

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

MURILO DELGOBO

MODULAÇÃO 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

PONTA GROSSA

2014

MURILO DELGOBO

MODULAÇÃO 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

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva na Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero

Coorientador: Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo

PONTA GROSSA

2014

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

Delgobo, Murilo
D352 Modulação 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/
 Murilo Delgobo. Ponta Grossa, 2014.
 82f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Biológicas - Área de Concentração:
 Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
 de Ponta Grossa e Universidade Estadual do
 Centro-Oeste.

 Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino
 Favero.

 Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Katia Sabrina
 Paludo.

 1.Toxinas Biológicas. 2.Tolerância
 Imunológica. 3.Imunoterapia. 4.Venenos de
 Aranha. 5.Aranha Marrom. I.Favero, Giovani
 Marino. II. Paludo, Katia Sabrina. III.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Universidade Estadual do Centro-Oeste.
 Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 616.079



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 02/2014

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato **MURILO DELGOBO**.

Aos vinte e um dias do mês de fevereiro de dois mil e quatorze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Giovani Marino Favero em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **MURILO DELGOBO**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Giovani Marino Favero (Orientador UEPG), Dr. Felipe Leite de Oliveira (UFRJ) e Drª Henriette Rosa de Oliveira Emilio (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Modulação da Resposta Imune Frente à Indução de Tolerância Oral a Toxina Dermonecrótica Presente no Veneno de *Loxosceles intermedia* a Tolerância Oral Sob a Perspectiva de Sistemas Complexos"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 21 de fevereiro de dois mil e quatorze.

Prof. Dr. Giovani Marino Favero

Prof. Dr. Felipe Leite de Oliveira

Profª Drª Henriette Rosa de Oliveira Emilio

Giovani Marino Favero

Felipe Leite de Oliveira

Henriette Rosa de Oliveira Emilio

*Aos meus pais, Luiz e Bernadeth e minha irmã Marina,
por tudo que me proporcionaram na vida. Pela educação,
amor, valores e apoio incondicional em todas as
situações.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Giovani Marino Favero, por expandir a minha visão logo no início da graduação, pelas oportunidades de poder aprender e realizar meu trabalho, pela liberdade e confiança que sempre depositou, e pela amizade que surgiu nesses anos. Sobretudo, pelo ensinamento: “O todo sem a parte, não é todo, A parte sem o todo não é parte...”, o qual mudou definitivamente minha visão sobre o conhecimento científico.

A professora Katia Sabrina Paludo, pela dedicação e amor que tem pelo o que faz, por permitir-me ultrapassar barreiras ao longo do mestrado, pelos inúmeros ensinamentos, por nunca medir esforços na realização desse trabalho, por sempre estar presente, tanto quando as coisas ocorrem bem, ou não. Agradeço pela amizade e incrível orientação ao longo desses dois anos.

À Priscila Zancanaro Schinaider, pelo amor de todos esses anos, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, sempre apoiando e incentivando. Por tornar-me hoje uma pessoa melhor, e dar sentido aos sonhos e planos. Pela paciência e compreensão comigo durante a realização desse trabalho e pela grande contribuição que fez a dissertação, através da Fig.1.

Aos colegas do laboratório multiusuário, Bruna, Juliana, Daiana e Angeline por criarem um ambiente saudável de trabalho, permitindo o crescimento pessoal e científico de todos.

Aos colegas Luiz Renato, William Moreira e ao professor Daniel Fernandes por disponibilizarem seu laboratório para realização de experimentos e pela longa amizade de anos.

À mestrande Tamara Nascimento Ferreira e ao aluno de IC Maicon Ramos, pela ajuda fundamental em diversos experimentos, por compartilharem dos esforços em realizar tudo da melhor forma possível.

Ao colega e amigo Pedro Jeferson Miranda, pela parceria e definitiva contribuição no segundo capítulo desta dissertação, como pelas discussões éticas e científicas que sempre acrescentaram muito.

À *professora Carolina W. Galvão* e demais colegas do laboratório de biotecnologia aplicada, pela disponibilização de equipamentos e reagentes essenciais para realização da pesquisa, como pela ajuda em biologia molecular.

Ao professor Silvio Sanches Veiga, por acreditar na proposta de trabalho, e fornecer as toxinas dermonecroticas, fundamentais ao trabalho. À professora Olga Chaim, pelos ricos ensinamentos passados em biologia molecular, pela dedicação que teve com o trabalho assim como o espírito científico que transmite. À mestranda Marianna Boia, por passar tardes, noites e finais de semana inteiros junto, nos experimentos de RT-PCR. Aos demais colegas, pela receptividade e amizade que demonstraram logo quando cheguei ao laboratório.

Ao *biotério da PUC-PR*, por fornecer os animais para a realização dos experimentos, conforme as nossas necessidades.

*Aquilo que hoje está provado não foi outrora mais
do que imaginado.*

William Blake

RESUMO

O veneno de aranha-marrom (*Loxosceles sp.*) apresenta-se como uma mistura complexa de toxina, capazes de causar necrose com espalhamento local, intensa resposta inflamatória, indução de edema e aumento da permeabilidade vascular *in vivo*. Recentemente, o potencial biotecnológico das toxinas foi explorado através de seu uso em análises clínicas, no estudo da resposta inflamatória, como ferramenta de pesquisa na biologia celular, como biopesticidas e na imunoterapia, através da produção de anti-soro. No presente trabalho, foi investigado se a indução de tolerância imunológica à toxina dermonecrótica recombinante (LiRecDT1) e sua forma mutada (LiRecDT1 H12A), através de sua administração oral, poderia modular as respostas inflamatórias e deletérias causadas pela toxina dermonecrótica. Para tal, foi desenvolvido um protocolo para indução de tolerância oral, consistindo na administração de 10 µg de LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A três vezes por semana, durante três semanas. Camundongos Swiss fêmeas adultas foram posteriormente imunizadas, e a indução de tolerância foi confirmada pela diminuição nos níveis de anticorpos IgG anti-toxina em relação ao grupo controle, resultado que aponta a obtenção de sucesso na indução de tolerância imunológica. Observou-se que animais tolerantes a LiRecDT1 H12A apresentaram uma diminuição no edema desenvolvida na pata, causado pela aplicação de 6 µg de LiRecDT1 na superfície plantar traseira. Animais tolerizados com LiRecDT1 e desafiados com 50 µg intraperitoneal de toxina dermonecrótica apresentaram maior índice de sobrevivência, quando comparados ao grupo controle. Esse efeito não foi observado em animais tolerizados com LiRecDT1 H12A. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que a indução de tolerância oral à LiRecDT1 H12A é capaz de atenuar o desenvolvimento da resposta inflamatória no edema de pata, enquanto a tolerância oral a LiRecDT1 foi capaz de aumentar a sobrevivência em animais desafiados com LiRecDT1. Os resultados demonstram que as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A podem ser exploradas como ferramenta na indução e estudo da tolerância oral. A geração de células T regulatórias (Tregs) e subsequente participação de citocinas imunossupressoras devem estar envolvidas na modulação da resposta imune.

Palavras-Chave: Toxinas Biológicas, Tolerância Imunológica, Imunoterapia, Venenos de Aranha, Aranha Marrom.

ABSTRACT

Brown-Spider's venom (*Loxosceles sp.*) is presented as a complex mixture of toxins, able to induce skin necrosis with gravitational spreading, intense inflammatory response, edema induction and increase in vascular permeability *in vivo*. Recently, the biotechnological potential of the toxins was explored by its use in clinical test, in the study of inflammatory response, as a research tool in cell biology, as a biopesticide and in immunotherapy, through the production of antiserum. In this context, immunotherapy is broadly spread through the production of vaccines, available for the treatment of deleterious reactions developed in accidents. In the present work, we investigated if immunological tolerance induction to dermonecrotic recombinant toxin (LiRecDT1) and its mutated form (LiRecDT1 H12A), through its oral administration, could modulate inflammatory and deleterious responses triggered by dermonecrotic toxin. For this purpose, an oral tolerance protocol was designed, consisting in the administration of 10 µg of LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A three times in a week, for three weeks. Adult Swiss mice were further immunized, and oral tolerance induction was observed by reduction in serum levels of IgG antibody anti-toxin when compared with control group. It was observed that mice tolerant to LiRecDT1 H12A present a reduction in paw edema, caused by the injection of 6 µg of dermonecrotic toxin in plantar surface hind paw. Mice tolerized with LiRecDT1 and challenged with 50 µg of dermonecrotic toxin, exhibited higher survival, when compared to control group. This effect was not observed in mice tolerized to LiRecDT1 H12A. The present findings suggested that oral tolerance induction to LiRecDT1 H12A was able to alleviate inflammatory responses triggered by dermonecrotic toxin in paw edema and oral tolerance to LiRecDT1 increase survivability in challenge. The results shown that LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A can be explored as a tool in the induction and study of oral tolerance phenomena. The generation of T regulatory cells (Tregs) and following involvement of immunosuppressive cytokines might take part in the modulation of immune response.

Keywords: Biological Toxins, Immune Tolerance, Immunotherapy, Spider Venoms, Brown Spider.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de captação de antígeno e geração de células T regulatórias.....	27
Figura 2. Protocolo de indução de Tolerância Oral.....	32
Figura 3. Níveis séricos de IgG anti-toxina em animais tolerizados.....	36
Figura 4. Avaliação dos níveis de IgG anti-toxina em soro pré-imune.....	37
Figura 5. Edema de pata pela injeção subcutânea de 6 µg de LiRecDT1.....	38
Figura 6. Avaliação da mortalidade dos camundongos expostos a 50 µg (ip) de toxina dermonecrótica.....	40
Figura 7. Análise da morfologia do epitélio e lâmina própria intestinal.....	42
Figura 8. Representação esquemática da rede de tolerância oral.....	66
Figura 9. Fluxo de informação padrão em rede de tolerância oral.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades topológicas da rede.....	64
Tabela 2. Tamanho da componente gigante (G_c) após a retirada de vértices com alta centralidade de intermediação e a retirada aleatória de vértices.....	65
Tabela 3. Erro relativo médio respectivo a cada <i>knockout</i> individual dos vértices..	68

LISTA DE SIGLAS

Breg	Célula B regulatória
BSA	Albumina do soro bovino
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CCR9	Receptor de Quimiocina 9
CD103	Integrina alfa E
CD11b	<i>Cluster</i> de diferenciação 11B
CD11c	Integrina alfa X
CD25	Cadeia alfa do receptor de interleucina 2
CD4	<i>Cluster</i> de diferenciação 4
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Con A	Concanavalina A
CTB	Toxina da cólera B
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
CX3CR1	Receptor de Quimiocina 1 CX3C
DC	Células dendríticas
DM tipo I	Diabetes mellitus tipo I
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
FoxP3	Fator de transcrição com cabeça em garfo P3
GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i>
IDO	Indolamina 2,3 Dioxigenase
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-27	Interleucina 27

IL-35	Interleucina 35
IL-6	Interleucina 6
ILC	Células linfoides inatas
IFN- γ	Interferon gama
i.p.	Intraperitoneal
iTreg	Célula T regulatória induzível
KO	<i>Knockout</i>
LAG-3	Gene ativador de linfócito 3
LAP	Peptídeo de latência associado
LiRecDT1 H12A	Toxina dermonecrótica recombinante mutada de <i>Loxosceles intermedia</i>
LiRecDT1	Toxina dermonecrótica recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i>
LP	Lâmina própria
LTB ₄	Leucotrieno B4
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe 2
mLN	Linfonodos mesentéricos
MOG	Glicoproteína mielínica dos oligodendrócitos
NFAT	Fator nuclear de célula T ativada
NF- κ B	Fator nuclear Kappa B
NOD	<i>Non-obese Diabetic</i>
PBS	Tampão fosfato salina
PGE ₂	Prostaglandina E2
PUC-PR	Universidade Pontifícia Católica do Paraná
RA	Ácido Retinoico
RALDH2	Retinal desidrogenase
RNA	Ácido ribonucleico

ROR γ t	Receptor órfão gama relacionado a RAR
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
s.c.	Via subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
Stat3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
TGI	Trato Gastrointestinal
T _H 1	Célula T auxiliar 1
T _H 17	Célula T auxiliar 17
T _H 2	Célula T auxiliar 2
TNF	Fator de necrose tumoral
Tr1	Célula T regulatória tipo 1
TXB ₂	Tromboxano B2
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Capítulo 1 - Modulação da resposta imune frente à indução de tolerância oral a toxina dermonecrótica presente no veneno de <i>Loxosceles intermedia</i>.....	19
2.1 Objetivos.....	20
2.1.1 Objetivo Geral.....	20
2.1.2 Objetivos Específicos.....	20
2.2 Revisão Bibliográfica.....	21
2.2.1 Sistema Imunológica associado ao intestino.....	21
2.2.2 Tolerância Oral.....	23
2.2.3 Células T regulatórias.....	25
2.2.4 Toxina dermonecrótica.....	28
2.2.5 Imunoterapia e imunomodulação em mucosas.....	29
2.3 Material e Métodos.....	30
2.3.1 Animais.....	30
2.3.2 Toxinas.....	31
2.3.3 Indução de Tolerância oral à LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A.....	31
2.3.4 Ensaio de anticorpos anti-LiRecDT1 H12A.....	32
2.3.5 Edema de pata induzido por LiRecDT1.....	32
2.3.6 Ensaio de Mortalidade.....	33
2.3.7 Western Blotting.....	33
2.3.8 Análise Histológica.....	34
2.3.9 Análise Estatística.....	34
2.4 Resultados.....	35
2.4.1 Administração oral da toxina dermonecrótica levou a diminuição nos níveis de IgG Anti-toxina dermonecrótica em camundongos imunizados.....	35

2.4.2 Redução no edema de pata induzido pela toxina dermonecrótica em camundongos tolerantes.....	37
2.4.3 Aumento da sobrevivência de camundongos tolerizados frente ao desafio com toxina dermonecrótica.....	39
2.4.4 Ausência de lesão tecidual e inflamação no epitélio de animais tolerizados com as toxinas.....	40
2.5 Discussão.....	44
2.6 Conclusões.....	47
3. Capítulo 2 – Tolerância oral sob a perspectiva de sistemas complexos.	48
3.1 Objetivos.....	51
3.1.1 Objetivo geral.....	51
3.1.2 Objetivos específicos.....	51
3.2 Revisão bibliográfica.....	52
3.2.1 Teoria dos Grafos.....	53
3.3 Montagem da rede.....	54
3.4 Modelo.....	55
3.4.1 Desenvolvimento do algoritmo.....	60
3.4.2 Linguagem R do algoritmo.....	61
3.5 Propriedades Topológicas e Dinâmicas do Modelo.....	63
3.5.1 Propriedades Topológicas.....	63
3.5.2 Propriedades Dinâmicas.....	67
3.6 Discussão.....	69
3.7 Conclusão.....	72
4. Referências.....	74

5. Anexo 1..... 82

1. INTRODUÇÃO

A tolerância imunológica é o processo pelo qual o sistema imune não desenvolve resposta específica a um determinado antígeno. Enquanto a tolerância a antígenos próprios desenvolve-se no timo, durante a seleção positiva e negativa de clones de linfócitos T, a tolerância a antígenos não-próprios, provenientes do ambiente, ocorre nos tecidos linfoides periférico (KOSMRLJ *et al.*, 2009; GORDON e MANLEY, 2011). A esse fenômeno denomina-se tolerância oral, a qual é frequentemente definida como uma supressão de atividade imunológica local e sistêmica, induzida nos tecidos linfoides associados ao intestino (GALT), após sua exposição a antígenos contatados inicialmente pela via oral (WEINER *et al.*, 2011). Os efeitos da tolerância oral estendem-se desde as respostas *in vivo*, como na hipersensibilidade tardia e na produção de anticorpos, como também a parâmetros observados *ex vivo*, como na proliferação de linfócitos e produção de citocinas (FARIA e WEINER, 2005).

A indução da tolerância oral inicia-se da seguinte forma: Células apresentadoras de antígeno (APCs), residentes na lâmina própria intestinal (LP), recebem antígenos da luz intestinal e posteriormente migram para linfonodos mesentéricos (mLN), onde apresentam os antígenos para linfócitos T *naive*, via MHC classe II. Na presença de moléculas co-estimulatórias como IL-10 e o fator de transformação do crescimento β (TGF- β), células T são diferenciadas a células T regulatórias (Tregs), as quais apresentam fenótipo imunossupressor. Tregs podem retornar a LP intestinal, onde se encontram em maior frequência, ou atingirem a circulação sistêmica, promovendo os efeitos sistêmicos da tolerância oral (PABST e MOWAT, 2012).

A imunoterapia dirigida a alérgenos específicos é até então a única forma curativa para o tratamento de alergias a venenos provenientes da picada de insetos, ácaros, pólen ou pelos de animais domésticos. Em diferentes modelos, a imunoterapia específica dirigida a alérgenos demonstram-se capazes de suprimir células efectoras e inflamatórias, modificar a classe de imunoglobulina secretada (reduzir IgE e aumentar IgG4 e IgA) como também reduzir a população de mastócitos, basófilos e eosinófilos e a liberação de seus respectivos mediadores no tecido. (JUTEL *et al.*, 2006) Enquanto a imunoterapia subcutânea foi extensamente explorada, as vias mucosas estão começando a serem consideradas, juntamente

com o uso de adjuvantes/vetores, proteínas recombinantes ou fragmentos de peptídeos (MASCARELL *et al.*, 2011). O veneno assim como as toxinas da aranha-marrom (*Loxosceles genus*) são extensamente estudadas pela característica lesão dermonecrótica provocada nos acidentes com a picada da aranha, assim como as modificações na homeostasia e lesão renal presente tanto em humanos quanto em modelo animal. Com a elucidação da composição do veneno e subsequente produção de toxinas recombinantes, foi possível utilizar as toxinas como ferramentas em modelos de estudo de inflamação/lesão celular. Nesse contexto, propomos a utilização da principal toxina do veneno, a toxina dermonecrótica e a sua respectiva forma mutada, na tentativa de induzir tolerância imunológica, caracterizando em qual nível a tolerância oral poderia suprimir as respostas causadas pela administração da toxina em modelo animal (Capítulo 1).

Além do estudo com as toxinas, esse trabalho propõe o estudo do evento de tolerância oral sob a perspectiva de sistemas complexos. O rápido crescimento da teoria dos sistemas complexos trouxe avanços no entendimento dos princípios organizacionais que governam a formação e a evolução de redes tecnológicas e sociais. Esse conhecimento já está causando impacto na compreensão da biologia celular, onde as redes de interações dos componentes moleculares das células compartilham propriedades com outros sistemas complexos, como a internet e sociedade. Essa inesperada universalidade pode indicar que leis semelhantes podem conduzir a maior parte dos fenômenos complexos na natureza (BARABÁSI e OLTVAI, 2004). Enquanto a imunologia teve avanços concretos em termos de compreender os componentes genéticos, moleculares e celulares presentes no fenômeno da tolerância oral (OHKURA *et al.*, 2013; ÁLVAREZ *et al.*, 2013), a rede de interações entre esses componentes como as propriedades que emergem dessas interações ainda não foi investigada. Com a complexidade de interações no fenômeno de tolerância oral entre componentes do sistema imune, microrganismos e antígenos provenientes do ambiente, aliados ao microambiente único proporcionado no GALT (PEARSON *et al.*, 2012), esperamos compreender o significado, a magnitude e importância relativa dessas relações, através da perspectiva de sistemas complexos (Capítulo 2).

