

**LIDIANE ZITO GRUND**

**PAPEL DAS CITOCINAS IL-5 E IL-17A NA DIFERENCIAÇÃO DE  
CÉLULAS PRODUTORAS DE ANTICORPOS DE VIDA LONGA (ASC)  
INDUZIDA PELO VENENO DO PEIXE *Thalassophryne nattereri***

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

São Paulo

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**LIDIANE ZITO GRUND**

**PAPEL DAS CITOCINAS IL-5 E IL-17A NA DIFERENCIAÇÃO DE  
CÉLULAS PRODUTORAS DE ANTICORPOS DE VIDA LONGA (ASC)  
INDUZIDA PELO VENENO DO PEIXE *Thalassophryne nattereri***

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Dra. Mônica Lopes Ferreira

São Paulo

2009

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

reprodução não autorizada pelo autor

Grund, Lidiane Zito.

Papel das citocinas IL-5 e IL-17A na diferenciação de células produtoras de anticorpos de vida longa (ASC) induzida pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* / Lidiane Zito Grund. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Resposta imunológica induzida por venenos animais.

Versão do título para o inglês: The role of cytokines IL-5 and IL-17A in the differentiation of long-lived antibody-secreting cells (ASC) induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom.

Descritores: 1. Veneno de peixe 2. Plasmócito de vida longa (ASC) 3. Célula B1a 4. Memória imunológica 5. Anticorpos de alta afinidade 6. Citocinas IL-5 e IL-17A I. Ferreira, Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0139/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Lidiane Zito Grund.

Título da Dissertação: Papel das citocinas IL-5 e IL-17A na diferenciação de células produtoras de anticorpos de vida longa (ASC) induzida pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*.

Orientador(a): Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira.

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

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **046** nas fls. **56** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Mônica Lopes Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Avaliação do papel do veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* na diferenciação de linfócitos B**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Lidine Zito Grund e a pesquisadora Carla Lima** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **26.08.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 27 de agosto de 2008.

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

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



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

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

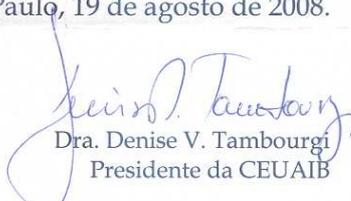
## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do papel do veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* na diferenciação de linfócitos B", protocolo nº 505/08, sob a responsabilidade de Mônica Lopes Ferreira e Lidiane Zito Grund, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/08/2008.

We certify that the research entitled "Evaluation of the role of *Thalassophryne nattereri* fish venom in B cell differentiation, protocol nº 505/08, under the responsibility of Mônica Lopes Ferreira and Lidiane Zito Grund, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 08/13/2008.

Vigência do Projeto: 08/2008 – 07/2010	Nº de animais/espécie 160 / camundongo – Balb/c
---	--

São Paulo, 19 de agosto de 2008.

  
Dra. Denise V. Tambourgi  
Presidente da CEUAIB

De acordo:

  
Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan

*Dedico este trabalho ao meu avô  
José Torres Zito (in memoriam)  
Uma pessoa inesquecível...  
Que me ensinou a acreditar no melhor das pessoas...  
Que sempre me apoiou com simplicidade e carinho...  
Que me conhecia tão bem e  
Que me fez tão feliz !*

*Saudades...*

## AGRADECIMENTOS

*... A Dr<sup>a</sup> Mônica Lopes Ferreira, pela imprescindível orientação, cumplicidade, por transmitir tanto fascínio e curiosidade pela Ciência e acima de tudo, por confiar no meu trabalho e acreditar no meu potencial. Tenho um grande respeito e admiração pela pessoa que você é. Tem sido um grande prazer trabalhar com você durante todos estes anos e poder compartilhar momentos alegres ou difíceis, sempre com carinho e grande espírito de equipe.*

*... A Dr<sup>a</sup> Carla Lima, minha co-orientadora, pelo apoio incondicional e atenção dedicada na execução deste trabalho e, sobretudo por ter sido a grande responsável pelo meu crescimento e amadurecimento profissional. Agradeço imensamente pela oportunidade de desenvolver este projeto ao seu lado, por tudo que aprendi e aprendo. Agradeço pela amizade que surgiu através das nossas afinidades e pela sua total confiança em mim. Dizem que o professor nunca morre porque vive eternamente nos olhos daqueles a quem ensinou....*

*... Aos meus pais tão queridos Carlos e Marta, pelo carinho e confiança. Vocês acreditaram em mim, me incentivaram, se preocuparam constantemente com o meu bem estar, estiveram do meu lado ao mínimo sinal de tristeza e me deram o prazer da companhia em todos os momentos de felicidade. Vocês estiveram e sempre estarão por trás de todas as minhas conquistas e não só me trouxeram a vida como fazem a alegria da minha vida. A vocês, meu porto seguro, não bastaria um muitíssimo obrigado!*

*... A minha irmã Ludimyla, que me mostrou que eu era capaz e iria superar todas as dificuldades e o cansaço. Obrigada por me deixar chorar e por me fazer rir tanto. Obrigada pelos ouvidos sempre disponíveis. Obrigada por me compreender sem me julgar. Obrigada pela companhia e alegre convivência. É muito bom ter você em minha vida. O destino nos tornou irmãs, mas foi o coração que nos transformou em grandes amigas.*

*...A minha avó Rosária, pelo apoio e compreensão. “Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”....serei eternamente responsável e cativada por você.*

*... A toda a minha família, em especial aos meus tios Francisco e Sueli Zito e ao meu primo Eriky pelo carinho, pelos momentos de alegria e descontração e pela nossa união nos momentos tristes. Momentos esses que nos aproximaram e fizeram crescer o sentimento de amor, respeito e confiança mútua. Meu coração reconhece em vocês o significado da palavra família !*

... A todos os amigos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan pela amizade e companheirismo em todos os momentos dessa caminhada em especial aos amigos da Imunofarmacologia (a eterna e querida SALA 1):

*Fernanda Bruni: uma amiga para sempre. Agradeço por todos momentos que passamos juntas, pela amizade, pela alegria, viagens, trabalhos e até stress compartilhados durante estes anos. Tudo o que esperei de uma amiga encontrei em você. Enquanto eu puder ouvir sua risada - aquela mesma- a mais escandalosa e gostosa eu vou ser feliz ...*

*Douglas Boletini: que responsabilidade falar de você. Você é um irmão. Se eu pudesse te daria a capacidade de ver como as pessoas o vêem porque assim você descobriria o quão especial você realmente é. Muito obrigada por tornar o meu dia-a-dia mais alegre, pelo apoio, pelos apelidos carinhosos, pelas broncas e por verdadeiramente torcer por mim...*

*Evilín Romegae: minha amiga e meu CD40L. Agradeço por fazer dos momentos mais difíceis os mais divertidos, pela disposição em discutir resultados, pela paciência, pela companhia no café e nos experimentos altas-horas, por ser tão cúmplice, tão sincera e tão divertida. Adoro muito você e admiro seu jeito "evilín offline" de ser...*

*Anderson Daniel: nunca imaginei ter um amigo tão "troll" e tão querido. Agradeço pelo apoio, por sempre me incentivar, por desejar o meu bem, por me salvar nos meus problemas diários com computador, por rir das minhas esquisitices, enfim, agradeço pela amizade e pela cumplicidade. Sempre estarei por perto, para o que precisar...*

*Kátia Conceição, por toda amizade e apoio. Obrigada pela torcida, pelas risadas, pela paciência com as perguntas mais básicas sobre bioquímica e por me mostrar o mundo da espectrometria de massas reforçando mais ainda meu gosto pela Imunologia. Torço muito por você!*

*Julio Stasi, um amigo querido que sempre esteve disposto a me ajudar. Obrigada por fazer a rotina do laboratório ficar muito mais divertida e cheia de histórias.*

*Fernanda Magalhães, que chegou ao laboratório no final do desenvolvimento deste projeto mas pra quem eu não hesito em pedir opiniões e sugestões profissionais e pessoais. Admiro muito a maneira como você vê a vida e estou aprendo muito com essa alegre convivência. Obrigada.*

*Aos alunos novos: Marcio, Edson e Adriana. Que vocês possam compartilhar comigo a mesma expectativa e fascínio pela pesquisa.*

... As amigas Patrícia Mello, Tânia Saraiva e Daniele Pavão, por toda amizade, dedicação, torcida e pelos momentos de descontração. Já dividimos tantas experiências, alegrias, problemas, assuntos importantes ou

*apenas corriqueiros. Quanto mais conheço vocês, mais feliz me sinto por preservar e cultivar essa amizade que existe há tantos anos.*

*...A Alessandra Pareja, uma amiga companheira que sempre torceu muito pela minha felicidade. Foi minha "amiga do dia" por muitos e muitos dias. Obrigada pela amizade, carinho e ajuda na realização dos experimentos. Há vezes em que não podemos agradecer no instante preciso, mas sempre poderemos retribuir em outro momento, em outro lugar... Te desejo muitas alegrias nesse novo momento da sua vida !*

*...As amigas Tatiane Canhamero, Mara Adriana Corrêa e Karina Scaramuzzi que compartilharam comigo os cursos e as expectativas do mundo da pós-graduação. Pessoas que quando deveriam ser simplesmente colegas, tiveram a cumplicidade de amigas. Sou muito feliz em saber que cultivamos essa amizade e que o tempo a amadureceu. Que Jesus et al continue sempre nos abanando!*

*...Ao Matheus Ferracini que primeiro foi apenas um colega de pós, depois nos tornamos vizinhos e hoje é um amigo muito querido. Obrigada pela companhia diária, pelas dicas profissionais, por fazer o segundo melhor pudim de leite, pela paciência, pela confiança, mas sobretudo pela oportunidade de te conhecer como pessoa. Dizem que as pessoas entram em nossas vidas por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem...eu concordo.*

*...A Juliane Bevilacqua, por verdadeiramente torcer e compartilhar comigo todas as alegrias e tristezas. Uma amizade assim é rara. Obrigada por percorrermos juntas diferentes caminhos. Nós não precisamos tanto da ajuda dos nossos amigos como precisamos da certeza da sua ajuda, quando necessário. Sejam sempre as melhores amigas...*

*... A todos os amigos do Departamento de Imunologia do ICB-USP.*

*... Aos doutores componentes da banca de Qualificação, Mrythes Toledo de Barros, Maria Notomi Sato e Maria Regina D'Império Lima, pela leitura do exemplar da qualificação e valiosas sugestões.*

*... Aos animais de laboratório, a quem o destino deu o poder e a grandeza de servir para o bem da humanidade. Sem eles não haveria este trabalho...*

*...A FAPESP, pelo apoio científico e financeiro.*

*... A todos que fizeram parte da realização deste trabalho direta ou indiretamente e que dividiram comigo a ansiedade de cumprir mais esta etapa... Muito obrigada!*

*“As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.  
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que  
aparecem em seus caminhos.  
A felicidade aparece para aqueles que se machucam.  
Para aqueles que choram.  
Para aqueles que buscam.  
E para aqueles que reconhecem a importância das  
pessoas que passam por nossas vidas”  
(Clarisse Lispector)*

## RESUMO

GRUND, L. Z. PAPEL DAS CITOCINAS IL-5 E IL-17A NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE ANTICORPOS DE VIDA LONGA (ASC) INDUZIDA PELO VENENO DO PEIXE *Thalassophryne nattereri*. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Recentemente demonstramos que o veneno do peixe *T. nattereri* é capaz de induzir uma resposta imune de memória com alta produção de IL-5, altos níveis de anticorpos IgG antígeno-específicos por até seis meses após imunização e ainda a diferenciação de células B220<sup>neg</sup>, indicativo de células produtoras de anticorpos de vida longa (*antibody-secreting cells* – ASC). Desta forma, nos propusemos a avaliar o efeito *in vivo* do veneno na indução da diferenciação de células B1a e ASC em diferentes compartimentos (peritônio, baço e medula óssea), os fatores envolvidos na manutenção da resposta de memória e o papel das citocinas IL-5 e IL-17A na diferenciação e manutenção das ASC. BALB/c foram imunizados intraperitonealmente nos dias 0 e 14 com o veneno e foram sangrados e mortos nos dias 21, 28, 48, 74 e 120 para obtenção do plasma, do lavado da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral. Os níveis plasmáticos de anticorpos e das citocinas no sobrenadante das células foram determinados por ELISA e os subtipos de células B avaliados por citometria de fluxo. Os resultados mostram que o veneno promoveu esplenomegalia acompanhada de intensa proliferação celular e formação de centros germinativos por até 120 dias após a imunização e induziu alta e constante produção de anticorpos específicos IgG1, IgG2a e IgE. Além disso, observamos a expansão de células B1a no peritônio e no baço dos animais imunizados, bem como a diferenciação de 5 populações de ASC CD138<sup>pos</sup> que variaram quando a expressão das moléculas B220 e CD43 (B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup>, B220<sup>low</sup> CD43<sup>low</sup>, B220<sup>neg</sup> CD43<sup>low</sup>, B220<sup>low</sup> CD43<sup>high</sup>, and B220<sup>neg</sup> CD43<sup>high</sup>). A produção de citocinas e

quimiocinas inflamatórias (KC, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) bem como a alta e constante produção de IL-5 e IL-17A pelas células dos três compartimentos, além da retenção do veneno pelas células dendríticas foliculares do baço parecem fornecer os estímulos necessários para formação e manutenção das ASC induzidas pelo veneno. Finalmente avaliamos o papel destas citocinas na resposta de memória formada para o veneno, tratamos os animais com anticorpos anti-IL-5 e anti-IL-17A, antes da imunização e da dose reforço. A ausência de ambas as citocinas no momento da estimulação antigênica induziu uma diminuição no número total de esplenócitos, mas não conseguiu reverter a esplenomegalia nem a formação de centros germinativos induzidas pelo veneno. No entanto, a regulação na expressão da molécula B220 pelas citocinas se mostrou evidente, uma vez que a população de ASC B220<sup>neg</sup> formada a partir da imunização com veneno desapareceu completamente após o tratamento. Nossos dados sugerem um papel importante para IL-5 e IL-17A na geração e sobrevivência de ASC B220<sup>neg</sup> e na proliferação de células B1a no baço, contribuindo para a manutenção da resposta de memória protetora de longa duração. Apoio: FAPESP.

**Palavras-chave:** *Thalassophryne nattereri*; células produtoras de anticorpos de vida longa (ASC); células B1a; memória imunológica; anticorpos de alta afinidade; citocinas inflamatórias; IL-5; IL-17A.

## ABSTRACT

GRUND, L. Z. THE ROLE OF IL-5 AND IL-17A IN THE DIFFERENTIATION OF LONG-LIVED ANTIBODY SECRETING CELLS (ASC) INDUCED BY *Thalassophryne nattereri* FISH VENOM. 2009. 115 f. Master thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

We demonstrated recently that *T. nattereri* fish venom is able to induce a memory immune response with a production of high levels of IL-5 and venom-specific IgG for six months after immunization and the differentiation of B cells B220<sup>neg</sup>, an indicative of long-lived antibody-secreting cells - ASC. Thus we proposed here to assess the *in vivo* effect of the venom on memory response analyzing the B1a cells and ASC differentiating in different compartments (peritoneum, spleen and bone marrow). The factors involved in the maintenance of memory response and the role of cytokine IL-5 and IL-17A in the differentiation and maintenance of ASC were also evaluated. Balb/c mice immunized twice (days 0 and 14) with 10 µg of venom adsorbed in alum were bled and killed at days 21, 28, 48, 74 and 120 to detection of antibodies by Elisa and PCA and of B cell subtypes by flow cytometry. The results showed that venom promoted splenomegaly accompanied by intense cell proliferation and germinal centers formation for 120 days after immunization and induced high and persistent production of venom-specific IgG1, IgG2a and IgE. Furthermore, we observed an expansion of B1a cells in the peritoneum cavity and spleen. Based on the expression of CD43 and B220 in CD138<sup>pos</sup> ASC, we reveal five subtypes of memory B cells (B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup>, B220<sup>low</sup> CD43<sup>low</sup>, B220<sup>neg</sup> CD43<sup>low</sup>, B220<sup>low</sup> CD43<sup>high</sup>, and B220<sup>neg</sup> CD43<sup>high</sup>) in all compartments. The production of inflammatory cytokines and chemokines (KC, TNF-α, IL-1β, IL-6), the secretion of high levels of IL-5 and IL-17A by cells of the all compartments, as well as the large amounts of venom retained in the surface of follicular dendritic cells

(FDCs) in spleen seem to provide a special microenvironment to maintenance of ASC. Finally, to address the role of cytokines IL-5 and IL-17A in persistent memory response induced by *T. nattereri* venom, we treated mice with anti-IL-5 and anti-IL-17A before the immunization and rechallenge. The treatment with both neutralizing antibodies was not able to reverse the splenomegaly and germinal centers formation induced by venom, but regulation of B220 expression on ASC was evident: both antibodies reduced the number of ASC B220<sup>neg</sup> induced by venom. Our data suggest an important role for IL-5 and IL-17A on the development and maintenance of B220<sup>neg</sup> ASC and B1a population, contributing to maintenance of long-term protective immunity by the venom. Support: FAPESP.

**Keywords:** *Thalassophryne nattereri*; long-lived antibody secreting cells (ASC); B1a cells, immunological memory, high-affinity antibodies, inflammatory cytokines, IL-5, IL-17A.

## LISTA DE ABREVIATURA

<b>ADCI</b>	Inibição celular dependente de anticorpo
<b>APRIL</b>	Ligante indutor de proliferação
<b>ASC</b>	Plasmócitos, do inglês <i>Antibody secreting cells</i>
<b>BAFF</b>	Fator ativador de célula B
<b>Bcl</b>	Proteínas intra-citoplasmáticas que inibem apoptose
<b>BCR</b>	Receptor de linfócito B
<b>BLIMP-1</b>	do inglês, <i>B lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CD</b>	Grupos de diferenciação, do inglês <i>Cluster of differentiation</i>
<b>CD11b</b>	Molécula de superfície expressa em macrófagos e alguns subtipos de células B
<b>CD11c</b>	Molécula de superfície expressa em células dendríticas
<b>CD138</b>	ou sindecan 1 é um proteoglicano de heparan-sulfato transmembranar que regula atividade de adesão, migração e fator de crescimento
<b>CD16/CD32</b>	Receptor tipo II e III para porção Fc da imunoglobulina IgG
<b>CD18</b>	Integrina $\beta 2$
<b>CD19</b>	Proteína expressa em células B e co-receptora junto com CD21 e CD81
<b>CD20</b>	Proteína não glicosilada expressa na superfície de células B em todos estágios de desenvolvimento exceto no início e final da diferenciação - nas células pró-B e plasmócitos.
<b>CD25</b>	Proteína transmembrânica tipo I que corresponde à cadeia $\alpha$ do receptor de IL-2
<b>CD27</b>	Proteína de superfície membro da família de receptores TNF que regula ativação das células B e a síntese de imunoglobulinas
<b>CD38</b>	Glicoproteína de ativação celular envolvida em processos de adesão celular, transdução de sinal e regulação intracelular de $Ca^{2+}$
<b>CD4</b>	Glicoproteína de superfície expressa na superfície de células T auxiliares e T reguladoras que funciona como co-receptor durante a ativação TCR
<b>CD40</b>	Proteína co-estimulatória requerida para ativação e apresentação de antígenos
<b>CD43</b>	Sialoglicoproteína de superfície envolvida principalmente nos processos de aderência celular
<b>CD44</b>	Glicoproteína de superfície celular envolvida nas interações célula-célula, adesão e migração celular, ativação de linfócitos T e recirculação.

<b>CD45R/B220</b>	Isoforma CD45R nas células B que modula a transdução de sinal via BCR
<b>CD5</b>	Proteína de superfície presente em um subtipo de células B não convencional chamadas de B1a mas também em células T.
<b>CD62L</b>	L-selectina envolvida na adesão de leucócitos
<b>CD86 ou B7.2</b>	Molécula de superfície co-estimulatória
<b>CD9</b>	Glicoproteína de superfície celular envolvida na adesão intercelular e remodelamento do citoesqueleto
<b>CDR</b>	Região determinante de complementaridade
<b>Células B1</b>	Subtipo de linfócito B não convencional
<b>Células B2</b>	Subtipo de linfócito B convencional
<b>CFA</b>	Adjuvante completo de Freud
<b>c-Myc</b>	Proteína anti-apoptótica
<b>CXCL12</b>	Quimiocina também conhecida como SDF-1
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático, do inglês, <i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
<b>FACS</b>	Ensaio de citometria de fluxo, do inglês <i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
<b>FcεRII (CD23)</b>	Receptor de baixa afinidade para IgE
<b>FDCs</b>	Células dendríticas foliculares
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>Foxp3</b>	Fator de transcrição da família "forhead", do inglês <i>Forhead Box p3</i>
<b>FSC</b>	Parâmetro de tamanho, do inglês <i>Forward scatter</i>
<b>GL113</b>	IgG de rato anti βgalactosidase de <i>Escherichia coli</i>
<b>Gr-1</b>	Marcador de superfície celular Ly6G/Ly6C
<b>HE</b>	Coloração hematoxilina/eosina
<b>HRP</b>	Peroxidase, do inglês <i>Horse radish peroxidase</i>
<b>ICF</b>	Adjuvante incompleto de Freud
<b>IFN-γ</b>	Interferon-gama
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>i.p</b>	Intraperitonal
<b>IL-5R</b>	Receptor para interleucina 5
<b>Irf4</b>	Gene envolvido na diferenciação de plasmócitos, do inglês <i>Interferon regulatory factor 4</i>
<b>KC</b>	Quimiocina murina homóloga a IL-8 humana recrutadora de neutrófilo
<b>Mac1</b>	Complexo CD11b/CD18
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática para monócitos
<b>MHCII</b>	Molécula de histocompatibilidade II

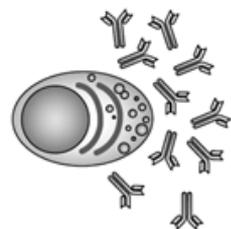
<b>MSP2</b>	Proteína 2 de superfície do merozoito de <i>Plasmodium falciparum</i>
<b>MyD88</b>	do inglês, <i>Myeloid differentiation factor 88</i>
<b>NKT</b>	linfócitos T “natural killer”
<b>OPD</b>	o-Fenilenodiamina
<b>PAX5</b>	do inglês, <i>Paired box gene 5</i>
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>PCA</b>	Anafilaxia cutânea passiva
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PE-Cy5</b>	Ficoeritrina Cy5
<b>QS21</b>	Saponina natural isolada a partir da <i>Quillaja saponaria Molina</i> usada como adjuvante
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	do inglês, <i>Orphan nuclear receptor gama T</i>
<b>RPMI</b>	Meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SDF-1</b>	Quimiocina do inglês, <i>Stromal cell-derived factor-1</i>
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SSC</b>	Parâmetro de granulocidade, do inglês <i>Side scatter</i>
<b>STAT-3</b>	Sinal transdutor e ativador da transcrição 3
<b>Th</b>	Linfócito T auxiliar
<b>Th1</b>	Linfócito T auxiliar tipo 1
<b>Th2</b>	Linfócito T auxiliar tipo 2
<b>Th17</b>	Linfócito T auxiliar produtor IL-17
<b>TLRs</b>	do inglês, <i>Toll like receptor</i>
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Treg</b>	Células T reguladoras
<b>VLA</b>	Integrina $\alpha 4\beta 1$ , do inglês, <i>very late antigen 4</i>
<b>XBP-1</b>	do inglês, <i>X-box binding protein 1</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>29</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
3.1 Animais .....	31
3.2 Obtenção dos peixes e extração do veneno .....	31
3.3 Dosagem de proteínas .....	31
3.4 Protocolo de indução de resposta imune de memória .....	32
3.5 Cultura de células esplênicas .....	32
3.6 Obtenção das células de medula óssea .....	33
3.7 Obtenção das células da cavidade peritoneal .....	33
3.8 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo .....	33
3.9 Quantificação de citocinas .....	34
3.10 Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos .....	35
3.11 Determinação de IgE veneno-específica por reação de anafilaxia cutânea passiva – PCA .....	35
3.12 Análise histológica e imunohistoquímica .....	36
3.13 Tratamento de neutralização com anticorpos anti-IL-5 e anti-IL-17A .....	37
3.14 Análise estatística .....	37
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1 Caracterização da resposta imune de memória induzida pelo veneno do <i>T. nattereri</i> .....	39
4.1.1 Indução de resposta imune de memória em camundongos .....	39
4.1.2 Análise dos subtipos de linfócitos B induzidos pelo veneno de <i>T. nattereri</i> .....	41
4.2 Análise dos fatores envolvidos na manutenção da memória .....	53
4.2.1 Citocinas e quimiocinas induzidas na resposta de memória para o veneno de <i>T. nattereri</i> .....	53
4.2.1 Análise da presença do veneno de <i>T. nattereri</i> no baço .....	54
4.3 Avaliação do papel das citocinas IL-5 e IL-17A na diferenciação e manutenção de células B de memória induzida pelo veneno .....	63
4.3.1 Resposta imune de memória induzida pelo veneno de <i>T. nattereri</i> após tratamento .....	63
4.3.2 Análise da diferenciação de linfócitos B induzida pelo veneno de <i>T. nattereri</i> após tratamento com anticorpos neutralizantes .....	64
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>92</b>

---

# *Introdução*



## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma extensa linha costeira de aproximadamente 7.400 km e uma ampla variação em sua fauna, contendo animais de águas temperadas e tropicais. Essa diversidade propicia a existência de grande número de animais potencialmente perigosos que podem favorecer a ocorrência de acidentes em humanos.

A produção de toxinas por animais aquáticos é uma estratégia importante que garante sua sobrevivência em um ecossistema altamente competitivo. Assim, para defender-se ou defender seu território, estes animais produzem um número enorme de metabólitos, cujas combinações resultam em uma grande variedade de estruturas químicas e moléculas complexas como peptídeos e proteínas com propriedades químicas e farmacológicas diferentes das apresentadas pelos venenos de animais terrestres (RUSSELL et al., 1971). Trabalhos realizados com toxinas oriundas de animais aquáticos vêm demonstrando que elas representam uma vasta fonte de substâncias com distintas atividades farmacológicas (OLIVEIRA et al., 1990; NUIJEN et al., 1999; RINEHART et al., 2000; CVETKOVIC et al., 2002; VAN-KESTEREN et al., 2002).

Os peixes de importância toxicológica podem ser agrupados em venenosos ou peçonhentos. Os peixes venenosos obtêm suas toxinas incorporando veneno de plantas, algas ou outros organismos através da cadeia trófica ou possuem vias metabólicas para a produção de seus venenos. Alguns exemplos são o baiacu, a garoupa, barracuda e bicuda. Já os peixes peçonhentos apresentam glândulas especializadas na secreção de substâncias tóxicas e um aparato especializado na inoculação do veneno. Embora no Brasil não haja relatos de acidentes fatais com peixes peçonhentos, estes podem ser responsáveis por acidentes graves que levam a diversos graus de morbidade.

Praticamente todas as famílias e gêneros de peixes peçonhentos têm representantes nos mares e rios do Brasil (HADDAD JR et al., 2000), entretanto os que mais causam acidentes são as arraias (HADDAD JR., 2004), os bagres (HADDAD JR., 2000), os peixes-escorpião (FIGUEIREDO e MENEZES, 1978; HADDAD JR. et al., 2003) e

o niquim (AUTO, 1992; ALMEIDA e ROCHA, 1989; FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000; HADDAD JR et al., 2003; FACÓ et al., 2005).

Os niquins pertencem à família *Batrachoididae* e são agrupados em 15 espécies, das quais somente quatro são encontradas no Brasil: *Thalassophryne nattereri*, *Thalassophryne punctata*, *Thalassophryne reticulata* e *Thalassophryne amazonica*. Os únicos relatos de acidentes referem à espécie *T. nattereri* encontrada nas regiões norte e nordeste do país.

O *T. nattereri* possui um aparelho inoculador de veneno completo presente nos quatro espinhos localizados nas regiões dorsal e lateral. Os espinhos são canaliculados e pontiagudos e possuem comunicação com as glândulas de veneno. Os acidentes acometem principalmente banhistas e pescadores e ocorrem quando o peixe é pisado ou tocado, acometendo principalmente mãos e pés, o que permite o rompimento do tegumento da glândula e a liberação do veneno pelo canal. Os sintomas decorrentes do envenenamento (dor, eritema e edema) e as seqüelas deixadas pelo acidente (em alguns casos o quadro clínico avança para uma necrose de difícil cicatrização) são agravados pela inexistência de um tratamento que reverta tais efeitos patológicos (ALMEIDA e ROCHA, 1989; AUTO, 1992; FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000; HADDAD JR. et al., 2003).

Vale ressaltar, que o uso de analgésicos, antiinflamatórios ou de antibióticos não é capaz de reverter o quadro decorrente do envenenamento que evolui independente da utilização dos medicamentos. Acidentes provocados pelo *T. nattereri* vêm sendo notificados em Salvador (ALMEIDA e ROCHA, 1989), Alagoas (AUTO, 1992; FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000), Fortaleza (MONTEIRO et al., 2003), Natal e Pará (HADDAD JR et al., 2003).

Trabalhos realizados com o veneno de *T. nattereri* em murinos reproduzem o envenenamento visto em humanos e demonstram sua ação local: dor, edema e necrose, independente da presença das atividades hemorrágica ou fosfolipásica A2 (LOPES-FERREIRA et al., 1998; FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000). Na micro-circulação de cremaster de camundongos foi demonstrada intensa coagulação intravascular com parada do fluxo sangüíneo nas vênulas pós-capilares e em capilares e pontos de

estrangulamento periódico e reversível em toda a extensão das arteríolas e também vasoconstrição (LOPES-FERREIRA et al., 2002).

A análise histológica da lesão provocada pelo veneno também mostrou presença de edema, mionecrose, hiperemia e/ou congestão nas veias e vênulas, presença de trombos, além de pouco infiltrado celular inflamatório, achados que podem justificar o comprometimento da regeneração tecidual por até 28 dias da injeção do veneno (LOPES-FERREIRA et al., 2001). A injeção do veneno no coxim plantar de camundongos induz liberação de importantes citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, e pobre resposta inflamatória celular. O veneno também afeta a viabilidade de células mononucleares (J774A1) em cultura (LIMA et al., 2003). Além disso, verificou-se experimentalmente que o veneno é capaz de alterar a fisiologia renal interferindo principalmente nos parâmetros vasculares (FACÓ et al., 2003).

Lopes-Ferreira e colaboradores (2004) demonstraram que somente inibidores de caliceína tecidual e plasmática reduzem a nocicepção e o edema induzidos pelo veneno. A participação do sistema caliceína-cininogênio-cinina foi confirmada uma vez que o veneno promove a clivagem de substratos sintéticos derivados do cininogênio humano liberando calidina (Lys-BK), apresentando, portanto uma atividade cininogénica semelhante à caliceína tecidual. Ao contrário, as atividades tóxicas induzidas pelo veneno não são reduzidas por antiinflamatórios comumente utilizados na clínica médica, como dexametasona e indometacina, nem pelo inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME), bem como pelo antagonista de serotonina (ciproheptadina) (LOPES-FERREIRA et al., 1998).

