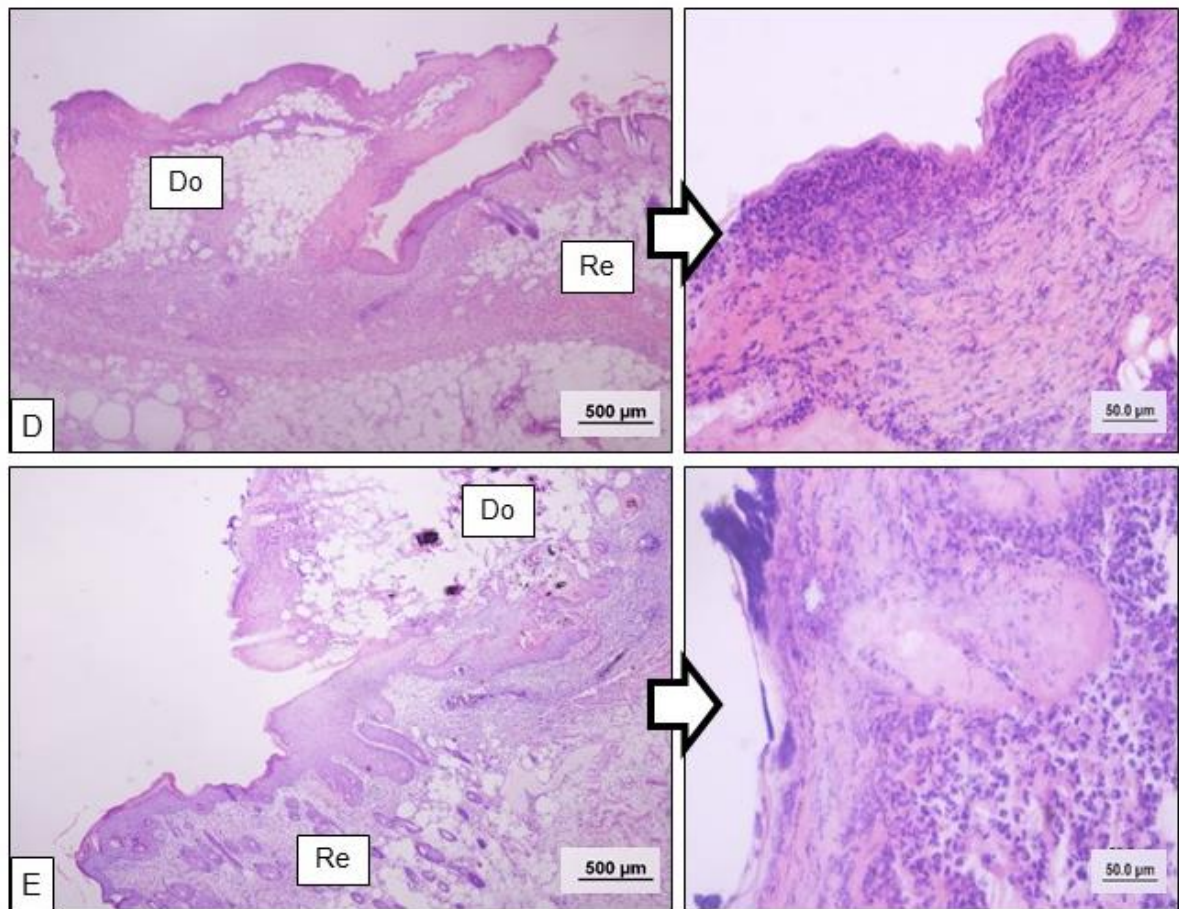
Figura 14a - Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Swiss tolerizados com a toxina LiRecDT1.



Fonte: A autora

Nota: O processamento histológico foi realizado sete dias após a cirurgia. A a C – camundongos 1, 2 e 3 (tolerizados com LiRecDT1), aumento de 40X. Re – pele do animal receptor (Swiss). Do – pele do animal doador (C57BL/6). As setas grandes entre as imagens indicam inserto da imagem imediatamente a esquerda com aumento de 400x mostrando detalhes da epiderme e derme da pele do animal doador (enxerto). Da mesma forma que o grupo controle (PBS) é possível perceber a ocorrência de morte do tecido, sendo difícil distinguir a derme da epiderme. **Continua na próxima página.**

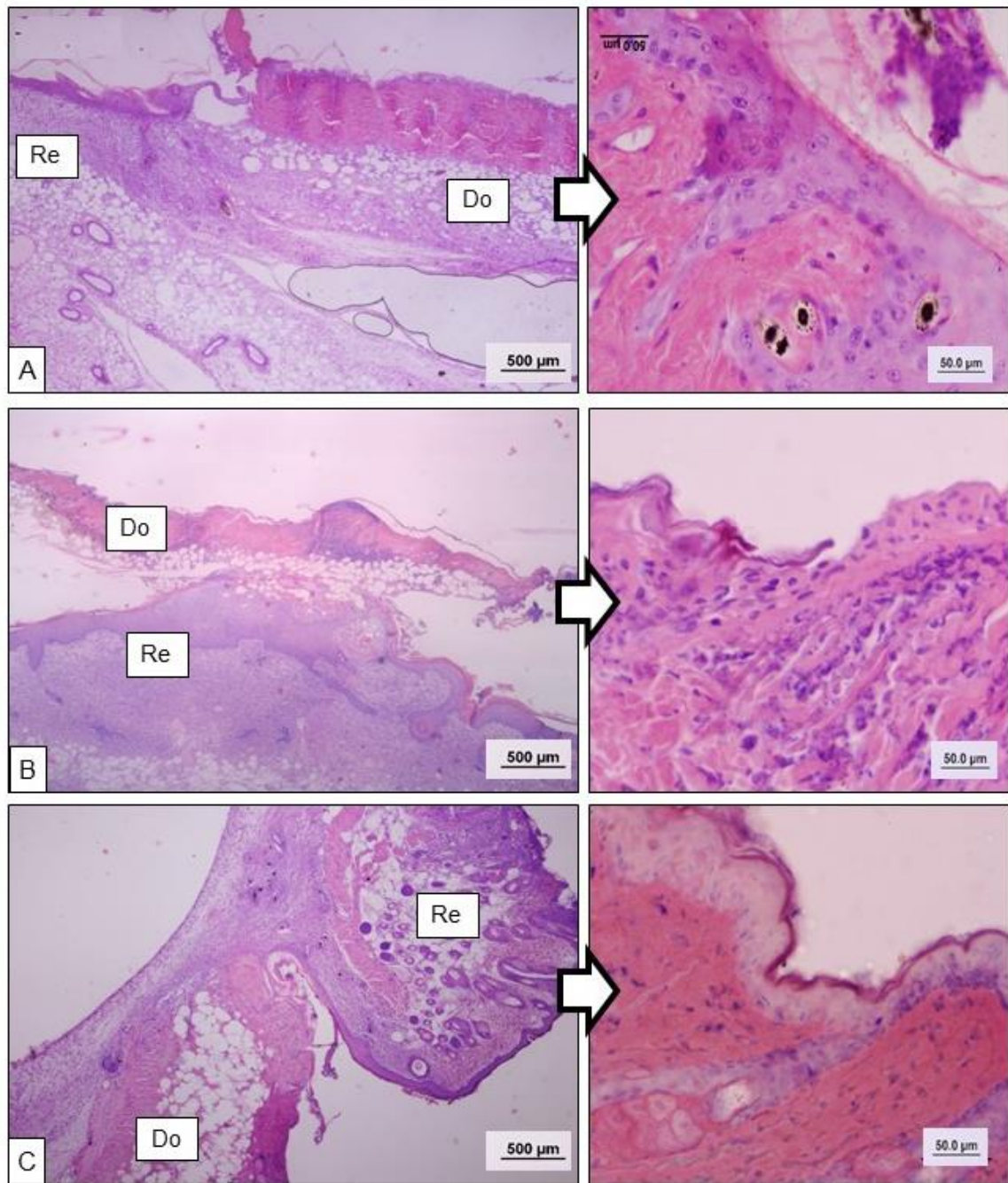
Figura 14b - Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Swiss tolerizados com a toxina LiRecDT1.