CAPÍTULO 1

MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE FRENTE À INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL A TOXINA DERMONECRÓTICA PRESENTE NO VENENO DE *Loxosceles intermedia*.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 *Objetivo Geral*

- Desenvolver um modelo de tolerância oral em camundongos Swiss utilizando as toxinas dermonecróticas de *Loxosceles intermedia*, LiRecDT1 e LiRecDT1H12A, e verificar o potencial de tais toxinas como ferramentas biotecnológicas na imunomodulação de respostas imunes

2.1.2 *Objetivos Específicos*

- Estabelecer um protocolo para indução de tolerância oral às toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1H12A em camundongos Swiss;
- Verificar a indução de tolerância oral através da produção de anticorpos específicos às toxinas;
- Investigar a possível atenuação de respostas deletérias induzidas pela toxina dermonecrótica LiRecDT1 em camundongos Swiss tolerizados;

2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2.1 Sistema Imunológico associado ao Intestino

O maior contato de um organismo com material antigênico ocorre na mucosa intestinal. Com uma área próxima a 300 m², a mucosa intestinal recebe aproximadamente 30 Kg de proteína por ano, das quais 130-190 g são absorvidas diariamente. A microbiota intestinal é uma fonte adicional de estímulo antigênico, contendo 10¹² microrganismos por grama de fezes (MOOG, 1981; BRANDTZAEG, 1998). Apesar de toda pressão antigênica, a organização do tecido linfoide associado ao intestino (GALT) permite a criação de um microambiente favorável à tolerância. Tolerância oral refere-se à indução fisiológica de tolerância que ocorre no GALT e mais amplamente em outras superfícies mucosas, como as do trato respiratório, após o contato com antígenos solúveis provenientes do ambiente, como os antígenos da dieta (WEINER *et al.*, 2011).

O tecido linfoide associado ao intestino (GALT) por sua morfologia e funcionalidade pode ser dividido em dois grupos principais: O GALT organizado, composto pelas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos (locais de indução) e o GALT difuso, composto pela lâmina própria e linfócitos intraepiteliais (regiões efetoras). As placas de Peyer possuem grandes quantidades de linfócitos B, linfócitos T, macrófagos e células dendríticas, organizados na forma de folículos de células B com áreas intermediárias de linfócitos T. Sua principal característica é o epitélio folicular, composto por células M; enterócitos especializados na captura de pequenos antígenos solúveis a microrganismos inteiros, direcionando aos tecidos linfoides (CASTRO-SÁNCHEZ e MARTÍN-VILLA, 2013; KNOOP *et al.*, 2013).

Linfonodos mesentéricos (mLN) constituem os maiores linfonodos do corpo (Mowat, 2003). Seu desenvolvimento é distinto da placa de peyer e dos demais linfonodos periféricos, sendo pouco afetado na falta de fatores necessários para a ontogenia desses órgãos, como o fator de necrose tumoral (TNF) e seu respectivo receptor (TNFR). Células dendríticas CD103⁺ e células estromais presentes no mLN são capazes de metabolizar vitamina A obtida através da dieta em ácido retinoico (RA), importante na síntese de moléculas *gut-homing* integrina $\alpha 4\beta 7$ e receptor de quimiocina 9 (CCR9), como na geração de células T regulatórias induzíveis

(iTregFoxP3⁺). Essas características tornam o ambiente do mLN único na manutenção da tolerância e regulação da resposta imune intestinal (PABST e MOWAT, 2012).

Células linfoides inatas (ILC) possuem um papel central no desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino durante a fase pré-natal. Todos os subtipos de ILC dependem da expressão do receptor órfão de ácido retinoico (ROR γ t), onde a falta de ROR γ t resulta na completa ausência de qualquer forma de GALT. No entanto, camundongos deficientes no gene ativador de recombinação (RAG), os quais não apresentam linfócitos B e T, desenvolveram estruturas semelhantes folículos linfóides isolados (ILF) (PEARSON *et al.*, 2011). Dessa forma, observa-se a antiga origem evolutiva e função geneticamente determinada das ILCs. No período pós-natal, ILCs respondem rapidamente a microrganismos presentes no intestino, através da produção de IL-22, IL-17 ou IL-13, contribuindo futuramente na formação e desenvolvimento do GALT. Além de sua função na organogênese, as ILCs podem diretamente modificar a resposta adaptativa de células B e T via interação célula-célula (PEARSON *et al.*, 2011).

A lâmina própria (LP) é uma camada de tecido conectivo, situada entre o tecido epitelial e a muscular da mucosa intestino delgado. É composta tanto por células mielóides quanto linfóides (CASTRO-SÁNCHEZ e MARTÍN-VILLA, 2013). A grande quantidade de linfócitos T, células dendríticas (DC) e macrófagos encontrados na lâmina própria, tornam esse tecido um local adequado para o processamento e apresentação de antígenos comensais e proteínas alimentares (NUTSCH e HSIEH, 2012). Dentre os leucócitos presentes na lâmina própria, os macrófagos encontram-se em maior abundância. Através de sua alta capacidade fagocítica, participam no controle de microrganismos e auxiliam na indução de tolerância, através da secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (MOWAT, 2003). Recentemente, identificou-se uma população de células mielóides intestinais CX3CR1^{high}CD11b⁺CD11c⁺ com funções únicas. Denominadas células Mreg, apresentam-se distribuídas na LP, sendo incapazes de promover diferenciação de células T, além de inibir a proliferação de células T CD4⁺ através de contato célula-célula (KAYAMA e TAKEDA, 2012). Células Mreg também são capazes de inibir a proliferação de células T_H1/T_H17 através de mecanismos envolvendo IL-10/Stat3. A administração de células Mreg *wild-type* em camundongos com mutação em Stat3 melhorou a inflamação intestinal, indicando que a disfunção de células Mreg pode

estar envolvida com a ocorrência de doenças inflamatórias intestinais (KAYAMA & TAKEDA, 2012).

Plasmócitos secretores de IgA representam de 30 a 40% das células mononucleares da LP em um intestino saudável (CASTRO-SÁNCHEZ e MARTÍN-VILLA, 2013). Células B regulatórias (Breg) CD1d^{high} regulam a resposta adaptativa através da secreção de IL-10, inibindo a ativação de células mieloides intestinais (KAYAMA & TAKEDA, 2012). Linfócitos T presentes na LP são em maior parte CD4⁺ (60-70%), onde 10% expressam CD25. Linfócitos T CD4⁺ desempenham um papel importante na regulação da resposta imunológica a antígenos provenientes da dieta. Através da secreção de citocinas como IL-10 e TGF- β , suprimem a resposta T_H1/T_H2/T_H17 (WEINER *et al*, 2011).

2.2.2 Tolerância Oral

Tolerância oral é o estado de anergia local e sistêmica, induzido pela administração oral de antígenos inócuos, como proteínas provenientes da dieta (PABST e MOWAT, 2012). Desde as primeiras décadas do século passado, têm-se demonstrado que a ingestão de proteínas imunogênicas é capaz de reduzir reações imunológicas específicas após subsequente imunização (WELLS, 1911).

O fenômeno de Tolerância oral foi extensivamente demonstrado em roedores, utilizando proteínas purificadas, antígenos celulares e haptenos, sendo também demonstrada em humanos (FUENTES-APARICIO *et al.*, 2012; ESCH *et al.*, 2011). Embora na presença do baixo pH intestinal e enzimas proteolíticas na porção superior do TGI, alguns componentes imunogênicos são resistentes a degradação e adentram o lúmen intestinal. Antígenos administrados oralmente foram detectados no epitélio intestinal e na LP minutos após administração (GOUBIER *et al.*, 2008). CHIRDO *et al.* (2005) observaram células dendríticas CD11c⁺ carregadas de antígeno na LP, entre 30 a 60 minutos após a administração oral desse antígeno. Células dendríticas (DCs) presentes nos linfonodos cervicais são capazes de induzir células T regulatórias (Tregs). Linfonodos cervicais que drenam da cavidade oral apresentaram maior frequência de Tregs FoxP3⁺ e CD4⁺ ROR γ t⁺ em relação aos demais linfonodos (YAMAZAKI *et al.*, 2012).

A natureza antigênica determina a forma como DCs acessam esse material da luz intestinal para a LP (Figura 1 A). Moléculas de baixo peso molecular como

haptenos e polipeptídeos, podem atravessar diretamente o epitélio por difusão através de poros nas junções oclusivas que conectam células epiteliais (PABST e MOWAT, 2012). Complexos moleculares podem sofrer transcitose através de enterócitos que podem expressar o complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), fornecendo antígenos a DCs via formação de exossomos (MÉNARD *et al.*, 2010). Exossomos são formados quando endossomos, contendo proteínas parcialmente degradadas, se fundem a compartimentos de MHC II (MIRON e CRISTEA, 2011). Além disso, enterócitos humanos expressam o receptor neonatal Fc (FcRn), facilitando a recirculação de IgG complexada a antígenos intestinais (MIRON e CRISTEA, 2011). Macrófagos que expressam o receptor de quimiocina CX3CR1 também são capazes de apresentar antígenos da luz intestinal através de extensão celular, não alterando a integridade do epitélio (PABST e MOWAT, 2012). O retro-transporte de complexos sIgA-vírus/bactérias por células M demonstrou-se benéfico na indução de resposta imune protetora. No entanto, o transporte de peptídeos intactos de gliadina via expressão ectópica do receptor para IgA (CD71) nos enterócitos, contribui para a ativação anormal de células T, caracterizada na doença celíaca (CD) (MÉNARD *et al.*, 2010).

Macrófagos, enterócitos e células dendríticas secretam TGF- β , onde na ausência de IL-6, induzem a geração de TregFoxP3⁺. TGF- β participa na manutenção da expressão de FoxP3 em linfócitos CD4⁺CD25⁺ Tregs, além de suprimir células T efectoras *in vitro* e *in vivo* (GILBERT *et al.*, 2011). A principal população de células dendríticas (DC) envolvidas na geração de Tregs expressam a integrina α E β 7 (CD103). Essas células migram da LP para os linfonodos mesentéricos (mLN), onde possuem a habilidade única de induzir a expressão de moléculas *gut-homing* em linfócitos T e participam na geração de células T regulatórias FoxP3⁺ (iTregFoxP3⁺) (GROUX *et al.*, 2004; JAENSSON *et al.*, 2008; WEINER *et al.*, 2011) (Figura 1 B). Essas propriedades das DCs CD103⁺ está relacionada a expressão da enzima Retinal-desidrogenase (RALDH2), possibilitando a conversão de vitamina A para ácido retinoico (RA) (HALL *et al.*, 2011). RA é suficiente para induzir moléculas *gut-homing* CCR9 e a integrina α 4 β 7 em células T e atuar como um cofator na conversão de *naive*CD4⁺ a Treg mediada por TGF- β (PABST e MOWAT, 2012). Além das DCs CD103⁺, o microambiente presente no mLN auxilia na geração de Tregs. Células do estroma do mLN produzem RA através

da expressão de RALDH1, RALDH2 e RALDH3, sendo indispensáveis na indução de tolerância oral (MOLENAAR *et al.*, 2009; BUETTNER *et al.*, 2010).

Tregs geradas no mLN retornam a LP via CCR9 e a integrina $\alpha 4\beta 7$ onde passam por expansão secundária mediada por macrófagos e DCs CD11b⁺, através da secreção de IL-10. Células Tregs podem estimular DCs CD11b⁺ a secretarem IL-27, a qual aumenta a produção de IL-10 por células T regulatórias tipo 1 (Tr1) (AWASTHI *et al.*, 2007). Tregs atingem a circulação sistêmica, saindo do mLN para linfonodos periféricos, seguindo o ducto torácico (MOWAT, 2003). PARK *et al.* (2012) identificou uma população de células dendríticas IDO⁺CD11b⁺ presentes no baço, como as responsáveis pelos efeitos sistêmicos da tolerância oral. Sugere-se que Tregs, induzidas no mLN, migrem para o baço e induzam a expressão de Indolamina 2,3 Dioxigenase (IDO) em DCs através da ligação do antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) ao receptor B7.

2.2.3 Células T regulatórias

Células T regulatórias exercem suas funções supressoras por diversos mecanismos. Tregs podem inibir células T efetoras através da produção de adenosina supressora ou transferência direta de cAMP para essas células (BOPP *et al.*, 2007). Tregs inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias em células T efetoras através da inibição da sinalização por Ca²⁺ e consequente redução na ativação do fator nuclear κB (NF- κB) e o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (LI *et al.*, 2010). Além da produção de citocinas imunossupressoras como IL-10, TGF- β e IL-35, Tregs suprimem células T efetoras através do consumo de IL-2, ou induzem morte celular via granzima e perforina (SCHMIDT *et al.*, 2012). De maneira indireta, Tregs diminuem a ativação de células T efetoras através da diminuição na expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80,CD86) em células apresentadoras de antígeno, via CTLA-4 (SCHMIDT *et al.*, 2012).

Além de CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, outras classes de Tregs são ativadas frente a administração de antígenos inócuos por via oral. Estas incluem Tregs naturais geradas no timo (nTreg CD25⁺FoxP3⁺), células T regulatórias tipo 1 (Tr1), dependentes de IL-10, Th3 LAP⁺ dependentes de TGF- β , CD8⁺ Tregs e Bregs (WEINER *et al.*, 2011; BERTHELOT *et al.*, 2012). Células Tr1 promovem e mantêm o estado de tolerância através da secreção de IL-10 e destruição de células

apresentadoras de antígeno (APC) via Granzima B. Expressam em sua superfície CD49b e o gene ativador de linfócito 3 (LAG-3) (GAGLIANI *et al.*, 2013). Células T_H3 apresentam um pro-peptídeo associado por ligação não-covalente ao domínio amino-terminal do TGF- β , formando um complexo latente de TGF- β (LAP). Células T_H3 permanecem em compartimento imune periférico, sendo ativadas via sinalização de TCR no intestino por antígenos orais. Demais Tregs como nTreg, $CD8^+$ Tregs e $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ podem ser LAP^+ (WEINER *et al.*, 2011). Os subtipos de Breg são semelhantes aos de Treg; Br1 expressam IL-10, Br3 expressam TGF- β e células $BFoxP3^+$ expressam ambas as citocinas. A ativação de Bregs é dependente de receptores *toll-like*, podendo ser ativadas e agirem antes que Tregs, auxiliando em seu recrutamento e desaparecendo quando Tregs se tornam funcionais (BERTHELOT *et al.*, 2012). $CD8^+$ Tregs são induzidas na tolerância oral e suprimem a resposta imune T_H1/T_H17 . Linfócitos $CD8^+$ Tregs auxiliam na produção de IgA por linfócitos B locais, e demonstram ter um papel auxiliar na tolerância a antígenos comensais (CASTRO-SÁNCHEZ e MARTÍN-VILLA, 2013). Embora estejam envolvidas na tolerância oral, estudos apontam que não são essenciais para a indução de tolerância oral a baixas doses de antígeno (ZHANG *et al.*, 2009).

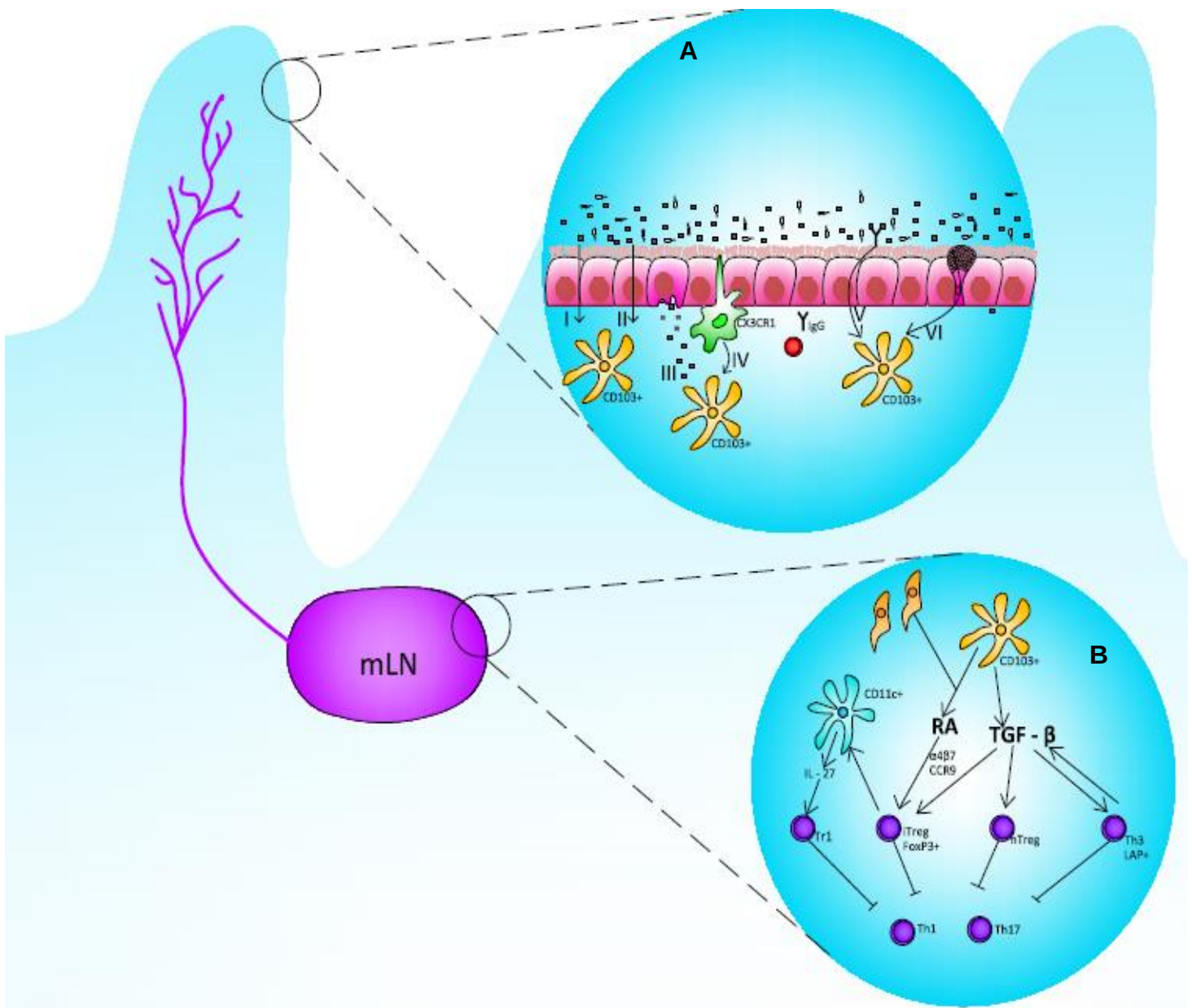


Figura 1. Mecanismos de captação de antígeno e geração de células T regulatórias. Células dendríticas CD103⁺ desempenham um papel fundamental na apresentação de antígenos e na indução de tolerância. **(A)** Essas células podem adquirir antígenos que tenham passado pelas junções oclusivas (I) ou por via transcelular (II). Exossomos contendo antígenos derivados de MHC classe II são captados por DCs CD103⁺ (III). Macrófagos CX3CR1^{high} captam antígenos luminiais por processos de extensão celular e entregam a DCs CD103⁺ (IV). IgG secretada por plasmócitos pode sofrer retro transporte via receptor neonatal Fc (FcRn) e amostrar antígenos da luz intestinal para DCs CD103⁺ (V). Células caliciformes também participam na captação de antígenos intestinais (VI). **(B)** DCs CD103⁺ migram para o linfonodo mesentérico (mLN) onde participam na geração de células T regulatórias (Tregs). Ácido retinoico (RA) é secretado por DCs CD103⁺ e células do estroma do mLN, necessário na síntese da integrina $\alpha 4 \beta 7$ e do receptor de quimiocina 9 (CCR9). TGF- β secretado por DCs CD103⁺ participa na geração e manutenção de linfócitos Th₃, iTregFoxP3⁺ e nTregs. iTregFoxP3⁺ induzem a secreção de IL-27 por células CD11c⁺, a qual promove a expansão de células produtoras de IL-10 (Tr1). Células Tregs inibem a ativação de células Th1 e Th17, mantendo um microambiente tolerogênico na lâmina própria e linfonodos mesentéricos.

2.2.4 Toxinas Dermonecroticas

Aranhas do gênero *Loxosceles* encontram-se em todos os continentes, apresentando maior distribuição no ocidente, particularmente em regiões urbanas da América do Sul (SWANSON e VETTER, 2006). Existem aproximadamente 34 espécies de *Loxosceles* no continente sul-americano, destacando-se *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta* no Brasil. A relação entre picada de aranha e dermonecrose foi primeiramente levantada no final do século XIX, e no início do século XX essa relação foi feita para aranhas do gênero *Loxosceles* especificamente. Apenas na metade do século XX foi determinada a etiologia da dermonecrose, apontando-se para o veneno de *Loxosceles* spp como o responsável (SWANSON e VETTER, 2006).