Na busca por uma terapia eficiente para o envenenamento pelo *T. nattereri*, trabalhos realizados por nosso grupo demonstraram a importância de anticorpos específicos produzidos em coelhos ou eqüinos na neutralização das atividades tóxicas (LOPES-FERREIRA et al., 2000; PIRAN-SOARES et al., 2003). Além disso, comprovamos experimentalmente que animais com altos títulos plasmáticos de anticorpos específicos apresentam menores respostas de nocicepção, edema ou necrose quando submetidos a um segundo contato com o veneno (PIRAN-SOARES et al., 2007). Além da verificação da persistência de anticorpos IgG anti-veneno em camundongos, neste trabalho também foi

demonstrado que pacientes acidentados pelo peixe apresentam altos níveis de IgG anti-veneno por até seis meses após o acidente.

Assim, estes dados mostram que a diferenciação de células B de memória e células plasmáticas de longa duração (*antibody-secreting cells* – ASC) no envenenamento pelo *T. nattereri* pode representar uma fonte importante de anticorpos protetores e garante a imunidade de longo prazo.

Em 2006 realizamos um estudo sobre a resposta imune humoral e celular induzida pelo veneno do *T. nattereri* em camundongos, avaliando principalmente os tipos de celulares esplênicos predominantes, a produção de citocinas e a produção de anticorpos específicos (GRUND et al., 2006). Neste trabalho demonstramos uma associação entre as citocinas secretadas pelas distintas populações de linfócitos T e a produção das subclasses de anticorpos gerados, sendo a grande produção de anticorpos IgG1 veneno-específicos e IgE total associada aos altos níveis de IL-5, e os altos níveis de IFN- $\gamma$  a anticorpos IgG2a. Estes resultados indicam que o veneno de induz uma resposta imune mista, com diferenciação de clones de linfócitos dos tipos Th1 e Th2. E ainda, de maneira interessante, seis meses após a imunização os animais foram desafiados novamente com o veneno e produziram altos níveis de anticorpos IgG antígeno-específico de memória. Investigamos também os diferentes padrões de expressão de moléculas nas células esplênicas dos animais imunizados e com resposta persistente e encontramos um aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B com baixa expressão da molécula CD45R/B220. A presença de resposta T dirigida com altos níveis de anticorpos IgG específicos confirmam que células B com funções efetoras e/ou de memória foram geradas.

Concluimos, portanto que a resposta imune gerada para o veneno pode induzir resposta imune de memória e a diferenciação de células B produtoras de anticorpos negativas para a molécula B220, sugerindo a diferenciação em células produtoras de anticorpos de vida longa. Esta área tornou-se, portanto o nosso objeto de estudo proposto neste trabalho.

Quando a célula B virgem encontra o antígeno nos órgãos linfóides secundários com um ambiente apropriado que inclui citocinas, células T auxiliares e células

dendríticas foliculares elas se tornam ativas e proliferam. Algumas dessas células B ativadas pelo antígeno se desenvolvem fora do folículo linfóide para se tornarem plasmócitos de vida curta. Outro grupo se diferencia no próprio centro-germinativo e desenvolve-se em células B de memória e/ou em ASC (SLIFKA et al., 1998; MANZ et al., 2002; SHAPIRO-SHELEF et al., 2005). A formação do centro germinativo favorece um ambiente dinâmico e especializado que coordena a maturação de afinidade da célula B antígeno-específica através de ciclos de hipermutação somática e seleção direcionada pelo antígeno, culminando na geração de células de memória de alta afinidade (JACOB et al., 1991; BEREK et al., 1991; HEYZER-WILLIAMS et al., 1993).

Sabe-se que as células B de memória expressam tipicamente IgM, IgG ou IgA de membrana e carregam mutações somáticas dentro da região variável da porção CDR (RAJEWSKY, 1996; KLEIN et al., 1998; TANGYE et al., 1998). Estas células podem expressar vários marcadores de superfície como CD19, CD20, CD27 e B220 e embora demonstrem preferência para se localizarem nos sítios de sua formação elas também recirculam (BAINÉ e THORBECKE, 1982) e montam respostas vigorosas para o antígeno original após uma segunda exposição.

Já a rara população de células ASC (frequência de 1% das células da medula óssea em indivíduos saudáveis) (HOOIJKAAS et al., 1983; TERSTAPPEN et al., 1990) mantém altos títulos de anticorpos de alta afinidade na circulação por longos períodos de tempo, ocupando nichos limitados na medula óssea (MANZ et al., 1998) no baço (SMITH et al., 1997) e em locais inflamados (SLIFKA et al., 1995; SMITH et al., 1996; MANZ et al., 1997). Essas células expressam várias moléculas de adesão como VLA-4, VLA-5, CD9, CD44, CD43 e CD138 (sindecin-1) (ARCE et al., 2004; RIDLEY et al., 1993; MEDINA et al., 2002) e possuem capacidade migratória heterogênea em resposta a quimiocinas e podem, por exemplo, migrar para a medula óssea em resposta a quimiocina CXCL12 (CXC ligand 12, ou stromal cell-derived factor 1 ou SDF-1) (HAUSER et al., 2002; WEHRLI et al., 2001). Trabalhos recentes sugerem que a longevidade das ASC não é somente uma capacidade intrínseca das células, mas também uma resposta a fatores do micro-ambiente como as citocinas IL-6, TNF $\alpha$  e IL-5 (SZE et al., 2000; CASSESE et al., 2003).

As ASC, embora sejam parte do compartimento B de memória diferem fenotipicamente das células B de memória convencionais por não apresentarem marcadores de superfície como CD19, MHC de classe II, CD20 ou CD45R/B220 (SMITH et al., 1996; MANZ et al., 1998) e expressarem moléculas como CD138 (sindecán-1), CD62L, CD43, CD38 e recentemente descrito a molécula CD93 (HEYZER-WILLIAMS et al., 2001; KALLIES et al., 2004; CHEVRIER et al., 2009).

As células B do compartimento de memória também podem ser formadas a partir de um subtipo não convencional de células B maduras, as chamadas células B1 que se distinguem das células B convencionais (B2) por apresentarem diferentes fenótipos de superfície, localização anatômica, capacidade de auto-reabastecimento e repertório de anticorpos (KANTOR, 1991) e por serem células com características de defesa inata (KANTOR, 1993; TAKATSU et al., 1994) e de vida longa (ROTHSTEIN et al., 2002).

As células B1 são conhecidas por serem uma fonte primária de anticorpos naturais IgM de baixa afinidade que apresentam papel importante em períodos iniciais de defesa contra bactérias, vírus e certos parasitas, antes do estabelecimento de respostas imunes adaptativas (MARTIN et al., 2001; BENEDICT et al., 1999; BOES et al., 1998; HAAS et al., 2005; BAUMGARTH et al., 2000) e são fontes de anticorpos de reações cruzadas com uma variedade de antígenos próprios (KOCKS e RAJEWSKY, 1989; CASALI e NOTKINS, 1989) tornando-se células produtoras de imunoglobulinas de todos os isótipos (KANTOR, 1993) principalmente em resposta a estimulação antigênica, por lipopolissacarídeo ou citocinas. Além disso, seus progenitores são abundantes no feto e no fígado, mas não na medula óssea de animais adultos (HAYAKAWA et al., 1985). Possui capacidade de auto-abastecimento principalmente nas cavidades peritoneal e pleural, sendo virtualmente ausentes no linfonodo e no sangue periférico onde é mais convencional a presença de células B2.

Células B1 expressam constitutivamente três tipos de marcadores de superfície Mac-1 (CD11b/CD18), FcεR (CD23) e a cadeia alfa do receptor de IL-5 (IL-5Rα) e apresentam super expressos os genes BLIMP-1 e XBP-1 (TUMANG et al., 2005) o que explica sua capacidade de longa vida e produção de IgM natural e contínua. Hasting e colaboradores definiram as células B1 como células que expressam B220<sup>low</sup> IgM<sup>high</sup> IgD<sup>low</sup>

CD23<sup>neg/low</sup>. Essas células podem ainda ser subdivididas nas populações B1a e B1b, diferenciando-se pela expressão de CD5 nas células B1a (HARDY e HAYAKAWA, 1994).

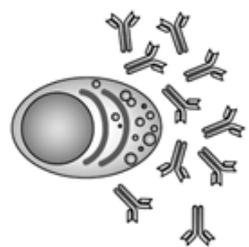
A população B1b representa apenas uma pequena porção destas células, ainda pouco conhecidas. Não está claro se esses dois subtipos são distintos tipos celulares ou dois estágios de desenvolvimento da mesma população uma vez que o CD5 é um regulador negativo expresso em células anérgicas ou nas células B1a após exposição a auto-antígenos (HIPPEN et al., 2000).

Quando as células B1a são ativadas na cavidade peritoneal ou pleural induzem a ativação e produção de citocinas pelos linfócitos T de forma muito mais eficiente do que as células B convencionais (ZHONG et al., 2007). Ha e colaboradores (2006) demonstraram que a sinalização por receptores do tipo Toll (TLRs) nas células B1 induz uma rápida, específica e transiente regulação da expressão de integrinas e da molécula CD9, permitindo o deslocamento da matriz local e alta velocidade de movimento das células em resposta a quimiocinas. Essas células podem, portanto migrar para os órgãos linfóides secundários tornando-se células produtoras de anticorpos de vida longa (BIKAH et al., 1996). Além da produção de citocinas, aumento da capacidade de apresentação de antígenos, e diferenciação em ASC, a expansão das células B1a também tem sido bastante associada à autoimunidade (HAYAKAWA et al., 1984, 1990; HARDY e HAYAKAWA, 1994; HARDY, 2006)

Diante do exposto, entendemos ser necessária uma avaliação do efeito do veneno de *Thalassophryne nattereri* na diferenciação de linfócitos B. Primeiramente focamos nossa investigação na avaliação do desencadeamento da resposta imune de anticorpos de memória para em seguida avaliarmos a diferenciação de linfócitos B através da análise da expressão de moléculas de superfície específicas para distintas subpopulações em diferentes compartimentos. Esperamos com isso obter resultados que possam auxiliar no esclarecimento da maturação de células produtoras de anticorpos e sua sobrevivência, como também para o entendimento dos mecanismos de ação do veneno de *T. nattereri* o que conseqüentemente poderá possibilitar o desenvolvimento de tratamentos mais específicos e adequados.

---

*Objetivo*

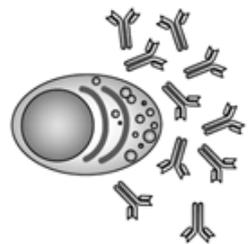


## **2 OBJETIVO**

Avaliar a capacidade do veneno de *T. nattereri* na indução de resposta imune de memória em camundongos e principalmente a sua capacidade na indução da diferenciação de subtipos de células B em diferentes compartimentos (peritônio, baço e medula óssea). Também pretendemos determinar os fatores do micro-ambiente como as citocinas IL-5 e IL-17A na regulação deste processo.

---

# *Material e Métodos*



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, pesando entre 18 e 22 g fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com água e ração *ad libitum*. Os experimentos estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelas Comissões de Ética Animal do Instituto Butantan (505/08) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (046).

#### **3.2 Obtenção dos peixes e extração do veneno**

Para extração do veneno foram utilizados peixes da espécie *T. nattereri*, coletados em diferentes épocas do ano no estado de Alagoas, no encontro das águas da Lagoa Mundaú com a Praia de Barra Nova. As coletas dos peixes foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico N°14693-1). A extração do veneno foi realizada através da compressão das glândulas na base dos espinhos forçando a expulsão do veneno (LOPES-FERREIRA et al., 1998). Logo após a extração, o veneno foi centrifugado e mantido à -20 °C.

#### **3.3 Dosagem de proteínas**

A concentração de proteína no veneno foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976) usando como padrão soro albumina bovina (Sigma, Chemical Company; ST. Louis, MO, USA). A quantidade de veneno foi expressa pelo seu conteúdo protéico em mg/mL.

### **3.4 Protocolo de indução de resposta imune de memória**

Camundongos BALB/c (n = 5) foram imunizados pela via intraperitoneal com o veneno de *T. nattereri* (10 µg) adsorvido em hidróxido de alumínio (1,6 mg) em um volume final de 500 µL de salina estéril por animal. Após 14 dias os animais receberam novamente a mesma quantidade de veneno sem adjuvante. Animais controle receberam apenas o adjuvante. Os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da primeira imunização para obtenção do sangue que foi centrifugado a 322g por 10 minutos à 10°C e o plasma retirado foi estocado na diluição 1/5 a 4 °C para dosagem de anticorpos. Em seguida, os animais foram mortos para obtenção das suspensões celulares do peritônio, do baço e da medula óssea femoral e identificação dos diferentes subtipos de linfócitos B nesses compartimentos.

### **3.5 Cultura de células esplênicas**

O baço dos animais imunizados ou não com o veneno foi retirado de forma estéril e em seguida submetido à maceração em homogeneizador com meio de cultura RPMI 1640 para recuperação da suspensão celular. Este homogenato foi centrifugado a 309,5g durante 8 minutos à 4 °C e submetido a lavagens e hemólise. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultura suplementado (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado – SFB, 2 mM de L-glutamina, 0.1% 2-mercaptoetanol, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 1 mM de piruvato de sódio e 0.1% de penicilina/estreptomicina). Os eventuais grumos foram retirados por sedimentação por 5 minutos no gelo e a viabilidade da suspensão celular obtida pela contagem em azul de Trypan. Uma parte das células foi marcada com anticorpos específicos para análise das sub-populações por citometria de fluxo e 6 x 10<sup>6</sup> células/poço foram cultivadas em meio RPMI suplementado na presença ou na ausência de veneno de *T. nattereri* (10 µg/poço) por 24, 48 e 72 horas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após estes períodos de tempo, as placas foram centrifugadas a 309,5 g por 10 minutos a 4 °C e os sobrenadantes coletados e conservados à -20 °C para dosagem de citocinas.

### **3.6 Obtenção das células de medula óssea**

Para obtenção de células da medula óssea, os cordões medulares do fêmur dos camundongos imunizados ou controle foram desprendidos das trabéculas ósseas com meio RPMI 1640 com auxílio de agulha (24  $\frac{3}{4}$  G). As células foram centrifugadas a 309,5g por 8 minutos a 4 °C, o sobrenadante coletado e as células ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado. Após a lise das hemácias as células foram centrifugadas e ressuspensas novamente em PBS + 0.1 % BSA e marcadas com os diversos anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo.

### **3.7 Obtenção das células da cavidade peritoneal**

Para obtenção das células do peritônio os animais imunizados e controle foram mortos e a cavidade peritoneal lavada com PBS +10 mM EDTA ou meio de cultura para obtenção da suspensão celular que foi centrifugada a 309,5g a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e congelado à -20 °C para dosagem de citocinas, enquanto o botão celular foi ressuspenso em PBS + 0.1% BSA e marcados com os diversos anticorpos específicos e posteriormente analisado por citometria de fluxo.

### **3.8 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo**

Para avaliar as diferentes populações de células B as células dos diferentes compartimentos (baço, medula óssea e peritônio) foram incubadas primeiramente com o anticorpo purificado de rato IgG2bk anti-mouse CD16/CD32 por 30 minutos a 4 °C. Em seguida foi adicionado meio RPMI 1640 suplementado e submetido à centrifugação de 309,5g por 8 minutos a 4 °C. O sobrenadante celular foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 e incubadas por 30 minutos à 4 °C no escuro com os seguintes anticorpos (BD PharMingen, Oxford, UK) marcados com diferentes fluorocromos: controles isotípicos PE rat IgG2ak, PE-Cy5 rat IgG2ak, PE rat IgG2ak e PE rat IgG2bk ou os anticorpos PE rat IgG2bk anti-mouse CD4, PE-Cy5 rat IgG2ak anti-mouse CD45R/B220, PE rat IgG2ak anti mouse CD138, PE rat IgG2ak anti-mouse CD5,

PE goat anti-mouse Ig (específico para IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), e FITC rat IgG2a anti-mouse CD43. Após nova lavagem e centrifugação, as células foram ressuspensas em formaldeído a 1% e deixadas a 4 °C até a leitura no citometro de fluxo FACsCalibur de três cores (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). Os eventos (10.000) foram adquiridos e analisados com o programa CellQuest Pro (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) seguido de marcação específica e as células mortas foram dispensadas. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de células positivas para cada molécula avaliada acrescida do desvio padrão e os experimentos foram repetidos duas vezes.

### **3.9 Quantificação de citocinas**

Os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-13, IL-5, IL-10, IL-17A e IFN- $\gamma$  e da quimiocina KC no sobrenadante de cultura de células esplênicas, no lavado da cavidade peritoneal e no sobrenadante das células da medula óssea foram determinados por ELISA sanduíche. Microplacas (Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas por 18 h com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina/quimiocina. Após lavagem e distribuição das amostras foram adicionados anticorpos específicos para as diferentes citocinas conjugados à biotina. Para a revelação da ligação, solução contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno foi adicionada. A reação de cor foi lida em espectrofotômetro a 450 nm. Curvas-padrão utilizando concentrações conhecidas das citocinas/quimiocina recombinantes foram realizadas para quantificação das amostras. O limite de detecção para IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-5, IL-4, IL-13, IL-10, IL-17A e IFN- $\gamma$  foi de 7.8 pg/mL e de 15.6 pg/mL para quimiocina KC. Os resultados foram expressos como a média das concentrações das amostras de cada grupo acrescida do desvio-padrão.

### **3.10 Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos**

A dosagem de anticorpos foi realizada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Para determinação de IgG1 e IgG2a, microplacas foram sensibilizadas com o veneno e posteriormente após incubação e lavagem, adicionadas dos plasmas em diluição previamente determinada. Para revelação foram adicionados anticorpos de detecção marcados com peroxidase específicos para IgG1 e IgG2a. Ao final, a reação foi revelada pela adição de 100 µL da mistura cromógena mais substrato da enzima (1 mg de OPD/mL em tampão citrato 0,2 M, pH 5,5 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,06%, por poço) e a reação interrompida pela adição de 50 µL de ácido cítrico 0,2 M por poço e leitura feita em espectrofotômetro a 490 nm. Curvas-padrão, utilizando concentrações conhecidas dos anticorpos murinos purificados foram realizadas para quantificação das amostras. Para a dosagem de IgE total usamos os anticorpos de captura e biotinilado anti-IgE de camundongo (BD Pharmingen). A quantidade de IgE total nas amostras foi calculada a partir da curva-padrão obtida com a IgE purificada (555248, BD Pharmingen). Os resultados foram expressos como a média das concentrações acrescida do desvio-padrão das amostras de cada grupo.

### **3.11 Determinação de IgE veneno-específica por reação de anafilaxia cutânea passiva – PCA**

A determinação de anticorpos anafiláticos IgE veneno-específicos foi feita pela reação de PCA, segundo as técnicas descritas por Mota e colaboradores (1969). Assim, ratos depilados no dorso foram sensibilizados intradermicamente com diluições seriadas dos plasmas obtidos de camundongos imunizados com o veneno de *T. nattereri* ou controle. Após um período de 18 a 24 horas de sensibilização, os animais foram desafiados intravenosamente com azul de Evans a 0,25%, contendo 100 µg de veneno de *T. nattereri*. A leitura da reação foi feita 30 minutos após o desafio, observando-se o diâmetro da reação na pele invertida do animal. Os títulos de IgE foram expressos como a recíproca da maior diluição dos plasmas que resultou em uma reação positiva maior que 5 mm de diâmetro. Todos os testes foram feitos em triplicata e diferenças entre os

títulos de PCA maiores que 2 vezes foram consideradas significativas (FOX et al., 1976; ISHIZAKA et al., 1976).

### **3.12 Análise histológica e imunohistoquímica**

Os baços dos animais imunizados ou não com o veneno foram retirados, lavados e fixados em formaldeído 4%. Em seguida foram embebidos em parafina e cortados a 2 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina eosina para visualização da morfologia esplênica utilizando microscópio óptico (Axio Imager A.1, Carl-Zeiss) com máquina fotográfica (Axion-cam IcC 1 – Zeiss) acoplada ao sistema. Para cada grupo quatro cortes de baço de cinco animais cada foram analisados.

A detecção da presença de veneno e de células produtoras de anticorpos (Ig positivas) foi feita de acordo com D'Suze et al. (2004) com algumas modificações. Os cortes foram desparafinados, re-hidratados com PBS (2 x de 1 minuto) e fixadas com formaldeído a 3% por 1 hora a temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens com PBS (3 x de 5 minutos) foi adicionada peróxido de hidrogênio a 3% em PBS para bloqueio da peroxidase endógena. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, os cortes foram lavados com PBS (3 x de 5 minutos) e incubados com solução de tripsina 0.1% adicionada de CaCl<sub>2</sub> 0.1%, por 10 minutos, seguido da adição de tripsina 0.1% adicionada de HCl 4 M por 15 minutos a temperatura ambiente. A reação foi neutralizada pela adição de PBS Tween 0.1% + BSA 0.05%, por 10 minutos de incubação a temperatura ambiente. Os cortes foram em seguida lavados com PBS (3 x de 5 minutos) e incubados com tampão de permeabilização (Triton X-100 3% em NH<sub>4</sub>Cl 50 mM) por 5 minutos. O excesso de reagente foi removido e os cortes incubados por 1 hora com soro com altos títulos de anticorpos específicos obtido de camundongos imunizados com o veneno *T. nattereri* na diluição de 1/40 em PBS + BSA 0,1% (para as lâminas de detecção indireta do veneno) ou com o anticorpo de cabra anti-Ig de camundongo marcado com HRP (ReD Systems) previamente diluído 1:1000 em PBS + BSA 0.1% (nos cortes para detecção de Ig) a temperatura ambiente em câmara úmida. Após a incubação com o primeiro anticorpo, os cortes para detecção do veneno foram lavados e incubados por 1

hora com o segundo anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo HRP (ReD Systems) diluído a 1:3000 em PBS + BSA 0.1%. A reação foi revelada usando o cromógeno 3' 3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma) associado ao substrato da enzima H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 minutos no escuro. O controle da detecção do veneno foi feito utilizando soro de camundongo não imunizado. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina eosina para visualização da morfologia esplênica utilizando microscópio óptico (Axio Imager A.1, Carl-Zeiss) com máquina fotográfica (Axion-cam IcC 1 – Zeiss) acoplada ao sistema.

### **3.13 Tratamento de neutralização com anticorpos anti-IL-5 e anti-IL-17A**

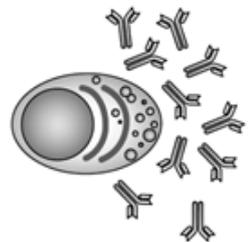
Camundongos imunizados ou não com o veneno de *T. nattereri* de acordo com protocolo descrito (item 3.4) foram tratados por via intravenosa com 5 µg/animal, dos anticorpos IgG1 k de rato anti-IL-5 de camundongo (TRFK5, ReD Systems Europe Ltd., Barton Lane, Abingdon, UK) e anticorpos IgG1 k de rato anti-IL-17A de camundongo (clone eBio Tc11-18N10.1, ReD Systems Europe Ltd) ou controle isotípico GL113, 30 minutos antes da imunização e da dose reforço. Os animais foram mortos nos dias 28 e 74 para obtenção das suspensões celulares do peritônio, do baço e da medula óssea femoral e identificação dos diferentes subtipos de linfócitos B nesses compartimentos.

### **3.14 Análise estatística**

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas após análise de variância (One-Way ANOVA), seguido do teste paramétrico Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Prisma (Graph Pad Software) e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para valores de  $p < 0,05$ .

---

*Resultados*



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da resposta imune de memória induzida pelo veneno do *T. nattereri*

#### 4.1.1 Indução de resposta imune de memória em camundongos

Camundongos BALB/c que apresentam maior suscetibilidade ao desenvolvimento de resposta imune do tipo Th2 (McINTIRE et al., 2001; BOYCE e AUSTIN, 2005) foram imunizados com as proteínas do veneno de *T. nattereri* na presença de adjuvante. Os animais foram deixados, após uma segunda aplicação intraperitoneal de veneno, sem adjuvante, por um período de no mínimo 7 dias e no máximo 106 dias na ausência de estimulação antigênica para cronificação da resposta imune de acordo com McHeyzer-Williams e colaboradores (2000). Primeiramente focamos nossa investigação na avaliação de anticorpos de memória produzidos após 1 semana da re-estimulação para então avaliar a resposta persistente após 28, 48, 74 e 120 dias, como apresentado na **Figura 1**.

Escolhemos analisar a resposta de anticorpos emergente aos antígenos do veneno como um modo de quantificar diretamente a atividade das células B de memória, *ex vivo*. Conforme apresentado na **Figura 2**, os resultados mostram uma produção alta e constante de anticorpos IgG1 veneno-específico (A) acompanhado por altos níveis de anticorpos IgE totais e específicos até 74 dias da imunização, os quais intensificaram fortemente após 120 dias (C e D). Níveis elevados de IgG2a veneno-específicos também são vistos a partir da primeira semana da re-estimulação antigênica, alcançando um nível máximo em 74 dias, porém diminuíram em 120 dias (B). Até 74 dias observamos que o veneno promoveu uma resposta crescente de anticorpos IgG2a e constante de IgG1 e de IgE. Após 120 dias observamos uma super-produção de IgE, queda nos níveis de IgG2a e manutenção dos níveis de IgG1, mostrando uma razão positiva para IgG2a/IgE até 74 dias e mudança para IgE/IgG2a após 120 dias.

Além da capacidade de produzir anticorpos específicos para o veneno, outro aspecto analisado que está ligado à formação de memória imunológica é a alteração na morfologia do baço, um órgão linfóide secundário considerado centro de proliferação de linfócitos e produção de anticorpos de alta afinidade. De acordo com a **Figura 3A** podemos observar que a imunização com o veneno promoveu esplenomegalia a partir da primeira semana do desafio intraperitoneal com o antígeno alcançando 3 vezes o tamanho original após 74 dias da imunização e retornando ao tamanho normal dos animais controle em 120 dias. A hipermegalia foi acompanhada de intensa proliferação celular com o dobro de células após 21 dias e chegando a 4 vezes mais após 74 dias. No dia 120, apesar do baço dos animais imunizados já apresentarem tamanho normal, o número total de células esplênicas ainda permaneceu significativamente maior em relação ao controle (**Figura 3B**). Além disso, as zonas do baço típicas de células B nos folículos linfóides foram alteradas com a resposta imune persistente ao veneno, levando a uma crescente expansão dos centros germinativos, maiores e mais populosos (indicado por setas, **Figura 4**).

A presença de células B positivas para imunoglobulinas (Ig+) dentro destes centros germinativos também foi avaliada como um modo de confirmar a expansão/diferenciação de células B após a imunização com o veneno. Na **Figura 5** observamos um aumento expressivo nas células Ig+ (corados de marrom) nas regiões dos centros germinativos de animais imunizados com o veneno (**B-F**) principalmente após 48 dias da imunização (**D**) se comparado às regiões dos centros germinativos de animais controle (**A**).

Previamente, baseado nos achados que o veneno induz diminuição na expressão de B220 pelas células B esplênicas sugerimos que o veneno seria capaz de induzir a diferenciação de células produtoras de anticorpos de longa vida - ASC (GRUND et al., 2006). Aqui neste trabalho, utilizando um modelo de resposta imune de memória quantificamos a porcentagem de células B positivas ou negativas para a molécula CD45R/B220 no compartimento de resposta efetora (peritônio), de memória (baço) e de manutenção de células de longa vida (medula óssea). Nossos resultados mostram que em todos os compartimentos o veneno induziu ambos os subtipos celulares, negativo e

positivo; e confirmam principalmente no baço a presença de grande número de células B negativas para B220 entre 28 e 48 dias da imunização (**Figura 6B**). Além disso, o veneno induziu aumento no número dessas células B220<sup>neg</sup> na cavidade peritoneal e na medula óssea somente em 120 dias (**Figura 6A e 6C**).

#### *4.1.2 Análise dos subtipos de linfócitos B induzidos pelo veneno de *T. nattereri**

Uma vez que o fenótipo celular pode providenciar indicações de funções celulares, analisamos os subtipos de linfócitos B usando anticorpos para B220 (anti-B *cell isoform* de CD45R), CD43, CD138 (anti-sindecán-1) e CD5 para identificação de linfócitos B de vida longa (ASC) e linfócitos B1a.

##### 4.1.2.1 Linfócitos B B1 $\alpha$

As células B maduras podem apresentar-se como células B B1 ou B2, que se distinguem por apresentarem diferentes moléculas de superfície, localização anatômica, capacidade de auto-reabastecimento e repertório de anticorpos produzidos. As células B1 podem ser subdivididas em B1a e B1b por expressarem marcadores de superfície semelhantes, diferenciando-se pela expressão de CD5 e pela cadeia alfa do receptor de IL-5 (IL-5R $\alpha$ ) nas células B1a (HARDY e HAYAKAWA, 1994).

Alterações significativas com relação a essa população de linfócito B B1a ocorreram nos três compartimentos analisados: na **Figura 7A** observa-se uma expansão peritoneal somente em 28 e 48 dias (2,46% e 3,05%, respectivamente) e no baço um maior número destas células foi visto em 21, 28 e em 74 dias (9,72%, 8,48% e 5,45%; respectivamente) (**Figura 7B**). Embora poucas células B1a tenham sido observadas na medula óssea dos animais imunizados com o veneno nos dias 21, 28 e 120 (**Figura 7C**), este compartimento mostrou-se o reservatório deste subtipo celular em 120 dias.

#### 4.1.2.2 Linfócitos B de memória secretores de anticorpos de longa vida (ASC)

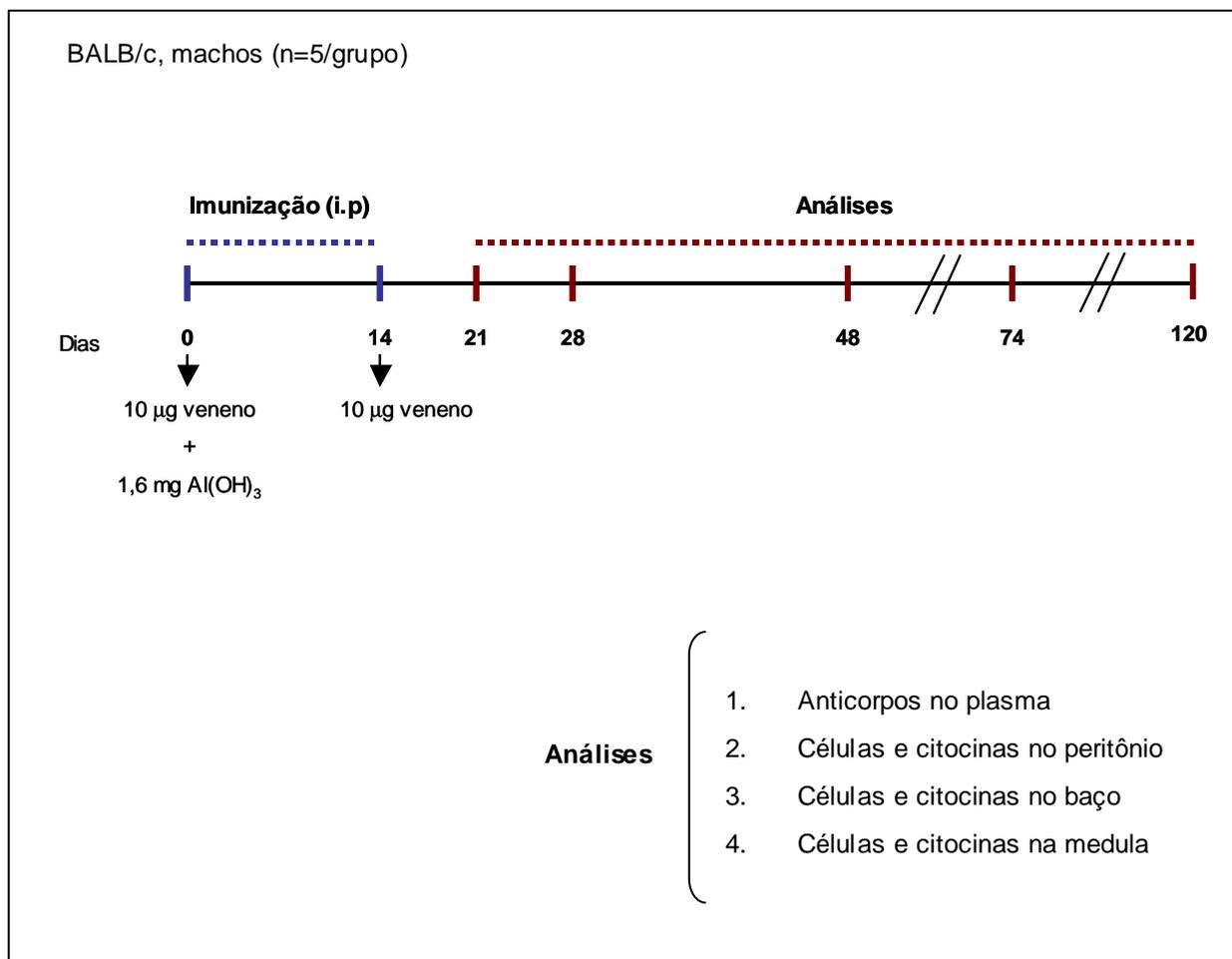
Diversos trabalhos focam o estudo de células B de memória secretoras de anticorpos de longa vida (ASC) principalmente na medula óssea após a re-estimulação (SLIFKA et al., 1995; SMITH et al., 1996; MANZ et al., 1997 e 1998). Para caracterizar a resposta de memória montada para o veneno, quantificamos as ASC nos três compartimentos, de acordo com a expressão de B220, CD43 e CD138 por até 120 dias. Observamos a presença de no mínimo três populações que variavam quando a expressão de B220 e CD43.