Fonte: A autora

Nota: O processamento histológico foi realizado sete dias após a cirurgia. D e E – camundongos 4 e 5 (tolerizados com LiRecDT1), aumento de 40X. Re – pele do animal receptor (Swiss). Do – pele do animal doador (C57BL/6). As setas grandes entre as imagens indicam inserto da imagem imediatamente a esquerda com aumento de 400x mostrando detalhes da epiderme e derme da pele do animal doador (enxerto). Da mesma forma que o grupo controle (PBS) é possível perceber a ocorrência de morte do tecido, sendo difícil distinguir a derme da epiderme.

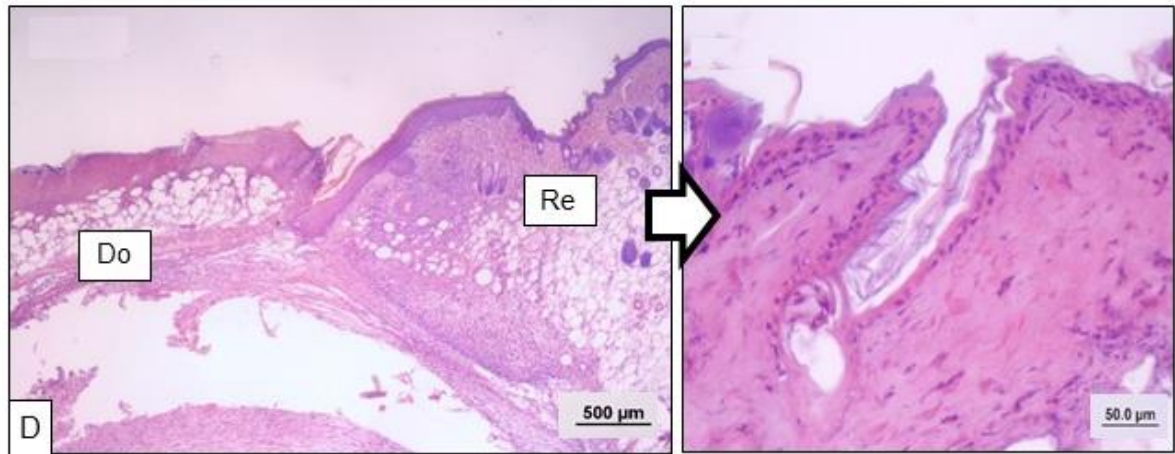
Figura 15a - Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Swiss tolerizados com a toxina LiRecDT H12A.



Fonte: A autora

Nota: O processamento histológico foi realizado sete dias após a cirurgia. A a C – camundongos 1, 3 e 4 (tolerizados com LiRecDT1 H12A), aumento de 40X. Re – pele do animal receptor (Swiss). Do – pele do animal doador (C57BL/6). As setas grandes entre as imagens indicam inserto da imagem imediatamente a esquerda com aumento de 400x mostrando detalhes da epiderme e derme da pele do animal doador (enxerto). É possível perceber manutenção da integridade do enxerto no animal A (inserto) e manutenção parcial nos insertos das imagens dos animais B e C. **Continua na próxima página.**

Figura 15b - Análise microscópica dos enxertos de pele de camundongos C57BL/6 em camundongos Swiss tolerizados com a toxina LiRecDT H12A.



Fonte: A autora

Nota: O processamento histológico foi realizado sete dias após a cirurgia D – camundongos 5 (tolerizado com LiRecDT1 H12A), aumento de 40X. Re – pele do animal receptor (Swiss). Do – pele do animal doador (C57BL/6). As setas grandes entre as imagens indicam inserto da imagem imediatamente a esquerda com aumento de 400x mostrando detalhes da epiderme e derme da pele do animal doador (enxerto). É possível perceber manutenção parcial da integridade do enxerto.

5 DISCUSSÃO

A função fisiológica do sistema imune compreende a formação de uma reação a componentes de micro-organismos, macromoléculas e a pequenas substâncias químicas que são reconhecidas como elementos estranhos, independente das consequências fisiológicas ou patológicas dessa reação (ABBAS et al., 2012). As reações desencadeadas dependem da característica do antígeno e são produto de uma interação complexa de diversos tipos celulares na presença de inúmeras citocinas. Eventualmente, essas reações podem ser direcionadas contra o próprio organismo e, por isso, o sistema imune também precisa modular essas reações, de modo a minimizar o efeito inflamatório causado por micro-organismos comensais, resposta autoimune e antígenos ambientais. Tal modulação tem sido intensamente investigada devido ao seu grande potencial terapêutico (JOSEFOWIZ, LU E RUDENSKY, 2012).