Acidentes envolvendo a picada de aranhas *Loxosceles* geralmente manifestam-se através de reação inflamatória local com espraiamento gravitacional, formação de edema, eritema, aumento de infiltrado leucocitário, liberação de mediadores inflamatórios e dermonecrose (Barbaro *et al.*, 2010). A nível sistêmico, pode ser observado febre, êmese, desordens na hemostasia, como formação de agregado plaquetário, trombocitopenia, hemólise, citotoxicidade em células endoteliais e nefrotoxicidade (KUSMA *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009; CHAIM *et al.* 2011).

Posteriormente, a composição do veneno foi elucidada como uma complexa mistura de compostos biologicamente ativos, principalmente proteínas e peptídeos com ação tóxica ou enzimática (GREMSKI *et al.* , 2010). Já foram descritas enzimas como fosfatase alcalina, ribonucleotídeo fosfohidrolase, peptídeos com atividade inseticida, hialuronidases, serinoproteases, metaloproteases e fosfolipases-D, as quais se destacam como o grupo bioquímico mais bem caracterizado e principal contribuinte dos efeitos tóxicos do veneno (HASH e HODGSON, 2002; PALUDO *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011).

Toxinas presentes no veneno de aranha-marrom difundiram-se no meio científico e tecnológico através de sua extensa aplicação biotecnológica. A primeira aplicação foi denominada ARACHnase, sendo empregado como controle positivo para anticoagulante lúpico (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Além do tratamento anti-soro, obtido em animais imunizados para tratar acidentes causados pela picada de

aranha-marrom, demais empregos para as toxinas incluem o potencial de atuarem como agentes biopesticidas e como ferramentas nos estudos de citotoxicidade, destacando-se as hialuronidases e toxinas dermonecróticas presentes no veneno (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

As toxinas dermonecróticas são compostas por uma complexa família de proteínas com massa molecular semelhante, sendo já identificadas 7 isoformas com atividade fosfolipásica e dermonecrótica (VUITIKA *et al.*, 2013). Essas toxinas foram obtidas por meio de DNA recombinante, empregando bibliotecas de cDNA montadas a partir da glândula da aranha da espécie *Loxosceles intermedia*. Em particular, a toxina dermonecrótica recombinante (LiRecDT1) apresenta estrutura tridimensional e atividade análoga a toxina dermonecrótica selvagem (RIBEIRO *et al.*, 2007). Uma mutação sítio dirigida (substituição de histidina por alanina na posição 12) à LiRecDT1 leva a drástica diminuição de sua atividade fosfolipásica, embora a estrutura tridimensional mantenha-se preservada (CHAIM *et al.*, 2011; ULLAH *et al.*, 2011). A maior parte dos efeitos tóxicos causados pelo veneno da aranha-marrom pode ser reproduzida experimentalmente através das toxinas dermonecróticas (CHAIM *et al.*, 2011).

2.2.5 Imunoterapia e Imunomodulação em mucosas

A utilização da via oral na administração de autoantígenos, alérgenos e antígenos de vacina demonstra-se uma estratégia promissora no tratamento de distúrbios imunológicos e doenças infecciosas. A administração em camundongos NOD de pro-insulina bioencapsulada em células vegetais levou a indução de tolerância, diminuição na insulite e incidência de DM tipo I. De maneira preventiva, o tratamento oral com antígenos da cólera (CTB), peste e malária promoveu o desenvolvimento de resposta imune protetora, com aumento da sobrevivência de camundongos desafiados com *Yersinia pestis*, aumento na retenção de água no intestino na cólera e inibição do parasita em camundongos infectados com malária (KWON *et al.*, 2013). Em modelo de lesão miocárdica induzida por isoproterenol, a introdução prévia de homogenato de proteínas cardíacas por via oral promoveu a diminuição na produção de citocinas inflamatórias no tecido cardíaco, com subsequente menor infiltrado linfocitário e fibrose tecidual (RAMOS *et al.*, 2012). A

administração oral do veneno da cobra cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) promoveu efeito antinociceptivo em modelo animal, porém o mecanismo envolvido não era dependente da geração de células T regulatórias. A via oral foi priorizada no estudo, pois não provocava os efeitos tóxicos do veneno (BRIGATTE *et al.*, 2002).

A utilização de peptídeos sintéticos derivados de alérgenos da abelha (*Apis mellífera*) em pacientes hipersensitivos ao veneno levou a anergia de células T após 80 dias, com diminuição nos níveis de IgE específica, aumento em IgG4 sérica e aumento na secreção das citocinas IL-10 e IFN- γ (FELLRATH *et al.*, 2002). Enquanto a imunoterapia subcutânea foi extensamente explorada, vias mucosas estão começando a serem consideradas, juntamente com o uso de adjuvantes/vetores, proteínas recombinantes ou fragmentos de peptídeos (MASCARELL *et al.*, 2011). WINKLER *et al.* (2003) induziram tolerância imunológica em modelo de alergia ao veneno de vespa (*Vespula vulgaris*), através da administração via intranasal de Ves v 5, principal alérgeno encontrado no veneno, produzido de forma recombinante. Juntamente com uma inibição nas respostas Th2, encontrou níveis elevados de TGF- β e IL-10.

Com base no que foi exposto, pretendemos avaliar o potencial das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 e sua forma mutada LiRecDT1 H12A na indução de tolerância oral e seu papel na modulação das respostas inflamatórias desencadeadas pela toxina em modelo animal. Há poucos relatos na literatura da utilização de toxinas de animais peçonhentos na imunomodulação, sendo que não há, até o momento da confecção desse trabalho, trabalhos utilizando especificamente as toxinas de aracnídeos.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Camundongos Swiss adultos, fêmeas, pesando aproximadamente 30 a 35 g, foram obtidos do biotério da Universidade Pontifícia Católica do Paraná (PUC-PR) e mantidos no Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa para realização dos experimentos com água e alimentação *ad libitum*. Todos os experimentos realizados

em animais foram aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal, número 03433/2012, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

2.3.2 Toxinas

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 *et al.* (2008) e VUITIKA *et al.* (2013). O envio de tais toxinas para a UEPG e a sua utilização nesse projeto estão de acordo com Convênio 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).

2.3.3 Indução de tolerância oral à LiRecDT1 e LiRecDT1 H12

Camundongos foram previamente divididos em três grupos: controle, LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A. Todos os animais foram tratados três vezes por semana, durante três semanas. Animais do grupo LiRecDT1 receberam a toxina dermonecrótica via gavagem nas concentrações de 1, 5 e 10 µg, por tratamento. O mesmo protocolo foi utilizado para o grupo LiRecDT1 H12A o qual recebeu a toxina mutada. O grupo controle recebeu solução salina tamponada (PBS), também veículo das toxinas. Posteriormente, todos os grupos foram imunizados via subcutânea com 10 µg de LiRecDT1 H12A em óleo mineral e submetidos a um reforço 14 dias depois. Após uma semana, amostras de sangue foram coletadas via incisão na veia caudal (Figura 2). Os níveis de anticorpos Anti-LiRecDT1 H12A foram comparados entre os grupos tratados com toxina dermonecrótica, toxina mutada e controle. Indução de tolerância oral foi avaliada pela diminuição nos níveis plasmáticos de IgG anti-LiRecDT1 H12A em relação ao grupo controle.

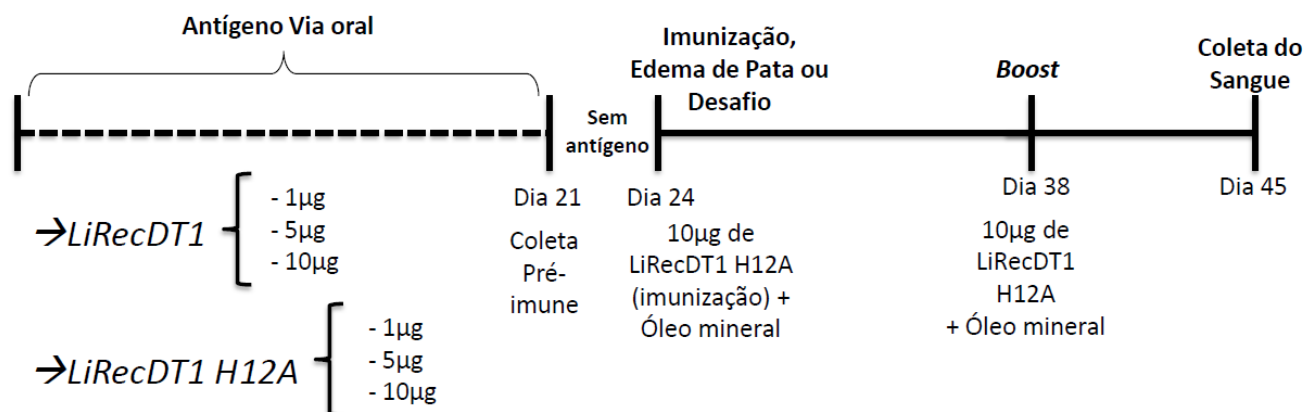


Figura 2. Protocolo de tolerância oral. Esquema da administração das toxinas por via oral, imunização e reforço encontram-se detalhados previamente. Animais foram submetidos ao edema de pata e o sangue foi coletado previamente para obtenção de soro pré-imune, e posteriormente para a análise de anticorpos específicos.

2.3.4 Quantificação de anticorpos anti-*LiRecDT1 H12A* por ELISA

O título de anticorpos específicos anti-*LiRecDT1 H12A* foi determinado através de ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA) em placa de microtitulação *Costar*[®] de 96 poços. Placas foram previamente sensibilizadas com 100 µL do antígeno (*LiRecDT1 H12A*) na concentração de 10 µg/mL e deixadas durante a noite a 4°C. Após a lavagem, as placas foram bloqueadas por 2 horas a 37°C com 200 µL de solução PBS/BSA 1%. Amostras de soro foram diluídas 1:2000 em PBS/BSA 1% e incubadas em câmara úmida por 2 horas a temperatura ambiente. Anticorpo anti-*mouse* IgG conjugado com peroxidase (*SIGMA*[®]) foi incubado na diluição de 1:3000 e incubado por 2 horas seguindo instruções do fabricante. Desenvolvimento de cor ocorreu através da adição de O-Fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato e 2 µL/mL de H₂O₂ 30% em câmara escura por 5 minutos. Reação foi interrompida pela adição de 100 µL de H₂SO₄ a 1M. Absorbância foi medida a 490nm através de leitor de microplaca *Biotek*[®] (*Biosystems*, EUA), 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.

2.3.5 Edema de pata induzido por *LiRecDT1*

Camundongos adultos foram tratados previamente com toxina dermonecrótica (*LiRecDT1*) e toxina mutada (*LiRecDT1 H12A*) para indução de tolerância oral

(Fig.2). Ao término do protocolo (22º dia), camundongos foram injetados subcutaneamente com 6 µg (13 µL) de LiRecDT1 na superfície plantar da pata traseira esquerda. Como controle, foi injetado o mesmo volume (13 µL) de veículo (PBS) na pata direita traseira de cada animal. Com o pico do edema em 10 minutos (PALUDO, *et al.*, 2009), a espessura da pata traseira esquerda e direita foi mensurado utilizando micrômetro digital, sendo o edema causado pela toxina expresso pela diferença do diâmetro da pata traseira esquerda em relação à direita em milímetros.

2.3.6 Ensaio de Mortalidade

Para o estudo da mortalidade, camundongos adultos foram submetidos ao protocolo de tolerância oral (Fig.2). No 22º dia, animais foram desafiados com 50 µg, via intraperitoneal, de LiRecDT1, dose responsável por 100% da mortalidade de camundongos Swiss em 24 horas (KUSMA *et al.*, 2008). Camundongos foram observados nos tempos de 8, 16, 24 e 48 horas após administração, sendo a sobrevivência avaliada a cada 4 horas.

2.3.7 Western Blot

Toxina dermonecrótica recombinante (LiRecDT1) foi misturada em tampão (200mM Tris, 2,75mM β-mercaptoetanol, 50% glicerol, 2% SDS e 0,04% azul de bromofenol) e fervida por 5 minutos. Alíquotas contendo 10 µg da proteína foram resolvidas em gel de poliacrilamida 12,5% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em tampão Tris contendo Tween 20 0,05%. A membrana bloqueada foi dividida em tiras e cada tira foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente com um *pool* do soro de camundongos pré-ímmunes do grupo controle, *pool* de soro de animais tolerizados com toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 e *pool* do soro de animais tolerizados com a toxina dermonecrótica recombinante mutada (LiRecDT1H12A) na diluição 1:1000. Como controle positivo da reação, foi utilizado soro hiperímune (imunizados com LiRecDT1) (1:10000) de camundongos imunizados com a toxina LiRecDT1. As membranas foram posteriormente incubadas com anticorpo

secundário anti-*mouse* IgG conjugado a *horseradish* peroxidase (1:3000) por 1 hora a temperatura ambiente. Reação foi detectada por autorradiografia quimioluminescente, utilizando como substrato para a enzima peroxidase uma solução contendo H_2O_2 e Luminol.

2.3.8 *Análise Histológica*

Seções histológicas do intestino delgado foram obtidas de grupo controle, imunizados com LiRecDT1 H12A, tolerizados com LiRecDT1 e tolerizados com LiRecDT1 H12A. Seções do duodeno e jejuno proximal foram coletados e fixados em fixador ALFAC (85% de álcool 80%, 5% de ácido acético glacial e 10% de formol) por 16 horas. A seguir, foi feita a desidratação do tecido através de banhos consecutivos de álcool absoluto e diafanizados com xilol. Os tecidos foram então incluídos em parafina, preparando-se lâminas histológicas em secção transversal (5 μ m) para análise. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram examinadas por microscopia óptica e imagens foram capturadas utilizando microscópio Olympus com câmera digital acoplada (DP21). A integridade do epitélio intestinal e lâmina própria da mucosa, submucosa intestinal e agregado linfocitário (fora dos centros germinativos) foram analisados.

2.3.9 *Análise estatística*

Resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (S. E. M), analisados por análise de variância de uma via ou duas vias (ANOVA), seguido de pós-teste de Bonferroni. Análise de sobrevivência foi feita através do teste de Mantel-cox. Diferença estatisticamente significativa foi considerada para $p < 0,05$. Adicionalmente, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ foram indicados por símbolos duplos (**) e triplos (***) respectivamente. Análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Administração oral da toxina dermonecrótica levou a diminuição nos níveis de IgG anti-toxina dermonecrótica em camundongos imunizados

Para observar a indução de tolerância oral às toxinas recombinantes, camundongos receberam por gavagem 1, 5 e 10 µg da toxina dermonecrótica e toxina dermonecrótica mutada, três dias na semana por três semanas. No início do dia 22, camundongos foram imunizados subcutaneamente (s.c) com 10 µg da toxina dermonecrótica mutada em óleo mineral e 14 dias após, animais receberam o reforço. Camundongos que não foram pré-tratados oralmente com as toxinas foram considerados como grupo imunizado. Níveis séricos de anticorpos IgG específicos (anti-toxina LiRecDT1 H12A) foram mensurados para avaliar a indução de tolerância. Animais que foram tolerizados com a toxina dermonecrótica e toxina mutada na concentração de 1 e 5 µg, não apresentaram diminuição nos níveis específicos de IgG de forma estatisticamente significativa quando comparados a animais controle (Fig. 3A e 3B) apesar de uma tendência ter sido observada. Camundongos que receberam 10 µg da toxina dermonecrótica e dermonecrótica mutada apresentaram diminuição significativa nos níveis de IgG específica quando comparado aos animais imunizados (Fig. 3C).

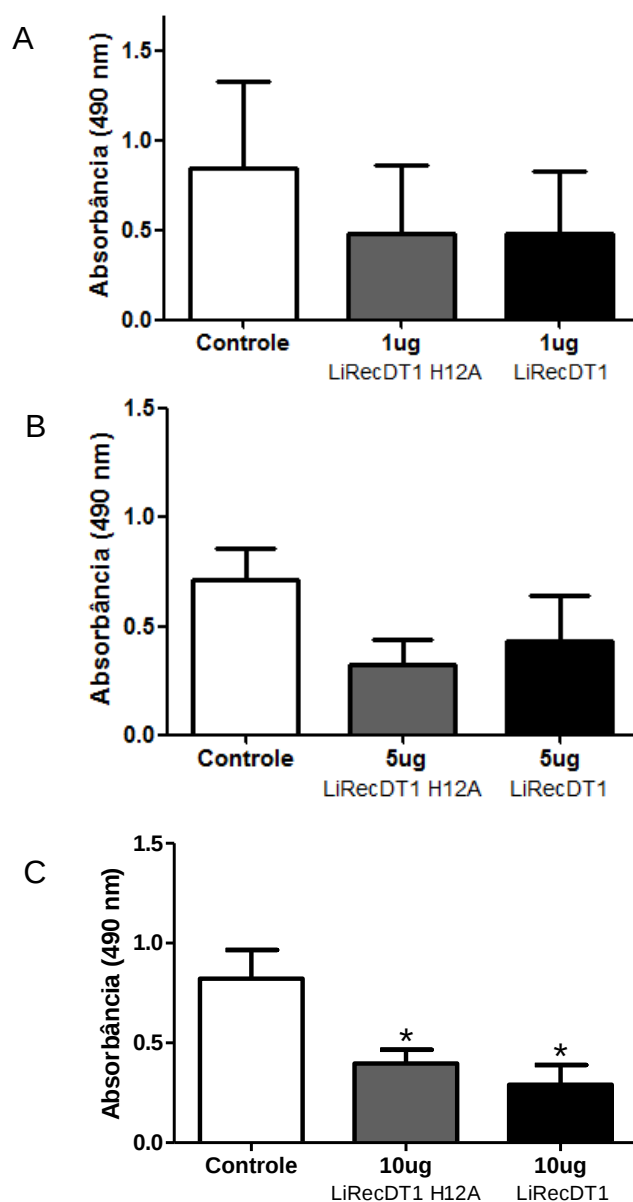


Figura 3. Indução de tolerância oral à toxina dermonecrótica e toxina mutada. Os níveis de anticorpos anti-LiRecDT1 H12A foram comparados entre os animais tolerizados com as toxinas e o grupo controle. Não foi possível induzir tolerância oral nas doses de 1 e 5 µg (**A e B**) da toxina dermonecrótica e toxina mutada. Animais que receberam 10 µg de toxina dermonecrótica recombinante e toxina mutada apresentaram diminuição significativa nos níveis de anticorpos IgG específicos (**C**). Análise estatística: ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni. Barras representam média $\pm$ S.E.M no título de anticorpos IgG específicos. * $p < 0,05$ em relação ao controle. n: 12.

Para verificar se a administração oral das toxinas poderia estar levando a produção de anticorpos IgG específicos, o soro pré-imune foi obtido após a tolerização e previamente a primeira imunização, sendo então mensurados os níveis de IgG sérica. Como controle positivo para a reação, soro dos camundongos imunizados e não tolerizados foram utilizados. Como controle negativo, soro de

animais *naive* (tratados oralmente com PBS) foi utilizado. Não foram observados níveis de IgG específico no soro de animais pré-imune (Fig. 4 A e B). Esses dados confirmam o status de tolerância dos camundongos que receberam previamente a toxina dermonecrótica em sua forma ativa e mutada, por via oral.