No peritônio, células ASC CD138<sup>pos</sup> foram observadas em grande número em 21 e 120 dias com o fenótipo B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> (**Figura 8A**), em 21, 48 e 120 dias com o fenótipo B220<sup>low</sup> CD43<sup>low</sup> (**Figura 8B**) e em 21, 74 e principalmente em 120 dias com o fenótipo B220<sup>neg</sup> CD43<sup>low</sup> (**Figura 8C**).

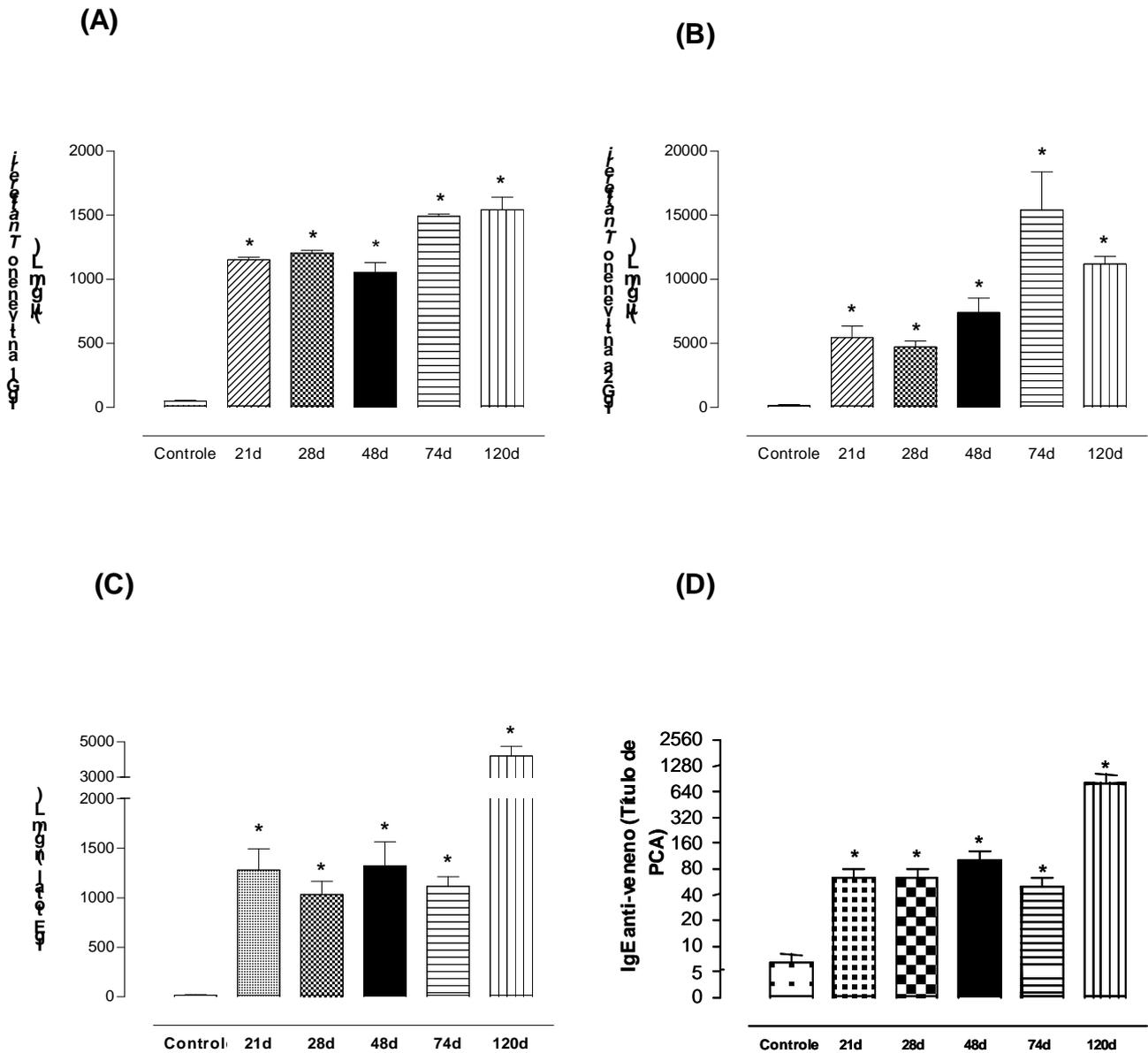
No baço, as células de longa vida CD138<sup>pos</sup> com o fenótipo B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> apareceram após 21, 28 e principalmente 120 dias (**Figura 9A**), com o fenótipo B220<sup>low</sup> CD43<sup>high</sup> em 21, 28, 74 e principalmente 120 dias e com o fenótipo B220<sup>neg</sup> CD43<sup>high</sup> em 48 e principalmente 74 dias (**Figura 9C**).

Na medula observamos uma expansão de células ASC CD138<sup>pos</sup> com o fenótipo B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> em 48 e em 120 dias (**Figura 10A**), com o fenótipo B220<sup>low</sup> CD43<sup>low</sup> entre 21 e 48 e em 120 dias (**Figura 10B**), sendo as células com o fenótipo B220<sup>neg</sup> CD43<sup>low</sup> vistas entre 21 e 48 dias (**Figura 10C**).

Em conjunto, estes resultados mostram que: a) no peritônio os três fenótipos de células ASC CD138<sup>pos</sup> se mantiveram por 120 dias e em maior número o fenótipo B220<sup>neg</sup> CD43<sup>low</sup>, no baço os fenótipos B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> e B220<sup>low</sup> CD43<sup>high</sup> permanecem por até 120 dias em igual número; e na medula também as células ASC positivas para B220 (high ou low) se mantiveram por 120 dias, porém em maior número do fenótipo B220<sup>low</sup> CD43<sup>low</sup>; b) em resposta ao veneno o peritônio e o baço são os maiores reservatórios crônicos de células B de memória secretoras de anticorpos de longa vida (ASC).



**Figura 1 – Protocolo de indução de resposta imune de memória em camundongos pelo veneno de *T. nattereri*.** BALB/c machos (n = 5) foram imunizados pela via intraperitoneal com o veneno de *T. nattereri* adsorvido em adjuvante em um volume final de 500 µL por animal. Após 14 dias os animais receberam a mesma quantidade de veneno sem adjuvante. Animais controle receberam apenas o adjuvante no dia 0. Os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico em diferentes períodos de tempo após a imunização para obtenção do plasma para dosagem de anticorpos. Em seguida, os animais foram mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral e posterior identificação dos diferentes subtipos de linfócitos B nesses compartimentos.

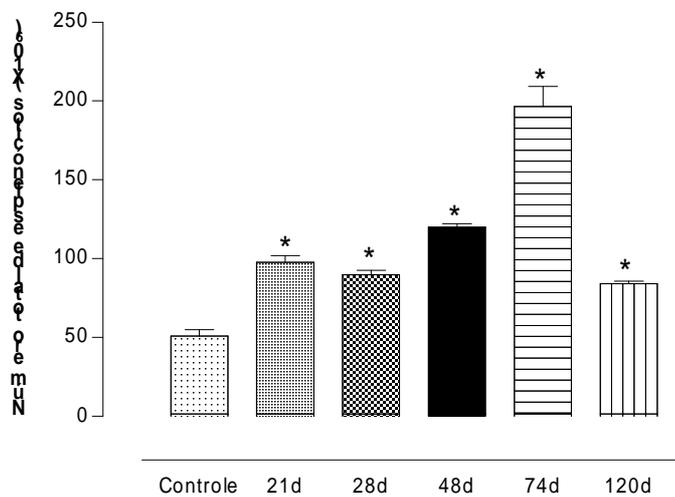


**Figura 2 – Níveis plasmáticos de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE.** Após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da imunização com o veneno de *T. nattereri* os animais foram sangrados para obtenção do plasma para dosagem dos anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) veneno-específicos e IgE total (C) por Elisa. Anticorpos IgE específicos foram determinados por PCA (D). Os títulos de PCA representam a recíproca da maior diluição do pool de plasmas que apresentaram uma reação cutânea positiva com diâmetro > 5 mm. As barras representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.

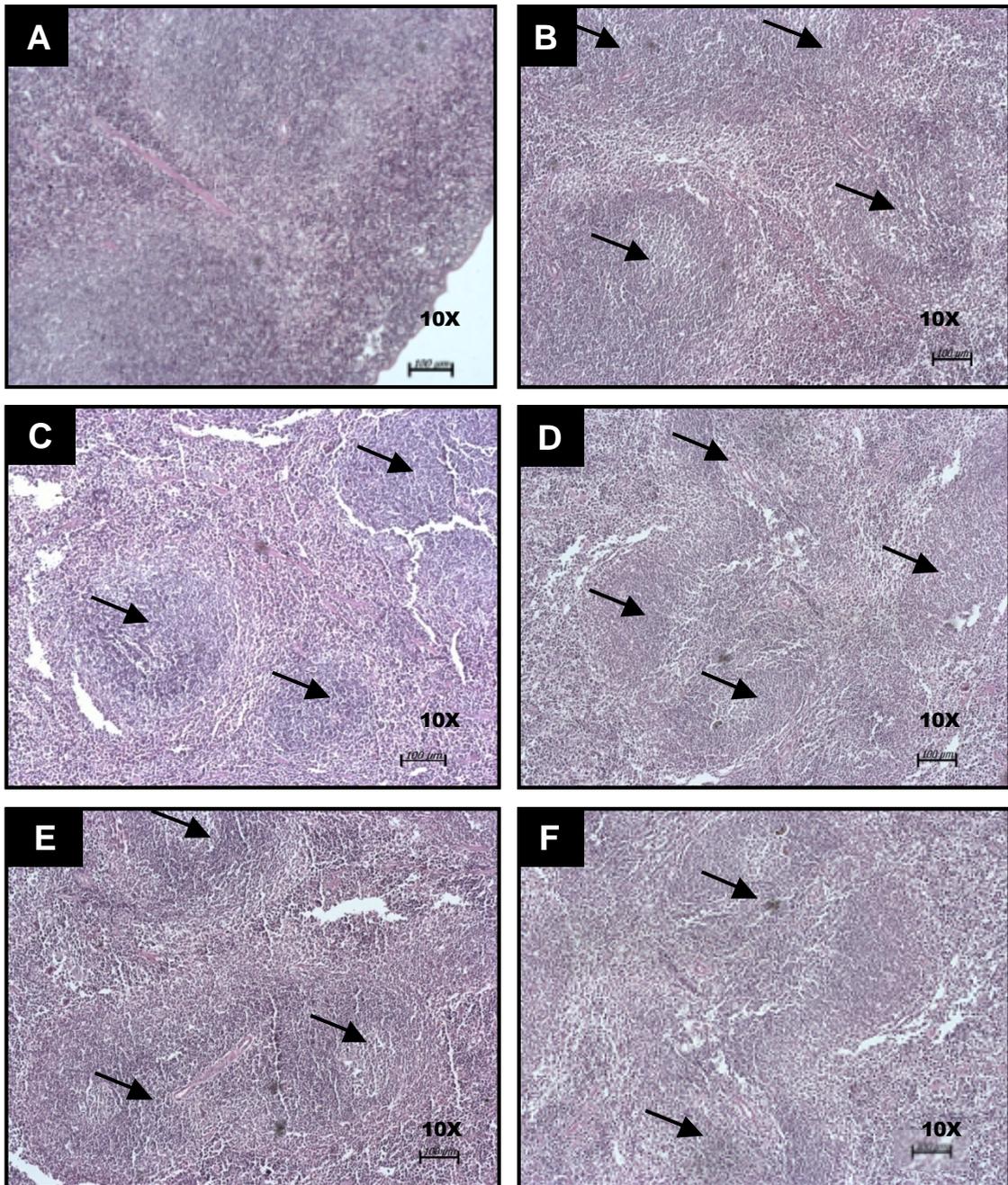
(A)



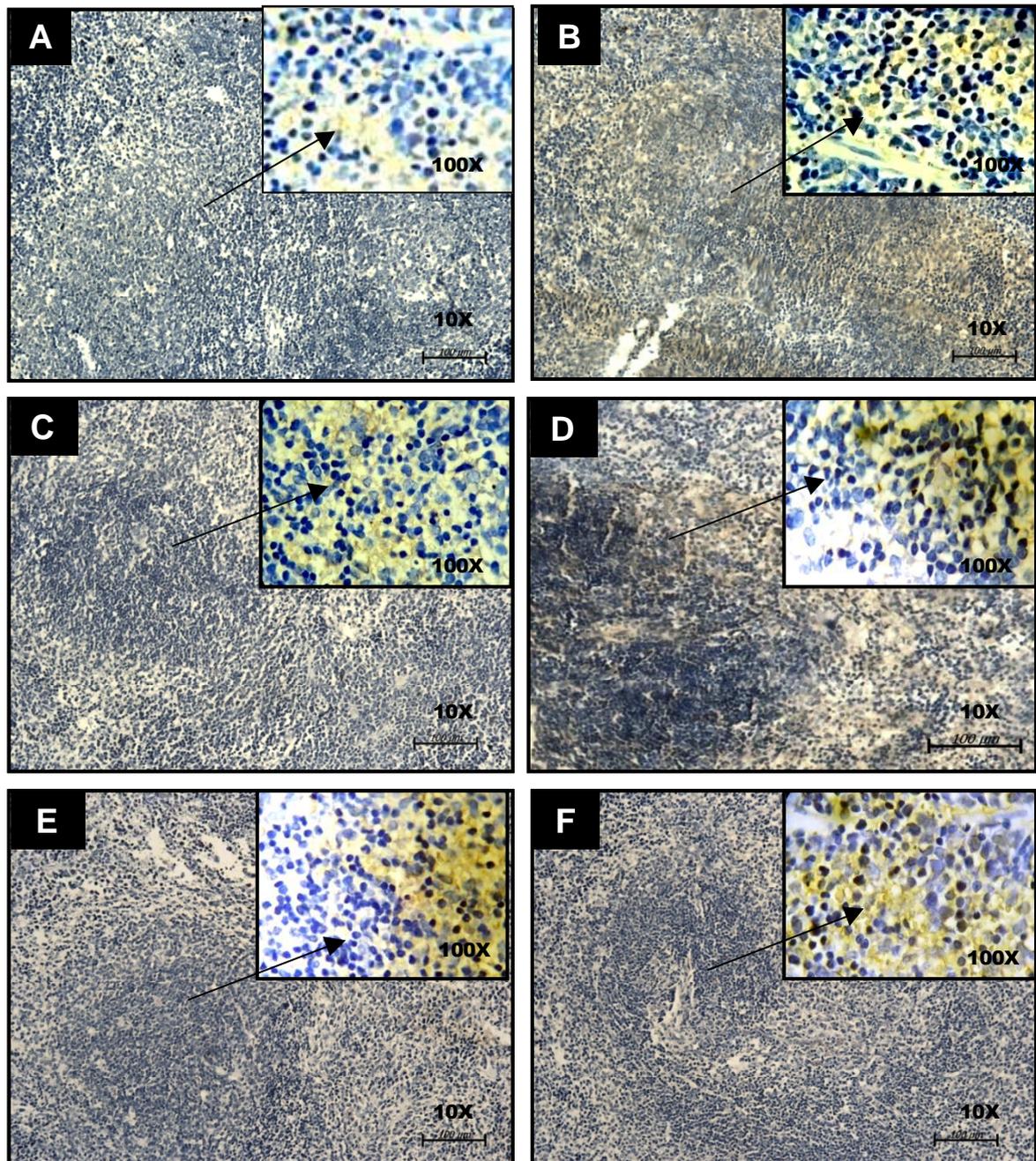
(B)



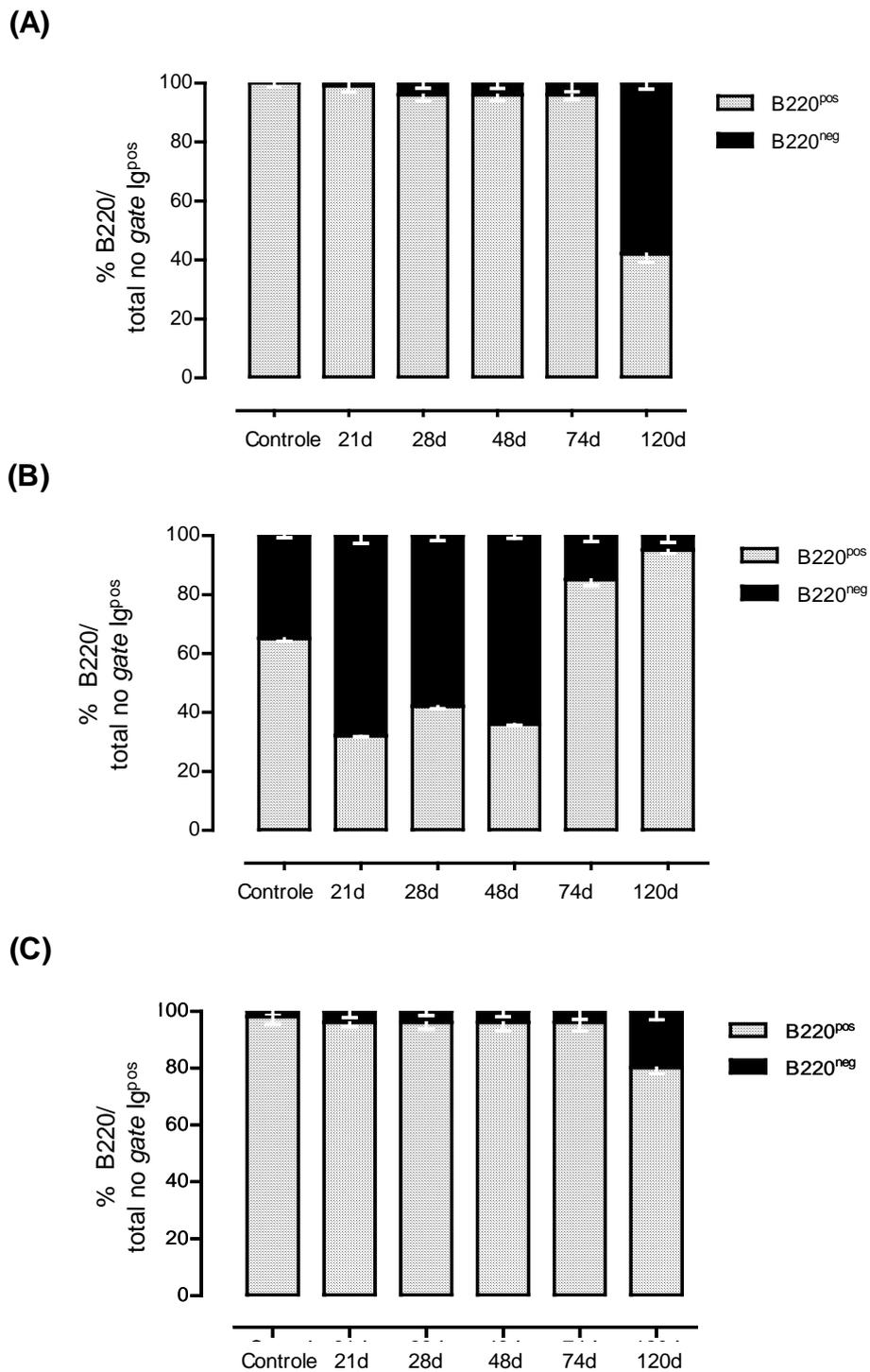
**Figura 3 – Esplenomegalia induzida pela imunização com o veneno de *T. nattereri*.** Fotos representativas dos baços dos animais imunizados ou não com veneno de *T. nattereri* obtidos após 21, 28, 48, 74 e 120 dias (A). O baço foi processado para obtenção da suspensão celular utilizada para contagem dos leucócitos com Azul de tripan em câmara de Neubauer (B). Cada barra representa a média do grupo acrescida do desvio-padrão. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.



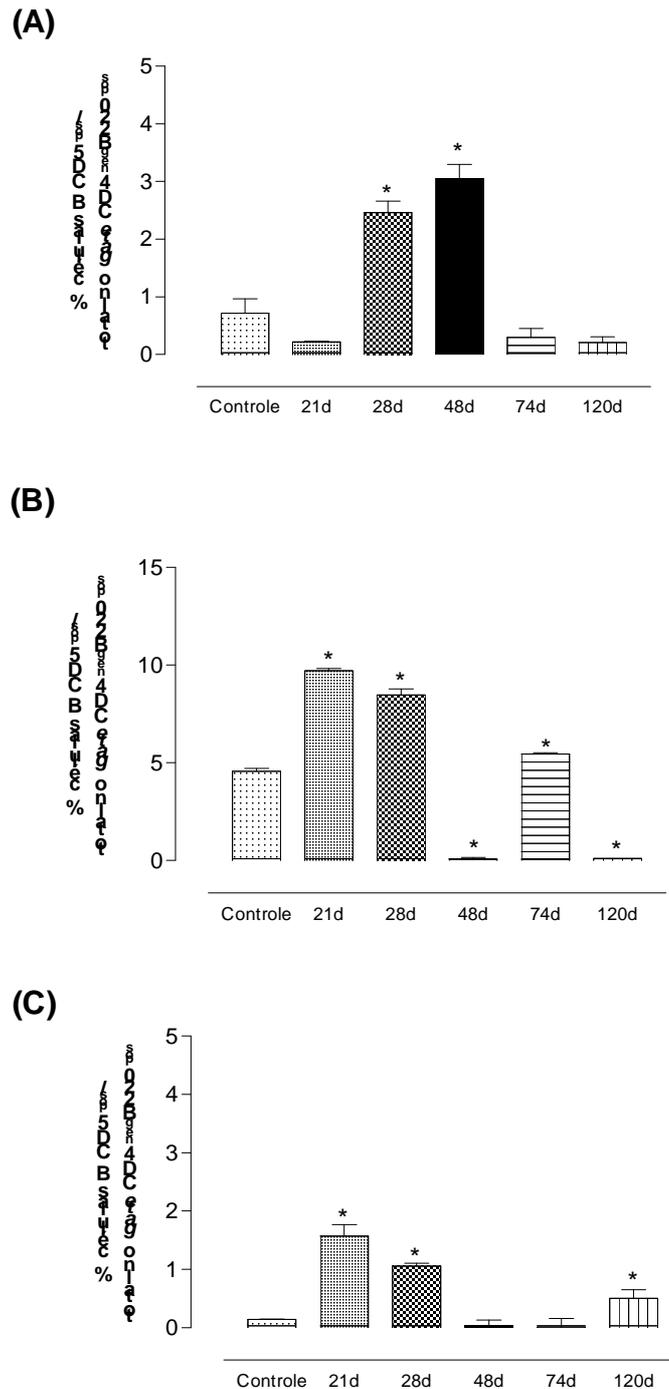
**Figura 4 – Análise histológica do baço de animais imunizados com o veneno de *T. nattereri*.** Os baços de animais imunizados com o veneno de *T. nattereri* (B-F) ou injetados apenas com hidróxido de alumínio (A) foram coletados após 21, 28, 48, 74 e 120 dias. Os órgãos foram cortados a 2 µm de espessura, parafinizados e corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise.



**Figura 5 –** Imunolocalização de linfócitos B produtores de imunoglobulinas em células esplênicas de animais imunizados com o veneno de *T. nattereri*. Baços coletados após 21, 28, 48, 74 e 120 dias (B-F) da imunização com o veneno de *T. nattereri* foram cortados, parafinizados e marcados com anticorpo anti-Ig de camundongo. Animais que receberam somente hidróxido de alumínio foram considerados controle (A). As células foram contra-coradas com hematoxilina-eosina (HE) e visualizadas ao microscópio óptico.

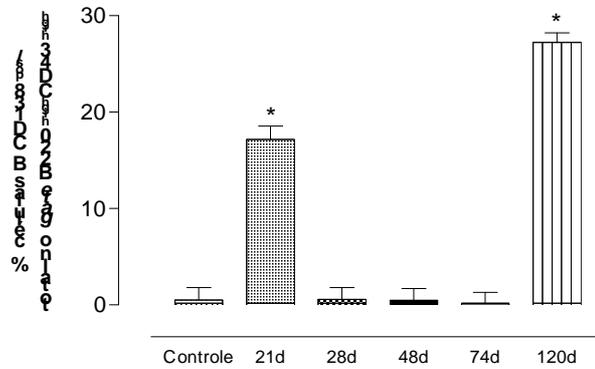


**Figura 6 –** Porcentagem de células B B220 positivas ou negativas nos compartimentos peritoneal, esplênico e medular de animais imunizados com o veneno *T. nattereri*. O lavado da cavidade peritoneal (A), o baço (B) e a medula óssea femoral (C) foram coletados após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da imunização com o veneno de *T. nattereri* para obtenção da suspensão celular que foi processada para marcação das células com os anticorpos anti-Ig e anti-CD45R/B220 e analisadas por citometria de fluxo. Células Ig positivas foram analisadas quanto a expressão de CD45R/B220. Os números representam a média das porcentagens de células acrescida do desvio-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.

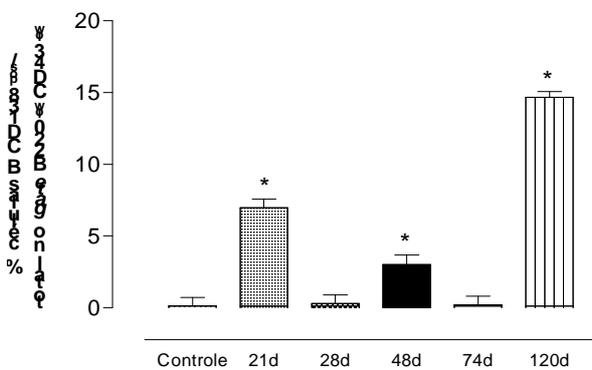


**Figura 7 –** Porcentagem de células B1a CD5<sup>pos</sup> nos compartimentos peritoneal, esplênico e medular de animais imunizados com o veneno *T. nattereri*. O lavado da cavidade peritoneal (A), o baço (B) e a medula óssea femoral (C) foram coletados após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da imunização com o veneno de *T. nattereri* para obtenção da suspensão celular que foi processada para marcação das células com os anticorpos anti-CD4 FITC, anti-CD45R/B220 PEcy5 e anti-CD5 PE e analisadas por citometria de fluxo. Células CD4 negativas B220 positivas foram analisadas quanto a expressão de CD5. Os números representam a média das porcentagens de células positivas acrescida do desvio-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.

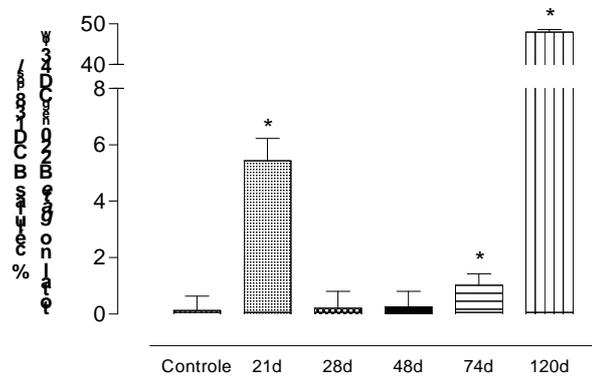
**(A) Células B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>**



**(B) Células B220<sup>low</sup> CD43<sup>low</sup> CD138<sup>+</sup>**

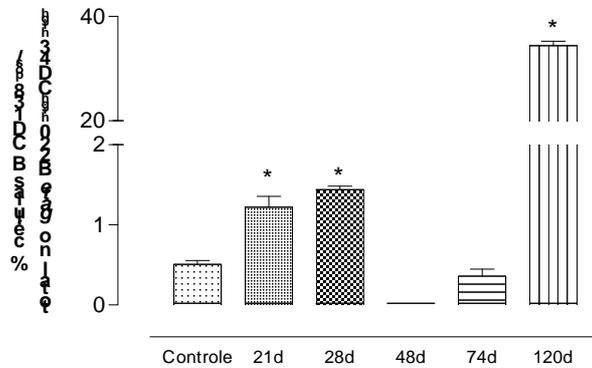


**(C) Células B220<sup>neg</sup> CD43<sup>low</sup> CD138<sup>+</sup>**

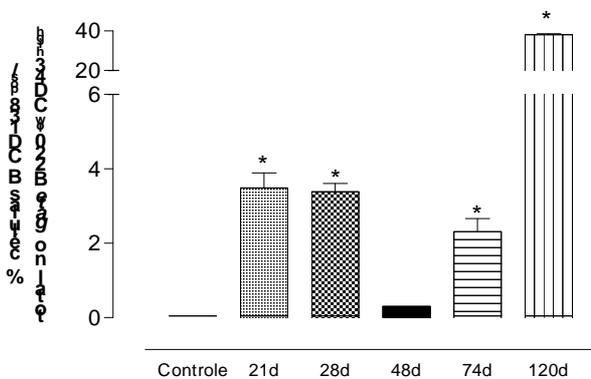


**Figura 8 – Porcentagem de células B de memória de vida longa (ASC) na cavidade peritoneal de animais imunizados com o veneno *T. nattereri*.** A cavidade peritoneal foi lavada após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da imunização para coleta da suspensão celular que foi processada para marcação das células com os anticorpos anti-CD43 FITC, anti-CD45R/B220 PEcy5, anti-CD138 PE e analisadas por citometria de fluxo. Os números representam a média das porcentagens de células positivas acrescida do desvio-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.