Os sistemas biológicos estão sujeitos a controles reguladores complexos. Para evitar a produção de anticorpos contra antígenos próprios (*self*), mecanismos de seleção foram desenvolvidos para evitar ou modular o desenvolvimento de células autoreativas (BILLINGHAM e MEDAWAR, 1951). O conceito de tolerância imunológica foi introduzido na década de 50, por Medawar e colaboradores (1951) ao observar que a injeção de tecido alogênico em ratos neonatos levava a tolerância de enxerto alogênico posterior. Tal observação levou ao conceito fundamental de que, expondo um sistema imunológico em desenvolvimento a novos antígenos, pode-se induzir tolerância específica, e também inespecífica (BLUESTONE, 2011).

O termo “tolerância oral” tem sido classicamente definido como uma supressão de respostas celulares e/ou humorais a um antígeno que foi previamente administrado por via oral. É um evento imunológico natural dirigido a um antígeno exógeno, que tem acesso ao organismo através das mucosas e é tratado com antígeno próprio, sendo assim, tolerado (MORTEAU, 2004). Analisando essa definição parece algo lógico que o tratamento de doenças autoimunes causadas por respostas inadequadas contra auto-antígenos tenham sido nos últimos tempos tratadas através da exposição desses antígenos a superfície das mucosas do TGI. Nos anos 80, a tolerância oral atraiu considerável atenção quando se mostrou eficiente na inibição de respostas imunopatológicas contra o colágeno do tipo II na artrite reumatoide e a proteína básica da mielina na encefalomielite (THOMPSON e STAINES, 1986; BITAR e WHITACRE,

1988) em animais. Nos anos 90 a técnica começou a ser utilizada para o tratamento de doenças em humanos (WEINER, 1997). A partir disso o potencial clínico da tolerância oral se espalhou sendo testada no tratamento de inúmeras doenças autoimunes, modelos de transplante, alergias, asma e doenças não consideradas mediadas pelo sistema imune, como aterosclerose e Alzheimer (ZHANG et al., 1991; NUSSENBLATT et al., 1990; SATO et al., 1998; SAYEGH et al., 1992; MARON et al., 2000; WEINER et al., 2000).

Apesar de inúmeros trabalhos envolvendo as aplicações e mecanismos do evento de tolerância oral, muito ainda precisa ser desvendado para que se torne uma ferramenta terapêutica ideal.

O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial das toxinas dermonecróticas recombinantes da aranha marrom da espécie *Loxosceles intermedia* em induzir estado de tolerância oral em modelo animal, avaliar os mecanismos celulares envolvidos e a resposta imunogênica do animal tolerante frente a estímulos imunológicos específicos e inespecíficos. Primeiramente avaliaram-se os mecanismos celulares básicos implicados na tolerância oral induzida pelas toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A. Também avaliaram-se os efeitos da tolerância cruzada a antígenos inespecíficos, se a tolerância poderia ser transferida para um animal “naive” e se essa tolerância poderia reduzir a rejeição de um transplante alogênico.

Existem poucos relatos na literatura sobre a utilização de toxinas de animais peçonhentos para indução de tolerância oral. E até o presente momento, não foi encontrado nenhum trabalho que utiliza toxinas de aranha para investigação de eventos de tolerância oral. Experimentos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que as toxinas dermonecróticas recombinantes na sua forma selvagem (LiRecDT1) e mutada (LiRecDT1H12A) são capazes de induzir tolerância (DELGOBO, 2014), uma vez que a administração oral prévia a essas toxinas levou a uma redução drástica na produção de anticorpos específicos quando apresentados por via parenteral.

Apesar de ter sido demonstrado que as toxinas dermonecróticas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A são capazes de induzir tolerância oral, os mecanismos envolvidos não foram demonstrados. Vários mecanismos têm sido propostos para o desenvolvimento de tolerância, porém um fator determinante é a dose de antígeno administrado. De acordo com Faria e colaboradores (1998), a diferença encontrada nos dois modelos de administração oral (altas doses ou baixas doses) do antígeno se

deve ao seu processamento e apresentação por APCs da mucosa. Estas têm sido diretamente relacionadas ao desenvolvimento da tolerância. Altas doses favorecem a indução de anergia ou deleção, enquanto baixas doses favorecem a indução de células T regulatórias (Treg) (WEINER et al., 2011).

Experimentos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa mostrou eficaz a tolerância imunológica induzida com baixas doses de antígeno. Com o sucesso da tolerização oral com baixas doses de antígeno administrado (10µg/administração/animal totalizando 90µg) foram realizados experimentos que poderiam demonstrar o aumento da população de linfócitos T regulatórios. Sabemos que as células T reguladoras (Tregs) têm emergido como um ponto de controle central na modulação de várias respostas imunológicas (CIRIACO e PICCIRILLO, 2008). Evidências indicam que as células Tregs desempenham um papel crucial na manutenção da autotolerância imunológica (*self*). A eliminação dessas células leva ao desenvolvimento espontâneo de várias doenças autoimunes em animais, além de potencializar a resposta imune a antígenos *non-self*, incluindo antígenos de transplante alogênico (NISHIMURA et al., 2004). Pesquisas mostram que a tolerância oral está intimamente ligada com a indução de células Tregs naturais (nTreg) e induzidas Treg (iTreg), (WANG et al., 2013), células fundamentais no controle das respostas imunes em roedores e seres humanos.

A Figura 5 mostra que camundongos tolerizados oralmente com as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A apresentaram níveis de Foxp3 nos extratos de linfonodos mesentéricos maiores que dos camundongos controle, tratados oralmente com PBS apenas. Esse resultado nos dá uma evidência de que a tolerância oral está sendo desencadeada por mecanismos supressivos mediados por células T regulatórias. Fahimeh e colaboradores (2014) observaram que ratos nos quais foi induzida tolerância oral utilizando 1,25-di-hidroxitamina D3, em modelo de lúpus induzido, apresentaram aumento na expressão do RNA mensageiro de TGF-β e os níveis de expressão de RNA mensageiro de Foxp3, e também aumentou a percentagem de linfócitos Treg no baço de animais tolerizados. Em outros estudos utilizando a tolerância oral, pesquisadores mostraram uma melhora terapêutica de animais induzidos a doença alérgica de vias respiratórias, após a tolerização ovoalbumina, os animais tolerizado com Ova tiveram seus níveis de foxp3 aumentados (NISHIMURA et al., 2004). Tais resultados são consistentes com a idéia de que a administração oral de antígeno induz Tregs antígeno-específico num processo que requer TGF-β para

indução de Foxp3, exercendo assim, sua capacidade supressora antígeno-específica a antígenos não próprios (MUCIDA et al., 2005).

A citocina TGF- β é reconhecida como chave na indução de Tregs (LI e FLAVELL, 2008). Células dendríticas, principalmente as CD103+, induzem Tregs FOXP3+ através da produção de TGF-beta na presença de ácido retinóico (MUCIDA et al., 2007). Além de ser importante na indução de Tregs, alguns autores acreditam que a própria Treg libere essa citocina. Howard e Weiner (1997) observaram que protocolos de indução a tolerância com doses baixas de antígeno por via oral, levam a um aumento de Tregs específicas para o antígeno no intestino e atuam através da liberação de citocinas anti-inflamatórias, tais como TGF- β , interleucina 4 e interleucina 10 no órgão alvo. A Figura 6 demonstra que extratos de linfonodos dos camundongos tratados oralmente com as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A apresentaram níveis de TGF- β maiores que dos camundongos controle, tratados oralmente com PBS apenas.

Esses dois resultados sugerem que uma das explicações para o mecanismo de tolerância envolvido em nosso trabalho seria a ativação de linfócitos T reguladores gerados pelo contato com o antígeno pela via oral, que inibiriam a ativação de linfócitos para antígenos não específicos pela secreção de citocinas inibitórias como o TGF- β . Assim temos evidências de que a tolerância oral está sendo desencadeada por mecanismos supressivos mediados por células T, mecanismos ativos envolvendo células T regulatórias, através da secreção de citocinas, como TGF- β (MILLER et al., 1992; WEINER, 2001).

Depois dos ensaios de mensuração de Foxp3 e TGF- β , outros grupos de animais foram tolerizados com as duas toxinas dermonecróticas, sacrificados e as células do baço coletadas e transferidas para camundongos *Swiss* naives (transferência adotiva). Camundongos que receberam os esplenócitos de camundongos tolerizados com a toxina mutada (LiRecDT1 H12A) tiveram uma redução na formação de edema, após aplicação da toxina dermonecrótica na pata (Figura 7). Trabalho anterior do nosso grupo demonstrou que camundongos tolerizados com a toxina LiRecDT1 H12A apresentaram redução significativa no edema gerado pela aplicação da toxina LiRecDT1 na pata (DELGOBO, 2014). A diminuição desse edema em animais naives que receberam esplenócitos demonstra que a tolerância induzida pela toxina LiRecDT1 H12A pode ser transferida para outro animal. Essa transferência de tolerância demonstra mais uma vez que o mecanismo

envolvido nesse evento é a supressão mediada por células Tregs. A tolerância não poderia ser transferida se o mecanismo envolvesse deleção clonal ou anergia, onde células T efectoras perdem a capacidade de migrar, tornando-se hiporresponsivas (WEINER, 2011).

Entretanto a transferência de esplenócitos não reduziu a produção de anticorpos após imunização com a toxina dermonecrótica mutada. A tolerância induzida pela toxina LiRecDT1 H12A pode ser transferida para outro animal, conforme foi verificado pela diminuição do edema induzido pela toxina LiRecDT1 no animal receptor (Figura 7). A produção de anticorpos, por sua vez, não foi inibida (Figura 8). Considerando que a imunização e coleta de sangue do animal receptor ocorreram sete dias depois da transferência de esplenócitos, é possível que essas células tenham sofrido *clearance* pelo organismo dos animais receptores. Animais Swiss são heterogêneos e a manutenção de células de outro animal, mesmo que de mesma espécie e linhagem, não seria tolerada por muito tempo. Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que o sucesso da persistência de células transferidas depende da deleção de linfócitos no animal receptor, através de irradiação de todo o corpo do animal, por exemplo, ou por tratamento imunossupressores (MAIN e MULÉ, 2002; TANCHOT et al., 2002). Karlsson e colaboradores (2000) investigaram se a transferência de sangue de ratos alimentados com ovalbumina (OVA) levava à tolerância específica animais receptores. Os ratos que receberam soro de animais tolerizados apresentaram uma diminuição na reação hipersensibilidade de tipo tardia, mostrando assim que a tolerância poderia ser transferida. Outros pesquisadores também avaliaram a eficácia da transferência adotiva utilizando células do baço de animais tolerantes a ovoalbumina e proteína básica de mielina (PBM), onde também tiveram resultados satisfatórios com os animais receptores. Akdis e colaboradores (1996) utilizando principal alérgeno do veneno de abelha (fosfolipase A2) através da transferência adotiva de células T isoladas de animais tolerantes, observou que ocorre uma diminuição drástica na produção de IgE específica nos animais receptores. Os animais que receberam esplenócitos de camundongos tolerizados com a toxina LiRecDT1 não apresentaram diminuição no edema induzido por essa mesma toxina (Figura 7).

O modelo utilizado neste trabalho para indução de tolerância oral mostrou que a tolerância se estendeu a outros antígenos não relacionados, como os do veneno de vespa. Resultados dos ensaios de tolerância cruzada nos mostram que a indução de

tolerância oral utilizando a toxina LiRecDT1 H12A reduziu os níveis de produção de anticorpos em animais imunizados com veneno da vespa *Polybia paulista* (Figura 9). A supressão significativa de anticorpos, indica a tolerância cruzada de animais tolerizados com toxina LiRecDT1 H12A e desafiados com veneno de vespa *Polybia paulista*, resumindo, a indução de tolerância oral com toxina mutada (LiRecDT1 H12A) pode gerar células reguladoras capazes de interferir nas respostas a outro antígeno não relacionado, demonstrando uma clara tolerância cruzada (*bystander tolerance*). Além disso, o edema induzido pela aplicação de 10ug do veneno da vespa *P. paulista* foi menor em camundongos tolerizados com a toxina LiRecDT1 H12A (Figura 10). A tolerância induzida pela toxina LiRecDT1 não foi capaz de inibir significativamente nem o edema e nem a produção de anticorpos, apesar de uma tendência poder ser observada (Figuras 9 e 10).