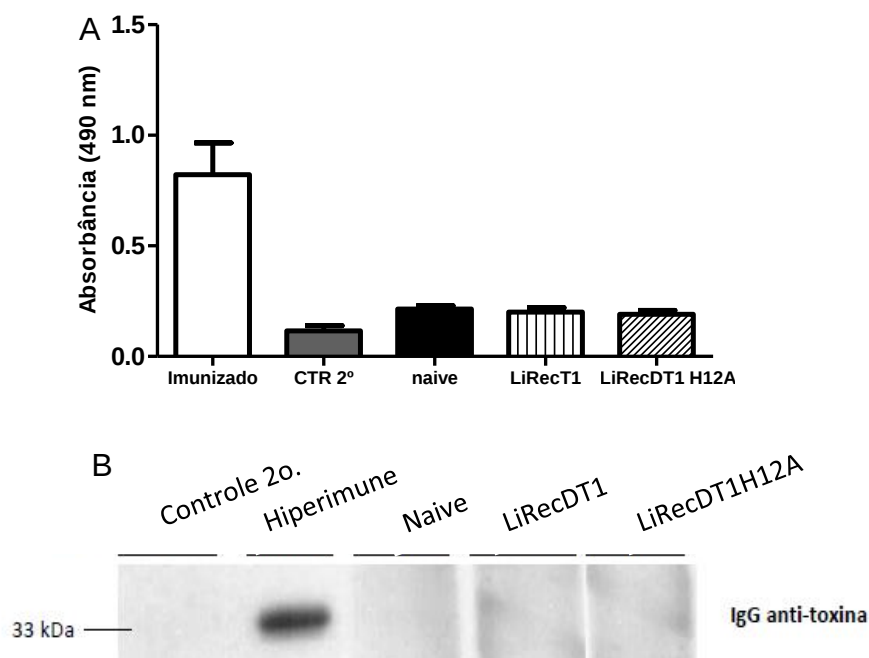
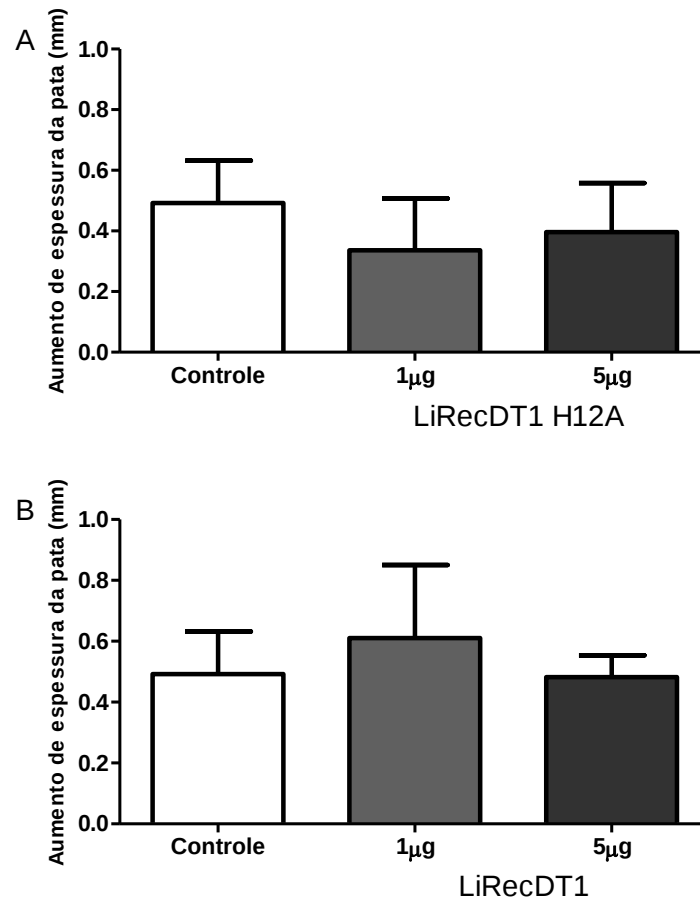


Figura 4. Avaliação dos níveis de anticorpos IgG específicos em soro pré-imune de animais tolerizados com a toxina dermonecrótica (LiRecDT1) e dermonecrótica mutada (LiRecDT1H12A). Animais que receberam toxina dermonecrótica e toxina mutada por via oral não apresentaram anticorpos IgG específicos em soro pré-imune. Presença de anticorpos IgG específicos determinados por ELISA (**A**) e *Western Blot* (**B**). Controle 2º. – membrana/placa incubadas com o anticorpo secundário apenas (1:3000), Hiperimune – membrana/placa incubadas com soro de animais hiperimunes (1:10000), Naive – membrana/placa incubada com pool do soro de animais tratados com administração oral de PBS, LiRecDT1 e LiRecDT1H12A- membrana/placa tratadas com soro de animais tolerizados (1:1000) com as respectivas toxinas por via oral. n: 12

2.4.2 Redução no edema de pata induzido pela toxina dermonecrótica em camundongos tolerantes.

A injeção subcutânea da toxina dermonecrótica recombinante leva a um edema de pata em uma forma dose-dependente, começando 5 minutos após a administração da toxina e atingindo o seu pico em 10 minutos, estando ausente após 12 horas (PALUDO, et al., 2009). Animais foram submetidos ao protocolo de tolerância oral e receberam via subcutânea 6 µg de LiRecDT1 na superfície plantar

da pata traseira esquerda. A pata traseira direita foi injetada com volume equivalente de PBS, como controle. Após 10 minutos, a espessura da pata traseira esquerda e direita por mensurado por micrômetro digital, e o aumento da pata foi calculado pela diferença entre as leituras da pata traseira esquerda em relação à pata controle. Camundongos tratados por via oral com as toxinas nas concentrações de 1 μ g e 5 μ g não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Fig. 5A; Fig. 5B). Animais tolerizados com 10 μ g da toxina mutada (LiRecDT1 H12A) apresentaram uma acentuada diminuição no edema causado pela toxina dermonecrótica. No entanto, camundongos tolerizados com a toxina dermonecrótica LiRecDT1 tiveram um aumento no diâmetro da pata (Fig. 5C), mesmo estando efetivamente tolerantes à toxina (Fig. 3).



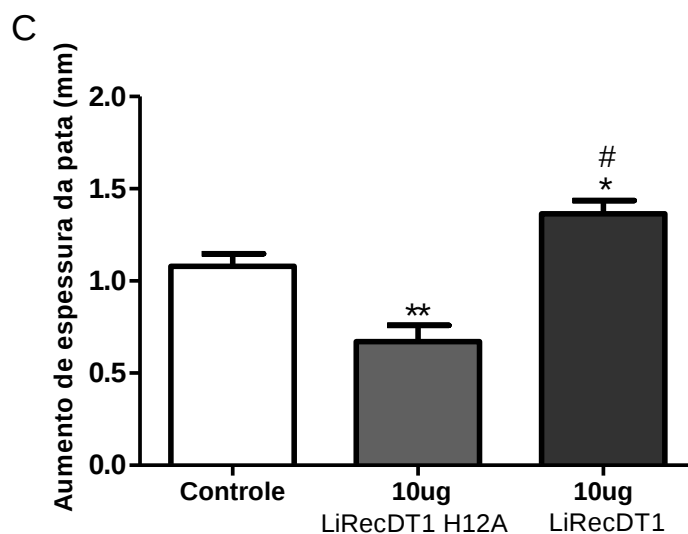


Figura 5. Edema de pata pela injeção subcutânea de 6 μ g de LiRecDT1. Edema foi calculado pela diferença do diâmetro da pata esquerda injetada com toxina dermonecrótica em relação à pata direita injetada com volume equivalente de PBS. Camundongos tolerizados à toxina mutada nas concentrações de 1 μ g e 5 μ g não apresentaram diferença significativa no edema de pata causado pela toxina dermonecrótica em relação ao controle (A,B). Camundongos que foram tolerizados com toxina dermonecrótica mutada apresentaram uma diminuição no edema quando comparado ao grupo controle e toxina dermonecrótica (C). Análise estatística: ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni. Barras representam média $\pm$ S.E.M. * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$ em relação ao controle e # indica $p < 0,001$ em relação ao grupo tolerizado com toxina mutada.

2.4.3 Aumento da sobrevivência de camundongos tolerizados frente a desafio com toxina dermonecrótica

Sabe-se que a administração de altas doses da toxina dermonecrótica leva a mortalidade de camundongos Swiss, caracterizada principalmente por oligúria e falência renal aguda. KUSMA et. al (2008) demonstrou que a administração intraperitoneal (i.p.) de 50 μ g de LiRecDt1 levava a 100% de mortalidade em 24 horas, enquanto que a forma mutada (LirecDT1 H12A) não causava a morte dos animais. Para avaliar os efeitos da tolerância oral na sobrevivência frente a desafio, animais foram submetidos ao protocolo de tolerância oral (Fig.6) na dose de 10 μ g para ambas as toxinas. Grupo controle recebeu PBS. Dois dias após o término do protocolo, animais receberam 50 μ g de LiRecDT1 i.p. e foram observados em intervalos de 4 h, por 24 h, posteriormente em 48 e 72 h. Camundongos tolerizados com a toxina LiRecDT1 apresentaram maior sobrevivência, com 60% dos animais vivos em 24 h, enquanto o grupo controle apresentou 20% no mesmo período. Ao término do experimento, em 72 h, 40% dos camundongos tolerizados com a toxina

dermonecrótica recombinante permaneceram vivos, contra 7% do controle (Fig. 6 A). Animais tolerizados com a toxina mutada não apresentaram diferença na taxa de sobrevivência quando comparada ao controle (Fig. 6 B).

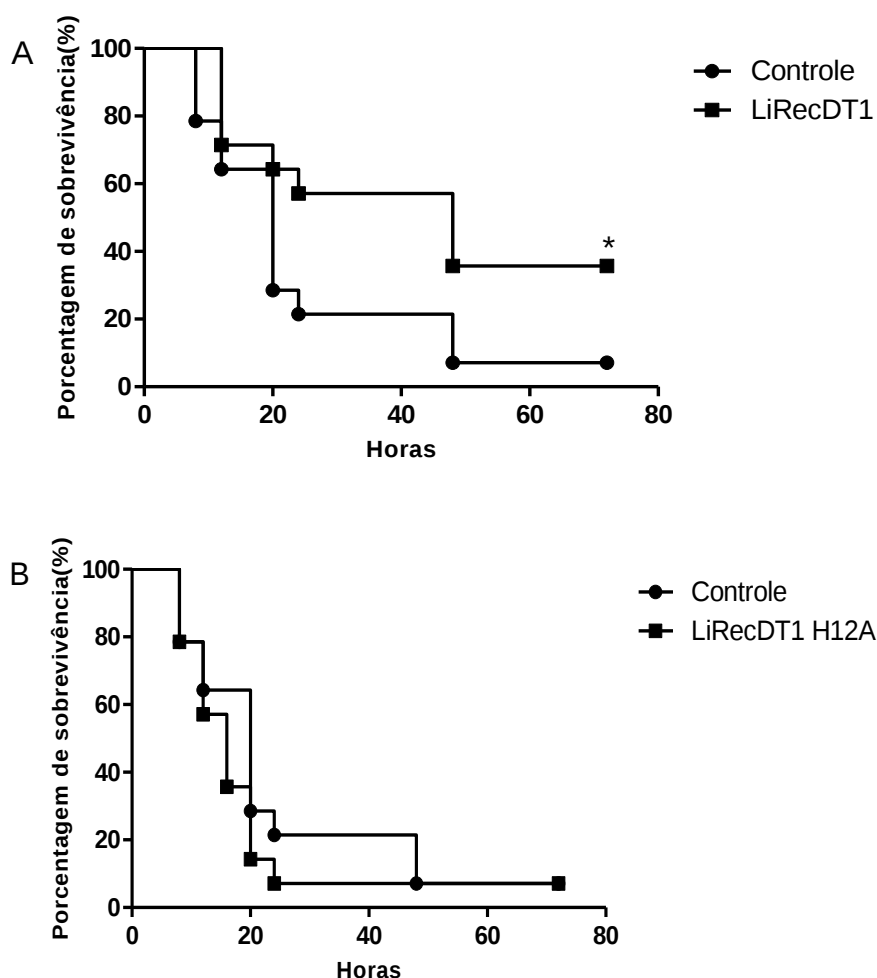
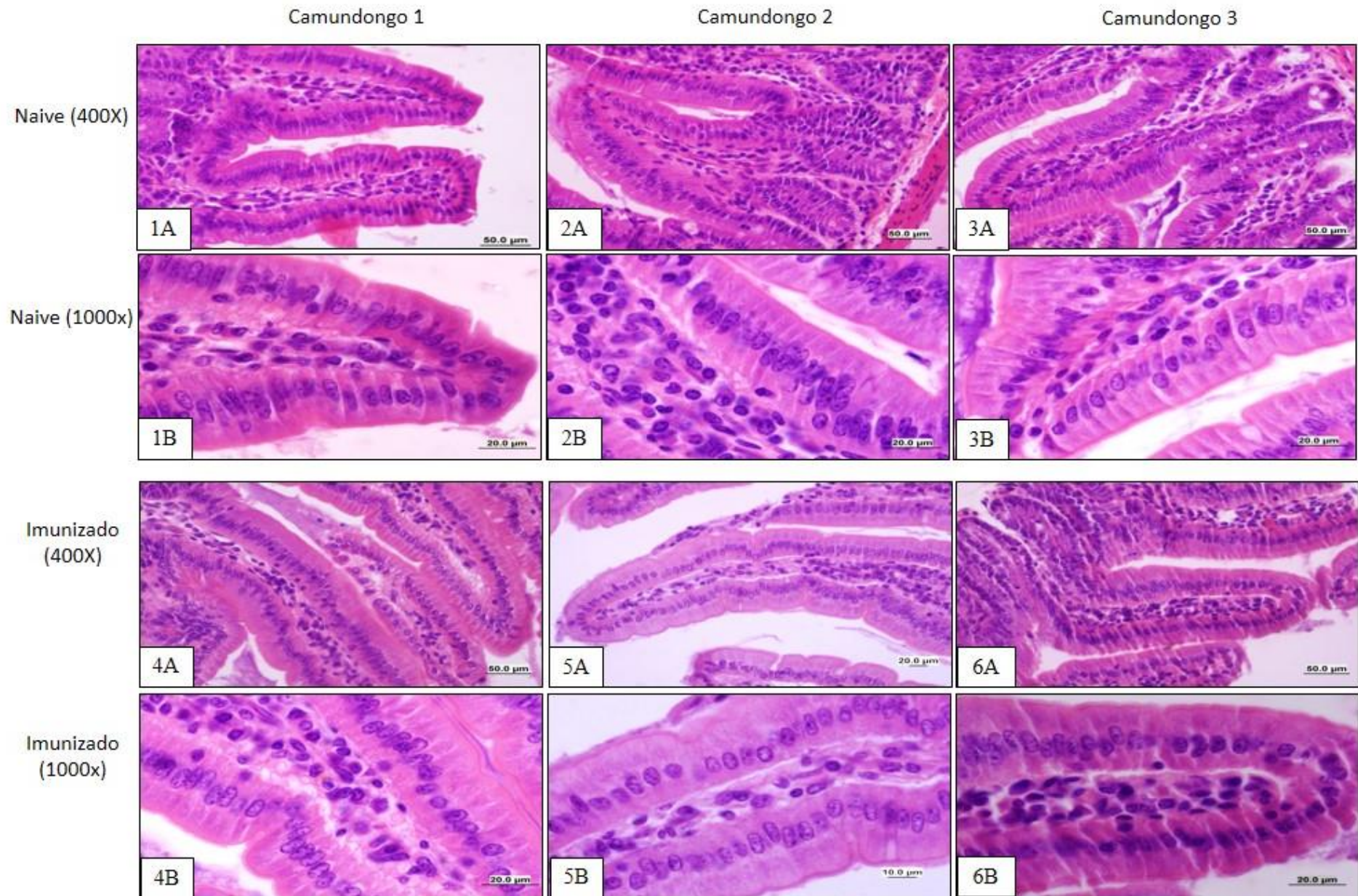


Figura 6. Avaliação da mortalidade dos camundongos expostos a 50 µg (ip) de toxina dermonecrótica. Animais foram submetidos ao protocolo de tolerância oral (Fig. 1) e desafiados com a toxina LiRecDT1. **(A)** Animais do grupo LiRecDT1 apresentaram menor taxa de mortalidade em relação ao controle. **(B)** Não houve diferença na sobrevivência dos camundongos tolerizados com a toxina mutada (LiRecDT1 H12A). Análise estatística: log-rank Mantel-cox teste. * indica $p < 0,05$ em relação ao controle.

2.4.4 Ausência de lesão tecidual e inflamação no epitélio intestinal de animais tolerizados com as toxinas

Seções do duodeno e jejuno proximal do grupo controle, imunizado e tolerizado com LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A foram obtidas conforme descrito previamente. Lâminas coradas por H&E foram observadas em aumento de 400x e 1000x por dois pesquisadores independentes, avaliando a integridade do epitélio e

lâmina própria intestinal. Não foram observadas alterações nos grupos estudados. Embora a LiRecDT1 provoque lesão celular e inflamação quando administrada via s.c e i.p, sua administração oral não provocou alterações no epitélio intestinal de camundongos nas concentrações utilizadas nesse estudo.



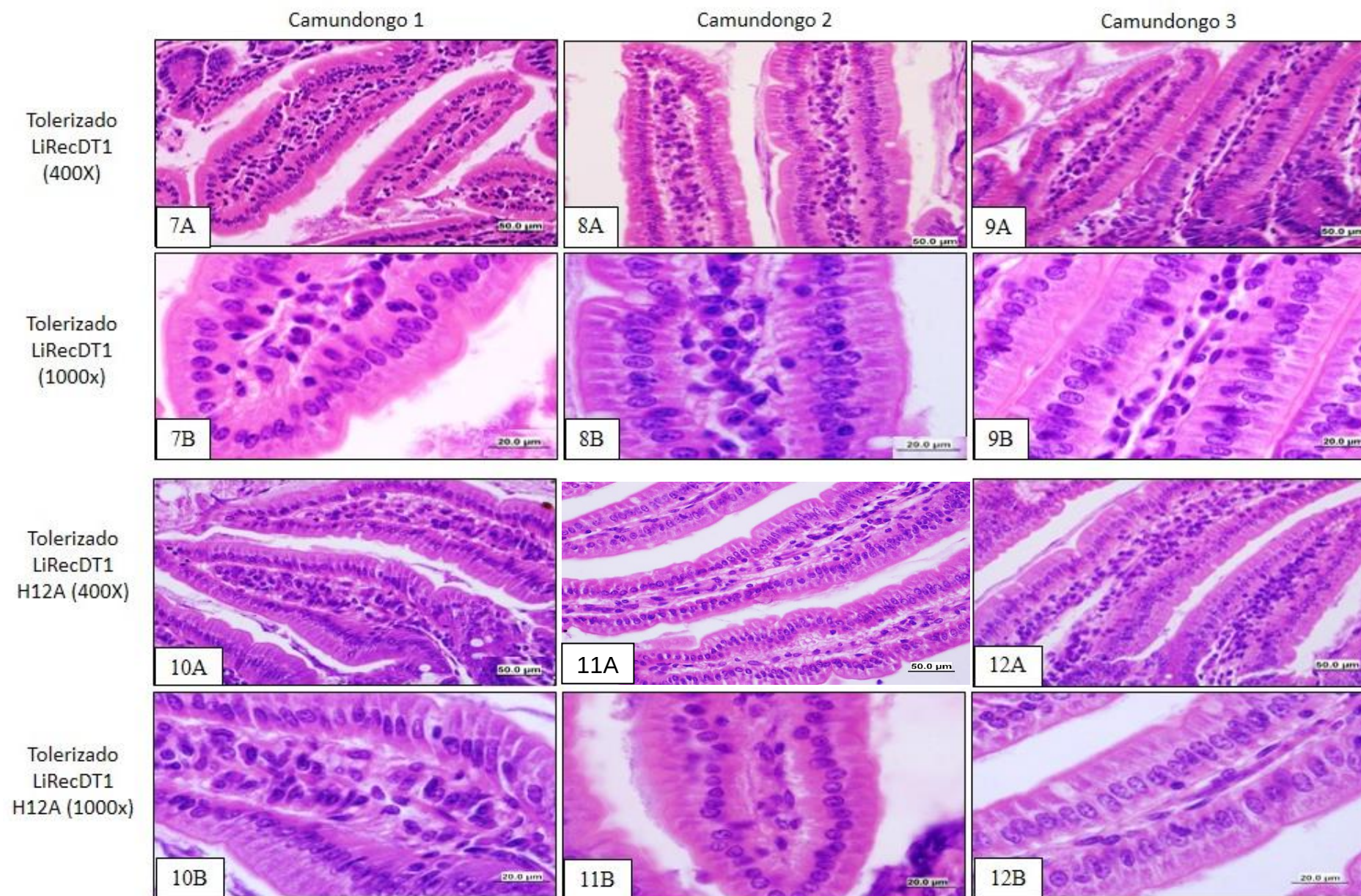


Figura 7. Análise da morfologia do epitélio e lâmina própria intestinal. Camundongos submetidos ao protocolo de tolerância oral (Fig. 2) foram sacrificados dois dias após o término do protocolo, sendo a porção do duodeno e jejuno proximal coletada para análise histológica. Lâminas foram coradas em H&E e analisadas em microscopia óptica. **(1A, 2A, 3A)** Grupo controle (Naive) em aumento de 400x. **(1B, 2B, 3B)** Grupo controle em aumento de 1000x. **(4A, 5A, 6A)** Grupo imunizado com LiRecDT1 H12A em aumento de 400x. **(4B, 5B, 6B)** Grupo imunizado com LiRecDT1 H12A em aumento de 1000x. **(7A, 8A, 9A)** Grupo tolerizado com LiRecDT1 em aumento de 400x. **(7B, 8B, 9B)** Grupo tolerizado com LiRecDT1 em aumento de 1000x. **(10A, 11A, 12A)** Grupo tolerizado com LiRecDT1 H12A no aumento de 400x. **(10B, 11B, 12B)** Grupo tolerizado com LiRecDT1 H12A em aumento de 1000x. n: 3.