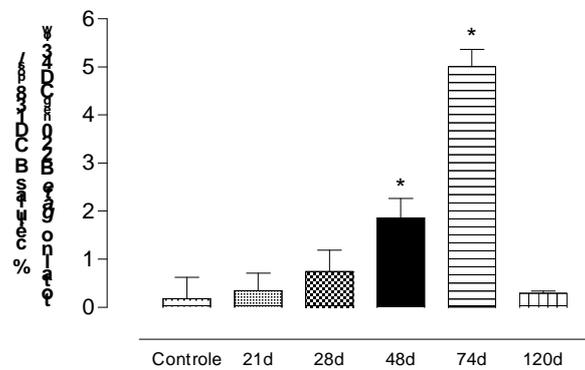
(A) Células B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>



(B) Células B220<sup>low</sup> CD43<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>

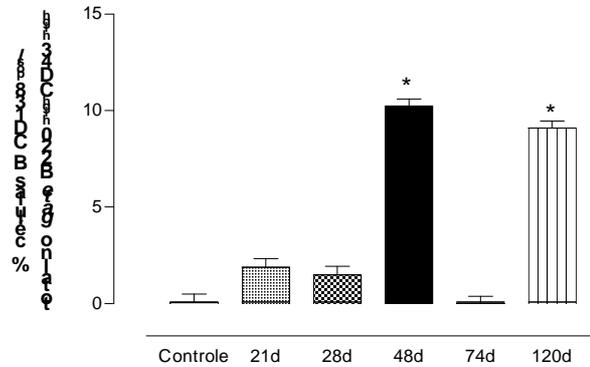


(C) Células B220<sup>neg</sup> CD43<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>

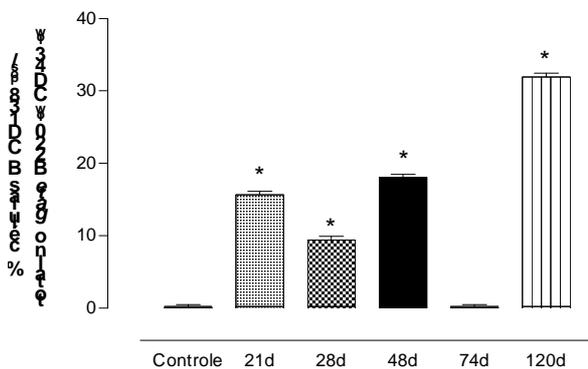


**Figura 9 – Porcentagem de células B de memória de vida longa (ASC) no baço de animais imunizados com o veneno *T. nattereri*.** O baço foi coletado após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da imunização para coleta da suspensão celular que foi processada para marcação das células com os anticorpos anti-CD43 FITC, anti-CD45R/B220 PEcy5, anti-CD138 PE e analisadas por citometria de fluxo. Os números representam a média das porcentagens de células positivas acrescida do desvio-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.

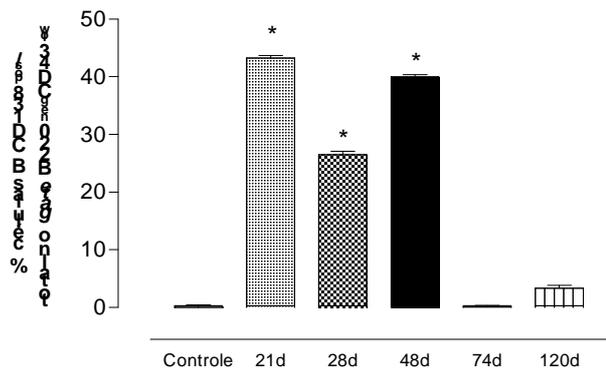
(A) Células B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>



(B) Células B220<sup>low</sup> CD43<sup>low</sup> CD138<sup>+</sup>



(C) Células B220<sup>neg</sup> CD43<sup>low</sup> CD138<sup>+</sup>



**Figura 10 – Porcentagem de células B de memória de vida longa (ASC) na medula óssea de animais imunizados com o veneno *T. nattereri*.** A medula óssea femoral foi coletada após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da imunização para coleta da suspensão celular que foi processada para marcação das células com os anticorpos anti-CD43 FITC, anti-CD45R/B220 PEcy5, anti-CD138 PE e analisadas por citometria de fluxo. Os números representam a média das porcentagens de células positivas acrescida do desvio-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.

## 4.2 Análise dos fatores envolvidos na manutenção da memória

### 4.2.1 Citocinas e quimiocinas induzidas na resposta de memória para o veneno de *T. nattereri*

Recentes evidências sugerem que a longevidade de linfócitos B é dependente de citocinas presentes nos compartimentos de memória (SZE et al., 2000; CASSESE et al., 2003). Assim, avaliamos os níveis de diferentes citocinas inflamatórias ou geradas por linfócitos T na medula e também no peritônio e no baço dos animais com resposta imune crônica ao veneno. Nossos resultados na **Figura 11** mostram a produção pelas células peritoneais de altos níveis de KC e persistentes por até 120 dias, e de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  somente durante as 2 primeiras semanas após a re-estimulação com o veneno. IL-6 não foi produzida de forma significativa pelas células peritoneais em resposta ao veneno.

A imunização dos animais com o veneno induziu pelas células esplênicas (**Figura 12**) a produção de KC somente em 28 dias, de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por até 48 dias, sendo que 120 dias após imunização altos níveis de TNF- $\alpha$  voltaram a ser detectados. E ao contrário das células peritoneais, as esplênicas produziram IL-6 por até 2 semanas após a re-estimulação com o veneno, re-aparecendo 120 dias após imunização.

Com relação à produção das citocinas e quimiocinas inflamatórias sintetizadas na medula óssea, os nossos resultados na **Figura 13** mostram que o veneno induziu a síntese de KC, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  somente nas 2 primeiras semanas após a re-estimulação com o veneno. Neste compartimento também não foi observada a produção de IL-6.

Em conjunto, os resultados das citocinas e quimiocinas inflamatórias mostram que: i) quanto à concentração: o veneno induziu a síntese de níveis aproximados nos diferentes compartimentos, exceto IL-6 que foi somente produzida pelas células esplênicas; ii) e quanto a duração: o veneno induziu níveis persistente de KC no local de resposta efetora (peritônio) e IL-6 e TNF- $\alpha$  no baço.

Considerando estudos anteriores que mostram que o veneno é capaz de induzir uma resposta imune específica mista caracterizada pela ativação de ambos os clones de linfócitos Th1 e Th2, com acentuada produção das citocinas IL-5 e IFN- $\gamma$  (GRUND et al., 2006) avaliamos além destas a síntese das citocinas IL-4, IL-13, IL-17A e IL-10 nos

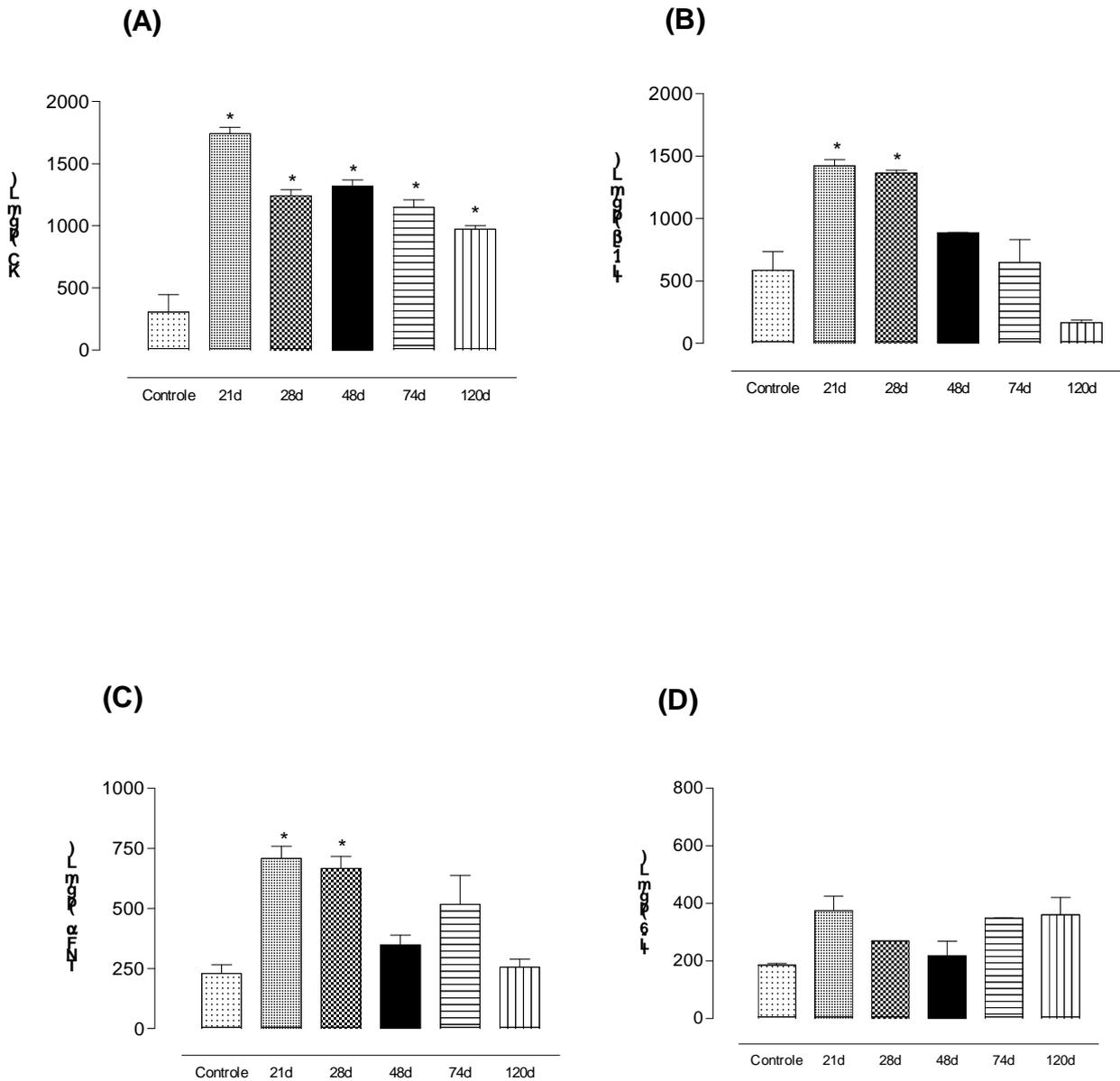
diferentes compartimentos. Podemos observar pelas **Figuras 14, 15, 16** que o veneno induziu altos, semelhantes e persistentes níveis de IL-5 no peritônio e baço e somente até 74 dias na medula óssea; a produção de IL-17A foi persistente e alta somente no baço, aparecendo no peritônio e na medula após 48 dias da imunização; IFN- $\gamma$  no peritônio foi produzida somente em 21 dias e no baço em 21, 48 e em 120 dias. Níveis persistentes por até 74 dias de IL-10 foram produzidos pelas células esplênicas, porém na medula óssea esta citocina foi somente observada em 48 dias após a imunização. Não houve produção significativa de IL-4 ou de IL-13 pelas células dos três compartimentos em nenhum período avaliado. Em resumo, podemos dizer que a resposta de memória ao veneno se dá pela persistente produção de IL-5 pelas células do peritônio e de IL-5, IL-17A e IFN- $\gamma$  pelas células do baço.

#### *4.2.1 Análise da presença do veneno de *T. nattereri* no baço*

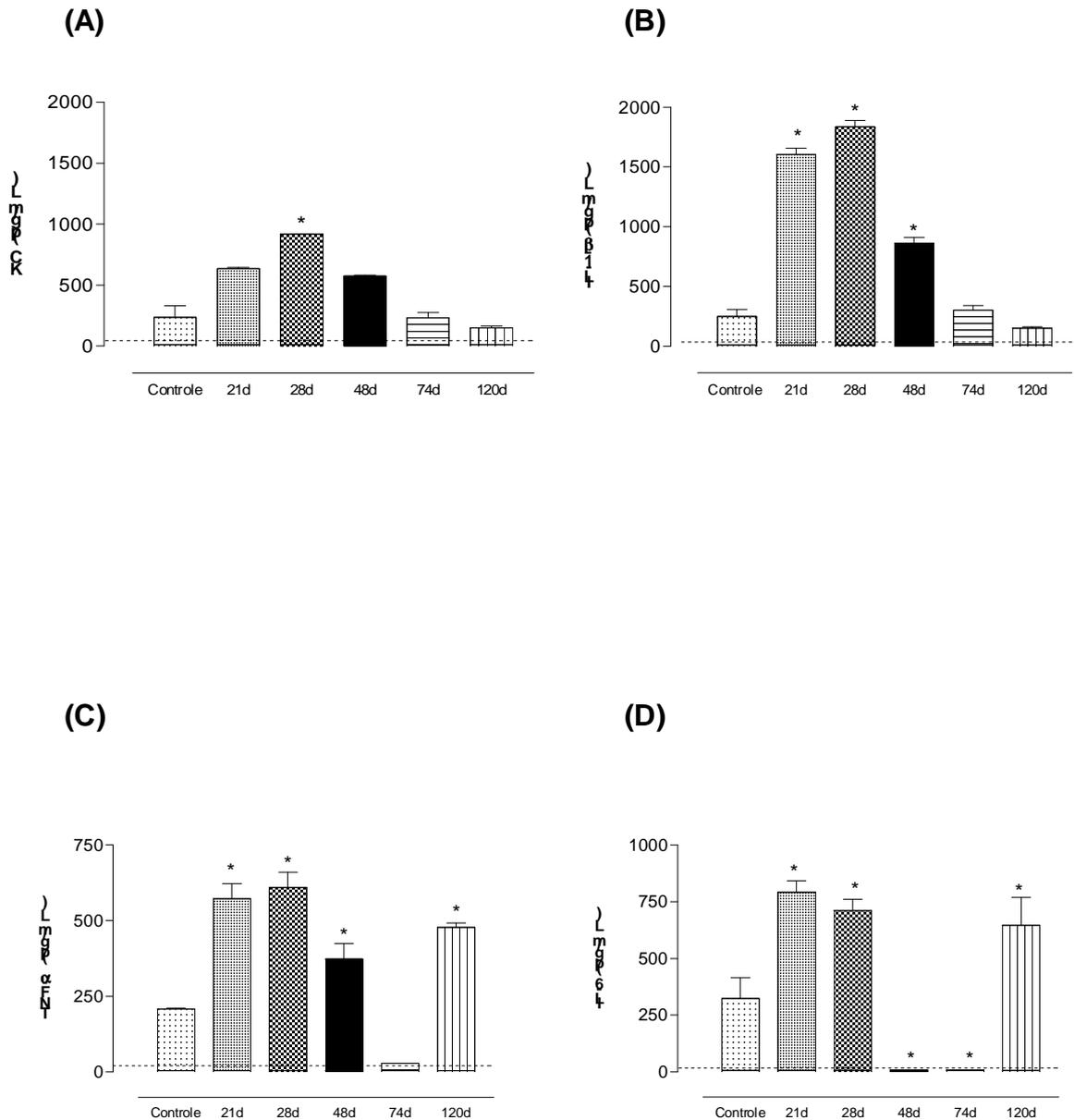
Além do envolvimento das citocinas na diferenciação de subtipos de células B, tem sido propostos e ainda discutidos outros mecanismos para explicar a produção persistente de anticorpos e o papel das células de vida longa na manutenção da resposta imunológica de memória (SLIFKA e AHMED, 1998). Traggiai e colaboradores (2003) reportaram os três principais mecanismos que sustentam os níveis séricos de anticorpos: 1) existência de células de longa vida; 2) ativação policlonal de células B de memória e 3) a persistência do antígeno, retido na forma de imunocomplexos na superfície de células dendríticas foliculares de origem mesenquimal (FDCs).

As FDCs estão localizadas no córtex, região denominada de área dependente de células B, nos folículos linfóides de órgãos como baço e linfonodos. Elas mantêm uma rede tridimensional estável que capturam e retêm por anos o complexo antígeno-anticorpo em organelas denominadas de icossomos. As FDCs são as grandes responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos B, participando da sua ativação e regulando a sobrevivência pela indução de morte por apoptose (TEW et al., 1997; IMAI et al., 1998).

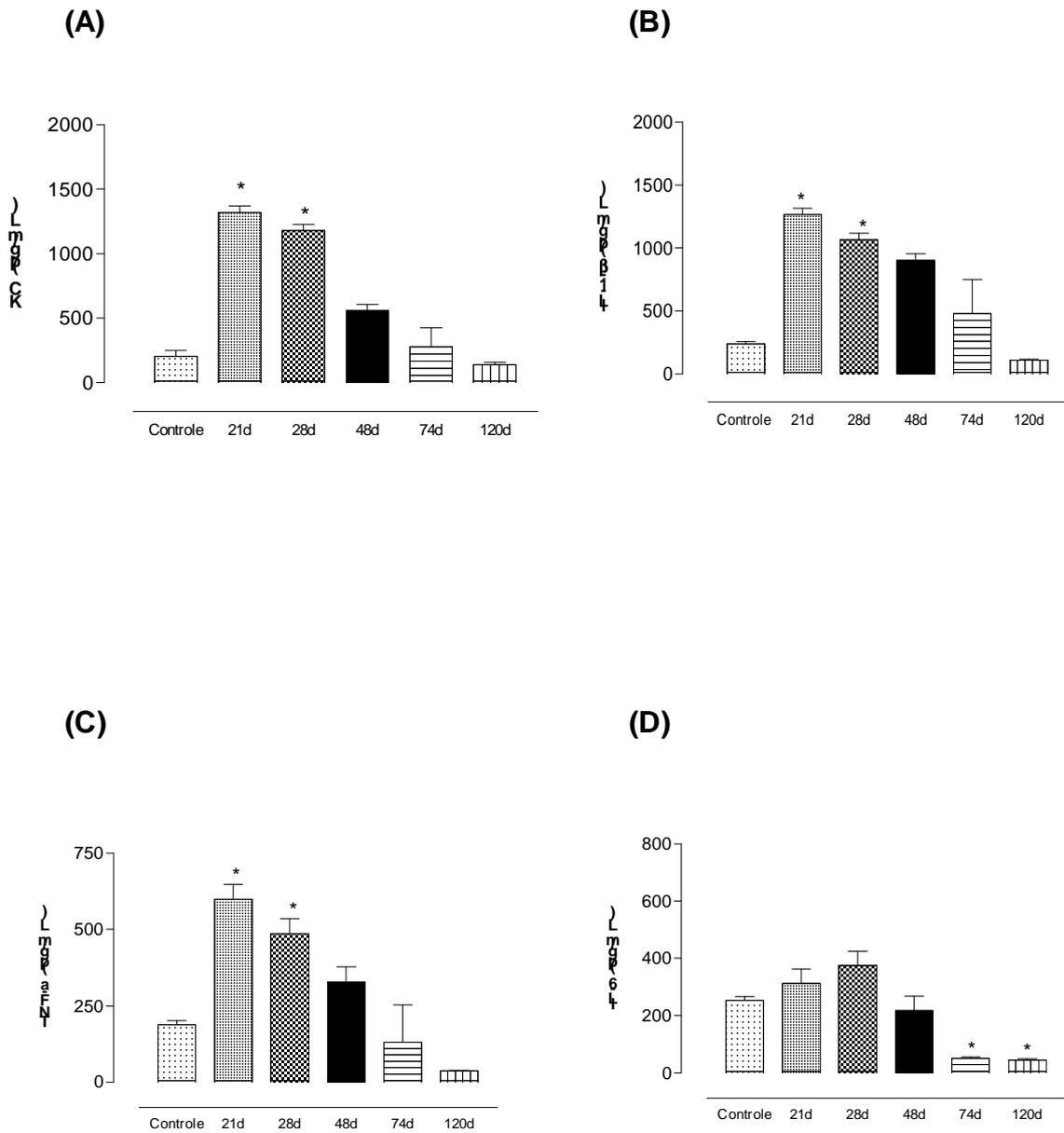
Os resultados na **Figura 17** mostram que a resposta de memória ao veneno é caracterizada pela sua retenção a partir de 21 dias e com um pico em entre 28 e 48 dias (*C* e *D*), mantendo-se presente por até 120 dias da imunização na zona clara do centro germinativo, local rico em FDCs, onde ocorrerá seleção de clones de células B que expressam BCR de alta afinidade, seguindo por hipermutação somática.



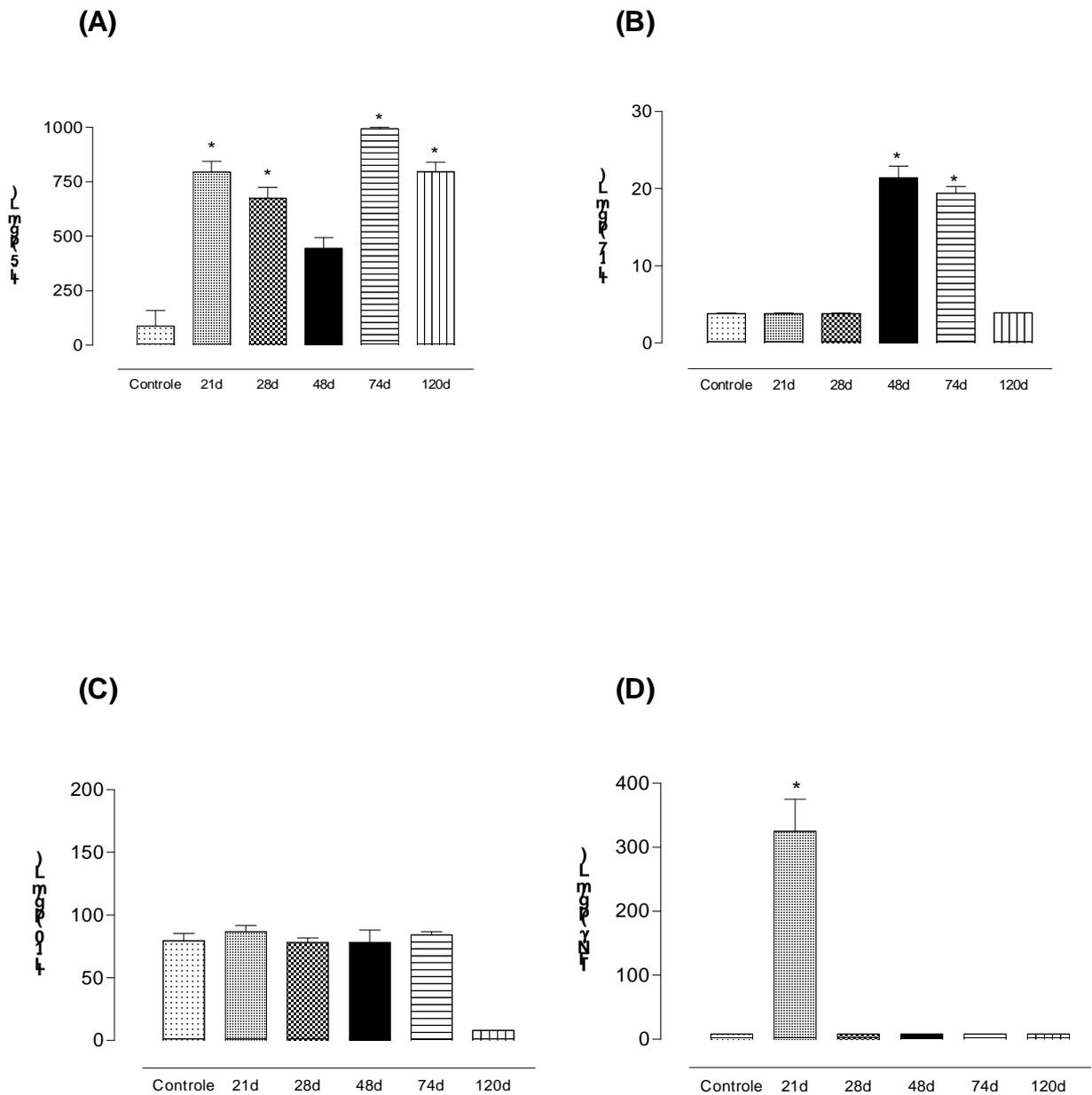
**Figura 11- Citocinas inflamatórias e quimiocinas produzidas pelas células peritoneais em resposta à imunização com o veneno de *T. nattereri*.** A cavidade peritoneal foi lavada após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da imunização para coleta da suspensão celular que foi processada para determinação da presença de KC, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 por ELISA. O limite de detecção para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 foi de 7.8 pg/mL e de 15.6 pg/mL para KC. Cada barra representa a média do grupo acrescida do desvio-padrão. Os dados são referentes a dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.



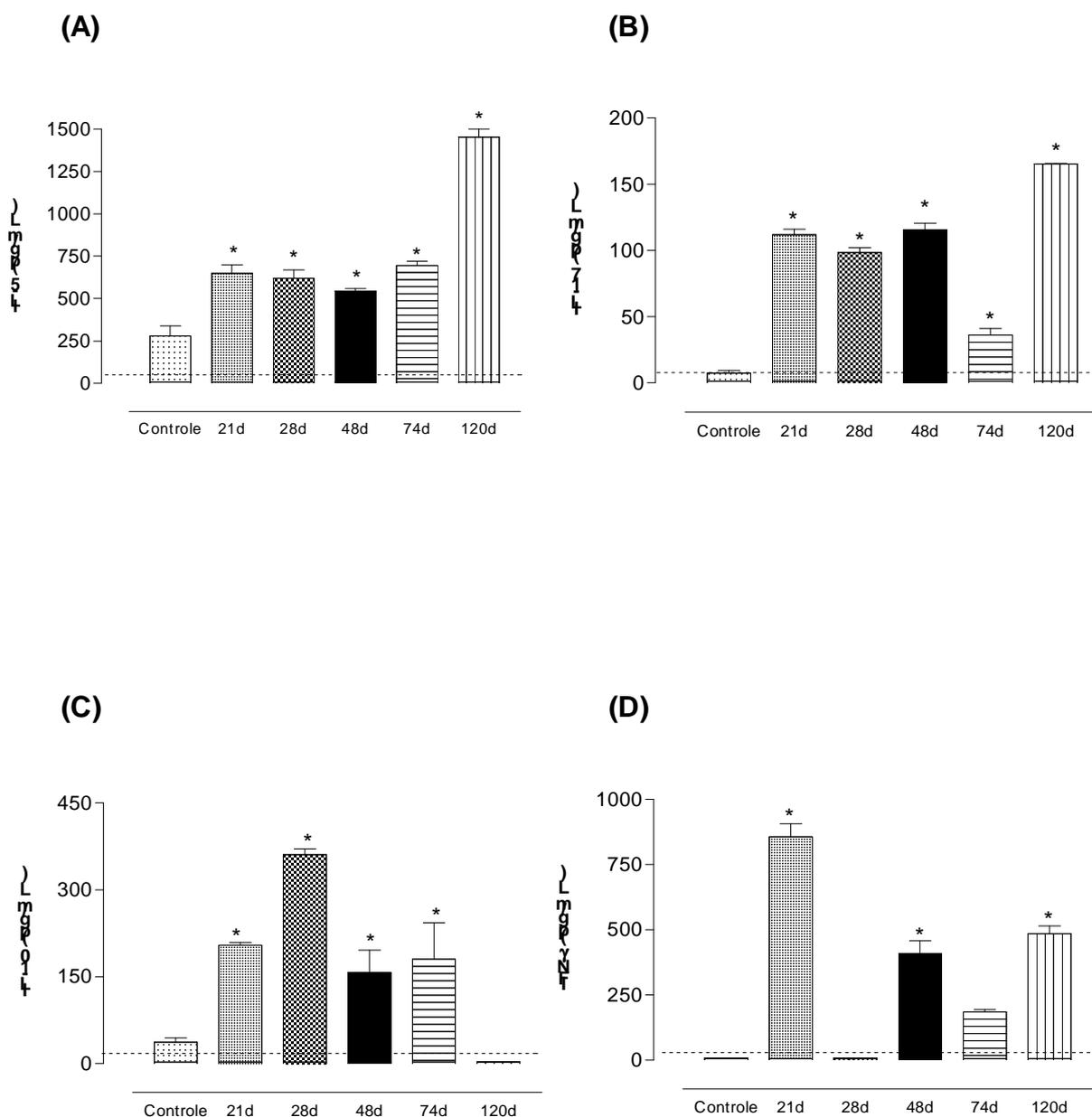
**Figura 12- Citocinas inflamatórias e quimiocinas produzidas pelas células esplênicas em resposta à imunização com o veneno de *T. nattereri*.** O baço foi coletado após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da imunização para obtenção da suspensão celular que foi re-estimulada *in vitro* na presença do veneno por até 72 h. O sobrenadante foi coletado para determinação da presença de KC, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 por ELISA. O limite de detecção para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 foi de 7.8 pg/mL e de 15.6 pg/mL para KC. Cada barra representa a média do grupo acrescida do desvio-padrão. A linha tracejada representa a média das citocinas avaliadas no sobrenadante das células do grupo controle sem estimulação. Os dados são referentes a dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.



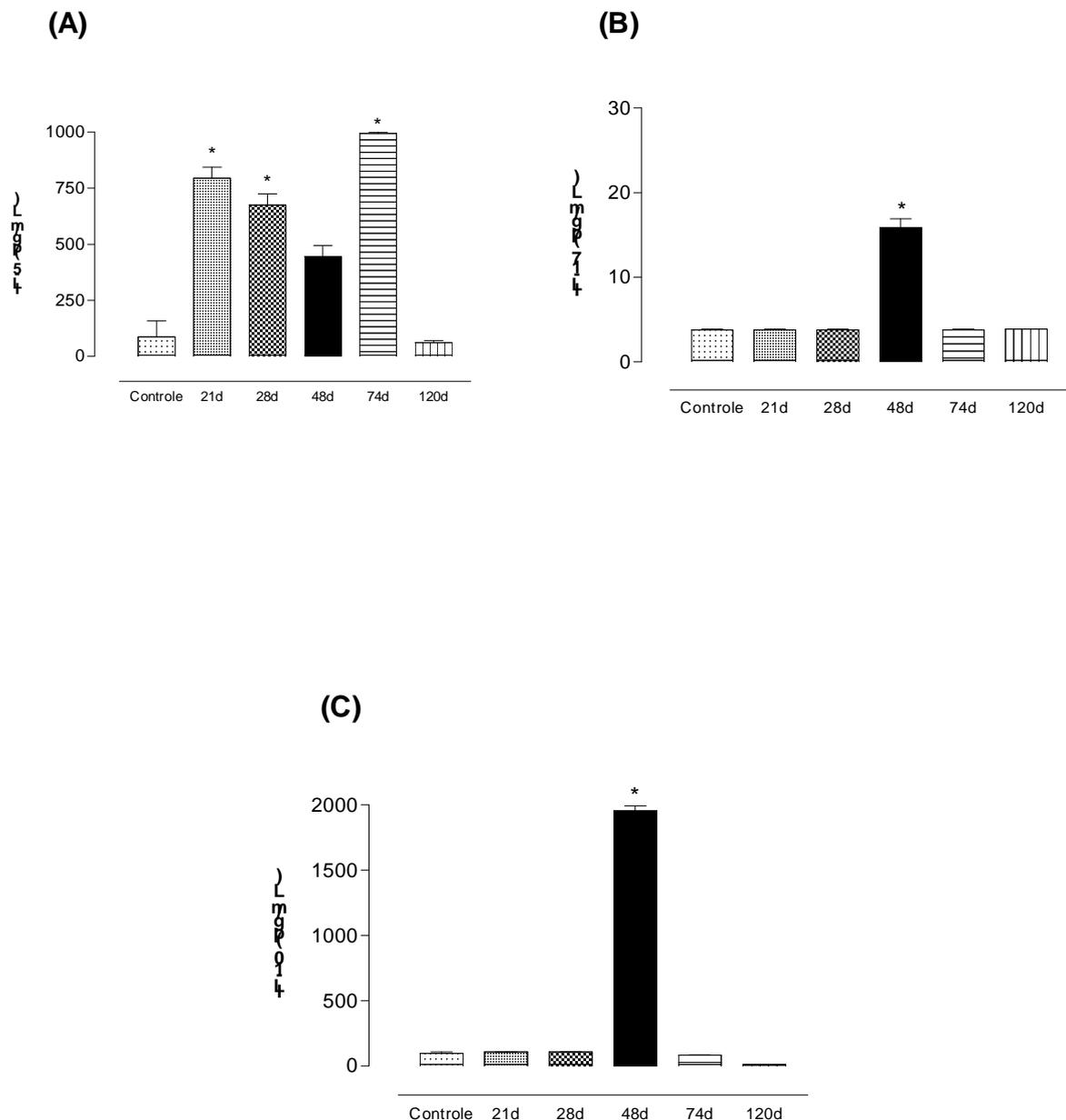
**Figura 13 – Citocinas inflamatórias e quimiocinas produzidas pelas células da medula óssea em resposta à imunização com o veneno de *T. nattereri*.** A medula óssea femoral foi coletada após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da imunização para obtenção da suspensão celular que foi processada para determinação da presença de KC, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 por ELISA. O limite de detecção para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 foi de 7.8 pg/mL e de 15.6 pg/mL para KC. Cada barra representa a média do grupo acrescida do desvio-padrão. Os dados são referentes a dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.