O conceito de tolerância cruzada está baseado no fato de que células Treg induzidas pelo tratamento oral com proteínas podem suprimir respostas imunes induzidas por proteínas diferentes, desde que a proteína tolerante esteja presente no mesmo sítio (WEINER e FARIA, 2009; BORDUCCHI, 2009). Winkler e colaboradores (2003) utilizando o alérgeno recombinante de vespa (rVes 5) também inibiu resposta imune contra a forma recombinante do maior alérgeno do pólen da planta *Bétula fontinalis occidentalis* (*water birch*), o rBet v1, numa clara tolerância cruzada a um antígeno não relacionado. Em outro trabalho, feito com células em cultura, esplenócitos de animais tolerizados com ovoalbumina tiveram respostas imunes suprimidas para a proteína básica da mielina (MBP). Da mesma forma, esplenócitos de animais tolerizados com MBP apresentaram supressão de respostas contra a ovoalbumina (MILLER, LIDER e WEINER, 1991). Nesses experimentos foi demonstrado que o componente solúvel da cultura responsável pela supressão foi o TGF- β .

O conceito de tolerância cruzada torna-se muito interessante para a terapia de doenças inflamatórias autoimunes como esclerose múltipla, diabetes tipo I e artrite reumatóide, onde o autoantígeno é desconhecido, ou quando múltiplos antígenos são responsáveis pela disfunção.

Analisando os resultados dos ensaios envolvendo transferência adotiva e tolerância cruzada, onde utilizou a toxina dermonecrótica LiRecDT1 para indução de tolerância, é possível observar que a mesma não foi capaz de inibir de forma estatisticamente significativa nenhum dos eventos, enquanto a toxina LiRecDT1 H12A

se mostrou eficiente. Considerando que as duas toxinas possuem apenas um aminoácido diferente na sua cadeia polipeptídica, é difícil determinar a razão da diferença encontrada nesse estudo. ULLAH e colaboradores (2011) em um estudo preliminar da estrutura tridimensional das duas toxinas utilizando cristalização e difração de raio-x, demonstrou que os cristais formados são muito parecidos, mas o valor de difração é diferente. Esses dados indicam que podem existir diferenças estruturais entre LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A, o que poderia justificar as diferenças encontradas nesse trabalho, apesar de estudos mais refinados serem necessários para confirmar. A mensuração da citocina TGF- β e do fator de transcrição Foxp3 também não ajudam a elucidar a diferença na atividade das duas toxinas. Quando consideramos especificamente a mensuração de TGF- β (Figura 6) é possível observar que essa citocina tem uma expressão maior nos linfonodos dos camundongos tolerizados com a toxina LiRecDT1 que nos tolerizados com a LiRecDT1 H12A. A citocina TGF- β como vimos é fundamental na indução de células Treg e na supressão de respostas imunes, então o resultado esperado nos ensaios seria o contrário. No trabalho anterior do nosso grupo, houve diminuição na produção de anticorpos para as duas toxinas dermonecróticas quando camundongos foram tolerizados oralmente com cada uma delas, ou seja, houve inibição da resposta humoral para as duas toxinas (DELGOBO, 2014). Entretanto, nesse mesmo trabalho, apenas animais tolerizados com a toxina LiRecDT1 H12A tiveram diminuição no edema induzido pela toxina LiRecDT1. Considerando isso, aparentemente animais tolerizados com a toxina LiRecDT1 apresentam inibição de imunidade humoral mas não de respostas celulares.

Essa diferença de atividade entre ambas as toxinas dermonecróticas provavelmente está relacionado com a diferença de estrutura entre ambas. Essa provável diferença de estrutura pode levar uma apresentação de antígeno diferente, o que explicaria essa diferença de atividade. Porém mais estudos relacionados com estrutura das toxinas dermonecróticas se faz necessário para auxiliar a elucidação dessa diferença de atividade.

Além da tolerância cruzada, há atualmente uma grande expectativa em relação ao potencial terapêutico das células Tregs na área de transplantes. Diversos estudos em modelos animais têm sido conduzidos nessa área, evidenciando que as células Tregs aumentam a tolerância ao enxerto e sua viabilidade (TANG, BUESTONE e KANG, 2010; WOOD, BUSHELL e JONES, 2011). Pouco ainda se sabe sobre os

mecanismos envolvidos na redução da rejeição de transplantes em animais tolerizados, sendo a teoria mais aceita o aumento na expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β . Em nossos experimentos pudemos demonstrar que os enxertos feitos em camundongos tolerizados com a toxina LiRecDT1 H12A, ocorreu uma aparente redução na rejeição tecidual. As lâminas histológicas foram submetidas a avaliação de um médico patologista para confirmação dessa observação.

Considerando os resultados obtidos podemos concluir que as toxinas dermonecróticas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A possuem grande potencial como ferramentas para indução e estudo do evento de tolerância oral. Apesar de a toxina LiRecDT1 não apresentar bons resultados, sua atividade fosfolipásica pode ser utilizada como ferramenta para o desafio da tolerância induzida pela toxina LiRecDT1 H12A.

6 CONCLUSÃO

- A tolerância oral induzida pelas toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A provavelmente envolve a indução e proliferação de linfócitos T regulatórios Treg Foxp3+, com aumento na citocina anti-inflamatória TGF- β .
- A tolerância oral induzida pela toxina LiRecDT1 H12A pode ser transferida para outro animal, naíve, (transferência adotiva), reforçando a teoria de um mecanismo envolvendo linfócitos Tregs.
- A tolerância oral induzida pela toxina dermonecrótica mutada LiRecDT1 H12A, inibiu a produção de anticorpos e edema gerados pelo veneno da vespa *Polybia paulista* (tolerância cruzada), demonstrando que a tolerância se estende a antígenos inespecíficos;
- A tolerância oral induzida pela toxina LiRecDT1 H12A pode retardar a rejeição de transplantes alogênicos de camundongos C57BL/6 para Swiss;
- As toxinas LiRecDT1 H12A e LiRecDT1 apresentam potencial como ferramentas na indução e estudo da tolerância oral.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. B.; LICHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

AKDIS, C. A.; AKDIS, M.; BLESKEN, T.; WYMAN, D.; ALKAN, S. S.; MULLER, U.; BLASER, D. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 e IL-15 in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, v.98, p.1676-1683, 1996.

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SILVA, D. T.; CHAVES, D. M.; DA SILVA, P. H.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. **Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1780, p. 167-178, 2008.

APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**, v. 2, p. 52-158, 2005.

ASTORI, M.; GARNIER, C.; KETTNER, A.; DUFOUR, N.; CORRADIN, G.; SPERTINI, F. Inducing tolerance by intranasal administration of long peptides in naïve and primed CBA/J mice. **The Journal of Immunology**, v.165, p.3497-3505, 2000.

BILLINGHAM, R. E.; MEDAWAR, P. B. The technique of free skin grafting in mammals. **The J Exp Biol**, v. 28, p.385-402, 1951.

BITTAR, D. M.; WHITACRE, C. C. Supression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. **J immunol**, v.112, p.364-370, 1988.

BLUESTONE, J. A. Mechanisms of tolerance. **Immunol Rev.**, v.241, p. 5-19, 2011.

BORDUCCHI, E. **Uso e limitações da tolerância imunológica periférica em modelo de asma experimental**. Tese de Doutorado em imunologia. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2009.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v 72, p 248–254, 1976.

BUENO, A.V.; PACHECO, S. Tolerância oral: uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. **Rev. Ass. Med Brasil**, v. 45, p.79-85, 1999.

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; SILVEIRA, R. B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.211,p. 64-77, 2006.

CHAIM, O. M.; SILVEIRA, R. B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1811, p. 84-96, 2011.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; da SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **J Cell Biochem**, v. 107, p. 655–666, 2009.

CHRIST M.; CARTNEY-FRANCIS, N. L. Mc.; KULKARNI, A.B.; WARD, J.M.; MIZEL, D.E.; MACKALL, C.L.; GRESS, R.E.; HINES, K. L.; H TIAN, H.; KARLSSON, S. Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. **J Immunol**, v. 153, n. 5, p. 1936-1946, 1994.

COMMODARO, A. G. The imbalance between Treg and Th17 cells caused by FTY720 treatment in skin allograft rejection. **Clinics [online]**, v. 67, n.7, p. 805-813, 2012.

COOMBES, J. L.; SIDDIQUI, K.R. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid dependent mechanism. **J Exp Med**, v. 204, n.8, p.1757-1764, 2007.

CRUVINEL, W. M.; MELO, W.; MESQUITA J.; ARAÚJO, D. Células T regulatórias naturais (T_{REGS}) em doenças reumáticas. **Rev. Bras. Reumatol.[online]**, v.48, n.6, p. 342-355, 2008.

DELGOBO, M. **Imunomodulação da resposta imune frente à indução de Tolerância Oral a toxina dermonecrótica presente no veneno de *Loxosceles intermedia* e tolerância oral sob a perspectiva de sistemas complexos.** 2014. Dissertação. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

FAHIMEH, L. A.; MARYAM, R.; FATEMEH, F.; SHAHRZAD, Z. T. R.; NAFISE, T.; MAHDIEH, K.; DARIUSH, H.; MAHMOUD, M. Assessment of 1,25-dihydroxyvitamin D3 effects on Treg cells in a mouse model of systemic lupus erythematosus. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 2014.

FARIA, A.; WEINER, H.L. Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune disease. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 13, p. 143–157, 2006.

FARIA, A.M.C. AND WEINER, H.L. Oral Tolerance. **Immunol Reviews**, 2005 v.206, p. 232-259, 2005.

FARIA, A.M.C., MARON, R., FICKER, S.M., SLAVIN, A.J., SPAHN, T., WEINER, H.L. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-B/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Autoimmunity**, v. 20, p.135-145, 2003.

FONTENOT, J.D.; RASMUSSEN, J.P.; WILLIAMS, L.M.; DOOLEY, J.L.; FARR, A.G.; RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity**, v. 22, p. 329–341, 2005.

FUJIHASHI, K., KATO, H., VAN GINKEL, F.W., KOGA, T., BOYAKA, O.N., JACKSON, R.J., KATO, R., HIGIWARA, Y., ETANI, Y., GOMA, I., FUJIHASHI, K., KIYONO, H., MCGHEE, J.R. A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance. **Acta Odontol Scand**, v.59, n.5, p. 301-308, 2001.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O.M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.F.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular Biosystems**, v. 12, p. 2403-2416, 2010.

Guy, B. **The perfect mix: recent progress in adjuvant research.** Nat Rev Microbiol, v. 5, n.7, p. 505-517, 2007.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: A laboratory manual.** Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. HIGGINS, P.J.; WEINER, H.L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. **Journal of Immunology**, v. 140, p.440-445, 1988.

HOHI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FOXP3. **Science**, v. 299, p. 1057-1061, 2003.

JOSEFOWICZ, S.Z.; LU, L.F.; RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annu Rev Immunol**, v.30, p. 531-564, 2012.

KARLSSON MR, KAHU H, HANSON LA, TELEMÓ E, DAHLGREN UI. Tolerance and bystander suppression, with involvement of CD25-positive cells, is induced in rats receiving serum from ovalbumin-fed donors. **Immunology**, v.100, n.3, p. 326-33, 2000.

KUSMA, J.; CHAIM, O.M.; WILLE, A.C.M.; FERRER, V.; SADE, Y.B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, p.1722- 1736, 2008.

LI, M. O.; FLAVELL, R. A. TGF-beta: a master of all T cell trades. **Cell**, v. 134, p. 394-404, 2008.

LUCIANO, M.N.; da SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; SANTOS, V.P.; FRANCO, C.R.C.; SOARES, M.F.S.; ZANATA, S.M.; MANGILI, O.; GREMSKI, O.C. VEIGA, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom on renal tissue. **The Journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 52, p. 455-467, 2004.

MACHADO, L. F., LAUGENSEN, S., BOTELHO, E. D., RICART, C. A., FONTES, W., BARBARO, K. C., ROEPSTORFF, P. & SOUSA, M. V. Proteome analysis of brown

spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v.5, p. 2167-2176, 2005.

MAINE, G. N.; MULÉ, J. J. Making room for t cells. **J Clinical Invest.**, v.110, p.157-159, 2002.

MARON, R.; SUKHOVA, G. K.; FARIA, A. M.; HOFFMANN, E.; MACH, F.; LIBBY, P.; WEINWE, H.L. Mucosal administration of HSP 65 decreases atherosclerosis and inflammation in the aortic arch of LDL receptor deficient mice. **FASEB J**, v. A1199, 2000.

MARTINEZ-VARGAS, A. Z. Loxoscelism, a health problem in Peru. **Bol Oficina Sanit Panam**, v.103, p. 378-86, 1987.

MATOS, L. **Efeitos indiretos da tolerância oral melhoram o processo de reparo de lesões excisionais na pele de camundongos**. Dissertação de mestrado. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2011.

MILLER, A.; LIDER, O.; WEINER, H. L. Antigen-driven bystander suppression following oral administration of antigens. **J Exp Med**, v. 174, p. 791-798, 1991.

MORTEAU, O. **Oral tolerance: The response of the intestinal mucosa to dietary antigens**. Nova Iorque: Kluwer Academic Plenum Publishers. 2004.

MUCIDA, D.; CHEROUTRE, H. TGFbeta and retinoic acid intersect in immunoregulation. **Cell Adh Migr**, v.1, n.3, p. 142-144, 2007.

MUCIDA, D.; KUTCHUKHIDZE, N. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **J Clin Invest**, v.115, n.7, p.1923-1933, 2005

MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, G.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H.; Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**. 2007

MURAKAMI, MT.; FERNANDES-PEDROSA, MF.; de ANDRADE, SA.; GABDOULKHAKOV, A.; BETZEL, C.; TAMBOURGI, DV.; ARNI, RK. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochem Biophys Res Commun**. V. 31, n.342, p.323-9, 2006.

NISHIMURA, E.; SAKIHAMA, T.; SETOGUCHI, R.; TANAKA, K.; SAKAGUCHI, S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by *in vivo* and *in vitro* antigen-specific expansion of naturally arising FoxP3+CD25+CD4+ regulatory T cell. **Int Immunol**, v.16, n.8, p.1189-201, 2004.

NOVAK, N., J. HABERSTOK, ET AL. The immune privilege of the oral mucosa. **TrendsMol. Med**, v.14, p.191-198, 2008.

NUSSENBLATT, R. B.; CASPI, R. R.; MAHDI, R. ET.; CHAN, C.C., ROBERGE, F., LIDER, O., H.L. WEINER, H.L. Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S antigen. **J Immunol**, v.144, p.1689-1695, 1990.

PABST, O.; MOWAT, A.M. Oral Tolerance to food protein. **Mucosal Immunology**, v..5, p. 232-239, 2012.

PALUDO, K. S; BISCAIA, S. M. P.; CHAIM, O. M.; OTUKI, M. F.; NALIWAICO, K.; VEIGA, S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: A pharmacological investigation. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 149, p. 323-333, 2009.

PERON, J. P. S. **O fenômeno da tolerância oral e a regulação de células patogênicas Th17 no modelo de encefalomielite experimental autoimune**. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Pomeranz B.; Chung S.H. **Dendritic-Tree Anatomy Codes Form-Vision Physiology in Tadpole Retina**. *Science*, v. 170, n. 3961, p. 983-984, 1970.

RAMIRO-PUIG, E.; PEREZ-CANO, F. J.; CASTELLOTE, C.; FRANCH, A. & CASTELL, M. The bowel: a key component of the immune system. **Rev Esp Enferm Dig**, v.100, p. 29–34, 2008.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia Texto e Atlas: Em correlação com a biologia celular e molecular**. 6. ed.Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 2014, p. 1000.

RUHLMAN, T.; AHANGARI, A.; DEVINE, A.; SAMSAM, M.; DANIELL, H. Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts — oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. **Plant Biotechnol J**, v. 5, p. 495-510, 2007.

RUSSO M.; JANCAR S.; PEREIRA DE SIQUEIRA A. L.; MENGEL, J.; GOMES, E.; FICKER., S., M. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. **Immunol Lett**, v.61, p.2310, 1998.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologica self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism os self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol**, v.155, p. 1151-1164, 1995.

SATO, M. N.; CARVALHO, A. F.; SILVA, A. O. Oral tolerance induced to house dust mice extract in naive and sensitized mice: evaluation of immunoglobulin G anti immunoglobulin E autoantibodies and IgC-IgE complexes. **Immunology**, v. 95, p. 193-199, 1998.

SAURER, L.; C. MUELLER. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. **Allergy**, v. 64, n.4, p. 505-519, 2009.

SAYEGH, M. H.; ZHANG, Z. J.; HANCOCK, W. W.; KWOK, C.A.; CARPENTER, C.B.; WEINER, H.L. Down regulation of the immune response to histocompatibility antigen and prevention of sensitization by skin allografts by orally administered alloantigen. **Transplantation**, v. 53, p. 163-166, 1992.

SILVA, J.P. **Efeito de uma dieta livre de proteínas no desenvolvimento de alergia alimentar e tolerância oral em camundongos BALB/c**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

SILVA, P.H.; SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, p. 693-709, 2004.

SILVEIRA, R.B.; PIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie**, v.88, p.1241 – 1253, 2006.

SPORN MB.; ROBERTS AB. A major advance in the use of growth factors to enhance wound healing. **Journal of Clinical Investigation**, v.92, n.6, p. 2565-2566, 1993.

STROBEL, S. AND MOWAT, A. M.C.L. Oral tolerance and allergic responses to food proteins. **Current Opinion and Clin.Immunol**, v. 6, p.207-213, 2006.

SUN C-M.; HALL JÁ.; BLANK RB. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n.8, p. 1775-1785, 2007.

SWANSON, D; VETTER, R.S. Loxoscelism. **Clin Dermatol**. v 24, p. 213-221.

TANCHOT, C.; LE CAMPION, A.; MARTIN, B.; LÉAUMENT, S.; DAUTIGNY, N.; LUCAS, B. Conversion of naïve T cells to a memory-like phenotype in lymphopenic hosts is not related to a homeostatic mechanism that fills the peripheral naïve t cell pool. **J Immunol**, v.168, n.10, p.5042-6, 2002.

TANG, Q.; BLUESTONE, J.; KANG, S. M. CD4+Foxp3 regulatory T cell therapy in transplantation. **J Mol Biocell Biol**. v. 4, p. 11-21, 2010.

THOMÉ, R.; FERNANDES, L.G.; MINEIRO, M.F.; SIMIONI, P.U.; JOAZEIRO, P.P.; TAMASHIRO, W.M. Oral tolerance and OVA-induced tolerogenic dendritic cells reduce the severity of collagen/ovalbumin-induced arthritis in mice. **Cellular Immunology**, v.280, p. 113-123, 2012.

THOMPSON, H. S. G.; STAINES, N. A. Gastric administration of type II collagen delays the onset and severity of collagen-induced arthritis in rats. **Clin Exp Immunol**, v. 64, p. 581-586, 1986.

TITUS, R.G.; CHILLER, J.M. Orally induced tolerance: Definition at the cellular level. **Int. Archs. Allergy appl. Immunol**, v.65, p.323, 1981.

TSUJI, N.M, MIZUMACHI, K. AND KURISAKI, J.-I. Antigen-specific, CD4+CD25+ regulatory T cell clones induced in Peyer's patches. **Int. Immunol**, v. 15, p.525-534, 2003.

ULLAH, A.; GIUSEPPE, P.O.; MURAKAMI, M.T.; SILVA, D.T.; WILLE, A.C.M.; CHAVES-MOREIRA, D.; GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; SENNF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S.; ARNI, R. K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. **Acta Crystallographica Section F**, v.67,p. 234-236, 2011.

VAZ N.M.; MAIA L.C.S.; HANSON D.G.; LYNCH J.M. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **J. Allergy clin. Immunol** , v.60, p.110, 1977.

VERMA, D.; MOGHIMI, B.; LODUCA, P.A.; SINGH, H.D.; HOFFMAN, B.E.; HERZOG, R.W.; DANIELL, H. Oral delivery of bioencapsulated coagulation factor IX prevents inhibitor formation and fatal anaphylaxis in hemophilia B mice. **ProcNatlAcad Sci**, v.107, p.7101-7106, 2010.

WAKABAYASHI, A., KUMAGAI, Y., WATARI, E., SHIMIZU, M., UTSUYAMA, M.,HIROKAWA, K. AND TAKAHASHI, H. Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction.**Immunol**, v. 119 p. 167-177, 2006.

WANG, J.; H, VAN, DONGEN.; HU, SCHERER.; TWJ, HUIZINGA.; TOES, REM. Suppressor activity among CD4+, CD25++ T cells is discriminated by membrane-bound tumor necrosis factor α . **Arthritis & Rheumatism**, v.58, p.1609-1618, 2008

WANG, X.; SHERMAN, A.; LIAO, G.; LEONG, K.W.; DANIELL, H.; TERHORST, C.; HERZOG, R. W. Mechanism of Oral Tolerance to therapeutic proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**.In Press, 2012.

WEINER HL.; FRIEDMAN, A.; MILLER, A.; KHOURY, SJ.; AL-SABBAGH A.; SANTOS, L.; SAYEGH M.; NUSSENBLATT, RB.; TRENTAM, DE.; HAFLER DA. **Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens**. Annu Rev Immunol, v. 12, p. 809–837, 1994.

WEINER, H. L. Oral tolerance: Immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. **Immunol Today**, v. 18, p. 335-343, 1997.

WEINER, H. L.; LEMERE, C. A.; MARON, R.; SPOONER, E.T.; GRENFELL, T.J.; MORI, C.; ISSAZEDEH, D.; HANCOCK, W.W.; SELKOE, D.J. Nasal administration

of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. **Ann Neurol**, v.48, p. 567-579, 2000.

WEINER, H.L., DA CUNHA, A.P., QUINTANA, F., WU, H.. Oral tolerance. **Immunol REV**, v. 241, p. 241–259, 2011.

WHITACRE, C.C.; GIENAPP, I. E.; OROSZ, C.G.; BITAR, D.M. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. **J Immunol**, v.147, p. 2155-2163, 1991.

WINKLER, B.; BOLWIG, C.; SEPPALA, U.; SPANGFORT, M. D.; EBNER, C.; WIEDERMANN, U. Allergen-specific immunosuppression by mucosal treatment with recombinant Ves v 5, a major allergen of *Vespula vulgaris* venom, in a murine model of wasp venom allergy. **Immunology**, v. 110, p. 376 – 385, 2003.

WOOD, K. J.; BUSHELL, A.; JONES, N. D. Immunologic unresponsiveness to alloantigen in vivo: a role for regulatory T cells. **Immunol Rev**. v. 241, p. 119-132, 2011.

ZHANG, J. Z.; DAVIDSON, L.; EISENBARTH, G. WEINER, H.L. Suppression of diabetes in NOD mice by oral administration of porcine insulin. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v.88, p. 10252-10256 , 1991.

ANEXOS

ANEXO I

Tampão Ripa.

- 50mM Tris-HCl
- 150mM NaCl
- 0,5% Desoxicolato de Sódio
- 20 mM EDTA
- 1% Triton x-100
- 1% SDS

Inibidores adicionados imediatamente antes do uso.

- 100 mM PMSF (fluoreto de fenil-metil-sufonil)
- 100 mM Nem (N-etilmaleiamida)
- 250 mM Fenantrolina
- 100mM NaF

ANEXO II**Solução ALFAC**

Para 100 mL

- 85 mL álcool etílico 85%
- 10 mL de formaldeído 40%
- 5 mL de ácido acético glacial

Obs.: preparar no momento do uso.

ANEXO III**Protocolo CEUA – 3233/2012**

UEPG
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 07/2012

Protocolo UEPG – 03433/2012

Título - “Indução de Tolerância Oral ao veneno de *Loxosceles intermedia* e a resposta imune a enxerto em modelo animal ”

Interessado – Giovani Marino Favero

Data de Entrada – 21/03/2012

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
04/04/2014

Considerações

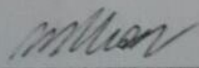
Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 78 camundongos.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.


Professor Marcelo Ricardo V.
Membro Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-U

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria – anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264

ANEXO IV

Protocolo CEUA: 6557/2014

UEPG
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 015/2014

Protocolo UEPG – 6557/2014

Título – "Projeto de pesquisa "Potencial das toxinas recombinantes do veneno de aranha marrom como ferramentas na indução de tolerância oral e imunomodulação de respostas imunes". Interessada: Kátia Sabrina Paludo

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 16/04/2014 a 15/04/2016

Considerações

Prezado Professor,

Prezado Professor,

Em relação a utilização de animais no projeto de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, do uso de 80 (oitenta) animais.

- APROVADO.

- APROVADO.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

Prof. Dra. Maria Marta Lodi

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264