2.5 DISCUSSÃO

A tolerância oral é definida por uma diminuição na resposta imune local e sistêmica, envolvendo mecanismos de anergia clonal, deleção de linfócitos T reativos e principalmente a geração de células T regulatórias, que exercem função imunossupressora (BILLATE e LAFAILLE, 2012). As primeiras observações a cerca do fenômeno surgiram no início do século XX, ganhando destaque com evidências experimentais durante a década de 70. Desde então, a tolerância oral vem sendo estudada principalmente através de diversos modelos animais de autoimunidade e reações alérgicas, estas com enfoque nas alergias alimentares, onde já há aplicação clínica ao ser humano (WEINER *et al.*, 2011). No entanto, a utilização de mucosas (oral, mucosa nasal) com o objetivo de promover imunomodulação para alérgenos ambientais e toxinas foi até o momento pouco explorada. Para investigar os efeitos da administração oral da toxina dermonecrótica recombinante e sua forma mutada no desenvolvimento da resposta inflamatória induzidas pela toxina dermonecrótica, animais foram submetidos ao protocolo para indução de tolerância oral (Fig.2).

A fim de determinar a quantidade de toxina necessária para promover a indução de tolerância oral, animais foram divididos em grupos que receberam 1, 5 e 10 µg de LiRecDT1 e 1, 5 e 10µg de LirecDT1 H12A por três semanas, totalizando 9, 45 e 90µg de toxina por animal no final do protocolo. Camundongos foram então imunizados com a toxina mutada, LiRecDT1 H12A, e os níveis de IgG específicos foram detectados. Os resultados demonstraram que apenas os animais que receberam 90 µg da toxina dermonecrótica e mutada, apresentaram uma diminuição nos níveis de IgG específicos, quando comparados ao grupo controle (PBS). Do mesmo modo, não foram detectados anticorpos IgG anti-toxina no soro de animais pré-imune, demonstrando que o tratamento oral dos animais com as toxinas

dermonecróticas não induz a produção de imunoglobulinas da classe IgG. A forma mais bem caracterizada de demonstrar a indução de tolerância oral é pela diminuição nos níveis de anticorpos IgG específicos em animais imunizados, que previamente receberam o antígeno pela via oral (FARIA e WEINER, 2005). Dessa forma, demonstramos a ocorrência de tolerância oral pela prévia administração oral das toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A em camundongos swiss. Foi também observado que a via oral demonstrou-se segura na administração das toxinas, especialmente em relação a LiRecDT1, a qual possui intensa atividade dermonecrótica, não sendo observados alterações na morfologia do epitélio e lâmina própria intestinal (Fig.7).

Animais previamente tratados com as toxinas foram injetados na pata traseira com LiRecDT1 e o desenvolvimento do edema foi mensurado. A administração no grupo controle foi caracterizada por rápido desenvolvimento do edema, atingindo o seu pico em 10 minutos como demonstrado previamente (PALUDO, *et al.*, 2008). Animais tolerizados com toxina mutada na dose de 10 µg apresentaram acentuada diminuição no edema em relação ao controle, enquanto que animais tolerizados com LiRecDT1 tiveram um aumento no edema quando comparados ao controle e ao grupo tratado com a toxina mutada. De forma semelhante, WINKLER *et al.* (2003) demonstrou a indução de tolerância ao principal alérgeno do veneno de *Vespula vulgaris*, através da prévia administração intranasal em modelo animal. O pré-tratamento com o alérgeno foi mais eficaz que o tratamento com veneno total, proporcionando acentuada diminuição na reação de hipersensibilidade do tipo I, redução na secreção de IL-4 e aumento na secreção de IL-10 e IL-5 em esplenócitos reestimulados *in vitro*, como o aumento na expressão de IL-10 e TGFβ. Atribui-se à tolerância oral, uma supressão nas respostas T_H1, T_H2 e T_H17, inibição na produção de citocinas efetoras como INF-γ e TNF-α e supressão na produção de IgG1 e IgE (MUCIDA, *et al.*, 2005; WEINER *et al.*, 2011; SCHIMIDT *et al.*, 2012). Sugerimos que diminuição no edema presente em animais tolerizados com a toxina mutada pode ser resultado da supressão de respostas T_H1 e T_H2 causada pela indução periférica de células T regulatórias. Embora observado uma redução nos títulos de anticorpos específicos no grupo LiRecDT1, investigações futuras podem esclarecer o aumento do edema observado nesse grupo.

A administração de altas doses de toxina dermonecrótica leva a mortalidade de camundongos Swiss, caracterizada por oligúria e falência renal (KUSMA *et al.*,

2008). Sabe-se que a imunização com veneno total, toxina dermonecrótica recombinante e peptídeos sintéticos promove um aumento na sobrevivência dos animais frente a desafio (ARAUJO, *et al.*, 2003; FELICORI *et al.*, 2009; CHATZAKI, *et al.*, 2012). Para investigar os efeitos da tolerância oral ao desafio com altas doses de toxina dermonecrótica, animais submetidos ao protocolo de tolerância oral foram injetados i.p. com 50µg de LiRecDT1. Mortalidade foi observada em intervalos de 4h por 24h e posteriormente em 48h e 72h. Tolerância oral à toxina dermonecrótica levou a aumento na sobrevivência dos camundongos em todos os tempos, com 60% de sobrevivência em 24h, enquanto apenas 20% do grupo controle haviam sobrevivido. Ao final do experimento, apenas 7% dos animais do controle sobreviveram, enquanto 40% do grupo LiRecDT1 estavam vivos. No entanto, animais tolerizados com a toxina mutada não apresentaram diferença na cinética de sobrevivência. Enquanto que a nefrotoxicidade causada por LiRecDT1 ocorre principalmente pela atividade catalítica da enzima no tecido e subsequente lesão glomerular, a geração do mediador ceramida-1-fosfato (C1P) estimula a liberação de ácido araquidônico via fosfolipase A2, levando a síntese de eicosanoides (GÓMES-MUNHOZ *et al.*, 2010), os quais podem potencializar a lesão glomerular causada por LiRecDT1. Sugerimos que a prévia indução de tolerância oral pode atenuar o desenvolvimento da resposta inflamatória no glomérulo, contribuindo dessa forma com o aumento da sobrevivência dos animais. No entanto, não há evidências no momento que expliquem a ocorrência deste evento apenas nos camundongos tolerizados com LiRecDT1.

A redução nos níveis de anticorpos IgG específicos em camundongos swiss previamente tratados pela via oral com as toxinas, assim como a redução do edema e aumento da sobrevivência frente ao desafio demonstram o potencial da toxina dermonecrótica no estudo do fenômeno da tolerância oral. A utilização da toxina dermonecrótica com atividade enzimática (LiRecDT1) possibilitou a indução de eventos inflamatórios em modelo animal, podendo observar se a imunomodulação promovida pela tolerância oral poderia reduzir a intensidade desses eventos. Por outro lado, a utilização da toxina dermonecrótica com atividade enzimática residual (LiRecDT1 H12A) permitiu que procedimentos como a imunização fosse realizada nos camundongos sem desencadear resposta inflamatória local, a qual induzir um erro nos experimentos. Contudo, é necessário caracterizar as bases celulares e moleculares envolvidas na indução de tolerância oral às toxinas, onde futuros

experimentos podem esclarecer os mecanismos dos eventos observados neste trabalho.

2.6 CONCLUSÕES

A administração oral da toxina dermonecrótica recombinante (LiRecDT1) e sua forma mutada (LiRecDT1 H12A) foi capaz de induzir tolerância oral, demonstrado pela diminuição da produção de anticorpos para a toxina mutada. Os resultados apontam diferentes efeitos da administração oral das toxinas quanto a resposta inflamatória (edema de pata) e sobrevivência a desafio, provocados pela toxina em modelo experimental. Futuros ensaios de proliferação celular e expressão de citocinas podem esclarecer as diferenças encontradas no presente trabalho e também indicar os mecanismos envolvidos.

As compreensões dos mecanismos que envolvem a tolerância oral assim como os que levam a alergias alimentares constituem o principal foco de estudo na imunoterapia de mucosas atual (FARIA *et al.*, 2013), carecendo a literatura de estudos utilizando outros alérgenos/antígenos no controle da resposta imune. A utilização das toxinas dermonecróticas pode proporcionar uma nova forma de estudar o fenômeno da tolerância oral, assim como encorajar a utilização de venenos e toxinas na imunomodulação por mucosas.

CAPÍTULO 2

TOLERÂNCIA ORAL SOB A PERSPECTIVA DE SISTEMAS COMPLEXOS

RESUMO

Tolerância oral refere-se a um estado local e sistêmico de tolerância, induzido no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) após sua exposição a antígenos inócuos como proteínas provenientes da dieta. A modulação da resposta imune pela ingestão de proteínas imunogênicas teve destaque na metade de 1970, onde foi observada como poderoso mecanismo na manutenção da homeostase do sistema imune. Enquanto descobertas recentes revelaram as bases células e moleculares da tolerância oral, a rede de interações entre os componentes que promovem a tolerância oral não foi investigada. O presente trabalho traz uma abordagem baseada em teoria de sistemas complexos, buscando identificar a contribuição de cada elemento em rede de tolerância oral, através de parâmetros topológicos e dinâmicos. Rede de interações foi construída a partir da literatura disponível e adaptada ao nosso modelo. Componentes do sistema imune foram representados como vértices; interações entre os vértices foram descritas como arestas, começando no vértice inicial e terminando no vértice alvo. Medidas topológicas foram obtidas em ordem de caracterizar a rede. Ataques aleatórios e direcionados foram feitos em vértices, e o seu impacto foi mensurado pelo decréscimo no tamanho da componente gigante. Para análises dinâmicas, foi implementado um algoritmo de caminhada aleatória para verificar a dependência topológica que as interações biológicas podem apresentar. Vértices foram individualmente retirados e o fluxo dinâmico foi obtido. A distribuição de grau dos vértices da rede apresentou um decaimento exponencial. O tamanho da componente gigante foi reduzido a 76% após a retirada de 20% dos vértices aleatoriamente, enquanto a remoção de 20% dos vértices com maior centralidade de intermediação reduziu o tamanho da componente gigante para 32%. O *knockout* dos respectivos vértices iTregFoxP3⁺, Tr1, DC CD103⁺, TGF- β e RA causaram maior impacto no fluxo padrão. Embora grande parte das redes biológicas sejam livres de escala, o modelo de tolerância oral não apresentou determinada característica, dado que representa uma partição do sistema imunológico. No entanto, os resultados demonstram robustez a ataques aleatórios e sensibilidade a ataques direcionados, características de redes biológicas. Os resultados dos *knockouts* correspondem a dados biológicos, onde na falta desses elementos, tolerância oral foi prejudicada.

Palavras-Chave: Tolerância Imunológica, Tolerância periférica, Modelo conexionista.

ABSTRACT

Oral tolerance refers to a local and systemic state of tolerance, induced in the gut associated lymphoid tissues (GALT) after its exposure to innocuous antigens such as food proteins. The modulation of immune response by the ingestion of immunogenic proteins had more attention in the mid of 1970s, where was observed as a powerful mechanism that maintains the immune homeostasis. While recent findings shed light in the cellular and molecular basis of oral tolerance, the network of interactions between the components mediating oral tolerance has not been investigated yet. Our work brings a complex systems theory approach, aiming to identify the contribution of each element in an oral tolerance network, through topological and dynamic parameters. Interactions network were built from the available literature and adapted to our system. Immune components were represented as nodes; interactions between these nodes were described as directed edges, starting from the source node and ending in the target node. Topological quantities were assessed in order to characterize the network. Random and direct attacks were performed on the nodes, and their impact was calculated by the decrease of giant component's size. For dynamical analysis, a random-walk algorithm was implemented to assess the topological dependence which biological interactions may display. Nodes were individually knocked out and dynamic flow was performed. The degree distribution showed an exponential decay. The size of giant component was reduced to 76% after 20% of the nodes being randomly removed, while removing 20% of the nodes with higher betweenness centrality reduced the giant component's size to 32%. The knockout of respective nodes iTregFoxP3⁺, Tr1, DC CD103⁺, TGF- β and RA caused great impact in the network flow. Although most of the biological networks are scale-free, our model of oral tolerance did not demonstrated it, given it represents a partition of the whole immunological network (i. e. organismal). Nevertheless, our results demonstrate network robustness to random attacks as the presence of hubs; features of biological networks. The results of knockouts correspond to biological data, where in the absence of these elements oral tolerance was impaired.

Keywords: Immune tolerance, Peripheral tolerance, Connectionist models.

3.1OBJETIVOS

3.1.1Objetivos Gerais

- Investigar o fenômeno da tolerância oral através da teoria de sistemas complexos.

3.1.2 Objetivos Específicos

- Montar uma rede de interações entre os componentes do sistema imune que participam da tolerância oral;
- Avaliar propriedades topológicas e dinâmicas do modelo;
- Verificar a importância relativa dos componentes da rede através da retirada individual dos vértices.

3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Sistema imune adaptativo representa uma característica marcante de organismos vertebrados mandibulados. O sistema imune adaptativo é basicamente composto por células produtoras de anticorpos, conhecidas como células B, e por um conjunto de células T especializadas, as quais orquestram de diferentes formas, as respostas desempenhadas pelo sistema imune (MURPHY *et al.*, 2012). Enquanto o sistema imune deve remover patógenos de hospedeiros infectados e proteger o organismo contra substâncias nocivas, de maneira recíproca deve tolerar antígenos benignos ou necessários, assim como antígenos encontrados no ambiente e na dieta (BURT, 2013).

O timo é o órgão responsável pelo desenvolvimento e maturação de células T. Peptídeos próprios e não-próprios são processados por células apresentadoras de antígenos (APCs) ligados a proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Receptores de linfócitos T (TCRs) apresentam alto grau de variação nas regiões de reconhecimento de antígeno, geradas por rearranjo estocástico de genes relevantes ao processo. Linfócitos T que reconhecem moléculas próprias de MHC recebem sinais para sobrevivência e são expandidos, em um processo conhecido como seleção positiva. No entanto, linfócitos T que reconhecem peptídeos próprios sofrem seleção negativa (morte celular por apoptose) ou se tornam células T regulatórias naturais (nTreg) (KOSMRLJ *et al.*, 2009; GORDON e MANLEY, 2011). Linfócitos T *naïve* (Células T que não encontraram seu antígeno cognato) podem sair do timo e promover tolerância periférica a antígenos comensais presentes nas mucosas, como a cavidade oral e o intestino. Seguindo a exposição de antígeno nessas áreas, linfócitos T *naïve* se tornam células T regulatórias induzíveis (iTreg). Ao contrário de nTregs, iTregs apresentam fenótipo transiente, dependendo das condições do microambiente em que estão presentes (HUEHN *et al.*, 2009).

O fenômeno da tolerância oral refere-se a um estado de tolerância local e sistêmico, induzido nos tecidos linfoides associados ao intestino (GALT), após sua exposição a antígenos inócuos, como proteínas provenientes da dieta (WEINER *et al.*, 2011). APCs residentes na lâmina própria intestinal (LP) recebem antígenos da luz intestinal e migram para linfonodos mesentéricos (mLN), onde promovem a diferenciação de células T. Tregs atingem a circulação via linfonodos pancreáticos

seguindo para o baço, causando os efeitos sistêmicos da tolerância oral (PABST e MOWAT, 2012). Enquanto a imunologia teve avanços concretos em termos de compreender os componentes genéticos, moleculares e celulares presentes no fenômeno da tolerância oral (OHKURA *et al.*, 2013; ÁLVAREZ *et al.*, 2013), a rede de interações entre esses componentes ainda não foi investigada. Como o fenômeno de tolerância oral depende das complexas interações entre componentes do sistema imune aliados ao microambiente único presente no GALT (PEARSON *et al.*, 2012), o presente trabalho tem como objetivo entender a estrutura e dinâmica da rede de tolerância oral, identificando a contribuição relativa de cada elemento. Para tal análise, foi proposto um modelo capaz de quantificar medidas topológicas e dinâmicas; e para avaliar a importância relativa dos elementos da rede, foram realizados *Knockouts* (KO), através do silenciamento de vértices e avaliação das divergências geradas no sistema.

3.2.1 Teoria dos Grafos

Conceitualmente, grafos são formados por vértices (V) e arestas (E), conectando os vértices. Formalmente pode ser descrito como um par de conjuntos $G = (V, E)$ onde V representa o conjunto de vértices e E é um multiconjunto; seus elementos podem ocorrer mais de uma vez, de tal forma que cada elemento possui uma multiplicidade (WEST, 1996). A característica mais elementar de um vértice é definida como grau (ou conectividade), k , a qual define quantas ligações um vértice possui com demais vértices. A distribuição de grau $P(k)$ é a probabilidade de um vértice ter k conexões. A distribuição de grau é obtida através da contagem de N vértices com $k = 1, 2, \dots$, dividido pelo número total de vértices N (BARABÁSI e OLTVAI, 2004). Redes em que a distribuição de grau se aproxima de uma lei de potência ($P(k) \sim k^{-\gamma}$) são denominadas como *scale-free* (livres de escala). Distância nas redes é medida através da extensão do caminho, a qual profere quantas arestas são necessárias passar para que se alcance o vértice alvo. Através desse conceito, pode-se obter a distância de caminho mais curta entre dois vértices (l_{AB}) e a distância de caminho médio $\langle l \rangle$, a qual representa a média da distância de caminho mais curta entre todos os pares de vértices da rede (BARABÁSI e OLTAVI, 2004).

A maior parte das redes biológicas são redes livre de escala, possuindo poucos vértices com maior conectividade, levando a formação de *hubs*. Redes livre

de escala são geralmente robustas a retirada aleatória de vértices, porém sensíveis a retirada de vértices com alta centralidade de intermediação. Centralidade de intermediação é a medida do grau em que um vértice se encontra no caminho entre outros vértices (BARABÁSI e OLTAVI, 2004; NEWMAN, 2005). Redes aleatórias começam com N vértices, os quais são conectados a outros vértices com probabilidade p , criando um grafo com aproximadamente $pN(N-1)/2$ arestas distribuídas aleatoriamente. $P(k)$ segue uma distribuição de Poisson, a qual indica que grande parte dos vértices possui o mesmo número de arestas (VAN Der HOFSTAD, 2013).

3.3 MONTAGEM DA REDE

A fim de compreender o fenômeno da tolerância oral como uma rede complexa, é necessário mudar como o evento ocorre ontologicamente. A primeira consideração a ser feita é a associação do fenômeno como uma resposta sistêmica a um estímulo; o estímulo inicial deve desencadear o processo que promove um conjunto de complexas interações entre os componentes do sistema imune.

A rede de interações foi construída através de dados presentes na literatura, adaptados para o modelo. Componentes do sistema imune como linfócitos, citocinas e antígenos foram representados como vértices da rede. As interações, relações regulatórias e transformações entre os componentes foram descritos como arestas direcionadas, começando no vértice fonte e terminando no vértice alvo (Fig. 8).