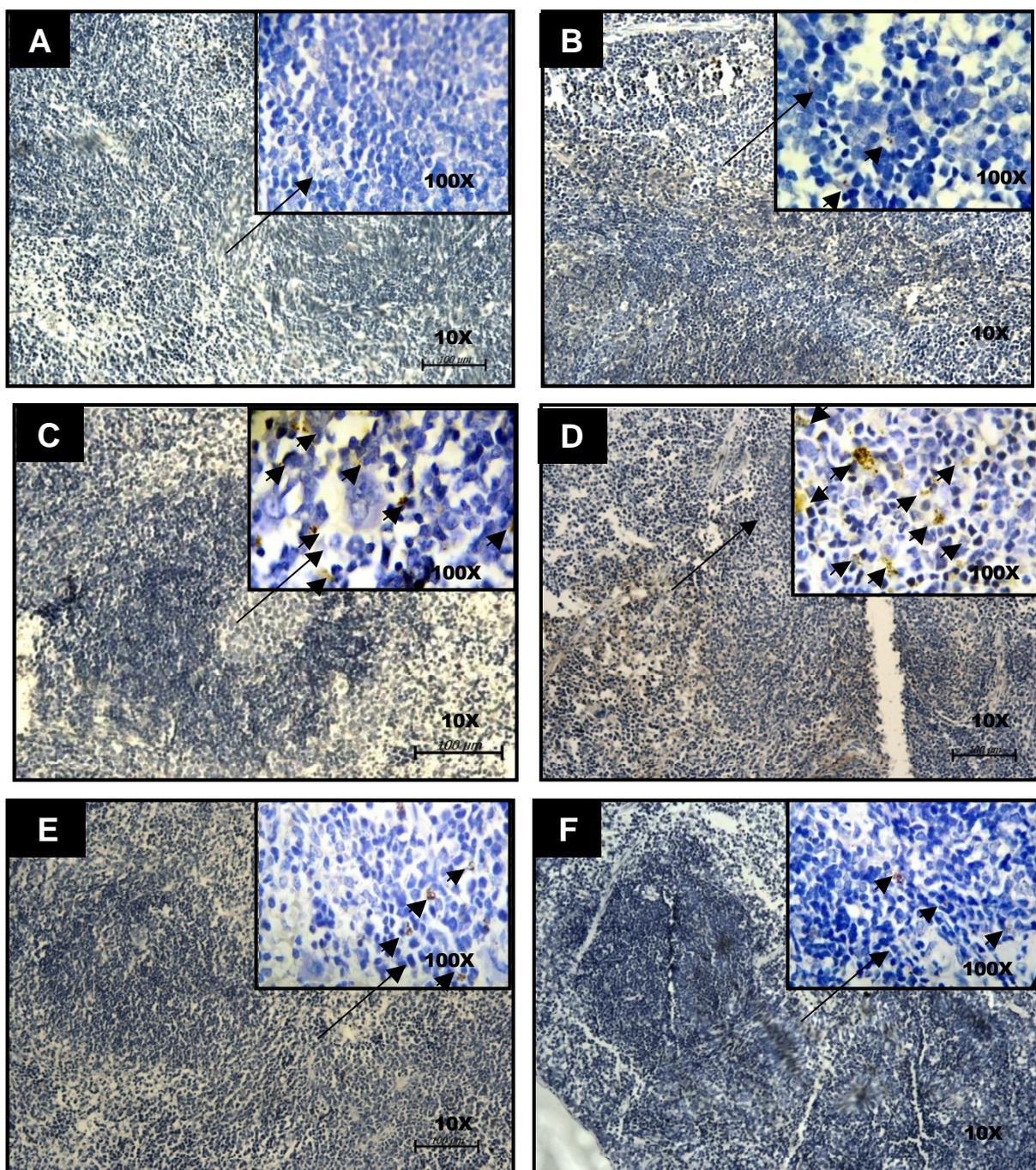
**Figura 14 – Níveis das citocinas IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A produzidas pelas células peritoneais em resposta à imunização com o veneno de *T. nattereri*.** A cavidade peritoneal foi lavada nos dias após 21, 28, 48, 74 e 120 da imunização para coleta da suspensão celular que foi processada para determinação da presença das citocinas por ELISA. O limite de detecção para citocinas foi de 7.8 pg/mL. Cada barra representa a média do grupo acrescida do desvio-padrão. Os dados são referentes a dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.



**Figura 15 – Níveis das citocinas IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A produzidas pelas células splênicas em resposta à imunização com o veneno de *T. nattereri*.** O baço foi coletado nos após dias 21, 28, 48, 74 e 120 da imunização para obtenção da suspensão celular que foi cultivada na presença de veneno de *T. nattereri* por até 72 h. As citocinas foram avaliadas no sobrenadante celular por ELISA. O limite inferior de detecção foi de 7,8 pg/mL. Cada barra representa a média do grupo acrescida do desvio-padrão. A linha tracejada representa a média das citocinas avaliadas no sobrenadante das células do grupo controle sem estimulação. Os dados são referentes a dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.



**Figura 16 – Níveis das citocinas IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17A produzidas pelas células da medula óssea em resposta à imunização com o veneno de *T. nattereri*.** A medula óssea femoral foi coletada após nos dias 21, 28, 48, 74 e 120 da imunização para obtenção da suspensão celular que foi processada para determinação da presença de citocinas por ELISA. O limite de detecção para citocinas foi de 7.8 pg/mL. Cada barra representa a média do grupo acrescida do desvio-padrão. Os dados são referentes a dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao controle. IFN- $\gamma$  não foi detectada em nenhum dos grupos analisados.



**Figura 17 – Presença do veneno de *T. nattereri* no baço de animais imunizados.** Baços coletados após 21, 28, 48, 74 e 120 dias da imunização com o veneno de *T. nattereri* foram cortados a 2  $\mu\text{m}$  de espessura, parafinizados e marcados com anticorpos anti-veneno de *T. nattereri* produzidos em camundongos. As células foram contra-coradas com hematoxilina-eosina (HE) e visualizadas ao microscópio óptico.

### **4.3 Avaliação do papel das citocinas IL-5 e IL-17A na diferenciação e manutenção de células B de memória induzida pelo veneno**

#### *4.3.1 Resposta imune de memória induzida pelo veneno de *T. nattereri* após tratamento*

Recentemente, Cassese e colaboradores (2003) demonstraram o envolvimento de fatores do micro-ambiente como IL-5, IL-6, TNF $\alpha$  e SDF-1 na regulação de células ASC. Já nossos resultados demonstram que além destas, a quimiocina KC e as citocinas IL-5 e IL-17A podem também suportar a sobrevivência das células ASC, uma vez que ocorreu a produção persistente nos três compartimentos. Com o objetivo de estudarmos o papel das citocinas derivadas de linfócitos T (IL-5 e IL-17A) na diferenciação de células B induzida pelo veneno e na tentativa de melhor esclarecer o complexo processo de diferenciação e sobrevivência das ASCs, tratamos os animais com anticorpos anti-IL-5 e anti-IL-17A, 30 minutos antes da imunização e da dose reforço com o veneno de *T. nattereri* (**Figura 18**) e analisamos os animais em 28 e 74 dias.

Como representado na **Figura 19A e B**, o tratamento com ambos os anticorpos neutralizantes diminuiu a produção de IgG1 e IgG2a veneno-específicos em 28 dias, e em 74 dias após a imunização somente o tratamento com os anticorpos anti-IL-5 reduziram discretamente os níveis de IgG1 veneno-específicos. A síntese de IgE total foi somente afetada pelo tratamento com os anticorpos anti-IL-5 em 28 dias (**Figura 19C**), porém animais tratados com ambos os anticorpos não produziram IgE veneno-específica (**Figura 19D**).

Ademais, a análise do baço mostrou que o tratamento com ambos os anticorpos não foi capaz de reverter a esplenomegalia (**Figura 20A**) ou a formação de centros germinativos (**Figura 21**) induzidos pelo veneno, sugerindo uma dissociação entre o aumento de tamanho do baço e a presença destas citocinas. No entanto, a ausência das citocinas IL-5 e IL-17A induziram uma diminuição no número total de esplenócitos em 74 dias, quando comparado aos animais imunizados, tratados ou não com o anticorpo controle GL113 (**Figura 20B**) e diminuiu o número de células B Ig<sup>pos</sup> induzidas pelo veneno tanto 28 quanto 74 dias após a imunização (**Figura 22**).

### 4.3.2 Análise da diferenciação de linfócitos B induzida pelo veneno de *T. nattereri* após tratamento com anticorpos neutralizantes

#### 4.3.2.1 Linfócitos B1a

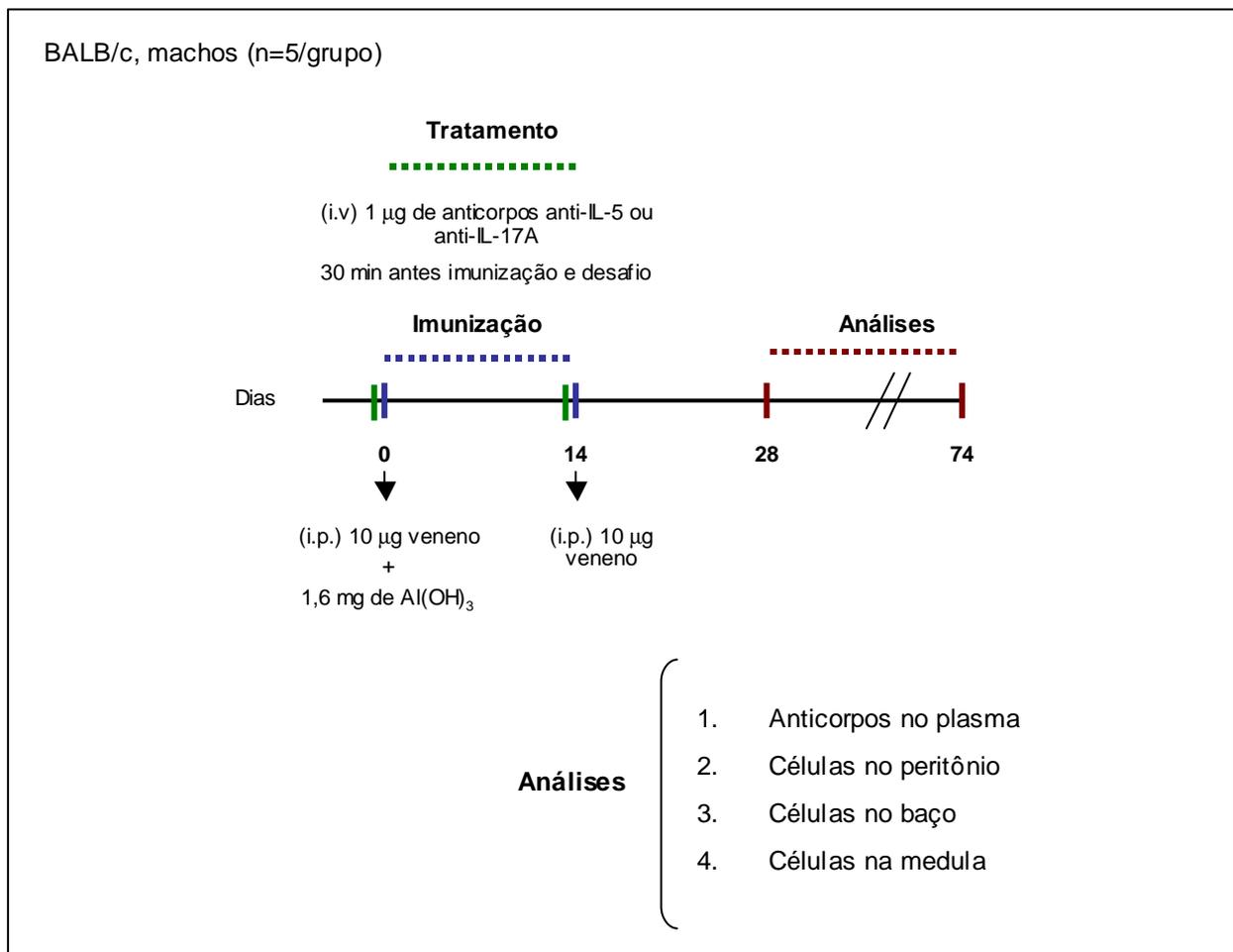
Com relação à população de células B B1a verificamos uma grande expansão peritoneal e medular em camundongos tratados com ambos os anticorpos, nos dois períodos de tempo se comparados aos animais imunizados e tratados com o anticorpo controle GL113 (**Figura 23 A e C**). Ao contrário, no baço a população de células B1a induzida pelo veneno diminuiu drasticamente após os tratamentos (**Figura 23B**).

#### 4.3.2.2 Linfócitos B de memória secretores de anticorpos de longa vida (ASC)

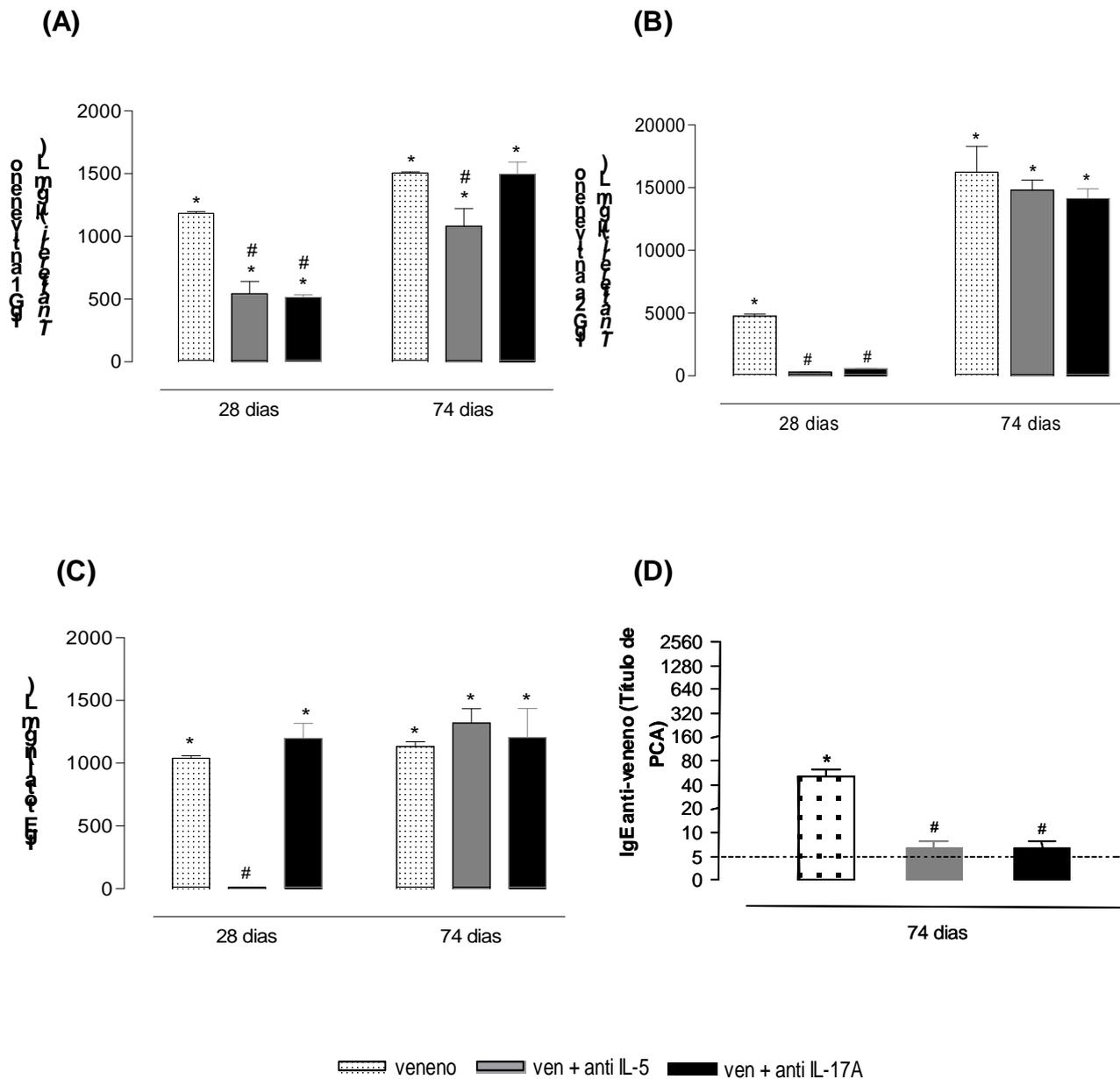
Os animais imunizados com o veneno, como descrito anteriormente, apresentavam no mínimo três populações celulares que variavam quando à expressão de B220 (high, low e negativas). Verificamos que no peritônio o tratamento com ambos os anticorpos induziu nos dois períodos de tempo somente a subpopulação de ASC B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup>, sendo o tratamento com anti-IL-5 potente na indução de elevado número destas células em 74 dias (**Figura 24**).

No baço, após o tratamento observamos uma maior porcentagem de ASC B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> em 28 e 74 dias (**Figura 25A**) e de ASC B220<sup>low</sup> CD43<sup>high</sup> em 74 dias (**Figura 25B**). Ao contrário, uma diminuição da população ASC B220<sup>low</sup> CD43<sup>high</sup> foi vista em 28 dias (**Figura 25B**) e de B220<sup>neg</sup> CD43<sup>high</sup> em 74 dias (**Figura 25C**).

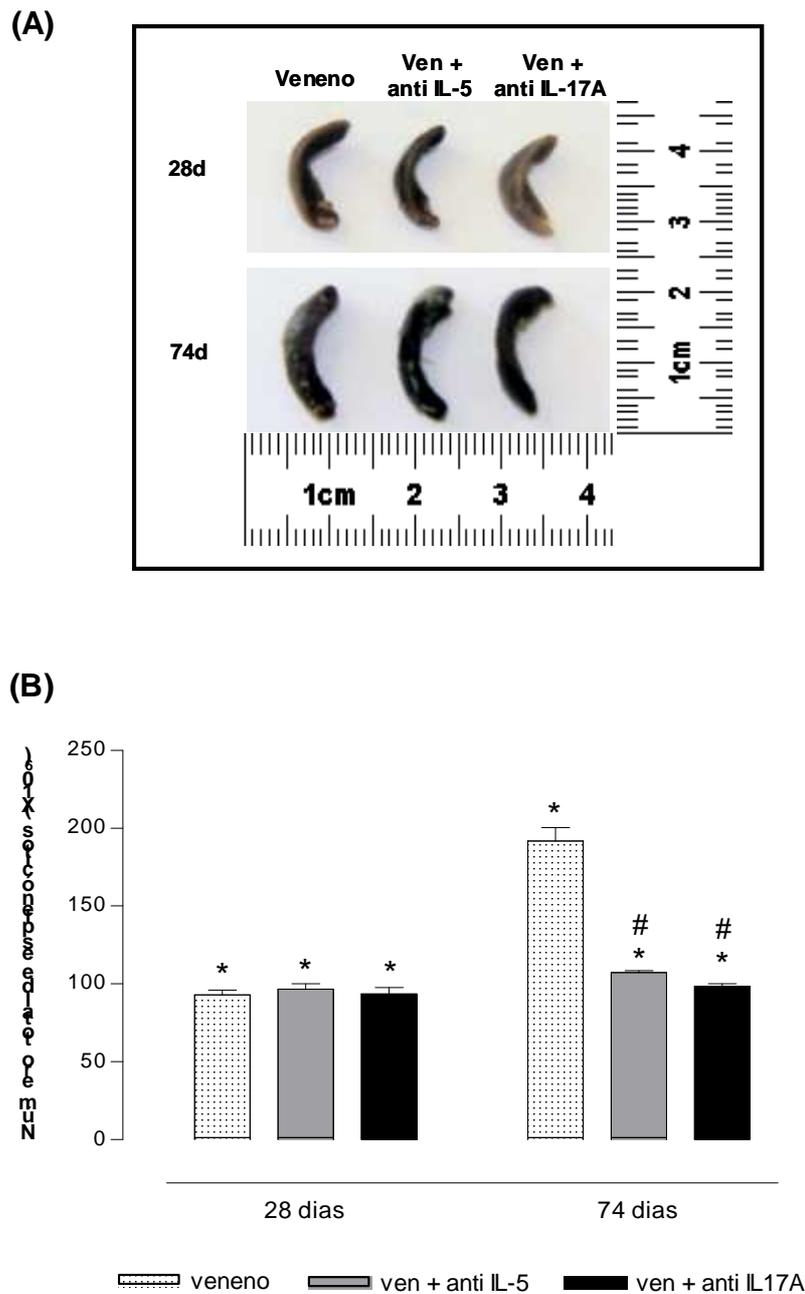
Na medula óssea, ambos os tratamentos induziram aumento somente em 28 dias das populações de ASC B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> (**Figura 26A**) e ASC B220<sup>low</sup> CD43<sup>low</sup> (**Figura 26B**) e uma nova população de ASC com fenótipo B220<sup>high</sup> CD43<sup>low</sup> foi induzida nos dois tempos pelo tratamento com anti-IL-5 (**Figura 26C**).



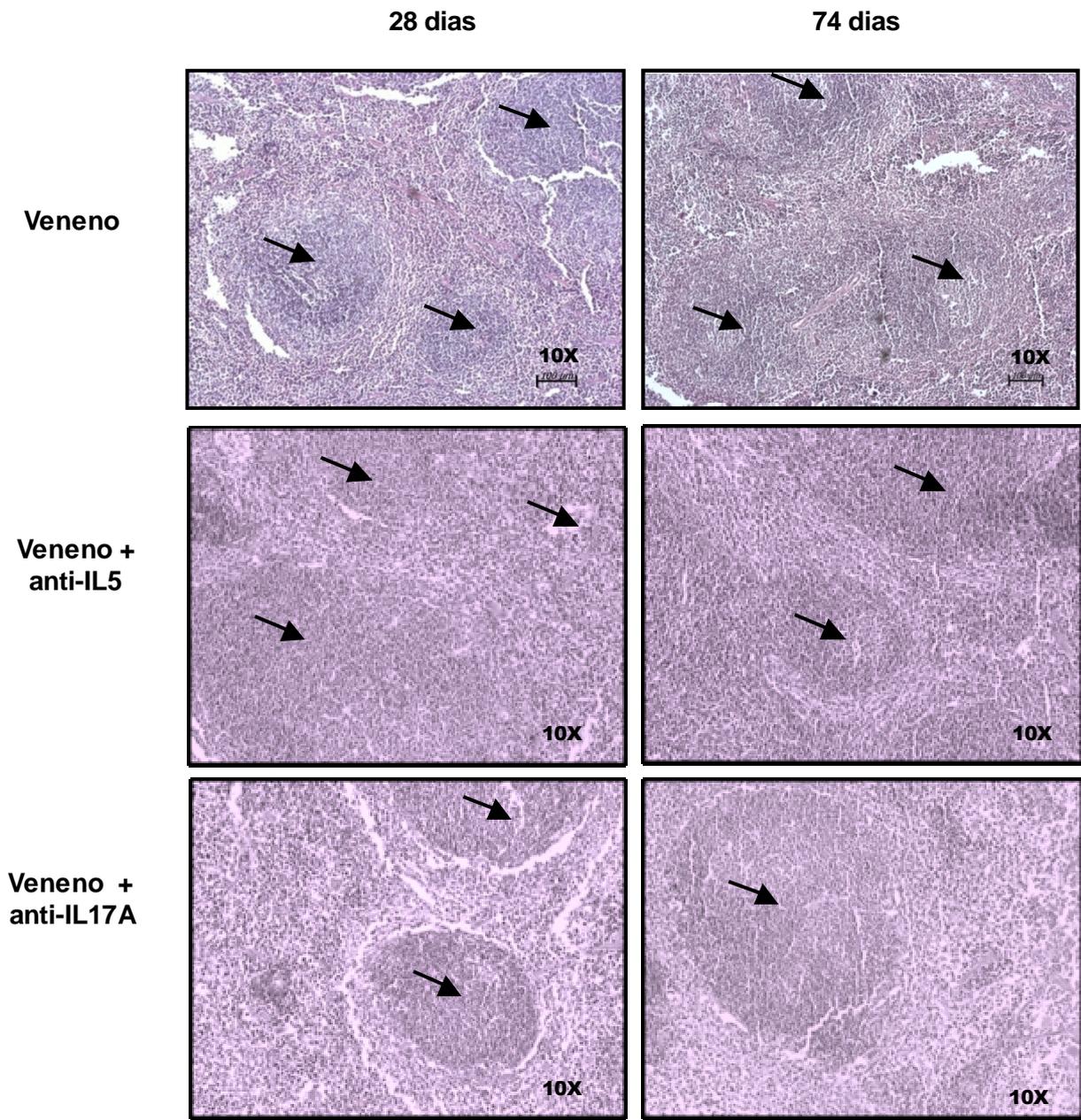
**Figura 18 – Protocolo de neutralização das citocinas IL-5 e IL-17A em animais imunizados com o veneno de *T. nattereri*.** Camundongos imunizados com o veneno de *T. nattereri* foram tratados via intravenosa com 1 µg/animal dos anticorpos neutralizantes anti-IL-5 ou anti-IL-17A, 30 minutos antes da imunização e da dose reforço. Animais controle receberam apenas o veneno e foram tratados com anticorpo controle GL113. Os animais foram mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral para posterior identificação dos diferentes subtipos de linfócitos B nesses compartimentos.



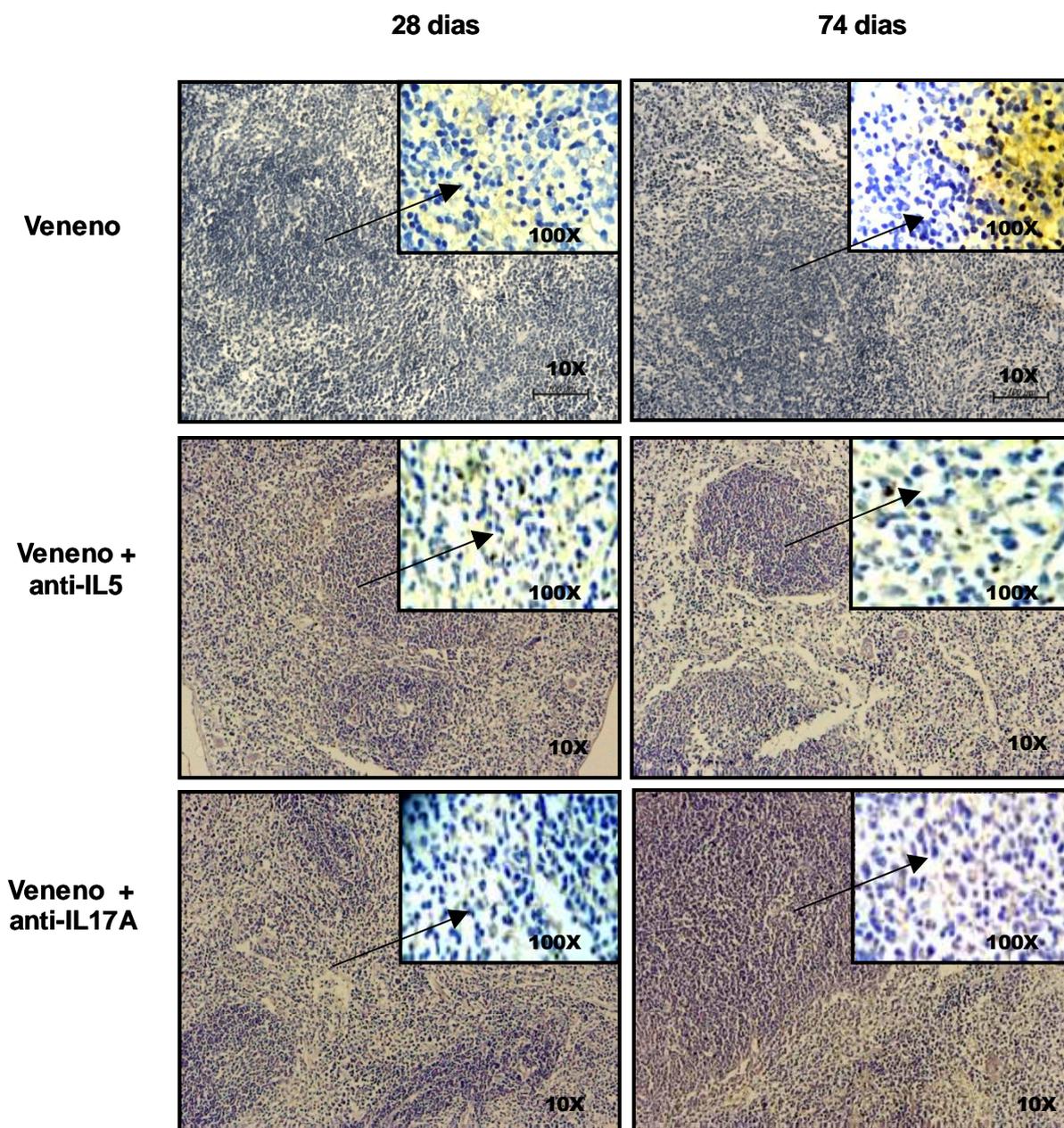
**Figura 19** – Níveis plasmáticos de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE após neutralização de IL-5 e IL-17A em animais imunizados com o veneno de *T. nattereri*. Os animais imunizados com o veneno e tratados com os anticorpos anti-IL-5 ou anti-IL-17A foram sangrados após 28 ou 74 dias da imunização para obtenção do plasma para dosagem dos anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) veneno-específicos e IgE total (C) por Elisa. Anticorpos IgE específicos foram determinada por PCA 74 dias após imunização (D). Os títulos de PCA representam a recíproca da maior diluição do pool de plasmas que apresentaram uma reação cutânea positiva com diâmetro > 5 mm. As barras representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão. \* $p < 0,05$  em relação ao controle e # $p < 0,05$  em relação ao grupo veneno.