Determinados antígenos podem resistir a ação do baixo pH gástrico e enzimas proteolíticas, alcançando a luz do intestino delgado como grandes peptídeos imunogênicos ou como proteínas intactas (MÉNARD *et al.*, 2010). Esses antígenos podem ser complexados a anticorpos da classe IgG e IgA na luz intestinal, e serem transportados para a lâmina própria via receptor Fc (FcRn) e o receptor de transferrina (CD71) respectivamente. (MÉNARD *et al.*, 2010; SUTHERLAND e FAGARASAN, 2012). Enterócitos, que são células intestinais absorvíveis, desempenham um papel crítico na captura de antígenos. Pequenas moléculas (<600 Da) podem atravessar através das junções oclusivas de enterócitos. Enterócitos podem fundir proteínas parcialmente degradadas a compartimentos de MHC classe II e entregar os antígenos na LP na forma de exossomos (PABST e MOWAT, 2012; MIRON e CRÍSTEA, 2011). Antígenos podem ser transportados para a placa de

Peyer através de células M (NAGATANI *et al.*, 2011). Uma população particular de células dendríticas (DCs) residentes na LP (DCs CD103⁺) recebe a maior parte desses antígenos. Essas células migram para o linfonodo mesentérico, e apresentam antígenos via MHC classe II a linfócitos T CD4⁺naïve, na presença das moléculas co-estimulatórias TGF- β e ácido retinóico (RA), favorecendo a diferenciação das iTregFoxP3⁺ (JAENSON *et al.*, 2008). RA imprime moléculas *gut-homing* em Tregs, de tal forma que essas células possam retornar a LP e proliferar através de mecanismos dependente de IL-10. iTregsFoxP3⁺ induzem a produção de IL-27 por DCs CD11b⁺, a qual aumenta a produção de IL-10 por células regulatórias do tipo 1 (AWASTHI, 2007).

3.3 MODELO

De forma geral, o modelo que será tratado é um modelo dinâmico de caminhada aleatória em rede direcionada com topologia fixa. O objetivo é gerar uma quantidade apreciável estatisticamente que nos dê noção acerca de como o fenômeno da tolerância oral ocorre via dependência complexa entre suas componentes (i. e. relações dos elementos do sistema imune envolvidos).

Consideremos a rede de *interação imunológica* como uma rede fixa com um número constante de vértices e arestas. Assume-se que a rede toda é conectada, não havendo vértices ou porções da rede que estejam desconexos com o resto. A conectividade entre um sítio da rede ao outro é representada por valores binários na matriz de adjacência, de forma que se há uma ligação entre o sítio i e j , o valor do elemento de matriz a_{ij} será 1; caso contrário, o inverso é verdadeiro.

Como o grafo em questão é direcionado, não há necessariamente a equivalência:

$$a_{ij} = a_{ji} \quad (1)$$

como artifício desse fenômeno, o grau que trataremos para este trabalho será o grau de saída de um vértice qualquer da rede, k_{out} . Seja um vértice i qualquer da rede, seu grau de saída é dado por:

$$k_{i\text{ in}} = \sum_i a_{ij} \quad (2)$$

Essa quantidade é representada como o número de arestas que saem do sítio i , ou seja, o número de setas que apontam para fora do vértice i .

Com esses dois conceitos topológicos estabelecidos, podemos sintetizar a *caminhada aleatória em rede complexa* para o nosso estudo. De forma geral a caminhada aleatória em rede complexa pode ser entendida como um processo estocástico em tempo discreto, onde um caminhante segue um caminho determinado pela topologia da rede em que o mesmo se encontra. Algumas regras gerais deste processo podem ser sumarizadas:

- I. Em um tempo inicial t , um caminhante genérico w_1 , que se encontre num vértice i qualquer na rede, muda sua posição para um vértice j no tempo $(t + 1)$;
- II. Para os caminhantes é permitido passar, de uma posição i qualquer para outra posição j , se j for um dos vizinhos de primeiro grau de i (i. e. separados por apenas uma aresta);
- III. Os caminhantes devem respeitar a direcionalidade da aresta; se o caminhante se encontra no vértice i ele só poderá ir para outro vértice j se houver uma aresta que aponte em direção de j .

Basicamente, estes três princípios permeiam a caminhada aleatória em rede direcionada. Para mais de um caminhante, é conveniente introduzir o conceito de *vetor posicional de caminhada* $S(g; t)$. Dado um tempo inicial t , um vetor de tamanho $N(t)$ (número total de caminhantes na rede no tempo t), pode ser escrito também em função de t ; cada componente deste vetor está associado a um caminhante na rede

$$W(g; t) = (w_1(t), w_2(t), w_3(t), \dots, w_{N(t)}(t)) \quad (3)$$

onde g é o grafo em que os caminhantes se encontram e w_n é a posição topológica do n -ésimo caminhante inserido na rede. O valor que as componentes deste vetor

podem tomar é a posição atual em que um caminhante qualquer se encontra naquele instante de tempo.

Em se tratando de caminhada aleatória, e assumindo caráter estocástico, podemos escrever a probabilidade de um caminhante inserido na rede na posição i se encontrar na posição j , após o intervalo de tempo entre t e $t + 1$, como

$$P_{ij}(t + 1) = \frac{a_{ij}}{k_{i \text{ out}}} \quad (4)$$

Especialmente, para redes direcionadas, a seguinte diferença expressa uma assimetria de caminhada, para

$$P_{ij}(t) \neq P_{ji}(t) \quad (5)$$

Ou seja, em redes direcionadas, a probabilidade de um caminhante sair do vértice i e chegar no j é diferente da probabilidade de sair do vértice j e chegar em i . Isso é real porque o grau de saída com frequência é diferente do grau de entrada para cada um dos nós.

De forma geral nosso modelo propõe gerar uma quantidade que seja apreciável dinamicamente e estatisticamente, de forma a originar “insights” imunológicos sobre o fenômeno de tolerância oral. Com isso, vamos introduzir um *vetor posicional topológico*, que associa cada componente deste vetor ao número de caminhantes especificados para cada sítio na rede, descrito como:

$$S(g; t) = (\sigma_i(t), \sigma_j(t), \sigma_k(t) \dots \sigma_n(t)) \quad (6)$$

onde $\sigma_i(t)$ o número de caminhantes no tempo t que se encontram no vértice i do grafo g . Para cada tempo t , haverá uma distribuição de caminhantes associados a posições topológicas. Se calcularmos o valor relativo de cada componente do vetor S em relação ao número total de caminhantes $W(t)$ no tempo t ; finalmente teremos a quantidade que denominamos *fluxo de caminhantes*, escrevendo formalmente, ficamos:

$$f_i(t) = \frac{\sigma_i(t)}{N} \quad (7)$$

onde $N(t)$ o número de caminhantes total na rede no tempo t . Ainda assim podemos escrever um vetor associado a cada valor do fluxo de caminhante da rede imunológica:

$$F(g; t) = (f_i(t), f_j(t), f_k(t), \dots, f_n(t)) \quad (8)$$

Este vetor sintetiza a quantidade estatística de nosso interesse neste modelo, pois o fluxo depende da escolha aleatória de caminhada de cada caminhante. De uma forma geral, para $t \rightarrow \infty$, o *vetor de fluxo* $F(g; t)$, tende a uma distribuição estacionária, onde os valores das componentes não variam significativamente com o passar do tempo. Vamos usar esta propriedade dinâmica deste sistema para mensurar a dependência dinâmica dos fluxos com a forma topológica da rede.

Se descrevermos um grafo g inicial, de forma a calcularmos todas as componentes do vetor $F(g; t \rightarrow \infty)$ e então fazermos uma mudança topológica em g , por exemplo, a retirada de um vértice ou uma aresta, ou de ambos; gerando um g' , teremos associado ao novo grafo um novo vetor $F'(g'; t \rightarrow \infty)$, onde os valores dos fluxos deste novo vetor sejam diferentes daquele do vetor inicial para o grafo g . Essa diferença para todos os fluxos pode ser estudada estatisticamente, a medida que escolhemos um modelo topológico como padrão, e calculemos o erro relativo para cada par $f_i(t)$ e $f'_i(t)$. Por exemplo, se estivermos interessados em saber o quanto que uma modificação topológica em um grafo inicial g gera uma mudança dinâmica disruptiva em relação aos valores esperados de $F(g; t \rightarrow \infty)$; calcula-se o erro relativo médio utilizando cada componente pareado de $F(g; t \rightarrow \infty)$ e $F'(g'; t \rightarrow \infty)$.

O cálculo do erro relativo médio, nesse caso, deve seguir algumas diretrizes para que gere uma quantidade estatisticamente robusta em relação à diferença de valores e o número caminhantes na rede. Reconhecendo estes cuidados, verificamos como se dá o cálculo do erro relativo. Primeiramente, calculamos o desvio entre cada par das componentes dos vetores de fluxo da rede padrão e da rede topologicamente modificada, ambos para um tempo suficientemente grande até

que os valores de fluxo de cada componente não modifiquem com o passar do tempo:

$$\begin{aligned}
 f_i(t \rightarrow \infty) - f'_i(t \rightarrow \infty) &= \Delta f_i \\
 f_j(t \rightarrow \infty) - f'_j(t \rightarrow \infty) &= \Delta f_j \\
 f_k(t \rightarrow \infty) - f'_k(t \rightarrow \infty) &= \Delta f_k \\
 &\vdots \\
 f_n(t \rightarrow \infty) - f'_n(t \rightarrow \infty) &= \Delta f_n
 \end{aligned} \tag{9}$$

De forma geral, os desvios podem ter valores negativos ou positivos, tais possibilidades modificam a forma com que vamos ponderar cada desvio. Calculamos o desvio ponderado em relação aos valores negativos e positivos dos mesmos:

$$p_i = \begin{cases} \frac{\Delta f_i}{f_i(t \rightarrow \infty)}, & \text{para } \Delta f_i > 0 \\ \frac{\Delta f_i}{f'_i(t \rightarrow \infty)}, & \text{para } \Delta f_i < 0 \end{cases} \tag{10}$$

Com os valores de p_i , podemos finalmente calcular o valor do erro relativo médio como a soma de todos os p_i divididos pelo número de vértices da rede:

$$P(g; g'; t \rightarrow \infty) = \frac{\sum_{i=1}^n p_i}{n} \tag{11}$$

A quantidade apresentada em (11), o erro relativo médio; é uma quantidade que varia de zero a um, onde valores próximos de zero significam que o impacto topológico gerado em g' é insignificante para o funcionamento “saudável” da dinâmica da rede padrão, g . Quando os valores de P se aproximam de um, indica que a rede foi muito impactada pela mudança topológica sofrida em g .

O processo de modelagem dinâmico, agora, permite que colemos uma informação da dependência entre a topologia da rede e sua dinâmica de caminhantes. Essa aproximação pode ser especialmente útil em casos onde a rede possui arestas sem peso e onde os dados experimentais, ao qual a rede é baseada,

não informam as relações explícitas de quantidade entre os vértices da rede. Esta última característica permite que modelemos a rede de interação imunológica sem a necessidade de quantificar cada relação, de forma a gerar uma quantidade estatística adimensional que depende unicamente da topologia da mesma.

3.4.1 Desenvolvimento do Algoritmo

O algoritmo do modelo de caminhada aleatória, para este caso, tem como objetivo final *gerar o vetor de fluxo médio* a partir de alguns parâmetros fixos de caminhada. O primeiro parâmetro é o tempo de caminhada. Em nosso trabalho, a cada intervalo de tempo, é criado um caminhante e o mesmo caminha uma vez, a medida que sua topologia corrente permita, respeitando as três regras de caminhada aleatória. Adicionalmente, a cada intervalo de tempo, o *vetor posicional de caminhada* recebe uma componente que sempre terá índice 1. O índice 1, para a rede desenhada pela revisão bibliográfica, é o sítio da rede que representa um Antígeno genérico na luz intestinal. Após um tempo suficientemente grande ($t \approx 1000$), a partir do *vetor de posicionalmente de caminhada*, é gerado o *vetor posicional topológico*. Então para cada sítio na rede, este vetor terá uma componente associada a ele, albergando o valor do *número de caminhantes* para aquela componente. Segue-se então para a razão entre o número de caminhantes de uma componente e o número total de caminhantes da rede, obtendo o *fluxo de caminhantes*; que nada mais é do que a frequência relativa de caminhante para um dado sítio. Esta informação permite que construamos o *vetor de fluxo*, que em última análise irá gerar os valores padrões para a rede imunológica desenhada. O segundo parâmetro de caminhada é o número de vezes que este processo é repetido: L . Onde L é o valor de repetições do processo acima descrito. Para nosso estudo $L = 100$. Isso gera 100 *vetores de fluxo*. No final deste processo, escrevemos um *vetor de fluxo médio*, que nada mais é do que a média dos *fluxos de caminhantes*:

$$\Phi(g; t; L) = \frac{\sum_{L=1}^L F(g; t)}{L} \quad (12)$$

O somatório deve respeitar as regras de somas de vetores. Este *vetor de fluxo médio* é a quantidade estatística de interesse para nosso estudo, pois repete um número suficientemente grande de vezes o processo de caminhada aleatória com $t = 1000$ instantes de tempo e $W(t) = 1000$ caminhantes, onde a regra geral para o número de caminhantes pode ser escrita:

$$W(t) = t \quad (13)$$

É interessante notar que não há interação entre os caminhantes, logo a probabilidade de uma caminhante ocupar um sítio qualquer é independente do número de caminhantes daquele sítio. Adicionalmente, o número total de caminhantes que uma componente do *vetor posicional de caminhada* pode assumir é ilimitado.

3.4.2 Linguagem R do algoritmo

Neste trabalho utilizamos a Linguagem R para escrever o algoritmo que sintetiza cada etapa do modelo proposto. A seguir temos a forma formal deste algoritmo em Linguagem R:

```
#Algoritmo de caminhada aleatória ( L = número de amostragens, T= número de
caminhadas, W = número da caminhantes)
```

```
library(igraph, Matrix)
```

```
L<-1000
```

```

for(l in 1:L){W<-1; T<-100; B<-c(); A<-vector(length=W, mode="numeric");

      imuno<-read.table(file="m.imuno.dat");g<-graph.data.frame(imuno,

directed=TRUE);

for(i in 1:W){A[i]<-1}

for(t in 1:T){W<-length(A);{

      for(i in 1:W){

            if(degree(g, mode=c("out"), A[i])==0){A[i]<-A[i];}

            else{vizinhos<-neighbors(g, A[i], mode="out");

                  if(length(vizinhos)==1){A[i]<-vizinhos[1];}

                  else{A[i]<-sample(vizinhos,1)}}}

      }; A<-c(A,1)}; if(l==1){B<-c(B, A); write.table(B, file="B.dat")}

      else{B<-c(read.table(file="B.dat")); B<-c(B$x, A);

            write.table(B, file="B.dat"); B<-c(); A<-c()}}

```

Estatística

N<-34

C<-vector(length=N, mode="numeric")

```

B<-c(read.table(file="B.dat"))

B<-B$x

for(n in 1:N){N[n]<-n ; S<-length(B);

for(i in 1:S){

    if(B[i]==N[n]){C[n]<-C[n]+1}

    else(C[n]<-C[n]+0)

}}

C[1]<-0 # vetor das frequencias

f<-C/sum(C) # frequencias relativas

x<-as.data.frame(V(g)$name)

f<-as.data.frame(f)

freqspad<-data.frame(x, f)

write.table(freqspad, file="freqspad.dat", dec=".", sep=" ")

```

3.5 PROPRIEDADES TOPOLÓGICAS E DINÂMICAS DO MODELO

3.5.1 *Propriedades Topológicas*

Propriedades topológicas da rede de tolerância oral foram estimadas para caracterizar que forma de organização a rede apresenta. O modelo consta com 34

vértices, retirados de dados experimentais provenientes da literatura, e 67 arestas, compondo as ligações que esses elementos do sistema imune exibem. Foi avaliado o grau médio da rede, distância de caminho médio, coeficiente de agrupamento e assortatividade (Tabela 1.). Os resultados concluem que a rede não possui características de rede *small world*, apresentando baixo coeficiente de agrupamento, assortatividade negativa e a distribuição de graus não se reflete uma lei de potência. No entanto, devido a pequena quantidade de vértices, redes podem não apresentar distribuição em lei de potência, e sim uma distribuição exponencial, observada em nosso modelo. Além disso, o modelo demonstrou robusto à retirada aleatória de vértices da rede, quanto comparado à retirada direcionada dos vértices. Vértices com maior centralidade de intermediação foram retirados da rede, e o tamanho da componente gigante (G_c) foi estimado. Da mesma forma, vértices foram retirados de forma estocástica. Com a retirada de 20% dos vértices com maior centralidade de intermediação, o tamanho da componente gigante foi reduzido para 32%, enquanto que a retirada de 20% dos vértices aleatoriamente resultou em um tamanho da componente gigante de 76% (Tabela 2.).

Tabela 1. Propriedades topológicas da rede. Os resultados obtidos não caracterizam redes *small world*. V = Número de vértices; A = Número de Arestas; G_c = Tamanho da componente gigante; ℓ = Distância de caminho médio; C = Coeficiente de agrupamento; R = Assortatividade.

V	A	G_c	$\langle K \rangle$	ℓ	ℓ_{random}	C	C_{random}	R
34	67	34(100%)	3,94	3,34	2,53	0,078	0,09	-0,35

Tabela 2. Tamanho da componente gigante (G_c) após a retirada de vértices com alta centralidade de intermediação e a retirada aleatória de vértices. A rede de tolerância oral demonstrou-se robusta a retirada aleatória de vértices, enquanto que ataques direcionados causaram grande impacto na topologia da rede.

Porcentagem de vértices retirados	Ataques direcionados	Ataques Aleatórios
5%	30 (88%)	32 (94%)
10%	28 (82%)	30 (88%)
15%	27 (79%)	28 (82%)
20%	11 (32%)	26 (76%)
25%	10 (29%)	24(70%)

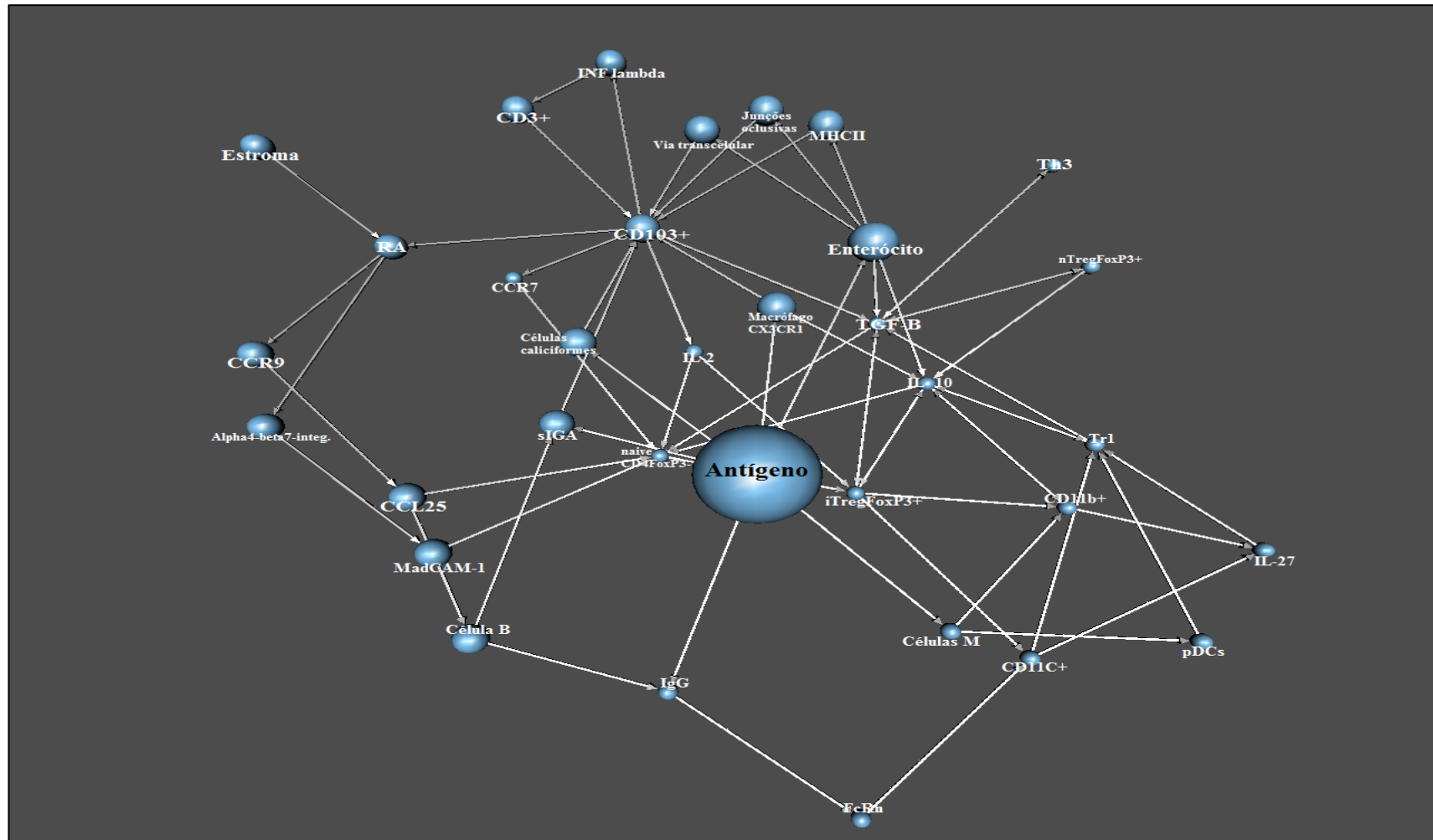


Figura 8. Representação esquemática da rede de tolerância oral. Elementos do sistema imune estão representados como vértices, e as respectivas interações entre os elementos estão representadas como arestas direcionadas, partindo do vértice fonte (antígeno) e terminam nos vértices alvo. Tamanho dos vértices da rede está representado pela medida centralidade de proximidade.

3.5.2 Propriedades Dinâmicas

Propriedades dinâmicas do modelo foram obtidas através da implantação de um algoritmo de caminhada aleatória. Brevemente, o objetivo do algoritmo é obter um vetor de tamanho N , ao qual cada componente possui uma posição l para cada caminhante w , em intervalo de tempo t . Dessa forma, a cada intervalo de tempo um caminhante é criado, sempre na posição inicial (l_1), e se desloca à medida que a topologia permita. Através do algoritmo foi possível obter o fluxo de informação padrão da rede de tolerância oral (Fig. 9). Os vértices TGF- β , IL-10 e iTregFoxP3⁺ foram os que tiveram maior fluxo de informação na rede. Posteriormente, os vértices Tr1, *naïve*CD4FoxP3⁻, células dendríticas CD11b⁺, IL-27, células dendríticas CD11c⁺, Th3 e nTregFoxP3⁺ apresentaram fluxo de informação.

Para avaliar a contribuição que cada elemento do sistema imune presente na rede possui, vértices foram individualmente silenciados (*Knockout*) e a caminhada aleatória foi realizada. O erro relativo médio foi calculado a partir da diferença do fluxo em cada vértice da rede *knockout* em relação ao fluxo dos vértices da rede padrão. Observou-se que a retirada do vértice CD103⁺ foi o que provocou maior impacto na rede, resultando em erro relativo médio de 0,65 e erro relativo percentual de 65%. A retirada dos vértices iTregFoxP3⁺ e Tr1 levaram a um erro relativo de 0,37 e 0,38 respectivamente, e para TGF- β e RA, 0,29 e 0,23 respectivamente (Tabela 3). Em primeira análise, os resultados obtidos correspondem a dados biológicos, onde células dendríticas CD103⁺ desempenham papéis críticos na geração de células Treg, através de mecanismos dependentes de TGF- β e RA. Linfócitos Tr1 atuam através da produção de IL-10, sendo importantes para promover tolerância a antígenos comensais (JAENSSON *et al.*, 2008; ANDOLFI *et al.*, 2012; OHKURA *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2006; HALL *et al.*, 2011)

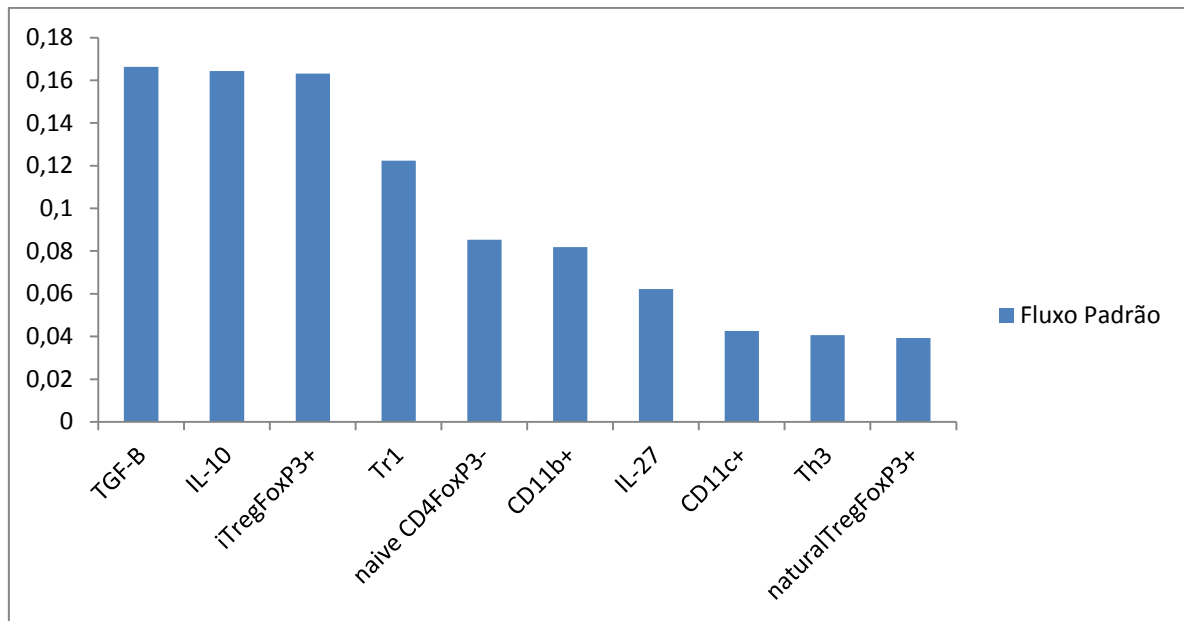


Figura 9. Fluxo de informação padrão em rede de tolerância oral. Vértices TGF-β, IL-10 e iTregFoxP3⁺ apresentaram maior fluxo de informação. Fluxo foi calculado através da quantidade total de caminhantes em determinado vértice, normalizado para a quantidade total de caminhantes na rede.

Tabela 3. Erro relativo médio respectivo a cada *knockout* individual dos vértices. Elementos da rede que quando retirados causaram maior erro relativo médio encontram-se marcado em negrito.

Enterócito 0,2	Junções Oclusivas 0,16	Via Transcelular 0,11	MHC II 0,10	Macrófagos CX3CR1 0,118
slgA 0,18	slgG 0,22	FcRn 0,19	Células M 0,185	pDCs 0,09
Células caliciformes 0,15	CD103⁺ 0,65	Estroma 0,06	RA 0,239	α4β7 integrina 0,139
CCR9 0,138	MadCAM-1 0,16	CCL25 0,15	TGF-β 0,29	CD4FoxP3 ⁻ 0,182
iTregFoxP3⁺ 0,374	Th3 0,14	CD11c ⁺ 0,16	IL-27 0,13	Tr1 0,387
nTregFoxP3 ⁺ 0,115	IL-10 0,198	CD11b ⁺ 0,17	IL-2 0,141	Célula B 0,09
INF-λ 0,127	CD3 ⁺ 0,187	CCR7 0,14		

3.6 DISCUSSÃO

Aproximadamente 40 anos atrás, Niels Kaj Jerne foi o primeiro a propor uma nova teoria para explicar as bases do comportamento do sistema imune, sugerindo a existência de uma rede funcional, baseada nos padrões de reconhecimento de idiótipos carregados por linfócitos (SÖDERQVIST, 2003). Esse breve conceito foi a centelha que despertou interesse em demais pesquisadores para não mais estudarem apenas o sistema nervoso através de modelos, mas também o sistema imunológico. Notórias propriedades do sistema como: diversidade, autorregulação, memória, conectividade e estabilidade a perturbações, levaram a criação de modelos matemáticos baseados em equações diferenciais, modelo celular autômato e funções booleanas (CELADA e SEIDEN, 1992; De BOER, *et al.*, 1993; RIBEIRO *et al.*, 2007; THAKAR *et al.*, 2012).

Uma das propriedades mais intrigantes do sistema imune é a regulação; o desenvolvimento de respostas limitadas quando perturbado constantemente. O intestino representa, nesse cenário, o local onde ocorre o maior contato antigênico do organismo. O intestino humano adulto apresenta cerca de 500 a 1000 espécies de microrganismos, os quais estão em uma densidade de 10^{14} células. Esse número equivale a 10 vezes o número de células humanas, e o microbioma supera o potencial genético humano em duas ordens (SOMMER e BÄCKHED, 2013). Além da microbiota, 130 a 190 g de proteínas alimentares são absorvidas diariamente, constituindo outra fonte de estímulo antigênico para o GALT (BRANDTZAEG, 1998). No entanto, quando em condições saudáveis, a resposta prevalente do sistema imune no intestino é tolerância; através da múltipla ação de seus constituintes (células dendríticas, linfócitos T, plasmócitos, citocinas) interagindo em um microambiente único, aos quais outras mucosas se assemelham. (WEINER *et al.*, 2011; PEARSON *et al.*, 2012; PABST e MOWAT, 2012)

No presente trabalho, investigamos as relações que geram, mantêm e regulam o fenômeno de tolerância oral, através da criação de uma rede complexa de interações entre os elementos. A maior parte das redes biológicas são redes *scale-free*, possuindo como “marca registrada” a distribuição de grau dos vértices em lei de potência. Em nosso modelo, o baixo coeficiente de agrupamento e a distribuição de grau dos vértices não seguindo uma lei de potência, não caracterizam a rede

como *scale-free* ou *small world*. No entanto, algumas redes biológicas apresentam distribuição de grau de forma exponencial. Nós encontramos em nosso modelo uma distribuição de grau exponencial, e robustez da rede a ataques aleatórios (Tabela 2), características de redes biológicas. Pela pequena quantidade de vértices da rede, pode ser difícil encontrar uma distribuição de grau em lei de potência (BARABÁSI e OLTVAI, 2004).

Os resultados obtidos no fluxo padrão sugerem que células iTregFoxP3⁺ estão constantemente ativadas, notando-se que TGF- β e IL-10 são as duas principais citocinas supressoras secretas por essas células. Tregs induzidas em tecido periférico desempenham seu papel supressor (inibição de Th1, Th2 e Th17) através de mecanismos dependentes de citocinas, enquanto que Tregs naturais atuam preferencialmente através de contato célula-célula (BILATE e LAFAILLE, 2012). O alto fluxo em *naïve* CD4⁺FoxP3⁻ indica uma dinâmica renovação de células T na lâmina própria e linfonodo mesentérico. Com a constante entrada de antígenos (proteínas alimentares, microbiota, demais antígenos provenientes do ambiente) na luz intestinal, novas células Treg são geradas (FoxP3⁺, Tr1, Th3) e mesmo linfócitos Th17 auxiliam a manter a homeostase no GALT (BILATE e LAFAILLE, 2012; HIROTA *et al.*, 2013; DENNING *et al.*, 2007). TregsFoxP3⁺ ativadas induzem a secreção de IL-27 por células dendríticas, que estimulam a proliferação de células Tr1 e produção de IL-10. Esse mecanismo é uma forma de Tregs regularem positivamente IL-10 na LP e mLN (AWASTHI *et al.*, 2007). Outros dois principais subtipos de células dendríticas presentes no GALT (CD11b⁺ CD103⁻ e CD11c⁺ CD11b⁻) estão presentes no fluxo padrão. Células dendríticas são essenciais no processo de tolerância oral, como também na resposta imune a antígenos potencialmente danosos. Células CD11b⁺ produzem IL-10, e auxiliam a manter a população de Tregs na lâmina própria. CD11b⁺ também são importantes no processamento de antígenos na placa de Peyer (WELTY *et al.*, 2013; NAGATANI *et al.*, 2010). Por último, células Treg naturais (nTregs) aparecem ativadas no fluxo padrão, contribuindo para tolerância a antígenos próprios. PACHOLCZYK *et al.* (2007) demonstrou que nTregs podem ter como cognato antígenos não-próprios, participando dessa forma da tolerância a antígenos comensais. Embora possam ser dispensáveis para a indução de tolerância oral (MUCIDA *et al.*, 2005), nTregs participam da regulação a antígenos comensais em tecidos periféricos como o GALT, onde a maior parte de nTregs ativou-se na presença de antígenos comensais

(CEBULA *et al.*, 2013). Sucintamente, o fluxo padrão encontrado no modelo representa características celulares marcantes da tolerância oral; A ativação de células T regulatórias (iTregFoxP3⁺, Tr1, Th3, nTreg), células dendríticas (DCs) e a produção das citocinas TGF- β e IL-10, as quais ocorrem por diversos tipos celulares presentes na LP (i. e. DCs, Tregs, Macrófagos, Enterócito) (WEINER *et al.*, 2011).

Ao retirarmos os vértices da rede individualmente e calcularmos o erro relativo médio, obtivemos uma medida que indica a importância dos elementos do sistema imune presentes em nosso modelo no fenômeno da tolerância oral. A retirada do vértice CD103⁺ foi a que provocou maior impacto na rede, levando a um erro relativo médio de 0,65. DCs CD103⁺ constituem a principal população de sua classe na lâmina própria intestinal e linfonodos mesentéricos. A expressão da integrina $\alpha E\beta 7$ limita a migração dessas células entre a LP e mLN, qual corresponde o seu papel em receber antígenos provenientes da luz intestinal e apresenta-los para células *naïve*CD4⁺ (JAENSSON *et al.*, 2008). DCs CD103⁺ secretam TGF- β , IL-10 e RA, através da expressão de RALDH2, contribuindo dessa forma para a geração de iTregsFoxP3⁺. O RA além de agir sinergicamente com TGF- β , é também importante na síntese de moléculas *gut-homing* em linfócitos T, como a integrina $\alpha 4\beta 7$ e CCR9, levando a um tropismo dessas células para a lâmina própria intestinal (Sela *et al.*, 2011; PABST e MOWAT, 2011). Camundongos *knockout* para CD103 (CD103^{-/-}) demonstraram menor proliferação tanto de células T regulatórias como T efectoras, significativa diminuição na expressão de moléculas *gut-homing* em linfócitos T, e a indução de tolerância oral foi prejudicada (SEMMRICH *et al.*, 2012). A retirada de iTregFoxP3⁺ e Tr1 do modelo resultou em erro relativo médio de 0,37 e 0,38. A expressão de FoxP3 é restrita a Tregs, não sendo apenas um marcador exclusivo dessas células, mas também indispensável para a função das mesmas (BILATE e LAFAILLE, 2013). Camundongos *null* FoxP3^{-/-} desenvolvem doença autoimune devastadora, caracterizada por esplenomegalia, linfadenopatia, insulite, severa inflamação da pele, retardo no desenvolvimento corporal e menor sobrevivência (LAHL *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008). No entanto, esses dados não discriminam entre Tregs induzíveis em tecido periférico e Tregs naturais, geradas no timo. Contudo, evidências apontam que iTregs tem um papel principal no processo de tolerância oral (BILATE e LAFAILLE, 2013). A falta de marcadores únicos para células Tr1 dificultou por longo tempo a compreensão de suas funções particulares e a possibilidade de ser utilizada na clínica. Recentemente essas células foram

identificadas como $CD4^+CD49b^+LAG-3^+$. São também induzidas no GALT, e respondem através da alta produção de IL-10 (GAGLIANI *et al.*, 2013). Assim como o *knockout* de FoxP3, camundongos *knockout* para LAG-3 apresentaram infiltrado linfocitário em múltiplos órgãos seguido por doença autoimune (WOO *et al.*, 2012). No entanto, sua principal citocina secretada, IL-10, não é indispensável para a indução de tolerância oral em baixas doses. Enquanto que encefalomielite desenvolveu-se mais grave em animais $IL-10^{-/-}$, a administração oral de glicoproteína mielínica dos oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅) resultou em melhora da doença em todos os grupos (GONNELLA *et al.*, 2004). TGF- β desempenha diversas funções no GALT; promove expressão de FoxP3, participa do controle da função de Tregs, assim como também participa da polarização de Th17. Assim como FoxP3 e LAG-3, camundongos *null* TGF- β apresentam doença autoimune espontânea, e a depleção de TGF- β R tipo II de células T resulta em um fenótipo similar, porém menos agressivo, marcado por ativação espontânea de células T, produção de autoanticorpos e infiltrado linfocitário em múltiplos órgãos (SHEVACH *et al.*, 2008). É importante notar que animais TGF- β *null* não proporcionam uma clara visão sobre TGF- β e sua função no sistema imune, já que TGF- β participa de inúmeros processos ligados ao desenvolvimento do organismo, e em sua ausência, alterações drásticas ocorrem (BÖTTINGER *et al.*, 1997). Na ausência de receptor para TGF- β em células T, menor quantidade de células $CD103^+$ desenvolve-se e há um aumento na produção de INF- γ (REYNOLDS e MAIZELS, 2012). Animais com dieta deficiente em vitamina A apresentaram células dendríticas positivas para langerina em linfonodo mesentérico, sugerindo que RA promove o microambiente único do linfonodo mesentérico, diferente ao encontrado em linfonodos cutâneos (CHANG *et al.*, 2010).

3.7 CONCLUSÃO

Em conclusão, demonstrou-se que o modelo baseado em rede é competente em descrever as dinâmicas do sistema imune na tolerância oral. O nosso modelo aborda tanto as relações topológicas qualitativas assim como a cinética sobre o tempo, na caminhada aleatória. No entanto, a maior limitação do modelo é sem dúvida a falta de dados totalmente quantitativos para os componentes. Contudo, a construção do modelo qualitativo dinâmico pôde corresponder a padrões

encontrados na tolerância oral, através dos resultados de fluxo padrão e erro relativo médio dos KO. Esse estudo, juntamente com outros realizados na área (THAKAR *et al.*, 2007; THAKAR *et al.*, 2012), apresentam-se como pontos de partida para futura construção de modelos de redes quantitativos, que descrevam as cinéticas e a intensidade das relações casuais entre os componentes do sistema imune.

4. REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, B.S., RANEROS A.B., ORTEGA F., LARREA C.L. Epigenetic modulation of the immune function: A potential target for tolerance. **Epigenetics** 8(7): 694-702, 2013
- ANDOLFI, G., FOUSTERI, G., ROSSETI, M., MAGNANI, C.F., JOFRA, T., LOCAFARO, G., BONDANZA, A., GREGORI, S., RONCAROL, M.G. Enforced IL-10 expression confers type 1 regulatory T cell (Tr1) phenotype and function to human CD4⁺ T cells. **Mol. Ther.** 20(9):1778-90, 2012
- ARAUJO, S.C., CASTANHEIRA, P., ALVARENGA, L.M., MANGILI, O.C., KALAPOTHAKIS, E., OLÓRTEGUI, C.C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon** 41: 261-267, 2003
- AWASTHI, A., CARRIER, Y., PERON, J.P.S., BETTELLI, E., KAMANAKA, M., FLAVELL, R.A., KUCHROO, V.K., OUKKA, M., WEINER, H.L. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10–producing anti-inflammatory T cells. **Nat Immunol.** 8(12): 1380-1389, 2007
- BARABÁSI, A.L., OLTVAI, Z.N. Network Biology: Understanding the Cell's Functional Organization. **Nat Review Genetics.** 5: 101-113, 2004
- BARBARO, K.C., LIRA, M.S, ARAUJO, C.A., PAREJA-SANTOS, A., TÁVORA B.C.L.F., PREZOTTO-NETO, J.P., KIMURA, L.F., LOPES-FERREIRA, C.L.M., SANTORO, M.L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon.** 56: 972-979, 2010.
- BERNARDES, A.T., SANTOS, R.M.Z. Immune network at the edge of chaos. **J Theor Biol.** 186: 173-187, 1997.
- BERTHELOT, J.M., JAMIN, C., AMROUCHE, K., LE GOFF, B., MAUGARS, Y., YOUINOU, P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. **Joint B Spine.** 1-5. DOI:10.1016/j.jbspin.2012.04.010, 2012.
- BILATE, A.M., LAFAILLE, J.J. Induced CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cell in Immune Tolerance. **Annual Rev Immunol.** 30:733-58, 2012.
- BOPP, T., BECKER, C., KLEIN, M., KLEIN, H.S., PALMETSHOFER, A., SERFLING, E., HEIB, V., BECKER, M., KUBACH, J., SCHMITT, S., STOLL, S., SCHILD, H., STAEGE, M.S., STASSEN, M., JONULEIT, H., SCHMITT, E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. **J. Exp. Med.** 204: 1303–1310, 2007
- BÖTTINGER, E.P., LETTERIO, J.J., ROBERTS, A.B. Biology of TGF- β in knockout and transgenic mouse models. **Kidney international** 51: 1355-1360, 1997.
- BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. **Nutr Rev** 56: 5–18, 1997.