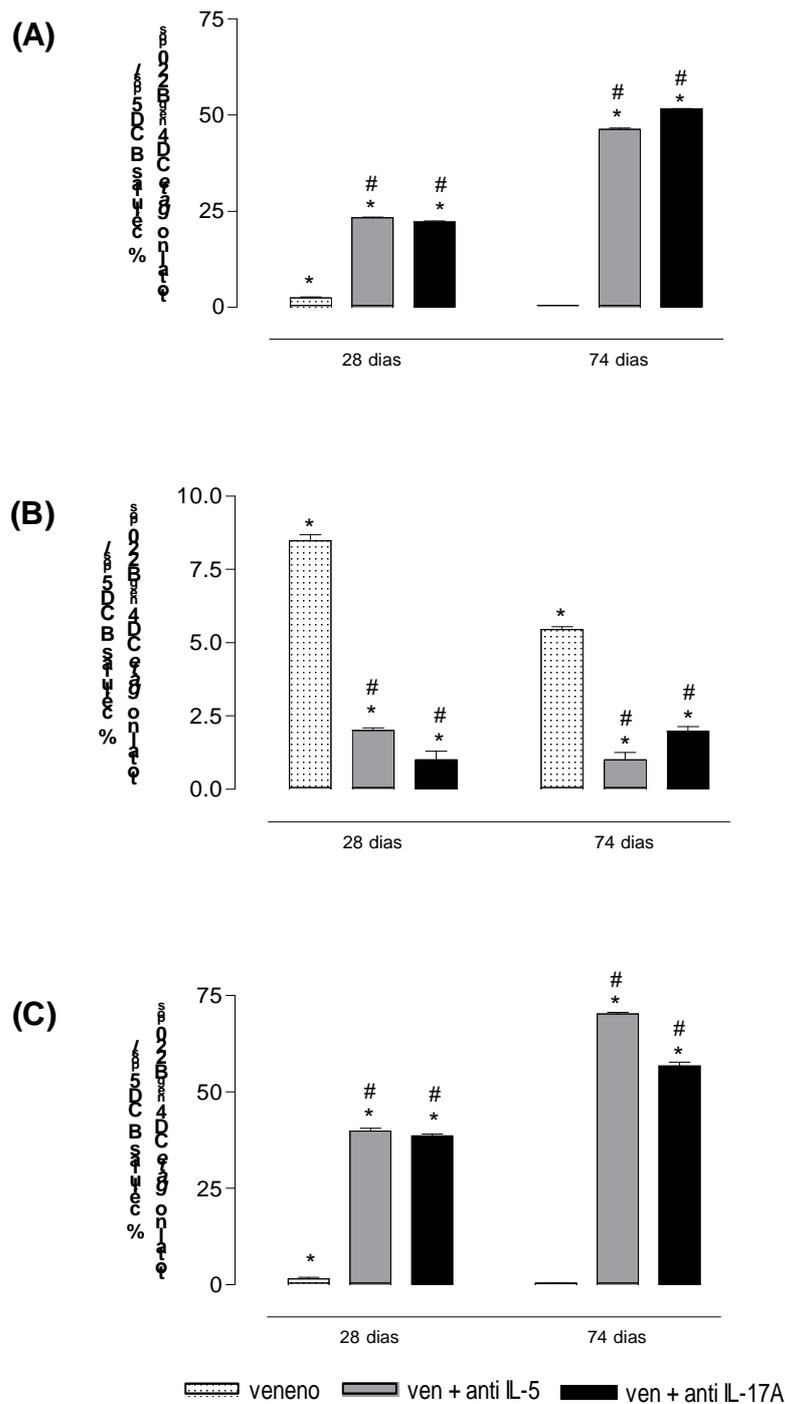
**Figura 20 – Avaliação de esplenomegalia após a neutralização de IL-5 e IL-17A em animais imunizados com o veneno de *T. nattereri*.** Os animais imunizados com o veneno e tratados com os anticorpos anti-IL-5 ou anti-IL-17A tiveram os baços removidos nos dias 28 e 74 após a imunização para observação de esplenomegalia (A) ou contagem do número de leucócitos (B). Cada barra representa a média do grupo acrescida do desvio-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação aos animais que receberam somente adjuvante e # $p < 0,05$  em relação aos animais imunizados com o veneno.



**Figura 21 – Análise histológica do baço de animais imunizados com o veneno de *T. nattereri* após o tratamento com anticorpos anti-IL-5 ou anti-IL-17A.** Os baços foram coletados após 28 ou 74 dias para realização de análise histológica. O órgão foi cortado a 2 µm de espessura, parafinado e corado com hematoxilina- eosina (HE).

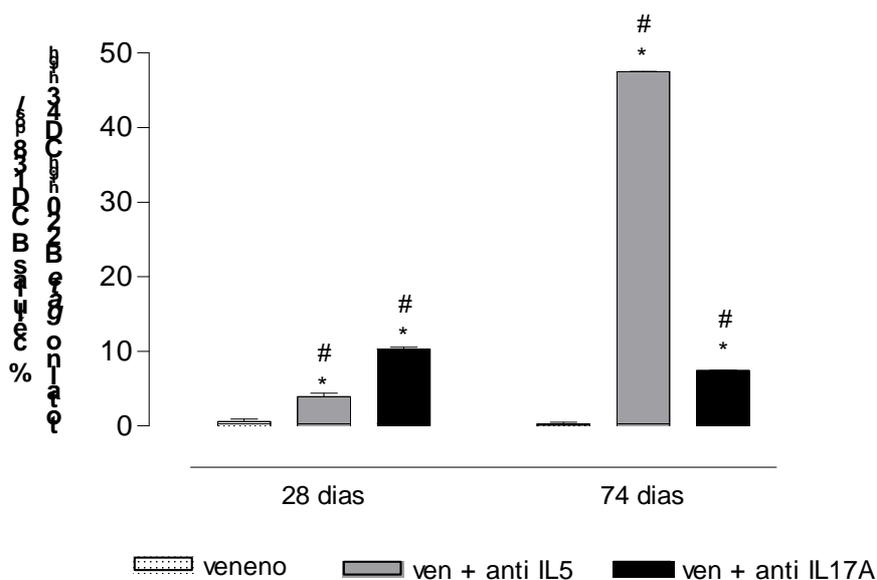


**Figura 22 - Imunolocalização em células esplênicas de linfócitos B produtores de imunoglobulinas após neutralização de IL-5 e IL-17A.** Os animais imunizados com o veneno e tratados com os anticorpos anti-IL-5 ou anti-IL-17A tiveram os baços coletados após 28 ou 74 dias da imunização com o veneno de *T. nattereri* para processamento e marcação com o anticorpo anti-Ig de camundongo. As células foram contra-coradas com hematoxilina-eosina (HE) e visualizadas ao microscópio óptico.



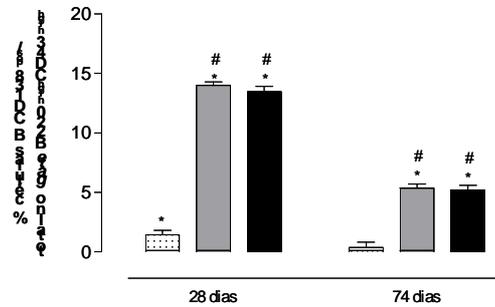
**Figura 23 – Porcentagem de células B1a CD5<sup>pos</sup> nos compartimentos peritoneal (A), esplênico (B) e medular (C) de animais tratados com os anticorpos anti-IL-5 e anti-IL-17A.** Os animais imunizados com o veneno foram tratados com 1 µg/animal dos anticorpos anti-IL-5 e anti-IL-17A 30 minutos antes da imunização e da dose reforço. As células foram coletadas após 28 ou 74 dias da imunização com veneno de *T. nattereri* e marcadas com os anticorpos anti-CD4 FITC, anti-CD45R/B220 PECy5 e anti-CD5 PE e analisadas por citometria de fluxo. Os números representam a média das porcentagens de células positivas acrescida do desvio-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes \**p* < 0,05 em relação aos animais que receberam somente adjuvante e #*p* < 0,05 em relação aos animais imunizados com o veneno.

(A) Células B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>

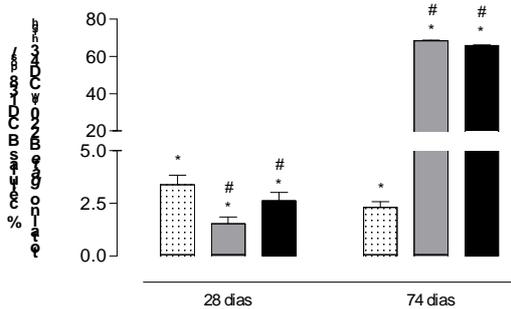


**Figura 24 – Porcentagem de células B de memória de vida longa (ASC) na cavidade peritoneal de animais tratados com os anticorpos anti IL-5 e anti IL-17A.** Os animais imunizados com o veneno foram tratados com 1 µg/animal dos anticorpos anti-IL-5 ou anti-IL-17A, 30 minutos antes da imunização e da dose reforço. A cavidade peritoneal foi lavada nos dias 28 e 74 após a imunização e as células marcadas com os anticorpos anti-CD43 FITC, anti-CD45R/B220 PECy5, anti-CD138 PE e analisadas por citometria de fluxo. Os números representam a média das porcentagens de células positivas acrescida do desvio-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \**p* < 0,05 em relação aos animais que receberam somente adjuvante e #*p* < 0,05 em relação aos animais imunizados com o veneno.

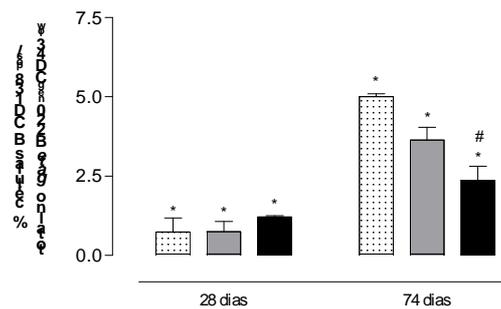
**(A) Células B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>**



**(B) Células B220<sup>low</sup> CD43<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>**



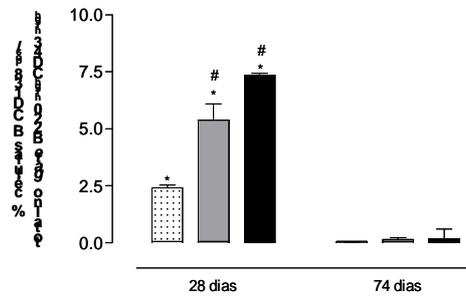
**(C) Células B220<sup>neg</sup> CD43<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>**



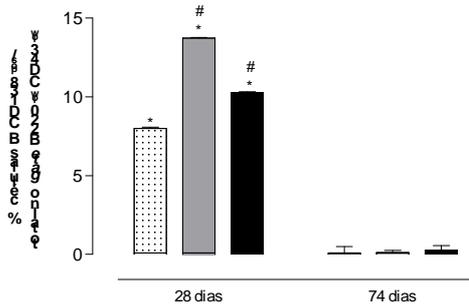
veneno    ven + anti IL-5    ven + anti IL-17A

**Figura 25 – Porcentagem de células B de memória de vida longa (ASC) no baço de animais tratados com anticorpos anti IL-5 e anti IL-17A.** Os animais imunizados com o veneno e tratados com os anticorpos anti-IL-5 e anti-IL-17A tiveram os baços coletados nos dias 28 e 74 após a imunização para obtenção da suspensão celular e marcação com os anticorpos anti-CD43 FITC, anti-CD45R/B220 PEcy5, anti-CD138 PE e analisadas por citometria de fluxo. Os números representam a média das porcentagens de células positivas acrescida do desvio-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \**p* < 0,05 em relação aos animais que receberam somente adjuvante e #*p* < 0,05 em relação aos animais imunizados com o veneno.

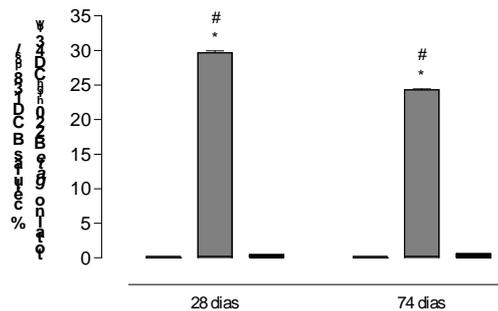
**(A) Células B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>**



**(B) Células B220<sup>low</sup> CD43<sup>low</sup> CD138<sup>+</sup>**



**(A1) Células B220<sup>high</sup> CD43<sup>low</sup> CD138<sup>+</sup>**

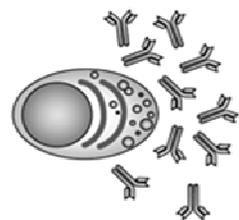


veneno    ven + anti IL-5    ven + anti IL-17A

**Figura 26 – Porcentagem de células B de memória de vida longa (ASC) na medula óssea de animais tratados com os anticorpos anti IL-5 e anti IL-17A.** Os animais imunizados com o veneno e tratados com os anticorpos neutralizantes anti-IL-5 e anti-IL-17A tiveram a medula óssea femoral coletada nos dias 28 e 74 após a imunização e as células marcadas com os anticorpos anti-CD43 FITC, anti-CD45R/B220 PEcy5, anti-CD138 PE e analisadas por citometria de fluxo. Os números representam a média das porcentagens de células positivas acrescida do desvio-padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação aos animais que receberam somente adjuvante e # $p < 0,05$  em relação aos animais imunizados com o veneno.

---

## *Discussão*



## 5 DISCUSSÃO

Investigamos recentemente padrões de expressão de moléculas nas células esplênicas de animais imunizados com o veneno de *T. nattereri* e os resultados obtidos mostraram uma diminuição na expressão de CD45R/B220 em linfócitos B com crescente aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Verificamos ainda que o veneno em baixa concentração estimula a produção de altos e persistentes níveis de anticorpos IgG específicos e estimula a diferenciação de linfócitos T para os dois principais subtipos, Th1 e Th2, com intensa produção de IL-5 (GRUND et al., 2006). A presença de um grande número de linfócitos T e altos níveis de anticorpos IgG específicos indica que células com funções efetoras e de memória foram geradas em resposta ao veneno. Portanto nossa hipótese de trabalho é que a resposta imune gerada contra o veneno se caracteriza pela formação de memória e diferenciação de células B produtoras de anticorpos negativas para a molécula B220, denominadas células B de memória secretoras de anticorpos de longa vida (*antibody secreting cells* –ASC).

Inicialmente, utilizamos um protocolo de indução de memória de acordo com McHeyzer-Williams e colaboradores (2000). Camundongos BALB/c imunizados com o veneno foram deixados, após uma segunda aplicação intraperitoneal de veneno, sem adjuvante, por um período de no mínimo 7 dias até 106 dias na ausência de estimulação antigênica.

Os adjuvantes são amplamente utilizados na pesquisa com o principal objetivo de desenvolver vacinas eficientes e de induzir uma resposta humoral de memória. O hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) é o único adjuvante licenciado para o uso em humanos e estudos demonstram que quando comparado a outros adjuvantes (CFA, ICF, QS21) ele é capaz de induzir resposta do tipo Th2 caracterizada por uma razão de IgG1:IgG2a >1 (CRIBBS et al., 2003). O mecanismo de ação deste adjuvante na indução da produção de anticorpos e células de memória foi recentemente descrito por Kool e colaboradores (2008) que demonstraram que na presença do adjuvante o antígeno ovalbumina é capturado, processado e carregado por macrófagos peritoneais até o linfonodo drenante,

onde se diferenciam em células dendríticas capazes de apresentar os peptídeos antigênicos para os linfócitos T e induzir uma resposta persistente. A imunização na presença do adjuvante favorece a produção de ácido úrico, um potente ativador das células apresentadoras que promoverá a diferenciação de macrófagos de origem mielóide em células dendríticas e a sua maturação e ativação (com maior expressão das moléculas co-estimulatórias CD86, CD40 e das moléculas MHC classe II e Ly6C<sup>high</sup> e CD11c<sup>high</sup>).

Esse mecanismo mostrou-se dependente da ativação do complexo intracelular *inflamassome* (caspase-1 e liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 e MyD88) (EISENBARTH et al., 2008). Estes autores propõem que o hidróxido de alumínio é um imunógeno potente por funcionar como um “adjuvante natural”, uma vez que induz sinais de perigo endógenos. Além disso, ele é capaz de induzir uma variedade de citocinas quimiotáticas, amplificando o recrutamento de fagócitos para o local da administração (SEUBERT et al., 2008) e ativando diretamente linfócitos B, via a ativação de macrófagos esplênicos de origem mielóide Gr-1+, produtores de IL-4 (JORDAN et al., 2004). Assim, o adjuvante hidróxido de alumínio atua potencializando o sistema imune, não apenas formando um depósito do qual o antígeno é lentamente liberado, mas também participando do processo inflamatório inicial que promove as condições ótimas para ativação de DCs e células T.

O que podemos apreender de nossos resultados é que a resposta de memória persistente gerada para antígenos do veneno com produção de anticorpos, principalmente IgG2a até 74 dias e que caracterizam uma resposta Th1 parece ser independente da ação do adjuvante ou do *background* genético do animal, a despeito de ambos os fatores promoverem um direcionamento da resposta para Th2. Ademais, certas proteínas antigênicas do veneno que permitem a cronicidade favoreceram também a troca do perfil da resposta para Th2, a partir de 120 dias, quando observamos alta produção total e específica de anticorpos IgE.

O balanço entre células Th1 e Th2 leva a uma resposta imune apropriada e direcionada para tipos específicos de infecções patogênicas. A resposta Th1, induzida por bactérias ou infecções virais, é dirigida pela citocina IL-12 e por fatores de transcrição

como Stat4 e T-bet (LIGHVANI et al., 2001; SZABO et al., 2000). A diferenciação de células Th2, a qual está predominantemente associada a infecções por parasitas helmínticos, é dirigida por citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, IL-18 e IL-33. Existem evidências consideráveis que o fator *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) também participa no direcionamento de respostas Th2. O fator de transcrição GATA-3, c-maf e NFATc são também conhecidos por controlar a diferenciação destas células (NEURATH et al., 2002; ZHU et al., 2006). Problemas nas respostas Th1 ou Th2 resultam em falhas no controle dos patógenos (KAWAKAMI, 2003) e podem causar respostas inapropriadas para antígenos inócuos, por exemplo, resultando em alergias (CAPRON et al., 2004).

O controle da resposta humoral com produção de diferentes classes e subclasses de anticorpos para antígenos, como de parasitas helmínticos, vem sendo fortemente estudado e tem sido associado a fatores como a linhagem do parasita (com expressão diferencial de antígenos), o nível da transmissão, fatores genéticos do hospedeiro e fase da doença (aguda ou crônica). Em humanos com fase aguda da malária, anticorpos IgG3 anti-*P. falciparum* têm importante papel no controle das manifestações clínicas (METZGER et al., 2003; ARIBOT et al., 1996), induzindo lise celular mediada por complemento, fagocitose e/ou ADCC, os quais controlam a multiplicação do parasita (BOUHAROUN-TAYOUN e DRUILHE 1992; TEBO et al., 2001). Porém diversos trabalhos mostram dados controversos sobre o papel de anticorpos como IgG1, IgG2a, IgG4 e IgE: anticorpos IgG1 para exo-antígenos são associados com a proteção clínica; IgG1 para o sorogrupo B MSP2 são associados com aumento no risco de manifestações clínicas; IgG2 para exo-antígenos ou antígenos do esquizonte apresentam correlação positiva com o número de ataques de malária, enquanto altos níveis de IgG2 e baixos de IgG4 estão associados com resistência ao *P. falciparum* (TAYLOR et al., 1998; CHUMPITAZI et al., 1996; NDUNGU et al., 2002; AUCAN et al., 2000) e por último, altos títulos de anticorpos IgE anti-*P. falciparum* vem sendo demonstrados em pacientes com malária crônica e grave, sugerindo um papel da IgE na sua patogênese (CALISSANO et al., 2003; TANGTEERAWATANA et al., 2007).

IgE é a molécula efetora chave das reações imunes alérgicas do tipo I, a qual resulta de linfócitos B ativados por linfócitos Th2 e de células secretoras de IgE (GEHA et

al., 2003). Exposição de indivíduos sensibilizados para o respectivo alérgeno gera novas células secretoras de IgE alérgeno-específicas oriundas de linfócitos B de memória por exemplo, como observado durante episódios de alergia a polens (DURHAM e TILL, 1998). Estes plasmablastos recentemente formados podem migrar para nichos de sobrevivência e tornarem-se células secretoras de anticorpos de longa vida e produzirem anticorpos IgE por muitos anos (RADBRUCH et al., 2006).

A produção e regulação da síntese de IgE é um processo complexo que envolve muitos fatores (LEBMAN et al., 1988) dentre eles a IL-4 tem sido bem caracterizada desde a sua descoberta (COFFMAN E CARTY 1986) como uma citocina essencial para a produção de IgE por células B humanas e murinas (PENE et al., 1988; SNAPPER et al., 1987), embora células B humanas também produzam IgE quando estimuladas com IL-13 (PUNNONEN et al., 1993; COCKS et al., 1993 ZURAWSKI et al., 1994; GEHA et al., 2003). Camundongos deficientes nos genes de IL-4, IL-13 ou da cadeia alfa do receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) não apresentam níveis detectáveis de IgE no soro ou fixados em mastócitos peritoneais, além de não serem capazes de degranular quando desafiados *in vitro* com anti-IgE (FISH et al., 2005). Vale ressaltar que IL-5 sinergiza com IL-4 na indução de IgE e IgG1 em camundongos (COFFMAN et al., 1988).

Em contrapartida, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10 e prostaglandinas são mediadores conhecidos por antagonizar a produção de IgE induzida por IL-4, tanto em células B humanas quanto em murinas (PENE et al., 1988; SNAPPER et al., 1987; GAUCHAT et al., 1992; PUNNONEN et al., 1993; JEANNIN et al., 1998; GEHA et al., 2003). Estes mecanismos indutores e reguladores contribuem para manutenção de níveis normais de IgE não patogênica, ao passo que a identificação dos moduladores da produção exacerbada de IgE (principalmente IL-4 e IL-13) se torna crítica para entender a patogenia de algumas doenças como alergia, asma, eczema, dermatites e infecções parasitárias (GEHA et al., 2003).

O perfil da resposta crônica para o veneno de *T. nattereri*, confirmada pelo aumento significativo na produção de IL-5 pelas células peritoneais, esplênicas e medulares e pela intensa produção de IgE policlonal e específica para o veneno sugere que além de linfócitos Th2 outras células efetoras como mastócitos e basófilos possam

também participar do processo crônico. Estas células são conhecidas por expressarem o receptor de alta afinidade para IgE, FcεRI, capaz de desencadear a desgranulação e a liberação de histamina, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e citocinas pró-inflamatórias promovendo a inflamação local e aumento da permeabilidade vascular (SIRAGANIAN, 2003; GILFILAN et al., 2006; KRAFT e KINET, 2007).

A atuação dos mastócitos nos mecanismos de defesa inato e adquirido do organismo está principalmente relacionada aos processos patológicos associados ao descontrole da resposta inflamatória, processos alérgicos, tumorais e na expulsão de parasitas (GALLI et al., 2000; METCALFE et al., 1997 e 2000; CHEN et al., 2002; WYMAN et al., 2003). Recentes estudos em camundongos revelam que basófilos são importantes na alergia e aumentam respostas humorais de memória (DENZEL et al., 2008; SOKOL et al., 2008). Estas células também têm papel primário na anafilaxia sistêmica mediada por IgG e na inflamação alérgica crônica mediada por IgE (MUKAI et al., 2005; TSUJIMURA et al., 2008).

A resposta persistente de produção de anticorpos induzida pelo veneno foi acompanhada de esplenomegalia com formação de centros germinativos densamente populados por células B Ig+, indicativo de intensa proliferação celular. Centros germinativos são regiões dinâmicas e especializadas compostas por centroblastos em divisão e centrocitos que não dividem e que sofrem maturação de afinidade através de ciclos de hipermutação somática e seleção direcionada pelo antígeno (JACOB et al., 1991; BEREK et al., 1991; MCHEYZER-WILLIAMS et al., 1993) culminando na geração de células de memória de alta afinidade. Durante este período muitos linfócitos B sofrem divisões ou morte por apoptose (McLENNAN, 1994). Podemos sugerir que o aumento progressivo no número de linfócitos B no baço por até 120 dias após a imunização seja o resultado de um aumento na resistência destas células aos estímulos apoptóticos como a repressão dos fatores Pax-5- e Bcl-6 por BLIMP-1 (SHAFFER et al., 2000; NERA et al., 2006), ou ao mesmo tempo uma maior geração, induzida pelo veneno, de fatores anti-apoptóticos como proteínas como Bcl-2, galectina-3 e c-Myc ou citocinas (KORSMEYER, 1999; HOYER et al., 2004; HURLIN e DEZFOULI, 2004; SZE et al., 2000; CASSESE et al., 2003).

Nosso próximo passo foi investigar a capacidade do veneno em induzir diferentes subtipos de linfócitos B. Linfócitos B-1 e B-2 diferem funcionalmente, e ambos os subtipos contribuem para a proteção do hospedeiro em uma variedade de modelos de doença. Os estudos com linfócitos B-1a (B220<sup>pos/low</sup> CD5<sup>+</sup> Mac-1<sup>+</sup> CD43<sup>neg</sup> CD23<sup>neg</sup> CD11b<sup>+</sup>) mostram que eles são a fonte principal de anticorpos naturais (FORSTER e RAJEWSKY, 1987; KROESE et al., 1989; CASALI e SCHETTINO, 1996), poli-reativos e de baixa afinidade, presentes nos soros de animais pré-ímmunes que protegem o organismo na fase aguda da resposta imune. Anticorpos derivados de B-1 protegem contra endotoxinas indutoras de choque (REID et al., 1997) e melhoram a peritonite bacteriana induzida após ligação cecal (BOES et al., 1998). Além disso, foi mostrado que linfócitos B-1 cooperam na zona marginal para a resposta de anticorpo T-independente para fosforilcolina de bactérias PC-positivas (MARTIN et al., 2001). Como mostrado, o veneno induziu a diferenciação de linfócitos B-1a (B220 positivos CD5 positivos) nos 3 compartimentos e a medula óssea se tornou o reservatório para a permanência e sobrevivência destas células. Linfócitos B1a induzidos pelo veneno podem estar associados com a produção policlonal de anticorpos IgE, uma vez que estas células via sinalização CD5/BCR tornam-se células produtoras de imunoglobulinas de todos os isótipos (KANTOR, 1991).

Durante a formação da resposta humoral, as células B após ativação diferenciam em plasmócitos ou entram no centro germinativo, onde sofrem maturação de afinidade. As células que sobrevivem ao processo de seleção amadurecem em células B de memória e/ou células de memória de longa vida (ASC). Linfócitos B de memória proliferam e produzem rapidamente anticorpos IgG após novo contato com o antígeno (SMITH et al., 1996; HO et al., 1986). No entanto, a grande maioria dos anticorpos IgG séricos antígeno-específicos é produzida por ASC residentes na medula óssea (McMILLAN et al., 1972; MANZ et al., 1997 e SLIFKA et al., 1998) mas por apresentarem evidências de maturação e seleção de afinidade (SMITH et al., 1997, 2000) acredita-se que sejam formadas principalmente no centro germinativo dos órgãos linfóides secundários (DILOSA et al., 1991) e migram subsequentemente para a medula óssea (MANZ et al., 1998).

Células produtoras de anticorpos de vida longa sobrevivem por mais de 1 ano em camundongos, não expressam B220 nem CD19 e respondem tão rápido ao estímulo antigênico quanto à população de células B de memória convencionais (MANZ et al., 1998, SLIFKA et al., 1995; BENNER et al., 1981), contribuindo para o aparecimento rápido de anticorpos de alta afinidade nas respostas secundárias (HOOIJKAAS et al., 1983; TERSTAPPEN et al., 1990). Apesar das células de longa vida manterem altos títulos de anticorpos por muito tempo sem reposição a partir de células B de memória (AHUJA et al., 2008), há fortes indícios de uma relação hierárquica entre os 2 tipos de células B (MCHEYZER-WILLIAMS et al., 2000): células B de memória B220<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> dão origem a células B com expressão intermediária da molécula B220 e estas por fim tornam-se células de longa vida, caracterizadas pela baixa expressão de B220 ou ausência deste marcador (GULLEY et al., 1988; LALOR et al., 1992). CD45R/B220 modula a transdução de sinal via BCR e é negativamente regulada a partir do momento que as células B de memória começam a expressar moléculas de localização, apontando uma maior necessidade destas células de migração e interação com o micro-ambiente. A diferenciação de ASCs nos centroblastos dos centros germinativos e a migração para a medula resultam em um aumento na afinidade pelo micro-ambiente com alta expressão de CD138, importante para a ligação ao colágeno tipo I da matriz extracelular medular (CALAME et al., 2003). Neste trabalho identificamos 5 distintos subtipos de células ASC pela expressão de B220, CD43 e da molécula CD138.

Nossos resultados demonstram que as ASCs estão organizadas em ao menos 3 compartimentos celulares (peritônio, baço e medula) e que além da medula óssea descrita como local preferencial destas células o veneno as mantém também no peritônio e no baço, e o padrão de expressão das moléculas dentro dos compartimentos indica um potencial linear de diferenciação, iniciando com alta expressão de B220 e CD43 chegando à ausência destes marcadores no final do processo de diferenciação. Observamos pelos nossos resultados que as ASCs CD138<sup>+</sup> no peritônio e na medula são inicialmente do fenótipo B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> passam para o fenótipo B220<sup>low</sup> CD43<sup>low</sup> e alcançam o fenótipo B220<sup>neg</sup> CD43<sup>low</sup>. Porém no baço, além de ASCs B220<sup>high</sup> CD43<sup>high</sup> encontramos também muitas com o fenótipo B220<sup>low</sup> CD43<sup>high</sup> e poucas com o fenótipo B220<sup>neg</sup> CD43<sup>high</sup>.

A molécula CD43, uma importante sialomucina transmembranica do tipo I é expressa na maioria dos leucócitos e subtipos de linfócitos B (FUKUDA e TSUBOI, 1999). Plasmablastos maduros, ASCs e células B da mucosa gastrointestinal expressam esta proteína, mas ao contrário linfócitos B virgens não expressam (MCHEYZER-WILLIAMS et al., 2005; MEDINA et al., 2002; LI et al., 1996; HARDY e HAYAKAWA, 2001). CD43 foi identificada em humanos e em camundongos em duas formas O-glicosiladas, de 115 e 130 kDa (FUKUDA e TSUBOI, 1999; JONES et al., 1994). A elevada expressão remanescente da molécula CD43 nas ASCs esplênicas pode indicar uma maior necessidade adesiva das ASCs às células endoteliais do baço, local ideal para o encontro de antígenos vindos da circulação (MARTIN et al., 2001). Além disso, como será discutido abaixo, células esplênicas em resposta crônica ao veneno produzem IL-6 e TNF- $\alpha$ , fatores de sobrevivência destas células (CASSESE et al., 2003).

Este modelo de diferenciação de linfócitos B induzido pelo veneno indica que as ASCs podem derivar de um complexo balanço entre precursores estáveis que sofrem alterações fenotípicas que as comprometem funcionalmente.

No que diz respeito à sobrevivência de células B de memória, a idéia mais aceita atualmente é a de que elas persistam em um estado de repouso mesmo na ausência do antígeno (VIEIRA e RAJEWSKY, 1990; KALIA et al., 2006; MARUYAMA et al., 2000). Porém, alguns autores acreditam que a persistência do antígeno, por meses e até anos, na forma de imunocomplexos na superfície das células dendríticas foliculares é um fator essencial para a manutenção das células B de memória e produção de anticorpos específicos (SLIFKA e AHMED, 1998; GRAY, 2002; IMAI et al., 1998; TEW et al., 1997). Nossos dados corroboram esta afirmação uma vez que detectamos veneno por até 120 dias na zona clara dos centros germinativos do baço dos animais imunizados, local rico em células dendríticas foliculares.

Sabemos que a função das células B ativadas *in vivo* é muito mais complexa e diversa do que simplesmente a produção de anticorpos. As células B podem funcionar como células apresentadoras de antígenos (HAMANO et al., 2000; AMIGORENA et al., 1992, 1998) e podem influenciar indiretamente outras células através da produção de citocinas como IL-4, IL-6, IL-12, e IFN- $\gamma$  (LUND et al., 2005; MIZOGUCHI e BHAN 2006).

Assim, podemos sugerir que no nosso modelo crônico as células B esplênicas induzidas pelo veneno podem agir no controle do desenvolvimento das células dendríticas foliculares via TNF- $\alpha$  (ENDRES et al., 1999) como também na formação dos folículos e centros germinativos (GONZALEZ et al., 1998) contribuindo na retenção do veneno pelas células dendríticas foliculares, formação de ASCs e cronificação da resposta de memória montada para o veneno.

A medula óssea é descrita como o ambiente favorável para células ASCs (MANZ et al., 2005) por possuir fatores extrínsecos que contribuem para a sua sobrevivência como citocinas IL-6, IL-5, TNF- $\alpha$ , o ligante para a molécula de adesão CD44, a quimiocina SDF-1 (CXCL12, CASSESE et al., 2003; SCHWALLER et al., 2007), membros da família do TNF como APRIL (ligante indutor de proliferação) e BAFF (fator de ativação de célula B) (INGOLG et al., 2005; O'CONNOR et al., 2004; THOMPSON et al., 2001). As ASCs além da dependência de fatores extrínsecos dependem de outros intrínsecos como o fator de transcrição BLIMP-1 que pelo aumento da expressão de Xbp-1 controla o estresse interplasmático causado pela secreção de anticorpos (TUNER et al., 1994; SHAFFER et al., 2000).

De forma alternativa, nichos adicionais de sobrevivência podem ser formados em tecidos inflamados (CASSESE et al., 2001). Recentemente, Huard et al. (2008) demonstraram que o fator solúvel APRIL secretado por neutrófilos inflamatórios no tecido linfóide associado à mucosa sustenta a produção local de anticorpos por ASCs e que ainda em modelos de autoimunidade células ASCs auto-reativas podem ficar retidas no baço, em oposição às células ASCs protetoras presentes na medula (HOYER et al., 2004).

Recentemente, Cassese e colaboradores (2003) demonstraram o envolvimento de citocinas do micro-ambiente como IL-5, IL-6, TNF $\alpha$  e SDF-1 na regulação de células ASC. Nossos resultados corroboram estes achados uma vez que o veneno induziu a produção destas citocinas e também de IL-17A onde estas células ASCs foram encontradas. E mais, a produção pelas células esplênicas e peritoneais destas citocinas descritas como moduladoras da inflamação (BRENNAN et al., 1999; HORUK, 1998) indica que o veneno gerou uma inflamação persistente nos tecidos, produzindo condições ideais para a

sobrevivência das ASCs. Realmente, células plasmáticas podem persistir bem em tecidos inflamados (CASSESE et al., 2001).

Os nossos resultados mostram uma produção de IL-6 somente pelas células do baço e não pelas células medulares ou peritoneais. Sobre IL-6, tem sido discutido seu papel na diferenciação terminal de linfócitos B (ROLDAN e BRIEVA, 1991; SKIBINSKI et al., 1998), na indução da expressão de Bcl-2 (RAHMAN et al., 2001) e no crescimento de células B malignas (KAWANO et al., 1988). Recentemente, Eddahri e colaboradores (2009) determinaram em camundongos que IL-6 via STAT-3 regula a habilidade das células T virgens a adquirirem a capacidade de auxiliar células B. IL-6 conduz à secreção de IL-21 que age aumentando a atividade auxiliar das células T, revelando um papel não convencional para IL-6 e IL-21 na promoção de respostas humorais T-dependentes (DIENZ et al., 2009).

Então, em nosso modelo com produção de IL-6 por células esplênicas sugere seu amplo papel na regulação da diferenciação e manutenção de ASCs, como também na indução da diferenciação de células T produtoras de IL-17, uma vez que estas necessitam da ação combinada das citocinas IL-6 e TGF- $\beta$  e expressão de STAT3 e do receptor órfão ROR $\gamma$ t para sua diferenciação (IVANOV et al., 2006). Ademais, nossos dados mostram uma importante correlação entre a produção de IL-5 e IL-17A e a diferenciação e sobrevivência de ASCs em animais imunizados com o veneno de *T. nattereri*.

IL-5 promove a proliferação de células B e a síntese de IgM por células B normais e tumorais (SWAIN et al., 1988; TAKATSU, 1998) e está envolvida na proliferação das células B1 e diferenciação de células ASC (MESSIKA et al., 1998; KNODEL et al., 2001). Takatsu e colaboradores (1998) demonstraram que IL-5 mantém seletivamente células B1 da medula óssea em cultura *in vitro*, fenômeno ligado à expressão preferencial por estas células B220<sup>low</sup> CD5<sup>+</sup> da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-5 (HARDY e HAYAKAWA, 1994). Além disso, recentes evidências mostram que células B1a apresentadoras de antígeno induzem a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17A por distintas populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *in vitro*, enquanto linfócitos B2 falham em ativar linfócitos T a produzirem citocinas (ZHONG et al., 2007).

Nossos resultados mostram que o veneno induziu a produção de IL-5 e IL-17A nos 3 compartimentos e de IFN- $\gamma$  no peritônio e baço. Em conjunto podemos dizer que: i) existe uma forte relação entre a síntese de IL-5 dirigida pelo veneno e a diferenciação/sobrevivência das células B1a/ASC, respectivamente e ii) os linfócitos B1a específicos para o veneno podem agir no baço como células apresentadoras de antígeno para linfócitos T, induzindo a diferenciação para os subtipos Th1 e T produtores de IL-17A. Linfócitos Th17 e Th1 são conhecidos como células patogênicas em muitos modelos de doenças auto-imunes como artrite reumatóide e esclerose múltipla (LANGRISH et al., 2005) ambas caracterizadas por uma resposta imune celular (Th17) e humoral (produção persistente de anticorpos), o que nos leva a sugerir que a inflamação crônica produzida pelo veneno constitui um bom modelo para o estudo de doenças auto-imunes.

Dados recentes mostram que diferentes tipos celulares como fagócitos, células dendríticas convencionais, linfócitos Th2, linfócitos T reguladores (Treg), linfócitos B, células *Natural Killer* e linfócitos Th1 antígeno-específicos CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup> (os quais também produzem IFN- $\gamma$ ) produzem IL-10, estes últimos mais que linfócitos Th2, T reg ou células inflamatórias (MOORE et al., 2001). IL-10 vem sendo relacionada com a limitação da inflamação patológica e pela manutenção da infecção crônica não resolvida induzida por parasitas (JANKOVIC et al., 2007; ANDERSON et al., 2007). Além disso, linfócitos B isolados de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumática e síndrome de Sjogren produzem mais IL-10 que linfócitos B de indivíduos normais (LIPSKY, 2001; LLORENTE et al., 1994). Nossos resultados mostram que o veneno foi capaz de induzir uma resposta crônica de produção de anticorpos por ASCs e ao mesmo tempo induzir a síntese de IL-10, o que sugere seu papel na diferenciação de linfócitos B de memória para células ASC (CHOE e CHOI, 1998) e no controle do processo inflamatório crônico.

O bloqueio de citocinas em modelos animais através do uso de estratégias neutralizadoras tem sido amplamente utilizado e estabelece a importância das citocinas tanto na patogenia e progressão de doenças quanto nas respostas imunológicas. Sendo assim, na tentativa de melhor esclarecer o complexo processo de diferenciação e

sobrevivência das ASCs, tratamos os animais com anticorpos anti-IL-5 e anti-IL-17A antes da imunização e da dose reforço com o veneno de *T. nattereri*.

A ausência de IL-17A e também de IL-5 no momento de estimulação antigênica pelo veneno induziu uma diminuição no número total de esplenócitos, que pode estar correlacionada com a participação destas citocinas na formação de estruturas dos centros germinativos e/ou manutenção das quimiocinas que regulam a sua formação. Nós observamos que ambos os tratamentos não afetaram a formação de centros germinativos, no entanto o bloqueio de IL-17A prejudicou o aumento de células B Ig<sup>pos</sup> induzidas pelo veneno nas áreas dos centros germinativos tanto 28 quanto 74 dias após imunização. Sobre esse aspecto, verificou-se recentemente o primeiro efeito direto da IL-17A sobre a atividade e a função de células B e a formação de centros germinativos. Hsu e colaboradores (2008) demonstraram que IL-17 acelera a formação do centro germinativo e o pré-tratamento das células B *in vivo* com antagonistas de IL-17 reduz a resposta quimiotática das células B as quimiocinas CXCL2 e CXCL3 impedindo a migração correta em um modelo de artrite erosiva, sugerindo que IL-17 promove a formação e manutenção de estruturas dos centros germinativos que modulam a quimiotaxia.

Pode-se observar ainda que a neutralização pelos anticorpos retardou o desenvolvimento da resposta imune humoral específica (produção de IgG1 e IgG2a) montada para o veneno, mas que se restabeleceu nos períodos mais tardios. No entanto, o principal aspecto a ser discutido em relação aos níveis plasmáticos de anticorpos específicos após tratamento com anti-IL-5 e anti-IL-17A é referente à diminuição da produção de IgE específica 74 dias após imunização. Podemos especular que ambas as citocinas, principalmente IL-5 agem preferencialmente na diferenciação de células ASC CD138<sup>pos</sup> com fenótipo B220<sup>high/low/neg</sup> capazes de gerar anticorpos da classe IgE e mantêm a permanência de células B1a CD5<sup>+</sup> no baço. Com a neutralização destas citocinas, ASC CD138<sup>pos</sup> com fenótipo B220<sup>high</sup> geradas produzem agora somente IgG1, IgG2a e IgE policlonal. Nossos dados mostram que a cronicidade da resposta montada contra o veneno é alcançada pela geração de células T produtoras de IL-5 e IL-17A e de linfócitos B ASCs produtores também de IgE específica.

O desenvolvimento de uma resposta Th2 induzida pelo veneno, com ausência das citocinas IL-4 e IL-13, nos apontam para uma resposta Th2 atípica na qual a produção de IgE anafilática pode ser dependente principalmente das citocinas IL-5 e IL-17A . Deve-se ressaltar também que o tratamento com anticorpos neutralizantes além de induzirem queda drástica nos níveis de IgE anafilática/específica manteve altos os níveis de IgE total neste período. A presença de grandes quantidades de anticorpos policlonais pode ser responsável pelo bloqueio dos receptores de alta afinidade para a IgE ancorados nas membranas de mastócitos e basófilos que conseqüentemente impedirão a desgranulação dessas células efectoras, contribuindo para a redução da resposta anafilática observada 74 dias após o tratamento.

A complexidade dessa resposta não convencional pode ser formada pelo envolvimento de outras citocinas não analisadas neste estudo, mas consideradas como co-estimuladoras das respostas imunes, como a IL-33, que além de promover respostas Th2 clássicas (SCHMITZ et al., 2005; CHACKERIAN et al., 2007) participa da geração de clones Th2 produtores de IL-5 e inflamação alérgica pulmonar por mecanismos independentes de IL-4 (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2008). IL-33 exibe potencial pro-inflamatório sobre mastócitos derivados da medula óssea com produção de IL-6, IL-13, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 e prostaglandina D2 (ALLAKHVERDI et al., 2007; IIKURA et al., 2007; HO et al., 2007; ALI et al., 2007; MOULIN et al., 2007).

A presença e importância de clones Th2 e Th17 nesta resposta gerada pelo veneno também apontam para a síntese de IL-21, uma citocina que foi primeiramente identificada por Parrish-Novak e colaboradores (2000). Ela é produzida por uma variedade de células como linfócitos T CD4 e NKT ativadas, clones Th17, células Th foliculares e principalmente clones Th2 (PARRISH-NOVAK et al., 2000; VOGELZANG et al., 2008; MONTELEONE et al., 2008; WURSTER et al., 2002).

Dependendo do contexto celular, da natureza de co-estimulação, do background genético e do micro-ambiente, IL-21 pode agir desde a regulação da maturação e apresentação de antígenos nas células dendríticas (MONTELEONE et al., 2008; SPOLSKI e LEONARD 2008) até o controle da diferenciação de células Th1 (WURSTER et al., 2002) e seu papel na diferenciação de células B humanas e murinas tem sido amplamente

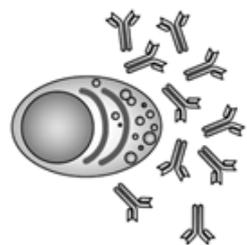
estudado desde a sua descoberta e apresenta dados contraditórios. Sabe-se, portanto que IL-21 controla a proliferação e apoptose de células B ativadas (ETTINGER et al., 2008), estimula células B virgens a expressarem cistidina deaminase, enzima envolvida na hipermutação somática e troca de cadeia das imunoglobulinas no centro germinativo (PELED et al., 2008; STAVNEZER et al., 2008; ETTINGER et al., 2005; SAITO et al., 2008), direciona a mudança para IgG1 e IgG3 (REFAELI et al., 1998), inibe a transcrição germinativa do gene que codifica a região constante da IgE em células murinas (KUHN et al., 1991) inibindo assim a produção IgE induzida por IL-4, via apoptose das células B comprometidas e induz a produção de IFN- $\gamma$  em células não B (HARADA et al., 2006; PENE et al., 2006; OZAKI et al., 2002; SUTO et al., 2002). Além disso, induz a diferenciação de células B em células produtoras de anticorpos (OZAKI et al., 2004) excedendo de 5 a 20 vezes mais a capacidade da IL-4, IL-2 ou IL-10 nesta função (BRYANT et al., 2007).

Com relação a seu efeito no compartimento de memória imunológica, IL-21 é requerida para a produção de IgG por células B de memória (KUCHEN et al., 2007) e há indícios de que aumente a expressão de BLIMP-1, IRF4, Xbp-1s e Bcl-6 (OZAKI et al., 2004; BRYANT et al., 2007; KUCHEN et al., 2007; JOHNSON et al., 2005) induzindo a diferenciação e sobrevivência de células ASCs CD138 positivas produtoras de células IgG1 (OZAKI et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2009).

Finalmente, podemos dizer que o veneno de *T. nattereri* é capaz de desencadear e sustentar uma resposta imunológica de memória dependente de citocinas de linfócitos T, IL-5 e IL-17A com altos e persistentes níveis de anticorpos específicos IgG2a, IgG1 e principalmente IgE produzidos por células de longa sobrevivência fenotipicamente caracterizadas como B22<sup>high/low/neg</sup> CD43<sup>high/low</sup> CD138<sup>pos</sup> presentes além da medula óssea também no baço e no peritônio.

---

*Conclusão*

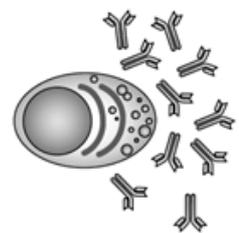


## 6 CONCLUSÃO

Finalmente, nossos dados permitem um maior esclarecimento da resposta humoral de memória induzida no envenenamento pelo peixe *T. nattereri* e da complexa organização do compartimento de células B de memória, principalmente do subtipo de longa sobrevivência (ASC) com distintos fenótipos e muito provavelmente com sub-especialidades funcionais. Ademais, este trabalho também suporta a idéia de que IL-5 e IL-17A participam na geração e na sobrevivência de ASC com fenótipo B220<sup>high/low/neg</sup> e na manutenção esplênica de células B1a.

---

*Referências Bibliográficas*



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

AHUJA, A.; ANDERSON, S. M.; KHALIL, A.; SHLOMCHIK, M. J. Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, p. 4802-4807, 2008.

ALI, S.; HUBER, M.; KOLLEWE, C.; BISCHOFF, S. C.; FALK, W.; MARTIN, M. U. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, p. 18660-18665, 2007.

ALLAKHVERDI, Z.; SMITH, D. E.; COMEAU, M. R.; DELESPESE, G. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. **J. Immunol.**, v. 179, p. 2051-2054, 2007.

ALMEIDA, V. G.; ROCHA, C. M. Registro de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. **Rev. Soc. Bras. Toxicol.**, v. 2, p. 49-51, 1989.

AMIGORENA, S.; SALAMERO, J.; DAVOUST, J.; FRIDMAN, W. H.; BONNEROT, C. Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. **Nature**, v. 358, p. 337-341, 1992.

AMIGORENA, S.; LANKAR, D.; BRIKEN, V.; GAPIN, L.; VIGUIER, M.; BONNEROT, C. Type II and III receptors for immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 505-515, 1998.

ANDERSON, C. F.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. J.; SACKS, D. CD4+ CD25- Foxp3- Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 285-297, 2007.

ARCE, S.; LUGER, E.; MUEHLINGHAUS, G.; CASSESE, G.; HAUSER, A.; HORST, A.; LEHNERT, K.; ODENDAHL, M.; HÖNEMANN, D.; HELLER, K. D.; KLEINSCHMIDT, H.; BEREK, C.; DÖRNER, T.; KRENN, V.; HIEPE, F.; BARGOU, R.; RADBRUCH, A.; MANZ, R. A. CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, p. 1022-1028, 2004.

---

\* De acordo com:

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

ARIBOT, G.; ROGIER, C.; SARTHOU, J. L.; TRAPE, J. F.; BALDE, A. T.; DRUILHE, P.; ROUSSILHON, C. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p. 449–457, 1996.

AUCAN, C.; TRAORE, Y.; TALL, F.; NACRO, B.; TRAORÉ-LEROUX, T.; FUMOUX, F.; RIHET, P. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1252–1258, 2000.

AUTO, H. F. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. **Rev. Esc. Ciênc. Méd. Alagoas**, v. 5, p. 35-36, 1992.

BAINE, Y.; THORBECKE, G. J. Induction and persistence of local B cell memory in mice. **J. Immunol.**, v. 128, p. 639-643, 1982.

BAUMGARTH, N.; HERMAN, O. C.; JAGER, G. C.; BROWN, L. E.; HERZENBERG, L. A.; CHEN, J. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 271–280, 2000.

BENEDICT, C. L.; KEARNEY, J. F. Increased junctional diversity in fetal B cells results in a loss of protective anti-phosphorylcholine antibodies in adult mice. **Immunity**, v. 10, p. 607-617, 1999.

BENNER, R.; RIJNBEEK, A. M.; SCHREIER, M. H.; COUTINHO, A. Frequency analysis of immunoglobulin V-gene expression and functional reactivities in bone marrow B cells. **J. Immunol.**, v. 126, p. 887-890, 1981.

BEREK, C.; BERGER, A.; APEL, M. Maturation of the immune response in germinal centers. **Cell**, v. 67, p. 1121-1129, 1991.

BIKAH, G.; CAREY, J.; CIALLELLA, J. R.; TARAKHOVSKY, A.; BONDADA, S. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. **Science**, v. 274, p. 1906-1909, 1996.

BOES, M.; PRODEUS, A. P.; SCHMIDT, T.; CARROLL, M. C.; CHEN, J. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 2381–2386, 1998.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; DRUILHE, P. Plasmodium falciparum malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1473–1481, 1992.

BOYCE, J. A.; AUSTEN, K. F. No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 1869-1873, 2005.

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

BRENNAN, F. R.; O'NEILL, J. K.; ALLEN, S. J.; BUTTER, C.; NUKI, G.; BAKER, D. CD44 is involved in selective leucocyte extravasation during inflammatory central nervous system disease. **Immunology**, v. 98, p. 427-435, 1999.

BRYANT, V. L.; MA, C. S.; AVERY, D. T.; LI, Y.; GOOD, K. L.; CORCORAN, L. M.; DE WAAL, M. R.; TANGYE, S. G. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. **J. Immunol.**, v. 179, p. 8180-8190, 2007.

CALAME, K. L.; LIN, K. I.; TUNYAPLIN, C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 205-230, 2003.

CALISSANO, C.; MODIANO, D.; SIRIMA, B.S.; KONATE, A.; SANOU, I.; SAWADOGO, A.; PERLMANN, H.; TROYE-BLOMBERG, M.; PERLMANN, P. IgE antibodies to Plasmodium falciparum and severity of malaria in children of one ethnic group living in Burkina Faso. **Am. J. Trop. Med.**, v. 69, p. 31–35, 2003.

CAPRON, A.; DOMBROWICZ, D.; CAPRON, M. Helminth infections and allergic diseases: from the Th2 paradigm to regulatory networks. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, v. 26, p. 25-34, 2004.

CASALI, P.; SCHETTINO, E. W. Structure and function of natural antibodies. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 210, p. 167–179, 1996.

CASALI, P.; NOTKINS, A. L. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. **Immunol. Today**, v. 10, p. 364-368, 1989.

CASSESE, G.; ARCE, S.; HAUSER, A. E.; LEHNERT, K.; MOEWES, B.; MOSTARAC, M.; MUEHLINGHAUS, G.; SZYSKA, M.; RADBRUCH, A.; MANZ, R. A. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. **J. Immunol.**, v. 171, p. 1684-1690, 2003.

CASSESE, G.; LINDENAU, S.; DE, B. B.; ARCE, S.; HAUSER, A.; RIEMEKASTEN, G.; BEREK, C.; HIEPE, F.; KRENN, V.; RADBRUCH, A.; MANZ, R. A. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 2726-2732, 2001.

CHACKERIAN, A. A.; OLDHAM, E. R.; MURPHY, E. E.; SCHMITZ, J.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. **J. Immunol.**, v. 179, p. 2551-2555, 2007.

CHEN, R.; FAIRLEY, J. A.; ZHAO, M. L.; GIUDICE, G. J.; ZILLIKENS, D.; DIAZ, L. A.; LIU, Z. Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation. **J. Immunol.**, v. 169, p. 3987-3992, 2002.

CHEVRIER, S.; GENTON, C.; KALLIES, A.; KARNOWSKI, A.; OTTEN, L. A.; MALISSEN, B.; MALISSEN, M.; BOTTO, M.; CORCORAN, L. M.; NUTT, S. L.; CHA-ORBEA, H. CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, p. 3895-3900, 2009.

CHOE, J.; CHOI, Y. S. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 508-515, 1998.

CHUMPITAZI, B. F.; LEPERS, J. P.; SIMON, J.; DELORON, P. IgG1 and IgG2 antibody responses to Plasmodium falciparum exoantigens correlate inversely and positively, respectively, to the number of malaria attacks. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 14, p. 151-157, 1996.

COCKS, B. G.; DE WAAL, M. R.; GALIZZI, J. P.; DE VRIES, J. E.; AVERSA, G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. **Int. Immunol.**, v. 5, p. 657-663, 1993.

COFFMAN, R. L.; CARTY, J. A. T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. **J. Immunol.**, v. 136, p. 949-954, 1986.

COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B. W.; LEBMAN, D. A.; HIRAKI, D. D.; CHRISTIANSEN, J. A.; SHRADER, B.; CHERWINSKI, H. M.; SVELKOU, H. F.; FINKELMAN, F. D.; BOND, M. W. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol. Rev.**, v. 102, p. 5-28, 1988.

CRIBBS, D. H.; GHOCHIKYAN, A.; VASILEVKO, V.; TRAN, M.; PETRUSHINA, I.; SADZIKAVA, N.; BABIKYAN, D.; KESSLAK, P.; KIEBER-EMMONS, T.; COTMAN, C. W.; AGADJANYAN, M. G. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. **Int. Immunol.**, v. 15, p. 505-514, 2003.

CVETKOVIC, R. S.; FIGGIT, D. P.; PLOSKER, G. L. ET- 743. **Drugs**, v. 62, p. 1185-1192, 2002.

DENZEL, A.; MAUS, U. A.; RODRIGUEZ, G. M.; MOLL, C.; NIEDERMEIER, M.; WINTER, C.; MAUS, R.; HOLLINGSHEAD, S.; BRILES, D. E.; KUNZ-SCHUGHART, L. A.; TALKE, Y.; MACK, M. Basophils enhance immunological memory responses. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 733-742, 2008.

DIENZ, O.; EATON, S. M.; BOND, J. P.; NEVEU, W.; MOQUIN, D.; NOUBADE, R.; BRISO, E. M.; CHARLAND, C.; LEONARD, W. J.; CILIBERTO, G.; TEUSCHER, C.; HAYNES, L.; RINCON, M. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. **Exp. Med.**, v. 206, p. 69-78, 2009.

DILOSA, R. M.; MAEDA, K.; MASUDA, A.; SZAKAL, A. K.; TEW, J. G. Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. **J. Immunol.**, v. 146, p. 4071-4077, 1991.

DURHAM, S. R.; TILL, S. J. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 102, p. 157-164, 1998.

EDDAHRI, F.; DENANGLAIRE, S.; BUREAU, F.; SPOLSKI, R.; LEONARD, W. J.; LEO, O.; ANDRIS, F. Interleukin-6 / STAT3 signalling regulates the ability of naive T cells to acquire B cell help capacities. **Blood.**, v. 113, p. 2426-33, 2009.

EISENBARTH, S. C.; COLEGIO, O. R.; O'CONNOR, W.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. **Nature**, v. 453, p. 1122-1126, 2008.

ENDRES, R.; ALIMZHANOV, M. B.; PLITZ, T.; FUTTERER, A.; KOSCO-VILBOIS, M. H.; NEDOSPASOV, S. A.; RAJEWSKY, K.; PFEFFER, K. Mature follicular dendritic cell

networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 159-168, 1999.

ETTINGER, R.; KUCHEN, S.; LIPSKY, P. E. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. **Immunol. Rev.**, v. 223, p. 60-86, 2008.

FACÓ, P. E.; HAVT, A.; BARBOSA, P. S.; NOBRE, A. C.; BEZERRA, G. P.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; LOPES-FERREIRA, M.; MONTEIRO, H. S. Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney. **Toxicon**, v. 42, p. 509-514, 2003.

FACÓ, P. E.; BARBOSA, P. S.; BEZERRA, G. P.; MARTINS, A. M.; GUIMARÃES, J. A.; LOPES-FERREIRA, M.; MONTEIRO, H. S. Epidemiology of the injuries caused by *Thalassophryne nattereri* (niquim) in Ceara State (1992). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p. 479-482, 2005.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. Manual de Peixes Marinhos do Brasil – II. Teleostei (1). Museu de Zoologia - Universidade de São Paulo. São Paulo. p. 34-95, 1978.

FISH, S. C.; DONALDSON, D. D.; GOLDMAN, S. J.; WILLIAMS, C. M.; KASAIAN, M. T. IgE generation and mast cell effector function in mice deficient in IL-4 and IL-13. **J. Immunol.**, v. 174, p. 7716-7724, 2005.

FONSECA, L. A.; LOPES-FERREIRA, M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). **An. Bras. Dermatol.**, v. 75, p. 435-443, 2000.

FORSTER, I.; RAJEWSKY, K. Expansion and functional activity of Ly-1+ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 17, p. 521-528, 1987.

FOX, D. A.; CHIORAZZI, N.; KATZ, D. H. Hapten specific IgE antibody responses in mice. V. Differential resistance of IgE and IgG B lymphocytes to X-irradiation. **J. Immunol.**, v. 117, p. 1622-1628, 1976.

FUKUDA, M.; TSUBOI, S. Mucin-type O-glycans and leukosialin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1455, p. 205-217, 1999.

GALLI, S. J. Mast cells and basophils. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 7, p. 32-39, 2000.

GAUCHAT, J. F.; AVERSA, G.; GASCAN, H.; DE VRIES, J. E. Modulation of IL-4 induced germline epsilon RNA synthesis in human B cells by tumor necrosis factor-alpha, anti-CD40 monoclonal antibodies or transforming growth factor-beta correlates with levels of IgE production. **Int. Immunol.**, v. 4, p. 397-406, 1992.

GEHA, R. S.; JABARA, H. H.; BRODEUR, S. R. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 721-732, 2003.

GILFILLAN, A. M.; TKACZYK, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 218-230, 2006.

GONZALEZ, M.; MACKAY, F.; BROWNING, J. L.; KOSCO-VILBOIS, M. H.; NOELLE, R. J. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 997-1007, 1998.

GRAY, D. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 60-65, 2002.

GRUND, L. Z.; SOUZA, V. M.; FAQUIM-MAURO, E. L.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Experimental immunization with *Thalassophryne nattereri* fish venom: striking IL-5 production and impaired of B220+ cells. **Toxicon**, v. 48, p. 499-508, 2006.

GULLEY, M. L.; OGATA, L. C.; THORSON, J. A.; DAILEY, M. O.; KEMP, J. D. Identification of a murine pan-T cell antigen which is also expressed during the terminal phases of B cell differentiation. **J. Immunol.**, v. 140, p. 3751-3757, 1988.

HA, S. A.; TSUJI, M.; SUZUKI, K.; MEEK, B.; YASUDA, N.; KAISHO, T.; FAGARASAN, S. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 2541-2550, 2006.

HAAS, K. M.; POE, J. C.; STEEBER, D. A.; TEDDER, T. F. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. **Immunity**, v. 23, p. 7-18, 2005.

HADDAD JR. V. **Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento.** São Paulo: Editora Rocca, 2000. p.145.

HADDAD JR. V.; PARDAL, P. P. O.; CARDOSO, J. L.; MARTINS, I. A. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): Report of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Serjipe State). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 45, p. 221-223, 2003.

HADDAD, JR. V.; NETO, D. G.; DE PAULA NETO, J. B.; DE LUNA MARQUES, F. P.; BÁRBARO, K. C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. **Toxicon**, v. 43, p. 287-294, 2004.

HAMANO, Y.; ARASE, H.; SAISHO, H.; SAITO, T. Immune complex and Fc receptor-mediated augmentation of antigen presentation for in vivo Th cell responses. **J. Immunol.**, v. 164, p. 6113-6119, 2000.

HARADA, M.; MAGARA-KOYANAGI, K.; WATARAI, H.; NAGATA, Y.; ISHII, Y.; KOJO, S.; HORIGUCHI, S.; OKAMOTO, Y.; NAKAYAMA, T.; SUZUKI, N.; YEH, W. C.; AKIRA, S.; KITAMURA, H.; OHARA, O.; SEINO, K.; TANIGUCHI, M. IL-21-induced Bepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 2929-2937, 2006.

HAYAKAWA, K.; HARDY, R. R.; HONDA, M.; HERZENBERG, L. A.; STEINBERG, A. D.; HERZENBERG, L. A. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 81, p. 2494-2498, 1984.

HAYAKAWA, K.; HARDY, R. R.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. **J. Exp. Med.**, v. 161, p. 1554-1568, 1985.

HAYAKAWA, K.; CARMACK, C. E.; HYMAN, R.; HARDY, R. R. Natural autoantibodies to thymocytes: origin, VH genes, fine specificities, and the role of Thy-1 glycoprotein. **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 869-878, 1990.

HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. **Adv. Immunol.**, v. 55, p. 297-339, 1994.

HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K. B cell development pathways. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 595-621, 2001.

HARDY, R. R. B-1 B cell development. **J. Immunol.**, v. 177, p. 2749-2754, 2006.

HAUSER, A. E.; DEBES, G. F.; ARCE, S.; CASSESE, G.; HAMANN, A.; RADBRUCH, A.; MANZ, R. A. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. **J. Immunol.**, v. 169, p. 1277-1282, 2002.

HEYZER-WILLIAMS, M. G.; MCLEAN, M. J.; LALOR, P. A.; NOSSAL, G. J. Antigen-driven B cell differentiation in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 295-307, 1993.

HEYZER-WILLIAMS, L. J.; COOL, M.; HEYZER-WILLIAMS, M. G. Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel B220(-) memory b cell compartment. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 1149-1166, 2000.

HEYZER-WILLIAMS, M. G.; HEYZER-WILLIAMS, L. J.; FANELLI, P. J.; BIKAH, G.; POGUE-CALEY, R. R.; DRIVER, D. J.; EISENBRAUN, M. D. Antigen-specific immunity. Th cell-dependent B cell responses. **Immunol. Res.**, v. 22, p. 223-236, 2000.

HEYZER-WILLIAMS, L. J.; DRIVER, D. J.; HEYZER-WILLIAMS, M. G. Germinal center reaction. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 8, p. 52-59, 2001.

HIPPEN, K. L.; TZE, L. E.; BEHRENS, T. W. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 883-890, 2000.

HO, F.; LORTAN, J. E.; MACLENNAN, I. C.; KHAN, M. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. **Eur. J. Immunol.**, v. 16, p. 1297-1301, 1986.

HO, L. H.; OHNO, T.; OBOKI, K.; KAJIWARA, N.; SUTO, H.; IIKURA, M.; OKAYAMA, Y.; AKIRA, S.; SAITO, H.; GALLI, S. J.; NAKAE, S. IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcepsilonRI signals. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, p. 1481-1490, 2007.

HOOIJKAAS, H.; PREESMAN, A. A.; VAN, O. A.; BENNER, R.; HAAIJMAN, J. J. Frequency analysis of functional immunoglobulin C and V gene expression in murine B cells at various ages. **J. Immunol.**, v. 131, p. 1629-1634, 1983.

HORUK, R. Chemokines beyond inflammation. **Nature**, v. 393, p. 524-525, 1998.

HOYER, K. K.; PANG, M.; GUI, D.; SHINTAKU, I. P.; KUWABARA, I.; LIU, F. T.; SAID, J. W.; BAUM, L. G.; TEITELL, M. A. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. **Am. J. Pathol.**, v. 164, p. 893-902, 2004.

HOYER, B. F.; MOSER, K.; HAUSER, A. E.; PEDDINGHAUS, A.; VOIGT, C.; EILAT, D.; RADBRUCH, A.; HIEPE, F.; MANZ, R. A. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 1577-1584, 2004.

HSU, H. C.; YANG, P.; WANG, J.; WU, Q.; MYERS, R.; CHEN, J.; YI, J.; GUENTERT, T.; TOUSSON, A.; STANUS, A. L.; LE, T. V.; LORENZ, R. G.; XU, H.; KOLLS, J. K.; CARTER, R. H.; CHAPLIN, D. D.; WILLIAMS, R. W.; MOUNTZ, J. D. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 166-175, 2008.

HUARD, B.; MCKEE, T.; BOSSHARD, C.; DURUAL, S.; MATTHES, T.; MYIT, S.; DONZE, O.; FROSSARD, C.; CHIZZOLINI, C.; FAVRE, C.; ZUBLER, R.; GUYOT, J. P.; SCHNEIDER, P.; ROOSNEK, E. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 2887-2895, 2008.

HURLIN, P. J.; DEZFOULI, S. Functions of myc: max in the control of cell proliferation and tumorigenesis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 238, p. 183-226, 2004.

IHKURA, M.; SUTO, H.; KAJIWARA, N.; OBOKI, K.; OHNO, T.; OKAYAMA, Y.; SAITO, H.; GALLI, S. J.; NAKAE, S. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. **Lab. Invest.**, v. 87, p. 971-978, 2007.

IMAI, Y.; YAMAKAWA, M.; KASAJIMA, T. The lymphocyte-dendritic cell system. **Histol. Histopathol.**, v. 13, p. 469-510, 1998.

INGOLD, K.; ZUMSTEG, A.; TARDIVEL, A.; HUARD, B.; STEINER, Q. G.; CACHERO, T.G.; QIANG, F.; GORELIK, L.; KALLED, S. L.; ACHA-ORBEA, H.; RENNERT, P.D.; TSCHOPP, J.; SCHNEIDER, P. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. **J. Exp. Med.**, v. 20, p. 1375-1383, 2005.

ISHIZAKA, K.; ADACHI, T. Generation of specific helper cells and suppressor cells in vitro for the IgE and IgG antibody responses. **J. Immunol.**, v. 117, p. 40-47, 1976.

ISHIZAKA, K. Cellular events in the IgE antibody response. **Adv. Immunol.**, v. 23, p. 1-75, 1976.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B.S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J. J.; CUA, D. J.; LITTMAN, D. R. The orphan nuclear receptor ROR gamma

directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell.**, v. 126, p. 1121-1133, 2006.

JACOB, J.; KELSOE, G.; RAJEWSKY, K.; WEISS, U. Intracloal generation of antibody mutants in germinal centres. **Nature**, v. 354, p. 389-392, 1991.

JANKOVIC, D.; TRINCHIERI, G. IL-10 or not IL-10: that is the question. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 1281-1283, 2007.

JANKOVIC, D.; KULLBERG, M. C.; FENG, C. G.; GOLDSZMID, R. S.; COLLAZO, C. M.; WILSON, M.; WYNN, T. A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A.; SHER, A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 273-283, 2007.

JEANNIN, P.; LECOANET, S.; DELNESTE, Y.; GAUCHAT, J. F.; BONNEFOY, J. Y. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **J. Immunol.**, v. 160, p. 3555-3561, 1998.

JOHNSON, K.; SHAPIRO-SHELEF, M.; TUNYAPLIN, C.; CALAME, K. Regulatory events in early and late B-cell differentiation. **Mol. Immunol.**, v. 42, p. 749-761, 2005.

JONES, A. T.; FEDERSPIEL, B.; ELLIES, L. G.; WILLIAMS, M. J.; BURGENER, R.; DURONIO, V.; SMITH, C. A.; TAKEI, F.; ZILTENER, H. J. Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 153, p. 3426-3439, 1994.

JORDAN, M. B.; MILLS, D. M.; KAPPLER, J.; MARRACK, P.; CAMBIER, J. C. Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. **Science**, v. 304, p. 1808-1810, 2004.

KALIA, V.; SARKAR, S.; GOURLEY, T. S.; ROUSE, B. T.; AHMED, R. Differentiation of memory B and T cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, p. 255-264, 2006.

KALLIES, A.; HASBOLD, J.; TARLINTON, D. M.; DIETRICH, W.; CORCORAN, L. M.; HODGKIN, P. D.; NUTT, S. L. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. **J. Exp. Med.**, v. 200, p. 967-977, 2004.

KANTOR, A. A new nomenclature for B cells. **Immunol. Today**, v. 12, p. 388, 1991.

KANTOR, A. B.; HERZENBERG, L. A. Origin of murine B cell lineages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 501-538, 1993.

KAWAKAMI, K. Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases. **J. Infect. Chemother.**, v. 9, p. 201-209, 2003.

KAWANO, M.; HIRANO, T.; MATSUDA, T.; TAGA, T.; HORII, Y.; IWATO, K.; ASAOKU, H.; TANG, B.; TANABE, O.; TANAKA, H. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. **Nature**, v. 332, p. 83-85, 1988.

KLEIN, U.; RAJEWSKY, K.; KUPPERS, R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 1679-1689, 1998.

KNODEL, M.; KUSS, A. W.; BERBERICH, I.; SCHIMPL, A. Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1972-1980, 2001.

KOBAYASHI, S.; HARUO, N.; SUGANE, K.; OCHS, H.D.; AGEMATSU, K. Interleukin-21 stimulates B-cell immunoglobulin E synthesis in human beings concomitantly with activation-induced cytidine deaminase expression and differentiation into plasma cells. **Hum. Immunol.**, v. 70, p. 35-40, 2009.

KOCKS, C.; RAJEWSKY, K. Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 537-559, 1989.

KOOL, M.; SOULLIE, T.; VAN, N. M.; WILLART, M. A.; MUSKENS, F.; JUNG, S.; HOOGSTEDEN, H. C.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 205, p. 869-882, 2008.

KORSMEYER, S. J. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. **Cancer Res.**, v. 59, p. 1693-1700, 1999.

KRAFT, S.; KINET, J. P. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 365-378, 2007.

KROESE, F. G.; BUTCHER, E. C.; STALL, A. M.; LALOR, P. A.; ADAMS, S.; HERZENBERG, L. A. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. **Int. Immunol.**, v. 1, p. 75–84, 1989.

KUCHEN, S.; ROBBINS, R.; SIMS, G. P.; SHENG, C.; PHILLIPS, T. M.; LIPSKY, P. E.; ETTINGER, R. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. **J. Immunol.**, v. 179, p. 5886-5896, 2007.

KUHN, R.; RAJEWSKY, K.; MULLER, W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. **Science**, v. 254, p. 707-710, 1991.

KUROWSKA-STOLARSKA, M.; KEWIN, P.; MURPHY, G.; RUSSO, R. C.; STOLARSKI, B.; GARCIA, C. C.; KOMAI-KOMA, M.; PITMAN, N.; LI, Y.; NIEDBALA, W.; MCKENZIE, A. N.; TEIXEIRA, M. M.; LIEW, F. Y.; XU, D. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. **J. Immunol.**, v. 181, p. 4780-4790, 2008.

LALOR, P. A.; NOSSAL, G. J.; SANDERSON, R. D.; HEYZER-WILLIAMS, M. G. Functional and molecular characterization of single, (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP)-specific, IgG1+ B cells from antibody-secreting and memory B cell pathways in the C57BL/6 immune response to NP. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 3001-3011, 1992.

LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHN, W. M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J. D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 233-240, 2005.

LEBMAN, D. A.; COFFMAN, R. L. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. **J. Exp. Med.**, v. 168, p. 853-862, 1988.

LI, Y. S.; WASSERMAN, R.; HAYAKAWA, K.; HARDY, R. R. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. **Immunity**, v. 5, p. 527-535, 1996.

LIGHVANI, A. A.; FRUCHT, D. M.; JANKOVIC, D.; YAMANE, H.; ALIBERTI, J.; HISSONG, B. D.; NGUYEN, B. V.; GADINA, M.; SHER, A.; PAUL, W. E.; O'SHEA, J. J. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, p. 15137-15142, 2001.

LIMA, C.; BIANCA, C. P.; MELIA PIRAN-SOARES, A.; TANJONI, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LOPES-FERREIRA, M. Characterizations of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. **Toxicon**, v. 42, p. 499-507, 2003.

LIPSKY, P. E. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 764-766, 2001.

LLORENTE, L.; RICHAUD-PATIN, Y.; FIOR, R.; COCER-VARELA, J.; WIJDENES, J.; FOURRIER, B. M.; GALANAUD, P.; EMILIE, D. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. **Arthritis Rheum.**, v. 37, p. 1647-1655, 1994.

LOPES-FERREIRA, M.; BARBARO, K. C.; CARDOSO, D. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, v. 36, p. 405-410, 1998.

LOPES-FERREIRA, M.; EMIM, J. A.; OLIVEIRA, V.; PUZER, L.; CEZARI, M. H.; ARAUJO, M. S.; JULIANO, L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 2151-2157, 2004.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I.; TAKEHARA, H. A. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. **Toxicon**, v. 38, p. 1149-1156, 2000.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIRAN-SOARES, A. A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; FARSKY, S. H. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. **Toxicon**, v. 40, p. 1141-1147, 2002.

LOPES-FERREIRA, M.; NUNEZ, J.; RUCAVADO, A.; FARSKY, S. H.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MOURA DA SILVA, A. M.; GUTIERREZ, J. M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, p. 55-64, 2001.

LUND, F. E.; GARVY, B. A.; RANDALL, T. D.; HARRIS, D. P. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. **Curr. Dir. Autoimmun.**, v. 8, p. 25 – 54, 2005.

MCLENNAN, I. C. Germinal centers. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 117-139, 1994.

MANZ, R. A.; LOHNING, M.; CASSESE, G.; THIEL, A.; RADBRUCH, A. Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. **Int. Immunol.**, v. 10, p. 1703-1711, 1998.

MANZ, R. A.; THIEL, A.; RADBRUCH, A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. **Nature**, v. 388, p. 133-134, 1997.

MANZ, R. A.; HAUSER, A. E.; HIEPE, F.; RADBRUCH, A. Maintenance of serum antibody levels. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 367-386, 2005.

MARTIN, F.; OLIVER, A. M.; KEARNEY, J. F. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. **Immunity**, v. 14, p. 617-629, 2001.

MARTIN, F.; KEARNEY, J. F. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, p. 195-201, 2001.

MARUYAMA, M.; LAM, K. P.; RAJEWSKY, K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. **Nature**, v. 407, p. 636-642, 2000.

MCINTIRE, J. J.; UMETSU, S. E.; AKBARI, O.; POTTER, M.; KUCHROO, V. K.; BARSH, G. S.; FREEMAN, G. J.; UMETSU, D. T.; DEKRUYFF, R. H. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 1109-1116, 2001.

MCMILLAN, R.; LONGMIRE, R. L.; YELENOSKY, R.; LANG, J. E.; HEATH, V.; CRADDOCK, C. G. Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of IgG production. **J. Immunol.**, v. 109, p. 1386-1394, 1972.

MEDINA, F.; SEGUNDO, C.; CAMPOS-CARO, A.; GONZALEZ-GARCIA, I.; BRIEVA, J. A. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. **Blood**, v. 99, p. 2154-2161, 2002.

MESSIKA, E. J.; LU, P. S.; SUNG, Y. J.; YAO, T.; CHI, J. T.; CHIEN, Y. H.; DAVIS, M. M. Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 515-525, 1998.

METCALFE, D. D. Differential diagnosis of the patient with unexplained flushing/anaphylaxis. **Allergy Asthma Proc.**, v. 21, p. 21-24, 2000.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.

METZGER, H. The receptor with high affinity for IgE. **Immunol. Rev.**, v. 125, p. 37-48, 1992.

METZGER, W. G. ; OKENU, D. M. ; CAVANAGH, D. R. ; ROBINSON, J. V.; BOJANG, K. A. ; WEISS, H. A. ; MCBRIDE, J. S. ; GREENWOOD, B. M. ; CONWAY, D. J. Serum IgG3 to the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. **Parasite Immunol.**, v. 25, p. 307-312, 2003.

MIZOGUCHI, A.; BHAN, A. K. A case for regulatory B cells. **J. Immunol.**, v. 176, p. 705-710, 2006.

MONTELEONE, G.; PALLONE, F.; MACDONALD, T. T. Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses. **Trends Immunol.**, v. 29, p. 290-294, 2008.

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

MOTA, I.; WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. **Life Sci.**, v. 8, p. 813-820, 1969.

MOULIN, D.; DONZE, O.; TALABOT-AYER, D.; MEZIN, F.; PALMER, G.; GABAY, C. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. **Cytokine**, v. 40, p. 216-225, 2007.

MUKAI, K.; MATSUOKA, K.; TAYA, C.; SUZUKI, H.; YOKOZEKI, H.; NISHIOKA, K.; HIROKAWA, K.; ETORI, M.; YAMASHITA, M.; KUBOTA, T.; MINEGISHI, Y.; YONEKAWA, H.; KARASUYAMA, H. Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. **Immunity**, v. 23, p. 191-202, 2005.

NDUNGU, F. M.; BULL, P. C.; ROSS, A.; LOWE, B. S.; KABIRU, E.; MARSH, K. Naturally acquired immunoglobulin (Ig) G subclass antibodies to crude asexual Plasmodium falciparum lysates: evidence for association with protection for IgG1 and disease for IgG2. **Parasite Immunol.**, v. 24, p. 77-82, 2002.

NERA, K. P.; KOHONEN, P.; NARVI, E.; PEIPPO, A.; MUSTONEN, L.; TERHO, P.; KOSKELA, K.; BUERSTEDDE, J. M.; LASSILA, O. Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. **Immunity**, v. 24, p. 283-293, 2006.

NEURATH, M. F.; FINOTTO, S.; GLIMCHER, L. H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. **Nat. Med.**, v. 8, p. 567-573, 2002.

NUIJEN, B.; BOUMA, M.; HENRAR, R.; MANADA, C.; BULT, A.; BEIJNEN, J. H. Compatibility and stability of apolidine, a novel marine-derive depsipeptide antitumor agent, in infusion devices, and its hemolytic and precipitation potential upon i.v. administration. **Anticancer Drugs**, v. 10, p. 879-886, 1999.

O'CONNOR, B. P.; RAMAN, V. S.; ERICKSON, L. D.; COOK, W. J.; WEAVER, L. K.; AHONEN, C.; LIN, L. L.; MANTCHEV, G. T.; BRAM, R. J.; NOELLE, R. J. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 91-98, 2004.

OLIVERA, B. M.; RIVIER, J.; CRAIG C.; CECILIA, A. R.; CORPUZ, G. P.; ABOGADIE, F.; MENA E. E.; WOODWARD, S. R.; HILLYARD, D. R.; Cruz, L. J. Diversity of Conus neuropeptides. **Science**, v. 249, p. 257-263, 1990.

OZAKI, K.; SPOLSKI, R.; ETTINGER, R.; KIM, H. P.; WANG, G.; QI, C. F.; HWU, P.; SHAFFER, D. J.; AKILESH, S.; ROOPENIAN, D. C.; MORSE, H. C., III; LIPSKY, P. E.; LEONARD, W. J. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. **J. Immunol.**, v. 173, p. 5361-5371, 2004.

OZAKI, K.; SPOLSKI, R.; FENG, C. G.; QI, C. F.; CHENG, J.; SHER, A.; MORSE, H. C. III.; LIU, C.; SCHWARTZBERG, P. L.; LEONARD, W. J. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. **Science**, v. 298, p. 1630-1634, 2002.

PARRISH-NOVAK, J.; DILLON, S. R.; NELSON, A.; HAMMOND, A.; SPRECHER, C.; GROSS, J. A.; JOHNSTON, J.; MADDEN, K.; XU, W.; WEST, J.; SCHRADER, S.; BURKHEAD, S.; HEIPEL, M.; BRANDT, C.; KUIJPER, J. L.; KRAMER, J.; CONKLIN, D.; PRESNELL, S. R.; BERRY, J.; SHIOTA, F.; BORT, S.; HAMBLY, K.; MUDRI, S.; CLEGG, C.; MOORE, M.; GRANT, F. J.; LOFTON-DAY, C.; GILBERT, T.; RAYOND, F.; CHING,

A.; YAO, L.; SMITH, D.; WEBSTER, P.; WHITMORE, T.; MAURER, M.; KAUSHANSKY, K.; HOLLY, R. D.; FOSTER, D. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. **Nature**, v. 408, p. 57-63, 2000.

PIRAN-SOARES, A. A.; BRUNI, F. M.; TÁVORA, J. P. F.; GUIDOLIN, R.; HIGASHI, H. G.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H. A.; LOPES-FERREIRA, M. Development of a new antivenom: experimental evidence of the efficacy of horse serum against *Thalassophryne nattereri* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 60, p. 95, 2003.

PIRAN-SOARES, A. A.; KOMEAGAE, E. N.; SOUZA, V. M.; FONSECA, L. A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Neutralizing antibodies obtained in a persistent immune response are effective against deleterious effects induced by the *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Toxicon**, v. 49, p. 920-930, 2007.

PELED, J. U.; KUANG, F. L.; IGLESIAS-USSEL, M. D.; ROA, S.; KALIS, S. L.; GOODMAN, M. F.; SCHARFF, M. D. The biochemistry of somatic hypermutation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 481-511, 2008.

PENE, J.; GUGLIELMI, L.; GAUCHAT, J. F.; HARRER, N.; WOISETSCHLAGER, M.; BOULAY, V.; FABRE, J. M.; DEMOLY, P.; YSSEL, H. IFN-gamma-mediated inhibition of human IgE synthesis by IL-21 is associated with a polymorphism in the IL-21R gene. **J. Immunol.**, v. 177, p. 5006-5013, 2006.

PENE, J.; ROUSSET, F.; BRIERE, F.; CHRETIEN, I.; BONNEFOY, J. Y.; SPITS, H.; YOKOTA, T.; ARAI, N.; ARAI, K.; BANCHEREAU, J. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 85, p. 6880-6884, 1988.

PUNNONEN, J.; AVERSA, G.; COCKS, B. G.; MCKENZIE, A. N.; MENON, S.; ZURAWSKI, G.; DE WAAL, M. R.; DE VRIES, J. E. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, p. 3730-3734, 1993.

RADBRUCH, A.; MUEHLINGHAUS, G.; LUGER, E. O.; INAMINE, A.; SMITH, K. G.; DORNER, T.; HIEPE, F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 741-750, 2006.

RAJEWSKY, K. Clonal selection and learning in the antibody system. **Nature**, v. 381, p. 751-758, 1996.

RAHMAN, Z.; YOSHIKAWA, H.; NAKAJIMA, Y.; TASAKA, K. Down-regulation of Pim-1 and Bcl-2 is accompanied with apoptosis of interleukin-6-depleted mouse B-cell hybridoma 7TD1 cells. **Immunol. Lett.**, v. 75, p. 199-208, 2001.

REFAELI, Y.; VAN, P. L.; LONDON, C. A.; TSCHOPP, J.; ABBAS, A. K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. **Immunity**, v. 8, p. 615-623, 1998.

REID, R. R.; PRODEUS, A. P.; KHAN, W.; HSU, T.; ROSEN, F. S.; CARROLL, M. C. Endotoxin shock in antibody-deficient mice: unraveling the role of natural antibody and complement in the clearance of lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 159, p. 970-975, 1997.

RIDLEY, R. C.; XIAO, H.; HATA, H.; WOODLIFF, J.; EPSTEIN, J.; SANDERSON, R. D. Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. **Blood**, v. 81, p. 767-774, 1993.

RINEHART, K. L. Antitumor compounds from tunicates. **Med. Res. Rev.**, v.20, p. 1-27, 2000.

ROLDAN, E.; BRIEVA, J. A. Terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high-rate immunoglobulin secretion: role of bone marrow stromal cells and interleukin 6. **Eur. J. Immunol.**, v. 21, p. 2671-2677, 1991.

ROTHSTEIN, T. L. Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4257-4261, 2002.

RUSSELL, F. E. **Poisonous Marine Animals**. New York: TFH Publications, 1971.

SAITO, T.; KITAYAMA, D.; SAKAMOTO, A.; TSURUOKA, N.; ARIMA, M.; HATANO, M.; MIYAZAKI, M.; TOKUHISA, T. Effective collaboration between IL-4 and IL-21 on B cell activation. **Immunobiology**, v. 213, p. 545-555, 2008.

SCHMITZ, J.; OWYANG, A.; OLDHAM, E.; SONG, Y.; MURPHY, E.; MCCLANAHAN, T. K.; ZURAWSKI, G.; MOSHREFI, M.; QIN, J.; LI, X.; GORMAN, D. M.; BAZAN, J. F.; KASTELEIN, R. A. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, p. 479-490, 2005.

SCHWALLER, J.; SCHNEIDER, P.; MHAWECH-FAUCEGLIA, P.; MCKEE, T.; MYIT, S.; MATTHES, T.; TSCHOPP, J.; DONZE, O.; LE GAL, F. A.; HUARD, B. Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. **Blood**, v. 109, p. 331-338, 2007.

SEUBERT, A.; MONACI, E.; PIZZA, M.; O'HAGAN, D. T.; WACK, A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 180, p. 5402-5412, 2008.

SHAFFER, A. L.; YU, X.; HE, Y.; BOLDRICK, J.; CHAN, E. P.; STAUDT, L. M. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. **Immunity**, v. 13, p. 199-212, 2000.

SHAPIRO-SHELEF, M.; CALAME, K. Regulation of plasma-cell development. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 230-242, 2005.

SIRAGANIAN, R. P. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 15, p. 639-646, 2003.

SKIBINSKI, G.; SKIBINSKA, A.; STEWART, G. D.; JAMES, K. Enhancement of terminal B lymphocyte differentiation in vitro by fibroblast-like stromal cells from human spleen. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 3940-3948, 1998.

SLIFKA, M. K.; AHMED, R. B cell responses and immune memory. **Dev. Biol. Stand.**, v. 95, p. 105-115, 1998.

SLIFKA, M. K.; AHMED, R. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, p. 252-258, 1998.

SLIFKA, M. K.; MATLOUBIAN, M.; AHMED, R. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. **J. Virol.**, v. 69, p. 1895-1902, 1995.

SMITH, K. G.; HEWITSON, T. D.; NOSSAL, G. J.; TARLINTON, D. M. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 444-448, 1996.

SMITH, K. G.; LIGHT, A.; NOSSAL, G. J.; TARLINTON, D. M. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. **EMBO J.**, v. 16, p. 2996-3006, 1997.

SMITH, K. G.; LIGHT, A.; O'REILLY, L. A.; ANG, S. M.; STRASSER, A.; TARLINTON, D. bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 475-484, 2000.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 139, p. 10-17, 1987.

SOKOL, C. L.; BARTON, G. M.; FARR, A. G.; MEDZHITOV, R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 310-318, 2008.

SPOLSKI, R.; LEONARD, W. J. The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 20, p. 295-301, 2008.

STAVNEZER, J.; GUIKEMA, J. E.; SCHRADER, C. E. Mechanism and regulation of class switch recombination. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 261-292, 2008.

SWAIN, S. L.; DUTTON, R. W.; MCKENZIE, D.; HELSTROM, H.; ENGLISH, M. Role of antigen in the B cell response. Specific antigen and the lymphokine IL-5 synergize to drive B cell lymphoma proliferation and differentiation to Ig secretion. **J. Immunol.**, v. 140, p. 4224-4230, 1988.

SUTO, A.; NAKAJIMA, H.; HIROSE, K.; SUZUKI, K.; KAGAMI, S.; SETO, Y.; HOSHIMOTO, A.; SAITO, Y.; FOSTER, D. C.; IWAMOTO, I. Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C(epsilon) transcription of IL-4-stimulated B cells. **Blood**, v. 100, p. 4565-4573, 2002.

SZABO, S. J.; KIM, S. T.; COSTA, G. L.; ZHANG, X.; FATHMAN, C. G.; GLIMCHER, L. H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, p. 655-669, 2000.

SZE, D. M.; TOELLNER, K. M.; GARCIA, D. V.; TAYLOR, D. R.; MACLENNAN, I. C. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 813-821, 2000.

TAKATSU, K.; TAKAKI, S.; HITOSHI, Y. Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. **Adv. Immunol.**, v. 57, p. 145-190, 1994.

TAKATSU, K. Interleukin 5 and B cell differentiation. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 9, p. 25-35, 1998.

TANGTEERAWATANA, P.; MONTGOMERY, S. M.; PERLMANN, H.; LOOAREESUWAN, S.; TROYE-BLOMBERG, M.; KHUSMITH, S. Differential regulation of IgG subclasses and IgE antimalarial antibody responses in complicated and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. **Parasite Immunol.**, v. 29, p. 475-83, 2007.

TANGYE, S. G.; LIU, Y. J.; AVERSA, G.; PHILLIPS, J. H.; DE VRIES, J. E. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 1691-1703, 1998.

TAYLOR, R. R.; ALLEN, S. J.; GREENWOOD, B. M.; RILEY, E. M. IgG3 antibodies to Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 406-413, 1998.

TEBO, A. E.; KREMENER, P.; LUTY, A. J. Plasmodium falciparum: a major role for IgG3 in antibody-dependent monocyte-mediated cellular inhibition of parasite growth in vitro. **Exp. Parasitol.**, v. 98, p. 20-28, 2001.

TERSTAPPEN, L. W.; JOHNSEN, S.; SEGERS-NOLTEN, I. M.; LOKEN, M. R. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. **Blood**, v. 76, p. 1739-1747, 1990.

TEW, J. G.; WU, J.; QIN, D.; HELM, S.; BURTON, G. F.; SZAKAL, A. K. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. **Immunol. Rev.**, v. 156, p. 39-52, 1997.

THOMPSON, J. S.; BIXLER, S. A.; QIAN, F.; VORA, K.; SCOTT, M. L.; CACHERO, T. G.; HESSION, C.; SCHNEIDER, P.; SIZING, I. D.; MULLEN, C.; STRAUCH, K.; ZAFARI, M.; BENJAMIN, C. D.; TSCHOPP, J.; BROWNING, J. L.; AMBROSE, C. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. **Science**, v. 293, p. 2108-2111, 2001.

TRAGGIAL, E.; PUZONE, R.; LANZAVECCHIA, A. Antigen dependent and independent mechanisms that sustain serum antibody levels. **Vaccine**, v. 21, p. 35-37, 2003.

TSUJIMURA, Y.; OBATA, K.; MUKAI, K.; SHINDOU, H.; YOSHIDA, M.; NISHIKADO, H.; KAWANO, Y.; MINEGISHI, Y.; SHIMIZU, T.; KARASUYAMA, H. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. **Immunity**, v. 28, p. 581-589, 2008.

TUMANG, J. R.; FRANCES, R.; YEO, S. G.; ROTHSTEIN, T. L. Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. **J. Immunol.**, v. 174, p. 3173-3177, 2005.

TURNER, C. A. JR.; MACK, D. H.; DAVIS, M. M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. **Cell**, v. 77, p. 297-306, 1994.

VAN KESTEREN, C.; TWELVES, C.; BOWMAN, A.; HOEKMAN, K.; LOPEZ-JAZARO JIMENO, J.; GUZMÁN, C.; MATHOT, R. A.; SIMPSON, A.; VERMORKEN J. B.; SMYTL, J.; SCHELLENS, J. H.; HILLEBRAND, M. J.; ROSING, H.; BEIJNEN, J. H. Clinical pharmacology of the novel marine-derived anticancer agent ecteinascidin 743 administered as a 1-and 3-h infusion in a phase in study. **Anticancer Drugs**, v.13, p.381-393, 2002.

VIEIRA, P.; RAJEWSKY, K. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 18, p. 313-316, 1990.

VOGELZANG, A.; MCGUIRE, H. M.; YU, D.; SPRENT, J.; MACKAY, C. R.; KING, C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. **Immunity**, v. 29, p. 127-137, 2008.

WEHRLI, N.; LEGLER, D. F.; FINKE, D.; TOELLNER, K. M.; LOETSCHER, P.; BAGGIOLINI, M.; MACLENNAN, I. C.; CHA-ORBEA, H. Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 609-616, 2001.

WURSTER, A. L.; RODGERS, V. L.; SATOSKAR, A. R.; WHITTERS, M. J.; YOUNG, D. A.; COLLINS, M.; GRUSBY, M. J. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 969-977, 2002.

WYMANN, M. P.; BJORKLOF, K.; CALVEZ, R.; FINAN, P.; THOMAST, M.; TRIFILIEFF, A.; BARBIER, M.; ALTRUDA, F.; HIRSCH, E.; LAFFARGUE, M. Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p. 275-280, 2003.

ZHONG, X.; GAO, W.; DEGAUQUE, N.; BAI, C.; LU, Y.; KENNY, J.; OUKKA, M.; STROM, T. B.; ROTHSTEIN, T. L. RECIPROCAL GENERATION OF TH1/TH17 AND T(REG) CELLS BY B1 AND B2 B CELLS. **EUR. J. IMMUNOL.**, V. 37, P. 2400-2404, 2007.

ZHU, J.; YAMANE, H.; COTE-SIERRA, J.; GUO, L.; PAUL, W. E. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. **Cell Res.**, v. 16, p. 3-10, 2006.

ZURAWSKI, G.; DE VRIES, J. E. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. **Immunol. Today**, v. 15, p. 19-26, 1994.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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