BRIGATTE, P., HOFFMANN, F.A., BERNARDI, M.M., GIORGI, R., FERNANDES, I., TAKEHARA, H.A., BARROS, S.B.M., ALMEIDA, M.G., CURY, Y. Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamics mechanisms. **Toxicon** 39: 1399-1410, 2001.

BUETNNER, M., PABST, R., BODE, U. Lymph node stromal cells strongly influence immune response suppression. **Eur J Immunol.** 41: 624-633. DOI 10.1002/eji.201040681, 2011.

BURT, T.D. Fetal Regulatory T cells and Peripheral Immune Tolerance *In Utero*: Implications for Development and Disease. **Am J Repro Immunol.** 69: 346-358, 2013.

CASTRO-SÁNCHEZ, P., MARTÍN-VILLA, J.M. Gut immune system and oral tolerance. **British J Nutr.** 109: S3-S11, 2013.

CEBULA, A., SEWERYN, M., REMPALA, G.A., PABLA, S.S., MCINDOE, R.A., DENNING, T.L., BRY, L., KRAJ, P., KISIELOW, P., IGNATOWISZ, L. Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. **Nature** 497: 258-262. DOI:10.1038/nature12079, 2013.

CELADA, F., SEIDEN, P.E. A computer model of cellular interaction in the immune system. **Immunology today** 13(2): 56-62, 1992.

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.** 1811: 84-96, 2011.

CHANG, S.Y., CHA, H.R., CHANG, J.H., KO, H.J., YANG, H., MALISSEN, B., IWATA, M., KWEON, M.N. Lack of retinoic acid leads to increased langerin-expressing dendritic cells in gut-associated lymphoid tissues. **Gastroenterology**; 138: 1468-1478, 2010.

CHATZAKI, M., HORTA, C.C., ALMEIDA, M.O., PEREIRA, N.B., MENDES, T.M., DIAS-LOPES, C., GUIMARÃES, G., MORO, L., OLÓRTEGUI, C.C. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon** 60: 21-30, 2012.

CHIRDO, F.G., MILLINGTON, O.R., BEACOCK-SHARP, H., MOWAT, A.M. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. **Eur. J. Immunol**; 35: 1831 – 1840, 2005.

DE BOER, R.J., PERELSON, A.S. Size and connectivity as emergent proprieties of a developing immune network. **J Theor. Biol.** 149: 381-424, 1991

ESCH, B.C.A.M., SCHOUTEN, B., KIVIT, S., HOFMAN, G., KNIPPELS, L.M.J., WILLEMSSEN, L.E.M., GARSSSEN, J. Oral tolerance induction by partially hydrolyzed whey protein in mice is associated with enhanced numbers of Foxp3+ regulatory T-cells in the mesenteric lymph nodes. **Pedia Alle Immunol.** 22: 820-826. DOI:10.1111/j.1399-3038.2011.01205.x., 2012.

FARIA, A.M., WEINER, H.L. Oral tolerance. **Immunol. Rev.** 206: 232-59, 2005.

FARIA, A.M.C., GOMES-SANTOS, A.C., GONÇALVES, J.L., MOREIRA, T.G., MEDEIROS, S.R., DOURADO, L.P.A., CARA, D.C. Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. **Frontiers in Immunol.** DOI: 10.3389/fimmu.2013.00102, 2013.

FELICORI, L., FERNANDES, P.B., GIUSTA, M.S., DUARTE, C.G., KALAPOTHAKIS, E., NGUYEN, C., MOLINA, F., GRANIER, C., OLÓRTEGUI, C.C. An *in vivo* protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine** 27: 4201-4208, 2009

FELLRATH, J.M., KETTNER, A., DUFOUR, N., FRIGERIO, C., SCHNEEBERGER, D., LEIMGRUBER, A., CORRADIN, G., SPERTINI, F. Allergen-specific T-cell tolerance induction with allergen-derived long synthetic peptides: Results of a phase I trial. **J allergy Clin Immunol.** 111(4): 854 - 861, 2002.

FUENTES-APARICIO, V., ALVAREZ-PEREA, A., INFANTE, S., ZAPATERO, L., D'OLEO, A., ALONSO-LEBRERO, E. Specific oral tolerance induction in paediatric patients with persistent egg allergy. **Allergol et Immunopatho.**;390: 1-8 , 2012.

GAGLIANI, N., MAGNANI, C.F., HUBER, S., GIANOLINI, M.E., PALA, M., LICONA-LIMON, P., GUO, B., HERBERT, D.R., BULFONE, A., TRENTINI, F., SERIO, C., BACCHETTA, R., ANDREANI, M., BROCKMANN, L., GREGORI, S., FLAVELL, R.A., RONCAROLO, M.G. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. **Nat Med.** 739-46. DOI: 10.1038/nm.3179, 2013

GILBERT, R.S., KOBAYASHI, R., SEKINE, S., FUJIHASHI, K. Functional Transforming Growth Factor- β Receptor Type II Expression by CD4+ T Cells in Peyer's Patches Is Essential for Oral Tolerance Induction. **Plos One.** 6(11): 1-10. DOI:10.1371/journal.pone.0027501, 2011.

GÓMEZ-MUNHOZ, A., GANGOITI, P., GRANADO, M. H., ARANA, L., OURO, A. Ceramide 1-Phosphate in Cell Survival and Inflammatory Signaling. **Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules.** Landes Bioscience, 2010.

GONNELLA, P.A., WALDNER, H.P., KODALI, D., WEINER, H.L. Induction of low dose oral tolerance in IL-10 deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **J of Autoimmunity** 23: 193-200, 2004.

GORDON J., MANLEY, N.R. Mechanism of Thymus organogenesis and morphogenesis. **Development.** 138: 3865-3878, 2011.

GOUBIER, A., DUBOIS, B., GHEIT, H., JOUBERT, G., VILLARD-TRUC, F., ASSELIN-PATUREL, C., TRINCHIERI, G., KAISERLIAN, D. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. **Immunity** 29: 464-475. DOI 10.1016/j.immuni.2008.06.017, 2008

GREMSKI, L.H., DA SILVEIRA, R.B., CHAIM, O.M., PROBST, C.M., FERRER, V.P., NOWATZKI, J., WEINSCHUTZ, H.C., MADEIRA, H.M., 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. **Mol Biosyst.** 6: 2403-2416, 2010.

GROUX, H., FOURNIER, N., COTTREZ, F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. **Seminars in Immunol** 16: 99-106. DOI:10.1016/j.smim.2003.12.004, 2004.

HALL, J.A., GRAINGER, J.R., SPENCER, S.P., BELKAIDE, Y. The Role of Retinoic Acid in Tolerance and Immunity. **Immunity** 35: 13-22. DOI 10.1016/j.immuni.2011.07.002, 2011.

HIROTA, K., TURNER, J.E., VILLA, M., DUARTE, J.H., DEMENGOT, J., STEINMETZ, O.M., STOCKINGER, B. Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. **Nat Immunol** 14(4): 372-380, 2013.

ISBISTER, G.K., Fan, H.K. Spider bite. **Lancet**; 378: 2039-2047, 2011.

JAENSSON, E., URONEN-HANSON, H., PABST, O., EKSTEEN, B., TIAN, J., COOMBES, J.L., BERG, P.L., DAVIDSSON, T., POWRIE, F., JOHANSSON-LINDBOM, B., AGACE, W.W. Small intestinal CD103 + dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. **The J Exp Med.** 205(9): 2139-2149, 2008.

JUTEL, M., AKDIS, M., BLASER, K., AKDIS, C.A. Mechanism of allergen-specific immunotherapy – T-cell tolerance and more. **Allergy** 61: 796-807, 2006.

KAYAMA, H., TAKEDA, K. Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. **Inter Immunol.** 1-8, 2012.

KOOP, K.A., MILLER, M.J., NEWBERRY, R.D. Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes. **Curr Opin Gastroenterol** 29: 112-118, 2013.

KOSMRLJ, A., CHAKRABORTY, A.K., KARDAR, M., SHAKNOVICH, E.I. Thymic Selection of T cell Receptors as an Extreme Value Problem. **Physical Review Letters.** 103, 068103, 2009.

KUSMA, J., CHAIM, O.M., WILLE, A.C.M., FERRER, V.P., 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** 90: 1722-1736, 2008.

KWON, K.C., VERMA, D., SINGH, N.D., HERZOG, R., DANIELI, H. Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. **Adv Drug Deliv Rev** 65: 782-799, 2013.

LAHL, K., LODDENKEMPER, C., DROUIN, C., FREYER, J., ARNASON, J., EBERT, G., HAMANN, A., WAGNER, H., HUEHN, J., SPARWASSER, T. Selective depletion of FoxP3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. **J Exp Med**. 204(1): 57-63, 2007

LI, M., LIN, J., WANG, Z., HE, S., MA, X., LI, D. Oxidized low-density lipoprotein-induced pro-inflammatory cytokine response in macrophages are suppressed by CD4CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells through down regulating toll-like receptor 2-mediated activation of NF-kappa B. **Cell.Physiol. Biochem**. 25: 649–656, 2010.

LI, M.O., SANJABI, S., FLAVELL, R.A. Transforming growth factor- β controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and independent mechanisms. **Immunity** 25: 455-471, 2006.

MASCARELL, L., ZIMMER, A., VAN OVERTVELT, L., TOUDORT, S., MOINGEON, P. Induction of allergic specific tolerance via mucosal routes. **Curr Top Microbiol. Immunol**. 352: 85-105. DOI: 10.1007/82_2011_132, 2011.

MIRON, N., CRISTEA, V. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. **Clin Exp Immunol**. 167: 405-412. DOI:10.1111/j.1365-2249.2011.04523.x., 2011.

MOLEENAR, R., GREUTER, M., VAN DER MAREL, A.P.J., ROOZENDAAL, R., MARTIN, S.F., EDELE, F., HUEHN, J., FÖRSTER, R., O'TOOLE, T., JANSEN, W., EESTERMANS, I.L., KRAAL, G., MEBIUS, R.E. Lymph Node Stromal Cells Support Dendritic Cell-Induced Gut-Homing on T cells. **J Immunol**. 183:6395-6402. DOI: 10.4049/jimmunol.0900311, 2009.

MOOG, F. The lining of the small intestine. **Sci Am**.245:154–158; 160, 162 et passim, 1981.

MOWAT, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat Rev Immunol**. 3: 331-341, 2003.

MUCIDA, D., KUTCHUKHIDZE, N., ERAZO, A., RUSSO, M., LAFAILLE, J.J., DE LAFAILLE, M.A.C. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **J Clin Invest**. 115(7): 1923-33. DOI:10.1172/JCI24487, 2005.

MUPHY, K.M., TRAVERS, P., WALPORT, M. Janeway's Immunobiology. (New York: Taylor & Francis, Inc., 2012), 8th ed.

NAGATANI, K., KOMAGATA, Y., ASAKO, K., TAKAYAMA, M., YAMAMOTO, K. Antigen-specific regulatory T cells are detected in Peyer's patches after the interaction between T cells and dendritic cells loaded with orally administered antigen. **Immunobiol**. 216: 416-422, 2011.

NEWMAN, M.E.J. A measure of betweenness centrality based on random walks. **Social Networks**. 27: 39-54, 2005.

NUTSCH, K., HSIEH, C.S. T cell tolerance and immunity to commensal bacteria. **Curr Op Immunol** 24: 385-39, 2012.

OHKURA, N., KITAGAWA, Y., SAKAGUSHI, S. Development and maintenance of Regulatory T cells. **Immunity**. 38: 414-423, 2013.

PACHOLCZYK, R., KERN, J., SINGH, N., IWASHIM, M., KRAJ, P., IGNATOWICZ, L. Nonself-antigens are the cognate specificities of FoxP3⁺ regulatory T cells. **Immunity**. 27: 493-504, 2007.

PALUDO, K.S., BISCAIA, S.M.P., CHAIM, O.M., OTUKI, M.F., NALIWAICO, K., DOMBROWSKI, P.A., FRANCO, C.R.C., VEIGA, S.S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: A pharmacological investigation. **Compar Bioche and Physiol, Part C** 323-333, 2009.

PARK, M.J., PARK, K.S., PARK, H.S., CHO, M., HWANG, S., MIN, S., PARK, M., PARK, S., KIM, H. A distinct tolerogenic subset of splenic IDO+CD11b⁺ dendritic cells from orally tolerized mice is responsible for induction of systemic immune tolerance and suppression of collagen-induced arthritis. **Cell Immunol**. 278: 45-54, 2012.

PEARSON, C., UHLIG, H.H., POWRIE, F. Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. **Trends in Immunol**. 33(6): 289-296, 2012.

PEREIRA, N.B., CAMPOS, P.P., SOCARRÁS, T.J.O., PIMENTA, T.S., PARREIRAS, P.M., SILVA, S.S., KALAPOTHAKIS, E., ANDRADE, S.P., MORO, L. Sponge implant in Swiss mice as a model for studying loxoscelism. **Toxicon**. 59: 672-679, 2012.

RAMOS, G.C., DALBÓ, S., LEITE, D.P., GOLDFEDER, E., CARVALHO, C.R., VAZ, N.M., ASSREUY, J. The autoimmune nature of post-infarct myocardial healing: oral tolerance to cardiac antigens as a novel strategy to improve cardiac healing. **Autoimmunity** 1-12. DOI: 10.3109/08916934.2011.647134, 2012.

REYNOLDS, L.A., MAIZELS, R.M. In the absence of TGF- β signaling in T cells, fewer CD103⁺ regulatory T cells develop, but exuberant INF- γ production renders mice more susceptible to helminth infection. **J Immunol** 189(1): 1113-1117, 2012.

Ribeiro LC, Dickman R, Bernardes AT, Vaz NM. Dynamic stability in random and scale-free B lymphocyte networks. *Phy Rev E*. 2007; 75: 1-26

RIBEIRO, R.O.S., CHAIM, O.M., SILVEIRA, R.B., GREMSKI, L.H., SADE, Y.B., PALUDO, K.S., SENFF-RIBEIRO, A., MOURA, J., CÁVEZ-OLÓRTEGUI, C., GREMSKI, W., NADER, H.B., VEIGA, S.S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon** 50: 1162-1174, 2007.

SCHIMIDT, A., OBERLE, N., KRAMMER, P.H. Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. **Front in Immunol** 3(51): 1-20. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00051, 2012.

SEMMRICH, M., PLANTINGA, M., SVENSSON-FREJ, M., URONEN-HANSSON, H., GUSTAFSSON, T., MOWAT, A.M., YRLID, U., LAMBRECHT, B.N., AGACE, W.W. Directed antigen targeting *in vivo* identifies a role for CD103⁺ dendritic cells in both tolerogenic and immunogenic T-cell responses. **Mucosal Immunology**. 5: 150-160, 2012.

SENFF-RIBEIRO, A., DA SILVA, P.H., CHAIM, O.M., GREMSKI, L.H., PALUDO, K.S., DA SILVEIRA, R.B., GREMSKI, W., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotech. Advan.** 26: 210-218, 2008.

SHEVACH, E.M., DAVIDSON, T.S., HUTER, E.N., DIPAOLO, R.A., ANDERSSON, J. Role of TGF- β in the induction of FoxP3 expression and T regulatory Cell function. **J Clin Immunol** 28:640-646, 2008.

SÖDERQVIST, T. The troubled life of Niels Jerne. Yale University Press, 2003.

SOMMER, F., BÄCKHED, F. The gut microbiota – masters of host development and physiology. **Nat Rev Microbio**. 1-12. DOI:10.1038/nrmicro2974, 2013.

STOCK, R.P., BREWER, J., WAGNER, K., RAMOS-CERRILLO, B., DUELUND, L., JERNSHOT, D., OLSEN, L.F., BAGATOLLI, L.A. Sphingomyelinase D Activity in Model Membranes: Structural Effects of *in situ* Generation of Ceramide-1-Phosphate. **Plos one**. 7(4): 1-15, 2012.

THAKAR, J., PILIONE, M., KIRIMANJESWARA, G., HARVILL, E.T., ALBERT, R. Modeling systems-level regulation of host immune responses. **Plos Comput Biol**. 3(6): 1022-1039. 2007.

THAKAR, J., PATHAK, A.K., MURPHY, L., ALBERT, R., CATTADORI, I.M. Network model of immune responses reveals key effectors to single and co-infection dynamics by a respiratory bacterium and a gastrointestinal helminth. **Plos Computational biology**. 8:1-19, 2012.

ULLAH, A., GIUSEPPE, P.O., MURAKAMI, M.T., SILVA, D.T., WILLE, A.C.M., MOREIRA, D.C., et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. **Acta Crystallographica Section F**. 67: 234-236, 2011.

VAN DER HOFSTAD, R. Random Graphs and Complex Network. Eindhoven University of Technology, 2013.

VUITIKA, L., GREMSKI, L.H., BELISÁRIO-FERRARI, M.R., CHAVES-MOREIRA, D., FERRER, V.P., SENFF-RIBEIRO, A., CHAIM, O.M., VEIGA, S.S. Brown Spider Phospholipase-D Containing a Conservative Mutation (D223E) in the Catalytic Site:

Identification and Functional Characterization. **J of Cell Biochem** 114: 2479-2492, 2013.

WEINER, H.L., DA CUNHA, A.P., QUINTANA, F., WU, H. Oral Tolerance. **Immunol. Rev.** 241: 241-259, 2011.

WELLS, H.G. Studies on the chemistry of anaphylaxis III. Experiments with isolated proteins, especially those of the hen's egg. **J. Infect. Dis.** 9: 147–171, 1911.

WELTY, N.E., STALEY, C., GHILARDI, N., SADOWSKY, M.J., IGYÁRTÓ, B.Z., KAPLAN, D.H. Intestinal lamina propria dendritic cells maintain T cell homeostasis but do not affect commensalism. **J exp Med.** 2011-2024, 2013.

WEST, D.B. Introduction to Graph Theory. Prentice-Hall, 1996.

WINKLER, B., BOLWIG, C., SEPPÄÄLÄ, 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.** 110: 376-385, 2003.

WOO, S.R., TURNIS, M.E., GOLDBERG, M.V., BANKOTI, J., SELBY, M., NIRSCHL, C.J., BETTINI, M.L., GRAVANO, D., VOGEL, P., LIU, C.L., TANGSOMBATVISIT, S., GROSSO, J.F., NETTO, G., SMELTZER, M.P., CHAUX, A., UTZ, P.J., WORKMAN, C.J., PARDOLL, D.M., KORMAN, A.J., DRAKE, C.G., VIGNALI, A.A. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T cell function to promote tumoral immune escape. **Cancer Res.** 72(4): 917-927, 2012.

YAMAZAKI, S., MARUYAMA, A., OKADA, K., MATSUMOTO, M., MORITA, A., SEYA, T. Dendritic Cells from Oral Cavity Induce Foxp3⁺ Regulatory T Cells upon Antigen Stimulation. **Plos One.** 7(12): 1-10. DOI:10.1371/journal.pone.0051665, 2012.

ZHANG, L., BERTUCCI, A.M., RAMSEY-GOLDMAN, R. Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF-beta-producing CD8⁺ Treg cells are associated with immunological remission of lupus. **J Immunol.** 183: 6346–6358, 2009.

ZHANG, B., SUN, C., QU, Y., ZHANG, A., LIU, J., ZHANG, L., NIU, Z., ZHAO, Y. Deficiency of mouse CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in xenogenic pig thymus-grafted nude mice suffering from autoimmune diseases. **Cell & Molec Immunol.** 5: 325-332, 2008.

ANEXO 1. Carta de aprovação do comitê de ética para experimentação animal.**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 Vicari
Membro Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG