

EVILIN NANAME KOMEgae

**PAPEL DOS RECEPTORES INATOS *TLR* NA FORMAÇÃO DE MEMÓRIA
HUMORAL E LINFÓCITOS B DE LONGA VIDA: AÇÃO DAS PROTEASES
NATTERINAS, TOXINAS MAJORITÁRIAS DO VENENO DE**

Thalassophryne nattereri

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

São Paulo
2010

EVILIN NANAME KOMEGAE

**PAPEL DOS RECEPTORES INATOS *TLR* NA FORMAÇÃO DE MEMÓRIA
HUMORAL E LINFÓCITOS B DE LONGA VIDA: AÇÃO DAS PROTEASES
NATTERINAS, TOXINAS MAJORITÁRIAS DO VENENO DE**

Thalassophryne nattereri

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

Área de Concentração: Imunologia

São Paulo
2010

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

reprodução não autorizada pelo autor

Komegae, Evilin Naname.

Papel dos receptores inatos *TLR* na formação de memória humoral e linfócitos B de longa vida: ação das proteases Natterinas, toxinas majoritárias do veneno de *Thalassophryne nattereri* / Evilin Naname Komegae. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Carla Lima da Silva.

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: Role of innate *TLR* receptors in formation of humoral memory and long-life lymphocytes B: action of natterins proteases, majority toxins of *Thalassophryne nattereri* venom.

Descritores: 1. Veneno de peixe 2. Plasmócito de vida longa (ASC) 3. Células B1 4. Memória imunológica 5. Receptores do tipo *Toll* 6. Sinalização *MyD88* I. Silva, Carla Lima da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Evilin Naname Komegae.

Título da Dissertação: Papel dos receptores inatos TLR na formação de memória humoral e linfócitos B de longa vida: ação das proteases Natterinas, toxinas majoritárias do veneno de *Thalassophryne nattereri*.

Orientador(a): Carla Lima da Silva.

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 **92** nas fls. **60** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Carla Lima da Silva, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Avaliação do efeito das Natterinas, toxinas majoritárias do veneno de Thalassophryne nattereri, na indução de resposta de memória e diferenciação de linfócitos B**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Evilin Naname Komegae e a Pesquisadora Mônica Lopes Ferreira**, 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 **15.10.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de outubro 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

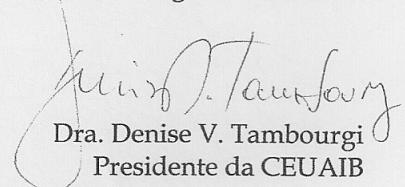
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do efeito das Natterinas, toxinas majoritárias do veneno de *Thalassophryne nattereri*, na indução da resposta de memória e diferenciação de linfócitos B", protocolo nº **504/08**, sob a responsabilidade de Carla Lima e Evilin Naname Komegae, 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**.

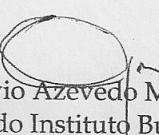
We certify that the research entitled "Evaluation of the effect of Natterinas, majority toxins of the *Thalassophryne nattereri*, on the memory response induction and differentiation of B lymphocytes" is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of 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 120/ camundongo – Balb/c
---	---

São Paulo, 26 de agosto de 2008.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

RESUMO

KOMEGAE, E. N. Papel dos receptores inatos TLR na formação de memória humoral e linfócitos B de longa vida: ação das proteases Natterinas, toxinas majoritárias do veneno de *Thalassophryne nattereri*. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A contribuição de células B para a memória imunológica se dá por duas distintas populações de células: células B de memória e células produtoras de anticorpos de longa vida (ASC). Entretanto, a inter-relação entre estas células bem como os mecanismos envolvidos para a manutenção destas tem sido pouco entendida. O veneno de *Thalassophryne nattereri* tem se mostrado capaz de induzir uma intensa resposta imune de memória. Neste sentido, nos propusemos a avaliar o efeito da Natterinas, toxinas majoritárias do veneno e que não apresentam homologia com nenhuma proteína presente em banco de dados, na indução e manutenção da resposta imune de memória de células B, focando a importância da atividade proteásica. Bem como, avaliar o papel dos receptores tipo *Toll* e de sua sinalização *MyD88* na regulação deste processo. Para isto, camundongos foram imunizados com as Natterinas proteoliticamente ativa ou inativa adsorvidas em hidróxido de alumínio, após 7, 21 e 28 dias os animais foram injetados apenas com as Natterinas. Após 48, 74 e 120 dias, os animais foram sangrados para obtenção do plasma para dosagens de anticorpos por Elisa ou PCA. Em seguida, os animais foram mortos para obtenção das células do compartimento efetor (Peritônio), de importantes compartimentos para manutenção das respostas imunes (Baço e medula óssea). Nossos resultados mostraram que a atividade proteásica das Natterinas é importante não só pela indução do perfil de resposta Th2 (altos títulos de IgG1 e IgE anafiláticos), mas pela manutenção da cronicidade de resposta de distintos subtipos de células B (B1a, B1b, B2, B efetora/memória, ASC B220 positiva e negativa) nos três compartimentos analisados, uma vez que as Natterinas inativas tendem ao perfil de resposta Th1 (IgG2a), induzindo uma melhor resposta precoce e principalmente local. Utilizando camundongos deficientes de *TLR4* ou *MyD88*, observamos que a resposta de memória induzida pelas Natterinas é regulada por mecanismos dependentes de *TLR4/MyD88* na regulação negativa de células B efetoras/memória durante todo o curso da resposta e supressão de IgE no período tardio. Uma regulação positiva de células B1a e B2 no período recente também são mediadas por esta via. E o mais importante, *TLR4* via *MyD88* são responsáveis pela manutenção de ASCs convencionais no compartimento efetor por longos períodos. Durante a resposta anti-Natterinas, também observamos mecanismos dependentes de *TLR4*, porém independentes de *MyD88*, sugerindo a outra via de

sinalização do TLR4, via TRIF, que parecem ser os responsáveis pela: Indução de anticorpos IgG1 e IgE no período recente, pela indução de ASCs B220⁺ e supressão de células B2 durante a resposta crônica, ou mesmo controlando a migração de células B1a e B1b do peritônio. Ainda, mecanismos dependentes de *MyD88*, porém independentes *TLR4* também foram observados na regulação da resposta anti-Natterinas, o que indica que as Natterinas possam mediar respostas via outros receptores do tipo *Toll*, que controlam a regulação negativa de anticorpos de perfil Th2 e são os responsáveis pela manutenção ASCs por longos períodos no baço e na medula óssea.

Portanto, o estudo com as proteases Natterinas além de permitir um maior esclarecimento da resposta humoral de memória induzida pelo veneno do peixe *T. nattereri*, permitiu o estudo da complexa organização do compartimento de células B de memória, principalmente do subtipo de longa sobrevida (ASC). Também nos permitiu evidenciar a importância da atividade proteásica das Natterinas para a manutenção da cronicidade de resposta de células B nos três compartimentos analisados, como verificarmos que a ativação de receptores inatos como os TLRs é decisiva para a geração e manutenção de células ASCs B220^{pos/neg} em resposta às Natterinas, dependentes das vias de sinalização *MyD88* ou *TRIF*. Estas sinalizações controlam a magnitude, a qualidade e a longa duração da resposta humoral de memória através da ação em diferentes subtipos de células B, em diferentes estágios de diferenciação e em diferentes microambientes. Apoio: FAPESP.

Palavras-chave: *Thalassophryne nattereri*. Células produtoras de anticorpos de vida longa (ASC). Células B1. Memória imunológica. Receptores do tipo *Toll*. Sinalização *MyD88*.

ABSTRACT

KOMEGAE, E. N. **Role of innate TLR receptors in formation of humoral memory and long-life lymphocytes B:** Action of Natterins proteases, majority toxins of *Thalassophryne nattereri* venom. 2010. 96 f. Master thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The contribution of B cells for the immunological memory feels for two different populations of cells: memory B cells and long lived antibodies secreting cells (ASC). However, the interrelation among these cells as well as the mechanisms involved for the maintenance of these it has been little understood. The venom of *Thalassophryne nattereri* has if shown capable to induce an intense memory immune response. In this sense, we intended to evaluate the effect of Natterins, majority toxins of the venom and that they don't present homology with any present protein in database, in the induction and maintenance of the immune memory response of cells B, focusing the importance of the proteases activity. As well as, to evaluate the paper of *Toll* like receptors and *MyD88* signalling in the regulation of this process. For this, mice were immunized with the Natterins activates or inactive adsorbed in alum, after 7, 21 and 28 days the mice were just injected with Natterins . After 48, 74 and 120 days, the animals were bled for obtaining of the plasma for dosages of antibodies for Elisa or PCA. Soon afterwards, the animals were killed for obtaining of the cells of the effector compartment (Peritoneum), of important compartments for maintenance of the immune responses (Spleen and bone marrow). Our results showed that the proteases activity of Natterins is important not only for the induction of the profile Th2 response (high titles of IgG1 and IgE), but for the maintenance of the chronicity of response of different subtypes of B cells (B1a, B1b, B2, effector/memory B cell, ASC positive and negative B220 expression) in the three analyzed compartments. The inactive Natterins tend to the profile Th1 responses (IgG2a), inducing a better precocious responses and mainly in effector compartment. Using deficient mice of *TLR4* or *MyD88*, we observed that the memory response induced by Natterins is regulated by dependent mechanisms of *TLR4/MyD88* in the negative regulation of effector/memory B cells during whole the course of the response and suppression of IgE in the late period. A positive regulation of B1a and B2 cells in the recent period are also mediated by this road. And the most important, *TLR4* through *MyD88* are responsible for the maintenance of conventional ASCs in the effector compartment for long periods. During the anti-Natterinas response, we also observed dependent mechanisms of *TLR4*, however independent of *MyD88*, suggesting the other road of signalling of *TLR4*, through *TRIF*, that seem to be the responsible for the: induction of antibodies IgG1 and IgE in the recent period, for ASCs B220⁺

induction and suppression of B2cells during the chronic response, or even controlling the migration of B1a and B1b cells of the peritoneum. Still, dependent mechanisms of MyD88, however independent TLR4 were also observed in the regulation of the anti-Natterins response, what indicates that Natterins can mediate responses road other *Toll* like receptors, that control the negative regulation of profile Th2 antibodies and they are the responsible for the maintenance ASCs for long periods in the spleen and in the bone marrow. Therefore, the study with the proteases Natterins besides allowing a larger explanation of the humoral memory response induced by the venom of the fish *T. nattereri*, it allowed the study of the complex organization of the compartment of memory B cells , mainly of the subtype of long lived (ASC). Also, allowed to evidence us the importance of the proteases activity of Natterins for the maintenance of the chronicity of B cells response in the three analyzed compartments, as we verify that the activation of Toll like receptors is decisive for the generation and maintenance of cells ASCs B220^{pos/neg} in response to Natterins, dependent of the signaling MyD88 or TRIF. These signallings control the quality and the long duration of the humoral memory response through the action in different subtypes of B cells, in different differentiation apprenticeships and in different environment. Support: FAPESP.

Keywords: *Thalassophryne nattereri*. Long-lived antibody secreting cells (ASC). B1 cells. Immunological memory. *Toll* like receptors. *MyD88* signaling.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Animais	26
3.2 Obtenção das Natterinas.....	26
3.3 Indução de Resposta Imune de Memória	26
3.4 Obtenção de Células da Cavidade Peritoneal	27
3.5 Obtenção de Células Esplênicas	27
3.6 Obtenção das Células de Medula Óssea	27
3.7 Análise por Citometria de Fluxo.....	28
3.8 Ensaio Imunoenzimático para Detecção de Anticorpos.....	28
3.9 Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva - PCA.....	29
3.10 Análise Histológica e Imunohistoquímica	29
3.11 Análise Estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Resposta de Memória Induzida pelas Natterinas.....	32
4.1.1 Resposta de memória humorai	32
4.1.2 Subtipos de células B	33
4.2 Regulação por TLR4 da Resposta Imune de Memória Induzida pelas Natterinas	42
4.2.1 Protocolo de indução de memória pelas Natterinas em camundongos funcionalmente deficientes do TLR4.....	45
4.2.2 Resposta de anticorpos induzida pelas Natterinas na ausência do TLR4	46
4.2.3 Regulação por TLR4 da diferenciação de subtipos de células B na resposta anti-Natterinas.....	49
4.3 Efeito da Ausência da Sinalização via MyD88 na Resposta Imune de Memória Induzida pelas Natterinas	57
4.3.1 Protocolo de indução de memória pelas Natterinas em camundongos knockout de MyD88	58
4.3.2 Resposta de anticorpos induzida pelas Natterinas na ausência da sinalização MyD88	59
4.3.3 Regulação por MyD88 da diferenciação de subtipos de células B na resposta anti-Natterinas... 	61
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÃO	81
7 REFERÊNCIAS	83

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A memória imunológica é um marco da resposta imune adaptativa de vertebrados superiores e é responsável pela imunidade de longo prazo contra uma enorme variedade de agentes infecciosos. A contribuição de células B para a memória imunológica T dependente se dá por duas distintas populações de células que são geradas durante a resposta imune primária no centro germinativo dos órgãos linfóides secundários: células B de memória e células B de memória de longa vida (*antibody secreting cells – ASC*; MANZ et al., 2005).

Células B humanas de memória que apresentam mutações somáticas no gene que codifica a região variável da imunoglobulina se diferenciam das virgens funcionalmente por serem capazes de desencadear uma resposta de anticorpo forte e rápida, morfologicamente por serem maiores e fenotipicamente por expressarem altos níveis de moléculas de ativação e co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD95, sendo negativas para IgD ou CD23 (TANGYE e TARLINTON, 2009; KLEIN et al., 1998; TANGYE et al., 1998).

A população de células B de memória expressa anticorpos de membrana que já sofreram mudança de isótipo e carregam mutações somáticas dentro da região variável da porção CDR (RAJEWSKY et al., 1996; KLEIN et al., 1998), além de moléculas como CD19, CD27 (humanos) e B220. Estas células possuem intensa capacidade de diferenciação e proliferação dependentes da repressão dos fatores apoptóticos Pax-5- e Bcl-6. Embora demonstrem preferência para se localizarem nos sítios de sua formação elas também re-circulam (BAINE et al., 1982). Conferem imunidade pela capacidade de autorenovação homeostática e por montarem respostas rápidas e vigorosas para o antígeno original após uma re-exposição.

Ao contrário, as ASC que expressam baixos níveis da molécula B220 são positivas para as moléculas como CD138, CD43, CD38, CD62L e CD93 (ARCE et al., 2004; KALLIES et al., 2004; CHEVRIER et al., 2009). Também expressam várias moléculas de adesão como VLA-4, VLA-5, CD9, CD44 (RIDLEY et al., 1993; MEDINA et al., 2002) e não se diferenciam nem proliferam.

Possuem capacidade migratória baixa ocupando nichos limitados na medula óssea (SLIFKA et al., 1995; ELLYARD et al., 2004), no baço (MAMANI-MATSUDA et al., 2008) e em locais inflamados (SMITH et al., 1996) em resposta a quimiocina CXCL12 e à molécula de adesão VCAM-1 expressos nas células estromais (HAUSER et al., 2002; WEHRLI et al., 2001). Nichos periféricos de manutenção de células ASCs providenciam uma forma elegante de manter em proximidade a célula de longa vida

ativa produtora de altas concentrações de anticorpos por segundo no local onde o antígeno persiste (JANOSSY et al., 1977).

As ASCs são importantes componentes da imunidade de memória por serem capazes de sobreviver e sustentar altos níveis de anticorpos neutralizantes importantes para manter a imunidade por vários anos, tornando-se um pilar da vacinação (CASTELLINO et al., 2009). Elas sobrevivem funcionalmente ativas mesmo na ausência do antígeno, ou seja, independente de sinais oriundos do BCR (MARUYAMA et al., 2000), pela expressão intrínseca de BLIMP-1, XBP-1 e IRF-4 (SHAPIRO-SHELEF e CALAME, 2005; LIN et al., 2002; SHAFFER et al., 2002, 2004) e fatores extrínsecos como citocinas IL-6, IL-5, TNF- α , o ligante para a molécula de adesão CD44, a quimiocina SDF-1 - CXCL12 (CASSESE et al., 2003), membros da família do TNF como APRIL (ligante indutor de proliferação) e BAFF (fator de ativação de célula B) (INGOLD et al., 2005; THOMPSON et al., 2001).

As células B do compartimento de memória podem também 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 autoreabastecimento e repertório de anticorpos e por serem células com características de defesa inata e de vida longa (KANTOR e HERZENBERG, 1993).

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 e são fontes de anticorpos de reações cruzadas com uma variedade de抗ígenos próprios tornando-se células produtoras de imunoglobulinas de todos os isotipos (HAYAKAWA et al., 1984; KANTOR e HERZENBERG, 1993) principalmente em resposta a estimulação antigênica por lipopolissacarídeo ou citocinas. Além disso, seus progenitores são abundantes no feto e no fígado, e recentemente progenitores destas células foram descobertos na medula óssea de animais adultos (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2006). Possuem capacidade de autoabastecimento principalmente nas cavidades peritoneal e pleural, sendo virtualmente ausentes no linfonodo e no sangue periférico onde é mais convencional a presença de células B2.

Fenotipicamente células B1a são caracterizadas por expressarem B220^{low} CD19^{high} IgM^{high} IgD^{low} CD43^{pos} CD5^{pos} CD23^{neg} e as B1b são B220^{low} CD19^{high} IgM^{high} IgD^{low} CD43^{pos} CD5^{neg} CD23^{neg} CD11b^{pos}. Ambos os subtipos de B1 expressam constitutivamente a cadeia alfa do receptor de IL-5 (IL-5R α) e os genes BLIMP-1 e XBP-1 o que explica sua capacidade de longa vida e a produção de IgM natural e contínua. 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 à autoantígenos (ROTHSTEIN, 2002).

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. HA e colaboradores (2006) demonstraram que a sinalização por receptores do tipo *Toll Like Receptors* – TLRs nas células B1 induz uma rápida, específica e transiente regulação da expressão de integrinas e da molécula CD9, permitindo o deslocamento na matriz local com alta velocidade de movimento em resposta a quimiocinas. Essas células podem, portanto migrar para os órgãos linfóides secundários tornando-se células produtoras de anticorpos de vida longa. Além da capacidade das células B1 de produção de citocinas, apresentação de抗ígenos e diferenciação em ASC, a intensa expansão destas células tem sido bastante associada à autoimunidade (YANABA et al., 2008).

Células B2 foliculares são conhecidas pela expressão dos marcadores $B220^{high}CD19^{low}IgM^{low}IgD^{high}CD43^{neg}CD5^{neg}CD23^{pos}$. Elas representam a população dominante no baço e estão presentes também nos linfonodos, re-circulam e são continuamente geradas na medula óssea. Após o reconhecimento de抗ígenos em condições apropriadas de ajuda dos linfócitos T, as células B2 migram para os centros germinativos onde proliferam e maturam a afinidade dos anticorpos específicos. Além disso, elas se diferenciam em células produtoras de anticorpos do tipo B de memória ou de longa vida - ASCs.

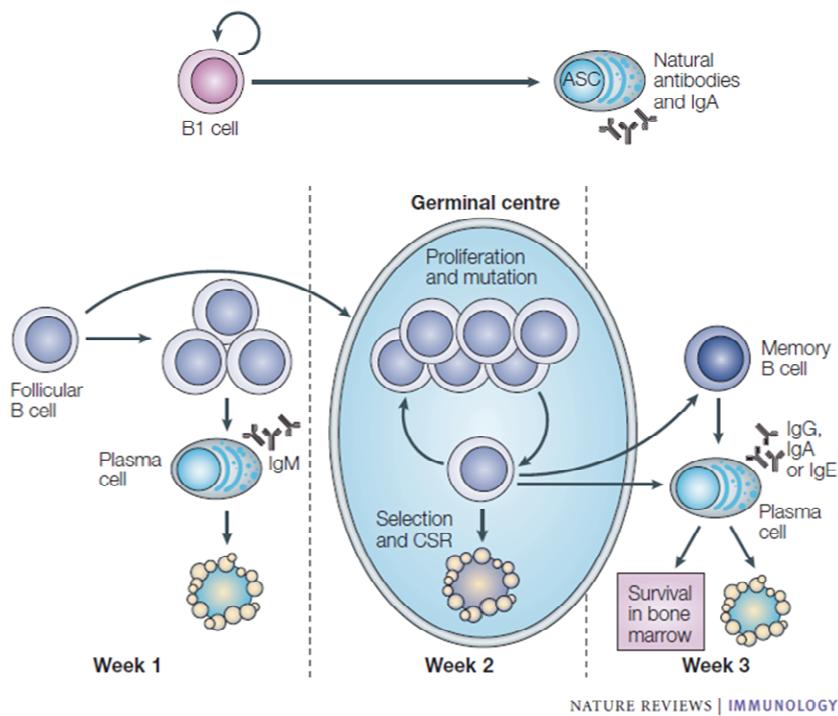


Figura 1. Regulação do desenvolvimento de plasmócitos.

Fonte: Shapiro-Shelef e Calame (2005)

Vale ressaltar que a inter-relação entre células B de memória e as de longa vida (ASC) com o mecanismo celular e molecular da sua geração, função e manutenção ainda é pouco entendida (AHUJA et al., 2008). Podemos justificar a importância do estudo da geração e manutenção de células ASC por 3 razões: a) da perspectiva da biologia fundamental dos linfócitos, b) do entendimento da regulação dos mecanismos de sobrevivência celular que podem ser importantes para o desenho de novas vacinas e c) por serem as células ASCs fonte de autoanticorpos os quais são patogênicos em diversas doenças autoimunes e não serem controladas por drogas anti-proliferativas.

No que diz respeito à sobrevivência das células de memória, a idéia mais aceita atualmente é a de que elas persistam mesmo na ausência do antígeno (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 (TEW et al., 1997; GRAY, 2002; GATTO et al., 2007). Em alguns casos, a exposição crônica ao antígeno poderia ser responsável, embora seja improvável que isto explique a presença de anticorpos para antígenos transientes como o toxóide tetânico e o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) (ZINKERNAGEL et al., 1996).

Apesar das ASC 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: células B de memória B220+ CD19+ 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 (MCHEYZER-WILLIAMS et al., 2000).

Na tentativa de esclarecer os mecanismos moleculares de indução e de manutenção de imunidade de memória duradoura, pesquisadores vêm demonstrando um papel importante para os receptores especializados em reconhecimento de padrões antigênicos da resposta inata, como os TLRs (PALM e MEDZHITOY, 2009). Diversos autores afirmam que a estimulação destes receptores inatos é decisiva para a geração de respostas T dependentes de memória de grande magnitude, qualidade e de longa duração (ZHU et al., 2007; QUIGLEY et al., 2009; ZHU et al., 2009).

Bernasconi et al. (2002) relataram que agonistas dos receptores TLR induzem células B humanas de memória a proliferarem e se diferenciarem em ASC *in vitro*. Ademais, células B foliculares murinas podem ser ativadas por ligantes de TLR como o LPS, uma vez que expressam receptores essenciais para a sinalização, como o complexo TLR4/MD-2 e altos níveis da proteína RP105 – CD180 (OGATA et al., 2000; GERONDAKIS et al., 2007; DASARI et al., 2005). Considerando que estímulos policlonais podem contribuir para as respostas imunes via TLRs e que o LPS, ligante de TLR4, é suficiente para induzir e/ou manter a expressão de BLIMP-1 pelas células B na ausência de sinalização via BCR (SHAPIRO-SHELEF e CALAME, 2005), a avaliação do papel dos TLRs na modulação da resposta humoral, em especial para a geração de células ASC torna-se uma promissora área de estudo.

TLRs representam uma família de receptores especializados em reconhecimento de padrões antigênicos evolutivamente conservados (AKIRA et al., 2001; MEDZIHITOF e JANEWAY JR, 2000; PULENDTRAN e AHMED, 2006). Os TLRs estimulam indiretamente a resposta imune adaptativa pela ativação de células inatas que produzem citocinas inflamatórias e quimiocinas e pela super-expressão de moléculas co-estimuladoras, mas também podem ativar diretamente as células T e B (CARAMALHO et al., 2003; DASARE et al., 2005; KABELITZ, 2007). A participação de receptores TLRs na ativação de células B foi descrita por Leadbetter et al. (2002) que mostraram que a ativação efetiva de células B requer uma ligação sinérgica do BCR e de membros da família dos TLRs, mostrando um papel decisivo para os receptores TLR no grau de ativação celular e na qualidade da função efetora.

Em murinos, a análise genômica revelou a existência de 13 diferentes TLRs. A maioria dos TLRs humanos (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 e 11) é expressa na superfície celular, enquanto outros (TLR 3, 7, 8 e 9) estão presentes em compartimentos endossomais de diferentes tipos celulares do sistema imune inato e adquirido, mas também em células não imunes. TLR4 alterna entre ciclos no complexo de Golgi e na membrana plasmática celular até ser ligado pelo LPS. A cascata de sinalização MyD88-dependente é então iniciada na membrana, seguido pelo movimento do complexo TLR4/LPS para o endossomo, onde a cascata de sinalização MyD88-independente é ativada (MCGETTRICK e O'NEILL, 2010).

Cada receptor TLR reconhece um distinto estímulo antigênico, que normalmente são padrões moleculares conservados associados à patógenos (PAMPs). Entretanto, os TLRs também podem requerer proteínas acessórias para reconhecerem seus ligantes ou reconhecer inúmeros ligantes endógenos não relacionados estruturalmente (MEDZHITOF, 2001). Interações dos TLRs (domínio extracelular C-terminal rico em leucinas repetidas) com seus ligantes específicos conduzem ao recrutamento intracelular de moléculas adaptadoras com domínio N-terminal TIR, tais como MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM. Este processo resulta no recrutamento de proteínas da família IRAK e TRAF para o complexo receptor, gerando a ativação de MAPKs e JUN N-terminal (JNKs), p38 e ERKs quinases e fatores como *interferon regulatory factor* (IRF3, IRF5 e IRF7) e a ativação de NF-κB e AP-1 que são essenciais para a indução de resposta imune inata e adaptativa (AKIRA et al., 2006; KAWAI e AKIRA, 2007).

Os mais bem caracterizados ligantes dos receptores do tipo TLR derivados de patógenos são: Lipídio A, componente de lipopolissacarídio (LPS; endotoxina) de bactérias Gram-negativas, o qual estimula TLR4 em associação com co-receptores CD14 e MD-2; lipoproteínas bacterianas e ácido lipotécóico e zimosan fúngico, os quais estimulam TLR1, TLR2 e TLR6; flagelina bacteriana, que ativa TLR5; a molécula profilin-like do protozoário *Toxoplasma gondii*, que ativa TLR11; motivos de CpG não metilados presentes em DNA que funcionam como estimuladores de TLR9; RNA de dupla fita que ativa TLR3; e RNA de fita simples que pode estimular TLR7 e TLR8.

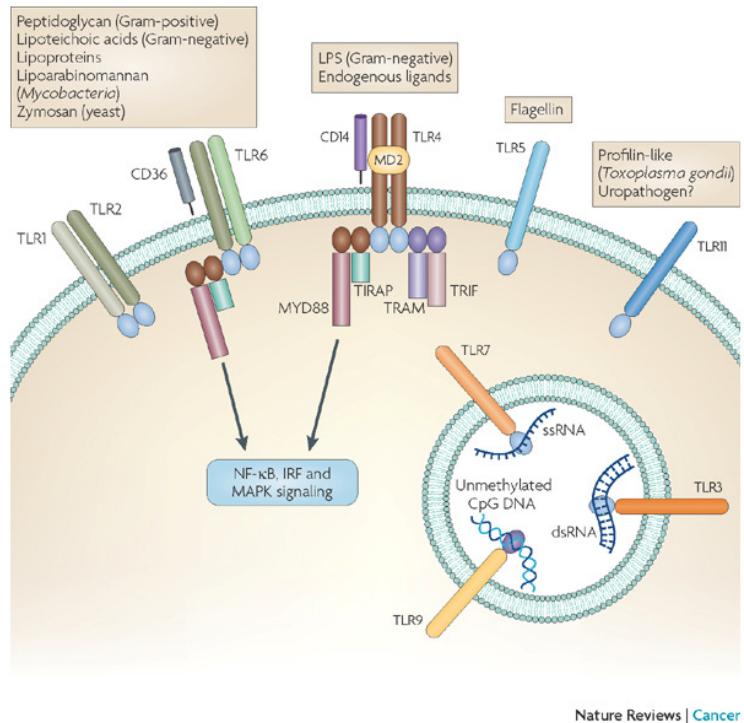


Figura 2. Funções fisiológicas dos Receptores do tipo Toll (TLRs).

Fonte: Rakoff-Nahoum e Medzhitov (2009)

Além de ligantes dos receptores do tipo TLR derivados de patógenos, um crescente número de ligantes endógenos vem sendo descritos como estimuladores de TLRs, em particular de TLR2 e TLR4, incluindo proteínas de choque séptico (HSP60, HSP70, endoplasmmina, HSPB8 e α -crystallin A chain), *high mobility group box 1* (HMGB1), cristais de ácido úrico, proteína surfactante A e vários produtos de matriz extracelular como fibronectina, heparan sulfato, biglican, fibrinogênio, oligossacáridios de hialuronan e fragmentos de hialuronan (AKIRA et al., 2006).

Os receptores do tipo TLRs transmitem sinais através de uma entre quatro proteínas adaptadoras: *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), TICAM1 (também conhecido como TRIF - *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*), TIRAP (também conhecido como MAL) e TICAM2 (também conhecido como TRAM e TIRP). Todos os receptores do tipo TLRs (exceto por TLR3) e os membros da família de receptores IL-1 sinalizam via MyD88. TLR3 sinaliza via TICAM1 e TLR4 sinalizam via MyD88 e/ou TRIF. De maneira semelhante ao TLR2, o TLR4 pode utilizar MAL como uma molécula adaptadora para recrutar o MyD88 para ativar vias MAPK para a indução de NF-κB, p38, JNK (MEDZHITOV et al., 1998).

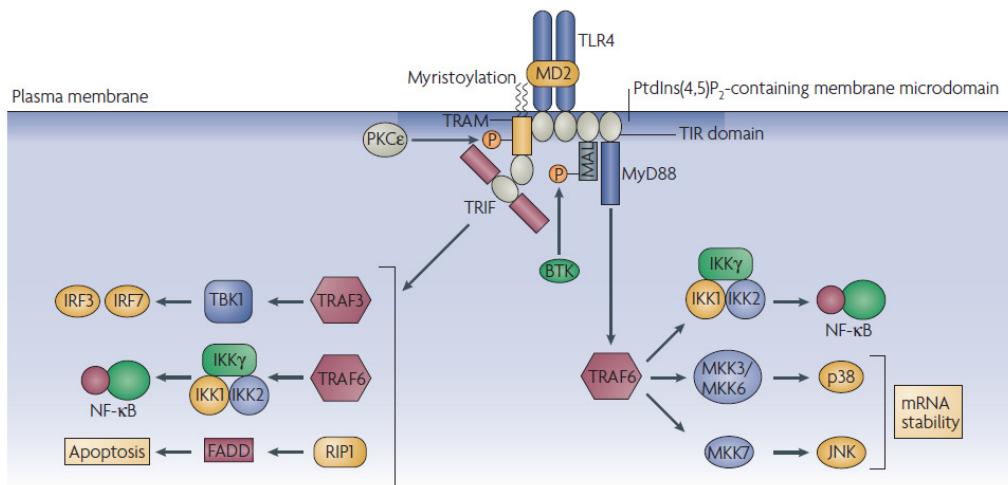


Figura 2. Moléculas adaptadoras utilizadas pelo TLR4.

Fonte: O'Neill e Bowie (2007)

Venenos e toxinas de animais terrestres peçonhentos são conhecidos e extensamente estudados pelos distúrbios hemtológicos e inflamatórios que induzem em humanos e por serem tratados com anticorpos específicos de rápida capacidade de neutralização (HAWGOOD, 1992). No entanto, a investigação da ativação do sistema imune adaptativo e a formação de memória imunológica duradoura para toxinas de venenos de animais terrestres e principalmente de peixes peçonhentos têm recebido pouca atenção. No Brasil não existe até o momento nenhum antissoro utilizado na clínica para acidentes por peixes peçonhentos, embora saibamos da existência de várias espécies de peixes peçonhentos que causam acidentes em rios e mares brasileiros. Acidentes provocados pelo *Thalassophryne nattereri* vêm sendo notificados em Salvador (ALMEIDA e ROCHA, 1989), Alagoas (AUTO, 1992; FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000), Fortaleza (FACÓ et al., 2003), Natal e Pará (HADDAD JR et al., 2003).

Ao contrário, na Austrália, desde a década de 1960 são empregados na clínica antissoros para acidentes por águas-vivas (*jellyfish*) e por peixes-pedra (*stonefish*) (BAXTER e MARR, 1974; MEIER e WHITE, 1995; WILLIAMSON et al., 1996, SUTHERLAND et al., 2001).

O peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri* habita águas salobras ao longo das regiões Norte e Nordeste do Brasil e seu veneno vem sendo amplamente estudado em diferentes aspectos pelo nosso grupo: envenenamento em vítimas humanas (FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000) e em modelos experimentais (LOPES-FERREIRA et al., 1998, 2001, 2002; FACÓ, 2003, LIMA et al., 2003; PAREJA-SANTOS et al., 2009), aspectos bioquímicos e farmacológicos (LOPES-FERREIRA et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2005; 2006), a capacidade de indução de anticorpos neutralizantes para os

principais efeitos tóxicos em camundongos (LOPES-FERREIRA et al., 2000; PIRAN-SOARES et al., 2007) e os mecanismos imunológicos envolvidos nesta resposta (GRUND et al., 2006; 2009).

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 esteroidais (dexametasona) e não-esteroidais (indometacina) ou inibidores de serotonina e da via L-arginina-óxido nítrico não é capaz de reverter o quadro decorrente do envenenamento que evolui independente da utilização dos medicamentos.

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). Além disso, comprovamos experimentalmente que animais com altos títulos plasmáticos de anticorpos específicos apresentam menores respostas de nociceção, 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.

Em 2006, Grund et al. realizaram 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. Neste trabalho foi demonstrada 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- γ a anticorpos IgG2a. Estes resultados indicam que o veneno 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. Investigando diferentes padrões de expressão de moléculas nas células esplênicas dos animais com resposta persistente encontramos um aumentado numero de linfócitos T CD4 $^{+}$ e linfócitos B, os quais expressam baixos níveis da molécula CD45R/B220. A presença de resposta T dirigida com altos níveis de anticorpos IgG específicos de memória confirmam que células T e B com funções efetoras e/ou de memória foram geradas.

Um trabalho recente mais detalhado de investigação dos efeitos do veneno de *T. nattereri* na geração de memória imunológica e dos fatores envolvidos na manutenção das células ASCs desenvolvido por Grund et al. (2009) mostra 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 sobrevida fenotipicamente caracterizadas como ASC B220^{high/low/neg}CD43^{high/low}CD138^{pos} presentes além da medula óssea também no baço e no peritônio. 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^{high/low/neg} e na manutenção esplênica de células B1a, uma vez que o uso de anticorpos neutralizantes para as duas citocinas conseguiram reverter a diferenciação das células ASCs induzidas pelo veneno.

Recentemente, uma nova família de proteínas com atividade cininogenásica e estrutura primária única foi caracterizada no veneno de *T. nattereri* (MAGALHÃES et al., 2006). As Natterinas (1, 2, 3, 4 e P), como foram nomeadas, possuem massa molecular em torno de 35 kDa, são capazes de induzir edema e nocicepção semelhante ao veneno (LOPES-FERREIRA et al., 2004), além de serem capazes clivar o cininogênio humano e peptídeos sintéticos derivados de cininogênio (MAGALHÃES et al., 2005)

Diante da necessidade de maiores dados para o esclarecimento da diferenciação e manutenção de ASCs e da participação dos receptores TLRs na modulação da resposta humoral de memória o objetivo deste trabalho foi avaliar em um modelo murino a resposta de memória humoral e os compartimentos celulares desenvolvidos pela imunização com uma nova classe de proteínas encontradas no veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*. Assim avaliamos em camundongos com resposta de memória às Natterinas a diferenciação de células secretoras de anticorpos de longa sobrevida, focando a importância da atividade proteásica, bem como o papel do receptor do tipo TLR4 e da sinalização MyD88 na modulação desta resposta.

Objetivo

2 OBJETIVO

Avaliar em camundongos o efeito das Natterinas, focando a importância da atividade proteásica, na indução e manutenção da resposta imune de memória com produção persistente de anticorpos plasmáticos e diferenciação de distintos subtipos de células B e de células secretoras de anticorpos de longa vida (ASC). E ao mesmo tempo, avaliar o papel de *TLR4* e *MyD88* na regulação da resposta imune de memória.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos com 7-8 semanas de idade da linhagem BALB/c fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e camundongos com o mesmo *background* genético exceto para o TLR4, C3H/HePas (*Tlr4 wild type*) e C3H/Hej (*Tlr4 mutante*), C57BL/6 (*MyD88 wild type*) e *MyD88 KO* fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. Antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos no Biotério de experimentação do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade, iluminação e livres de patógenos com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos que envolvem animais estão em acordo às diretrizes aprovadas pela Comissão Brasileira de Experimentação Animal (COBEA) e pelas Comissões de Ética Animal do Instituto Butantan (504/08) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (092).

3.2 Obtenção das Natterinas

As Natterinas do veneno do peixe *T. nattereri* foram concedidas pela Dra. Mônica Lopes Ferreira do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan. Elas foram obtidas por um sistema de cromatografia de fase reversa HPLC (Akta – Amersham Biosciences, Suécia) e protocolo previamente padronizado por nosso laboratório. Em alguns experimentos, a atividade proteásica das Natterinas foi inativada por calor.

3.3 Indução de Resposta Imune de Memória

Camundongos (n = 5/grupo) foram imunizados pela via intraperitoneal com as Natterinas (10 µg) adsorvidas em hidróxido de alumínio (1,6 mg) em um volume final de 500 µL por animal. Após 7, 21 e 28 dias os animais receberam a mesma quantidade das toxinas sem adjuvante. Animais controle foram imunizados somente com o adjuvante. Os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico nos dias 48, 74 e 120 após a primeira imunização para obtenção do sangue que foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos à 10 °C e o plasma retirado foi estocado na diluição 1/5 à -20 °C para dosagem

de anticorpos. Em seguida, os animais foram mortos para obtenção do lavado da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral para preparação das suspensões celulares e identificação dos diferentes subtipos de linfócitos B nesses compartimentos (Figura 1).

3.4 Obtenção de Células da Cavidade Peritoneal

Para obtenção das células do peritônio os animais imunizados com as Natterinas ou controle foram mortos e a cavidade peritoneal lavada com meio de cultura RPMI 1640 incompleto para obtenção da suspensão celular. O material coletado foi centrifugado a 1500 rpm a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e o botão celular foi ressuspenso em meio de cultura para marcação com os diversos anticorpos monoclonais e posteriormente analisadas por citometria de fluxo.

3.5 Obtenção de Células Esplênicas

Os baços dos animais imunizados com as Natterinas ou controle foram retirados de forma estéril e em seguida submetido à maceração com o auxílio de um êmbolo e uma membrana de nylon de 100 µm com meio de cultura RPMI 1640 para recuperação da suspensão celular. Este homogenato foi centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos à 4 °C. Em seguida foi submetido a lavagens e hemólise. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 incompleto. Os eventuais grumos foram retirados por sedimentação por 5 minutos no gelo e a viabilidade da suspensão obtida pela contagem celular em azul de Trypan. As células foram marcadas com os diversos anticorpos monoclonais e posteriormente analisadas por citometria de fluxo.

3.6 Obtenção das Células de Medula Óssea

Para obtenção de células da medula óssea, os cordões medulares do fêmur de camundongos imunizados com as Natterinas ou controle foram desprendidos das trabéculas ósseas com meio RPMI 1640 com auxílio de agulha e seringa. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640. Após a lise das

hemácia as células foram centrifugadas e ressuspensas novamente em meio RPMI 1640 e marcadas com os diversos anticorpos monoclonais e analisadas por citometria de fluxo.

3.7 Análise por Citometria de Fluxo

Para avaliar as diferentes populações de células B, as células dos diferentes compartimentos (peritônio, baço e medula óssea) foram incubadas primeiramente com o anticorpo anti Fc γ RII/III (anti-mouse CD16/CD32) por 30 minutos a 4 °C. Em seguida as células foram lavadas com meio RPMI 1640 incompleto e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante celular foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640. Anticorpos recombinantes (BD PharMingen, Oxford, UK) marcados com fluorocromos foram adicionados: controles isotípicos PE rat IgG2a, FITC rat IgG2b, PECy 5 rat IgG2a ou os anticorpos FITC rat IgG2bκ anti-mouse CD3, PECy 5 anti-mouse CD45/B220, FITC anti-mouse CD19, PE anti mouse CD138, FITC anti-mouse CD43, PE anti-mouse CD5, PE goat anti-mouse Ig (específico para IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), PE goat anti-mouse CD23, PE goat anti-mouse CD11b. As células foram incubadas por 30 minutos à 4 °C no escuro. Após nova lavagem e centrifugação, as células foram ressuspensas em formaldeído 1% e deixadas a 4 °C até a leitura no citometro de fluxo FACsCalibur de três cores (BD Biosciences). Os eventos (10.000) foram adquiridos e analisados com programa CellQuest Pro. Os experimentos foram realizados em duplicita e os resultados expressos em numero absoluto de células positivas em relação ao numero encontrado em cada compartimento.

3.8 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 3 µg/mL das Natterinas, após incubação e lavagem, os plasmas individuais foram adicionados em diluições previamente determinadas. Para revelação foram adicionados anticorpos de detecção biotinilados específicos para IgG1 e IgG2a. Após incubação e lavagem, a reação foi revelada pela adição da mistura cromógena mais substrato da enzima (1 mg de OPD em tampão citrato 0,2 M, pH 5,5 + H₂O₂ 0,06%) e a reação interrompida pela adição de ácido cítrico 0,2 M, seguido pela leitura da absorbância a 490 nm em espectrofotômetro Victor 3 (Multilabel Counter, PerkinElmer). Curvas-padrão, utilizando concentrações conhecidas dos anticorpos murinos purificados foram realizadas para determinação da quantidade destes isótipos nas 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 \pm desvio-padrão das amostras de cada grupo.

3.9 Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva - PCA

A determinação de anticorpos anafiláticos IgE e IgG1 específicos foi feita pela reação de PCA, segundo as técnicas descritas por Mota e Wong (1969) e Ovary (1958), respectivamente. Para a determinação de anticorpos anafiláticos IgE específicos para as Natterinas, ratos *Wistar* previamente depilados no dorso foram injetados intradermicamente com 100 μ L das diluições seriadas dos plasmas obtidos de camundongos controle ou imunizados com as Natterinas. Após 18 horas de sensibilização, os animais foram desafiados intravenosamente com azul de Evans a 0,25%, contendo 100 μ g de Natterinas.

Para a determinação de anticorpos anafiláticos IgG1 específicos para as Natterinas, camundongos BALB/c previamente depilados foram injetados intradermicamente no dorso com 50 μ L de diluições seriadas dos plasmas inativados a 56 °C, por 1 hora. Após 2 horas de sensibilização, os animais foram desafiados intravenosamente com azul de Evans a 0,25%, contendo 50 μ g das Natterinas. Em ambos os testes, 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 e IgG1 foram expressos como a recíproca da maior diluição dos plasmas que resultou em uma reação positiva com mais de 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 e ADACHI, 1976).

3.10 Análise Histológica e Imunohistoquímica

Os baços dos animais controle, imunizados com as Natterinas proteoliticamente ativa ou inativadas por aquecimento foram retirados e fixados em formaldeído 4%. Em seguida foram embebidos em parafina e cortados a 2 μ m de espessura. Para a detecção de MMP-9 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 CaCl₂ 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 NH4Cl 50 mM) por 5 minutos. O excesso de reagente foi removido e os cortes incubados por 1 hora com 100 μ g do anticorpo de cabra anti-MMP-9 de camundongo marcado com HRP (ReD Systems) previamente diluído em PBS + BSA 0.1% a temperatura ambiente em câmara úmida. Após a incubação com o primeiro anticorpo, os cortes foram lavados e incubados por 1 hora com o segundo anticorpo anti-IgG de cabra 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 H2O2 por 5 minutos no escuro. 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.

3.11 Análise Estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas após análise de variância (One-Way ANOVA), seguido do teste não-paramétrico Mann-Whitney ou paramétrico Bonferroni. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Foi empregado o programa SPSS (Release 8.0, Standard Version, 1997).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Resposta de Memória Induzida pelas Natterinas

4.1.1 Resposta de memória humoral

A habilidade das células T ativarem as células B pode ser avaliada pela medida do acúmulo de anticorpo no sobrenadante da suspensão celular em experimentos *in vitro* ou no plasma de animais imunizados (EDDAHRI et al., 2009). Focamos nossa investigação na avaliação da resposta humoral de memória após 48, 74 e 120 dias da primeira imunização como apresentado na Figura 4. Nossos resultados mostram que as Natterinas são capazes de induzir em camundongos BALB/c uma resposta imune humoral do tipo Th2 com a produção de altos níveis de IgG1 específica (Figura 5A) e de IgE total (Figura 5C), persistentes por até 120 dias após a imunização. Anticorpos específicos do subtipo IgG2a (Figura 5E), característicos de respostas com perfil Th1 não foram induzidos nos camundongos BALB/c imunizados com as Natterinas. Já as Natterinas com a atividade proteásica inativa, foram capazes de gerar anticorpos IgG1 específica (Figura 5A), mas não conseguiram mantê-los circulantes por longos períodos e foram incapazes de gerar anticorpos IgE (Figura 5C). Ao contrário, as Natterinas inativa geraram anticorpos IgG2a persistentes por até 120 dias (Figura 5E).

Por anafilaxia cutânea passiva em camundongos ou ratos, no plasma de animais imunizados com as Natterinas verificamos intensa atividade anafilática de IgG1 já em 48 dias que declinou com o tempo, alcançando níveis equivalentes ao controle em 120 dias (Figura 5B). Ao contrário, títulos significativos de IgE anafilático foram verificados somente em 120 dias (Figura 5D). Não houve detecção de anticorpos anafiláticos no plasma de animais imunizados com as Natterinas proteoliticamente inativa (Figura 5B e 5D).

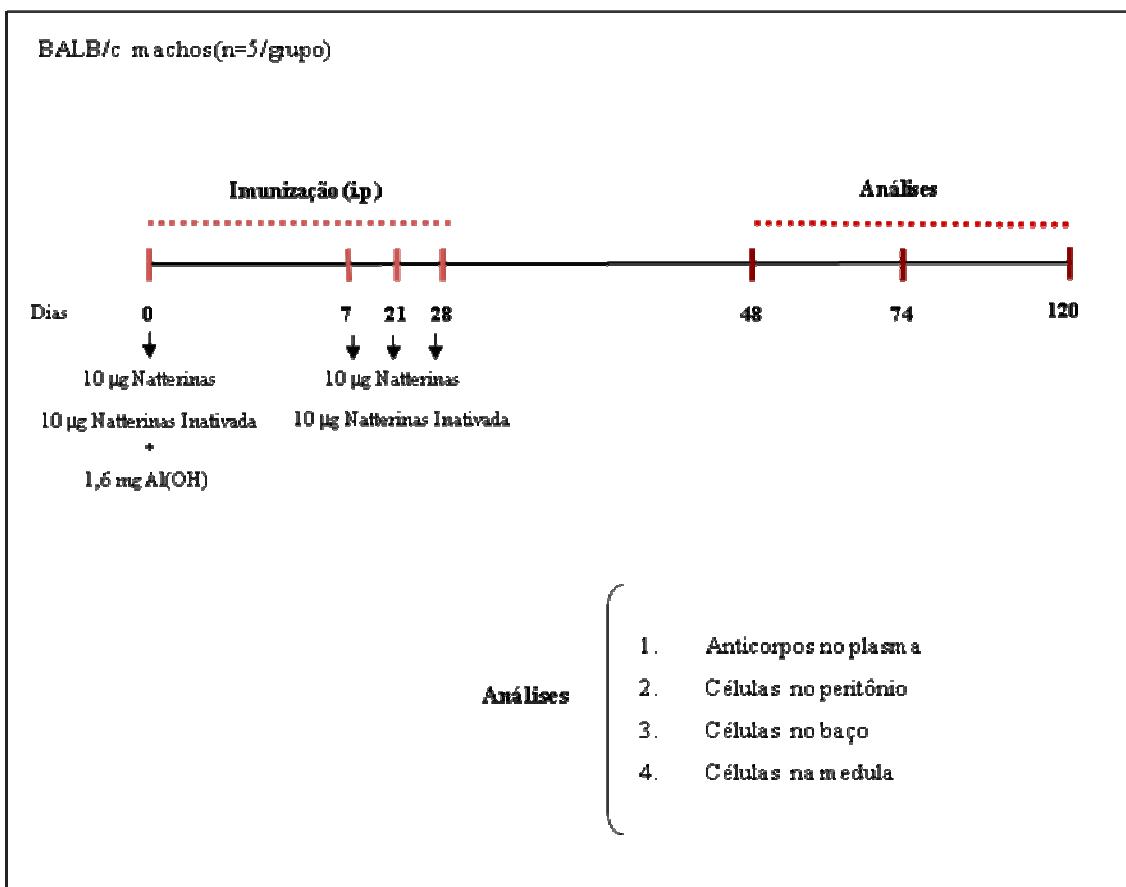


Figura 4. Resposta imune de memória em camundongos BALB/c induzida pelas Natterinas. Camundongos BALB/c machos ($n = 5$) foram imunizados pela via intraperitoneal com as Natterinas proteolíticas entre ativa ou inativa por aquecimento adsorvidas em adjuvante. Após 7, 21 e 28 dias os animais receberam a mesma quantidade de Natterinas sem adjuvante. Animais controle receberam apenas o adjuvante. Nos dias 48, 74 e 120 após a imunização, os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma para dosagem de anticorpos e em seguida mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral e identificação dos diferentes subtipos de linfócitos B nesses compartimentos.

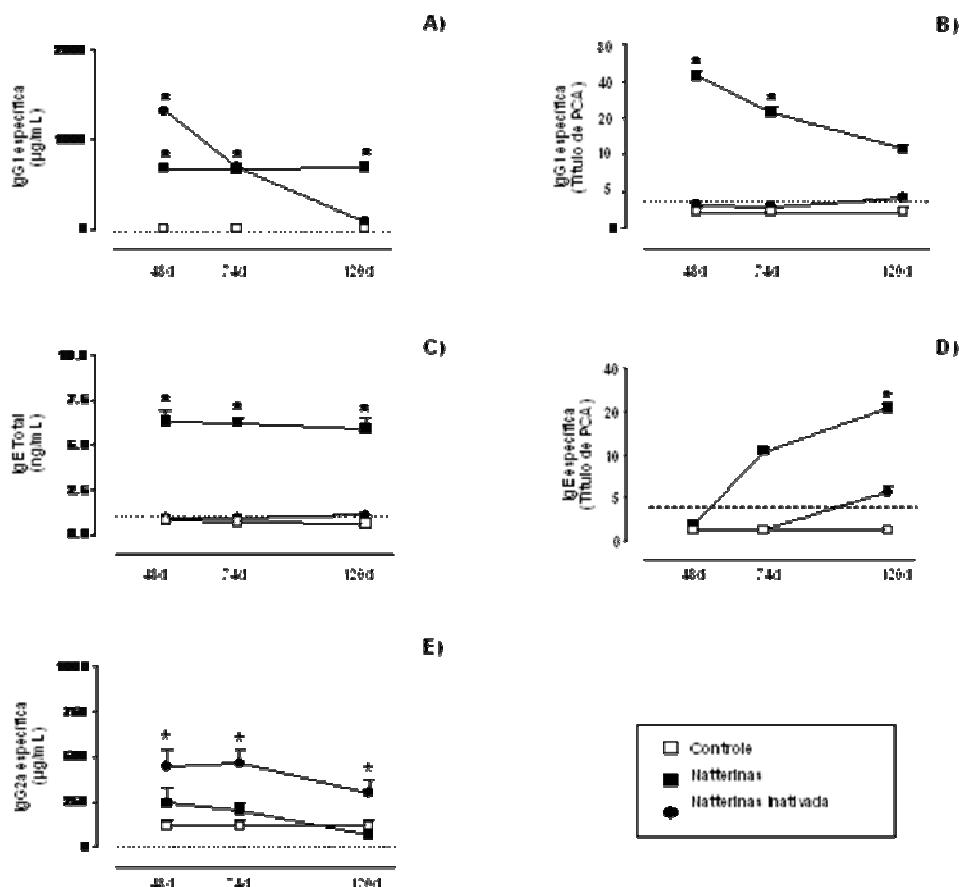


Figura 5. Níveis plasmáticos de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE. Camundongos BALB/c com resposta crônica as Natterinas foram sangrados após 48, 74 e 120 dias da imunização para obtenção do plasma e dosagem dos anticorpos IgG1 específicos por Elisa (**A**) e por PCA (**B**), anticorpos IgE totais por Elisa (**C**) e por PCA (**D**) e anticorpos IgG2a específicos por Elisa (**E**). Os títulos de PCA representam a recíproca da maior diluição do pool de plasmas que apresentaram uma reação cutânea positiva com diâmetro > 5 mm. Os dados representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.1.2 Subtipos de células B

Os linfócitos B, células efetoras da imunidade humoral podem ser divididos em diferentes subpopulações de acordo com distintas características fenotípicas e funcionais. Células B1 ($B220^{\text{low}}CD19^{\text{pos}}CD43^{\text{pos}}CD80^{\text{pos}}\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{low}}\text{Mac1}^{\text{pos}}CD11b^{\text{pos/neg}}CD23^{\text{neg}}$) podem ser subdivididas em B1a e B1b pela alta expressão de CD5 nas células B1a (HARDY e HAYAKAWA, 1994).

De acordo com a Figura 3, os animais imunizados com as Natterinas apresentaram uma discreta diminuição no número absoluto de células B1a ($B220^{\text{pos}}CD5^{\text{pos}}$) na cavidade peritoneal em 48 dias (Figura 6A). No baço, apesar de diminuição em 48 dias, as Natterinas induziram um grande número destas células a partir de 74 dias até 120 dias (Figura 6B). Já na medula óssea somente foi observado aumento no número absoluto de células B1a em 74 dias (Figura 6C). Estes resultados mostram que o reservatório crônico destas células em resposta as Natterinas é o baço que abriga também o maior número de células. A imunização com as Natterinas proteoliticamente inativa induziu um aumento de células B1a no peritônio em 48 dias, seguido por uma drástica diminuição desta subpopulação celular em 74 e 120 dias (Figura 6A). Além disso, mesmo que as Natterinas inativas induzem um ligeiro aumento de células B1a no baço, elas não foram capazes de gerar nichos de sobrevivência para a manutenção destas células no baço (Figura 6B) e na medula (Figura 6C) por longos períodos.

Com relação às células B1b ($B220^{\text{pos}}CD19^{\text{pos}}CD11b^{\text{pos}}$, Figura 7), as Natterinas induziram a expansão deste subtipo celular nos três compartimentos analisados, em quantidade ou períodos distintos: na cavidade peritoneal e no baço observamos um aumento significativo no número absoluto destas células por até 120 dias (Figura 7A e 7B). Na medula óssea foi observado aumento significativo em relação ao controle em 48 e em menor quantidade em 74 dias, voltando ao nível normal do controle em 120 dias (Figura 7C). Estes resultados mostram que o reservatório crônico destas células é o peritônio e o baço, sendo o compartimento esplênico o local de maior número celular. As Natterinas inativas foram capazes de gerar apenas aumento na população de células B1b da cavidade peritoneal em 48 e 120 dias (Figura 7A).

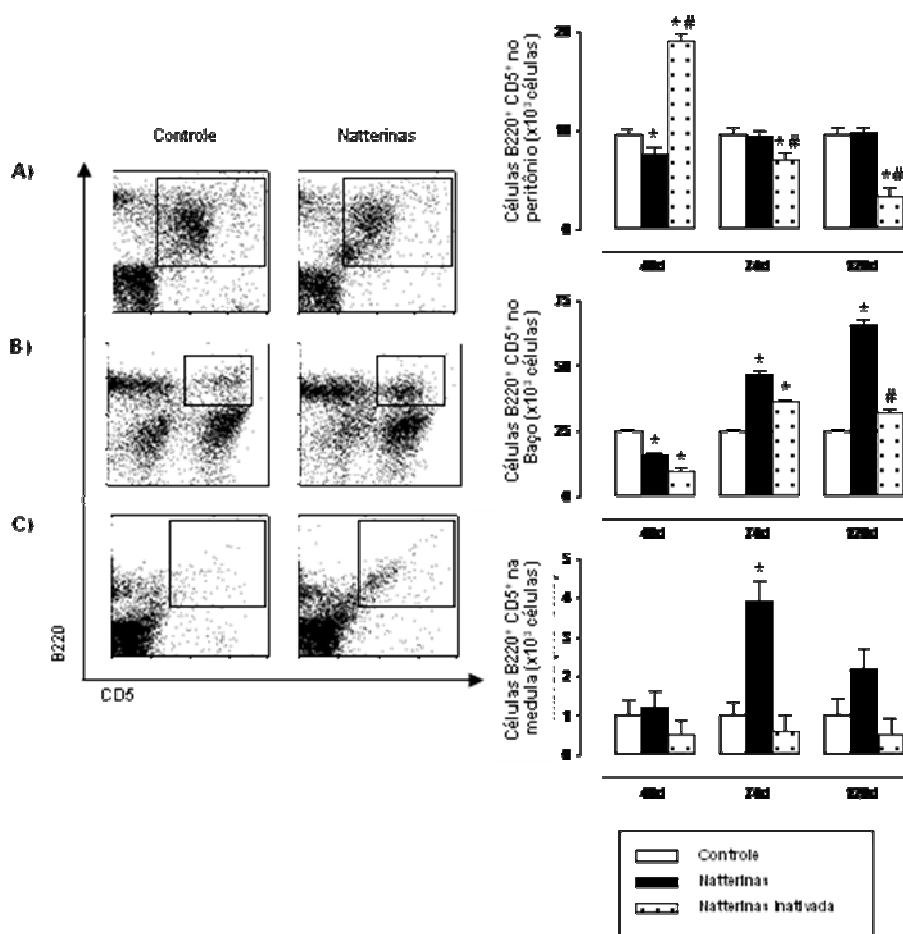


Figura 6. Células B1a geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta às Natterinas. Camundongos BALB/c imunizados com as Natterinas foram mortos nos dias 40, 74 e 120 e tiveram as células peritoneais, esplênicas e medulares coletadas para marcação com anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Células B1a foram identificadas como B220⁺ CD5⁻. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

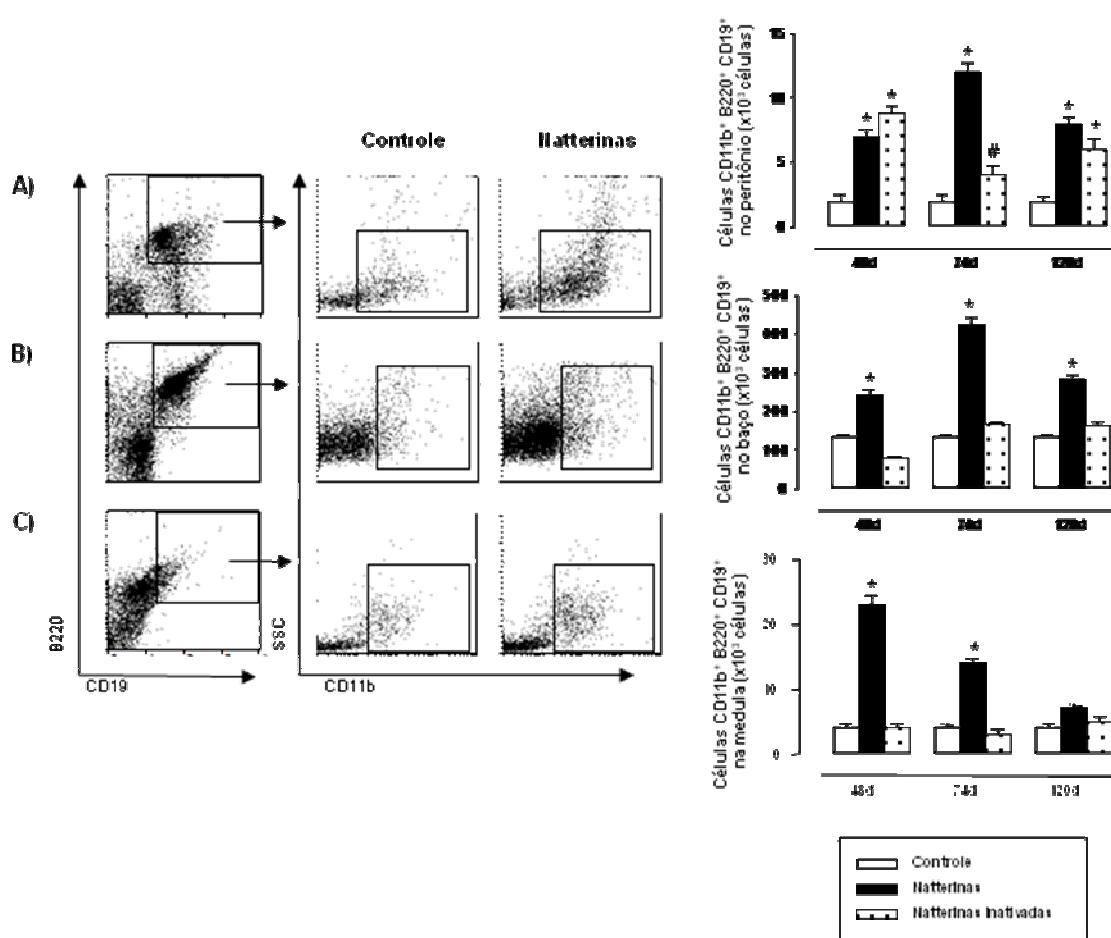


Figura 7. Celulas B1b geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta as Natterinas. Camundongos BALB/c imunizados com as Natterinas ativas ou inativas foram mortos nos dias 48, 74 e 120 e tiveram as células peritoneais (A**), esplênicas (**B**) e medulares (**C**) coletadas para marcação com anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Celulas B1b foram identificadas como CD11b⁺ na população duplamente positiva para B220 e CD19. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle.**

As células B2, também conhecidas como células B convencionais caracterizadas pela alta expressão de B220 e CD23 e pela ausência de CD5 e Mac1, foram observadas em número aumentado no peritônio somente em 120 dias (Figura **8A**) e no baço e na medula óssea em 74 e 120 dias (Figura **8B** e **8C**) dos animais imunizados com as Natterinas. Estes resultados mostram que os três compartimentos apresentam células B2 em 120 dias e que o baço abriga também o maior número de células B2. Já as Natterinas proteoliticamente inativas geraram uma intensa resposta de células B2 em todos os compartimentos analisados em 48 e 74 dias (Figura **8A**, **8B** e **8C**), mantendo-se em grande quantidade apenas no baço em 120 dias.

A contribuição de células B para a memória imunológica se dá por duas distintas populações produtoras de anticorpos: células B de memória e células ASC. Sabe-se que as células B de memória expressam tipicamente IgM, IgG, IgE ou IgA de membrana que carregam mutações somáticas dentro da região variável da porção CDR. 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 e montam resposta proliferativa vigorosa para o antígeno original após uma segunda exposição.

Em 48 dias, as Natterinas induziram aumento de cerca de 4 vezes no número absoluto de células B efetora/memória ($B220^{\text{high}}\text{Ig}^{\text{pos}}\text{CD19}^{\text{pos}}$) em relação ao controle no peritônio que caiu para níveis iguais ao do controle após 74 dias, retornando discretamente aumentado em 120 dias (Figura **9A**). Na medula óssea (Figura **9C**) foi observado um aumento significativo desta população também em 48 dias com decréscimo em 74 dias e alcançando níveis iguais aos do controle em 120 dias, e ao contrário, no baço observamos um aumento crescente do número absoluto destas células até 120 dias (Figura **9B**), mostrando a importância dos três compartimentos na manutenção deste subtipo celular em períodos mais recentes, e principalmente do compartimento esplênico como um ambiente ideal para a manutenção por longos períodos. Com relação à resposta induzida pelas Natterinas proteoliticamente inativas, podemos observar uma ligeira diminuição na população de células B efetora/memória em todos os compartimentos analisados em 48 dias (Figura **9A**, **9B** e **9C**), e aumento destas apenas em 120 dias no peritônio.

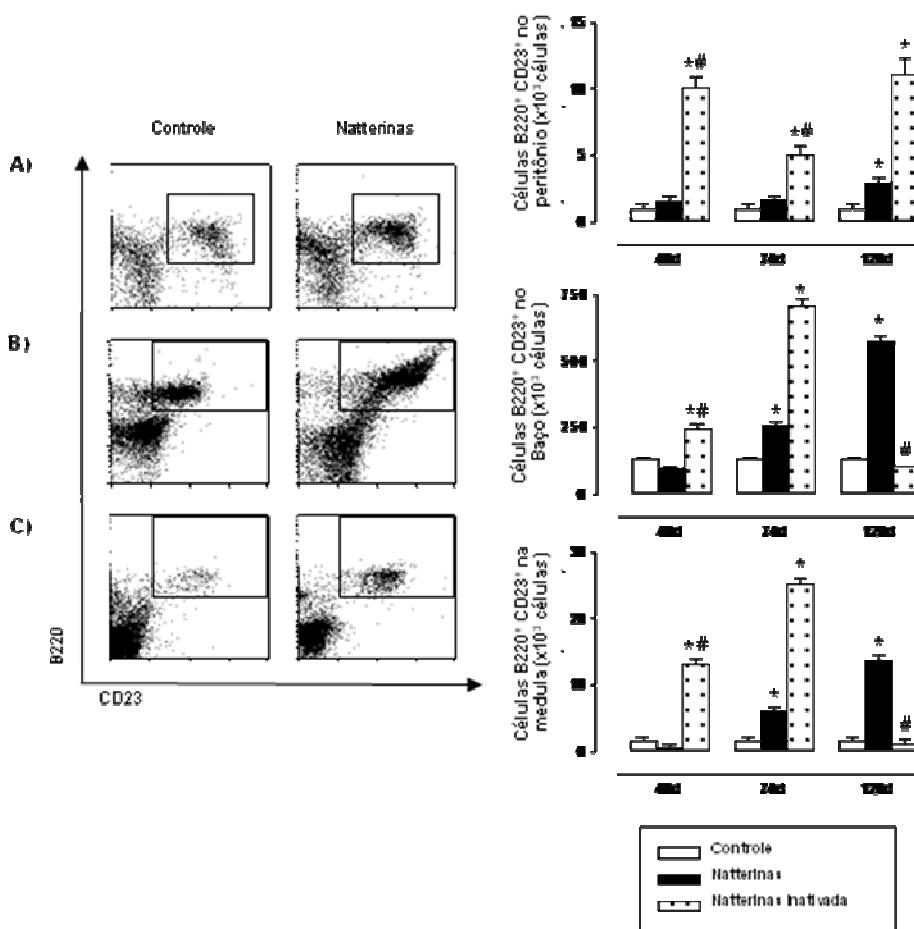


Figura 8. Células B2 geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta às Natterinas. Camundongos BALB/c imunizados com as Natterinas foram mortos nos dias 48, 74 e 120 e tiveram as células peritoneais, esplênicas e medulares coletadas para marcação com anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Células B2 foram identificadas como B220⁺ CD23⁻. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. *p < 0,05 em relação ao controle.

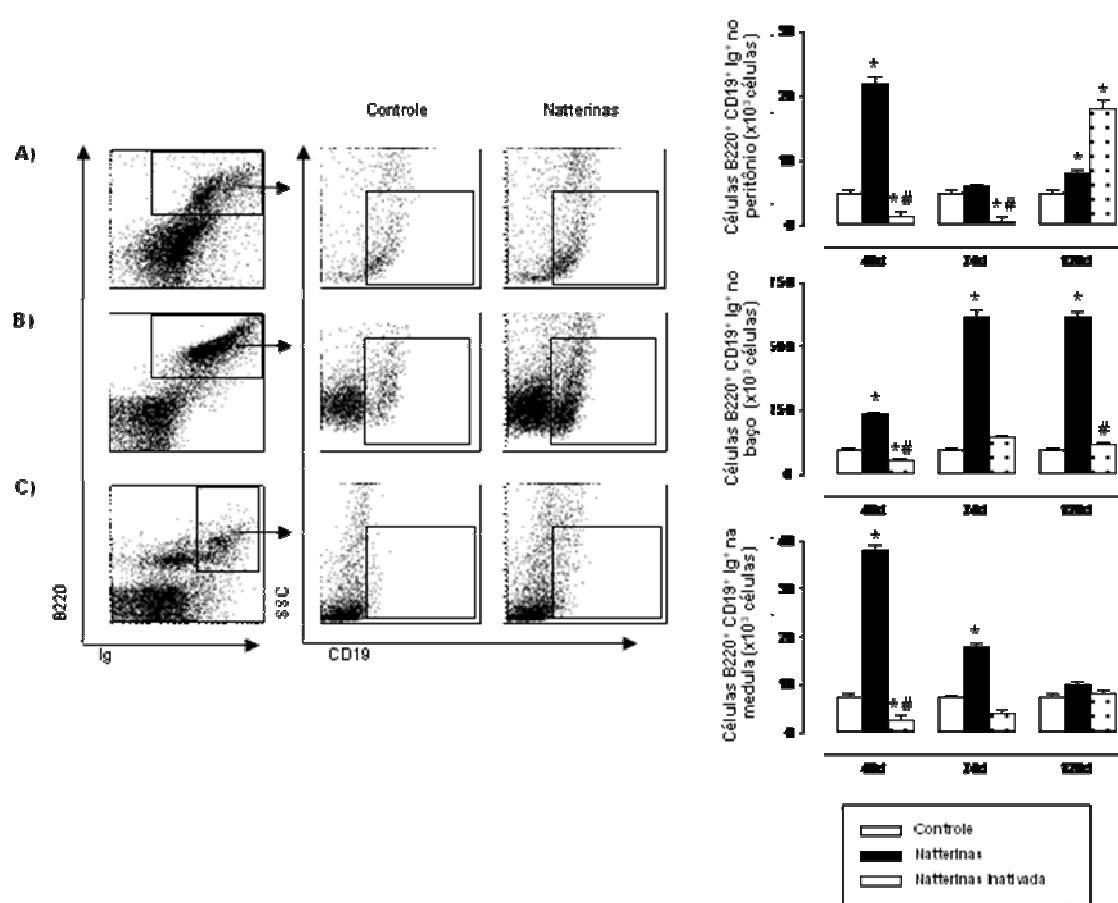


Figura 9. Células B efetoras/memória geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta as Natterinas.

Nos dias 48, 74 e 120 as células peritoneais, esplênicas e medulares dos animais imunizados ou não com as Natterinas foram coletadas para marcação com anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Células B CD19⁺ foram identificadas na população de células duplamente positiva para B220 e Ig. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. *p < 0,05 em relação ao controle.

A partir de dados que mostram que células B de memória B220^{pos}CD19^{pos} podem originar células B com expressão intermediária da molécula B220 e estas por fim tornarem células de longa vida, caracterizadas pela baixa expressão de B220 ou mesmo ausência deste marcador, avaliamos nos 3 compartimentos as populações de células ASC CD43^{pos}CD138^{pos} dos fenótipos negativo e positivo para B220. Na Figura **10** podemos observar a presença em 74 dias de ASC CD43^{pos}CD138^{pos} positivas para B220 no peritônio (Figura **10A**), aumento significativo destas células no baço em todos os períodos (Figura **10B**) e aumento a partir de 74 dias com persistência por até 120 dias no compartimento medular (Figura **10C**), mostrando que a medula óssea e principalmente o baço são os reservatórios crônicos desta subpopulação celular em animais imunizados com as Natterinas. A imunização com as Natterinas inativa resultou em diminuição de ASC CD43^{pos}CD138^{pos} positivas para B220 no peritônio em 74 dias, seguido por um aumento em 120 dias (Figura **10A**). No compartimento esplênico, as Natterinas inativas induziram expansão deste subtipo celular a partir de 74 dias (Figura **10A**) e em todos os períodos analisados na medula óssea (Figura **10C**).

Já a população de ASC CD43^{pos}CD138^{pos} do fenótipo B220 negativo foi observada em todos os períodos de tempo no baço, em resposta as Natterinas (Figura **11B**) aparecendo na medula óssea a partir de 74 dias (Figura **8C**) e na cavidade peritoneal somente em 120 dias (Figura **11A**), mostrando que além do baço e da medula óssea o peritônio também apresenta um microambiente favorável para a manutenção por longos períodos de células ASC B220^{neg}. Ademais, as maiores populações de células produtoras de anticorpos de longa vida são do fenótipo ASCs B220^{neg}. A população de ASC CD43^{pos}CD138^{pos} do fenótipo B220 negativo induzida pelas Natterinas proteoliticamente inativas pode ser observada logo em 48 dias no peritônio (Figura **11A**). No período crônico, o principal reservatório desta subpopulação celular é a medula óssea (Figura **11C**), seguida pela cavidade peritoneal (Figura **11A**). E ao contrario, da resposta as Natterinas proteoliticamente ativas, as Natterinas inativas não geraram nichos de sobrevivência para as ASCs convencionais no baço (Figura **11B**).

Na Figura **12**, podemos observar a indução de MMP-9 na região perifolicular do baço de animais imunizados com as Natterinas, através de imunohistoquímica com anticorpos específicos. O pico de indução de MMP9 foi em 8 dias, mas manteve-se positivo em 22 e 29 dias. Ao contrário, as Natterinas proteoliticamente inativas não foram capazes de induzir MMP-9 em nenhum dos períodos analisados.

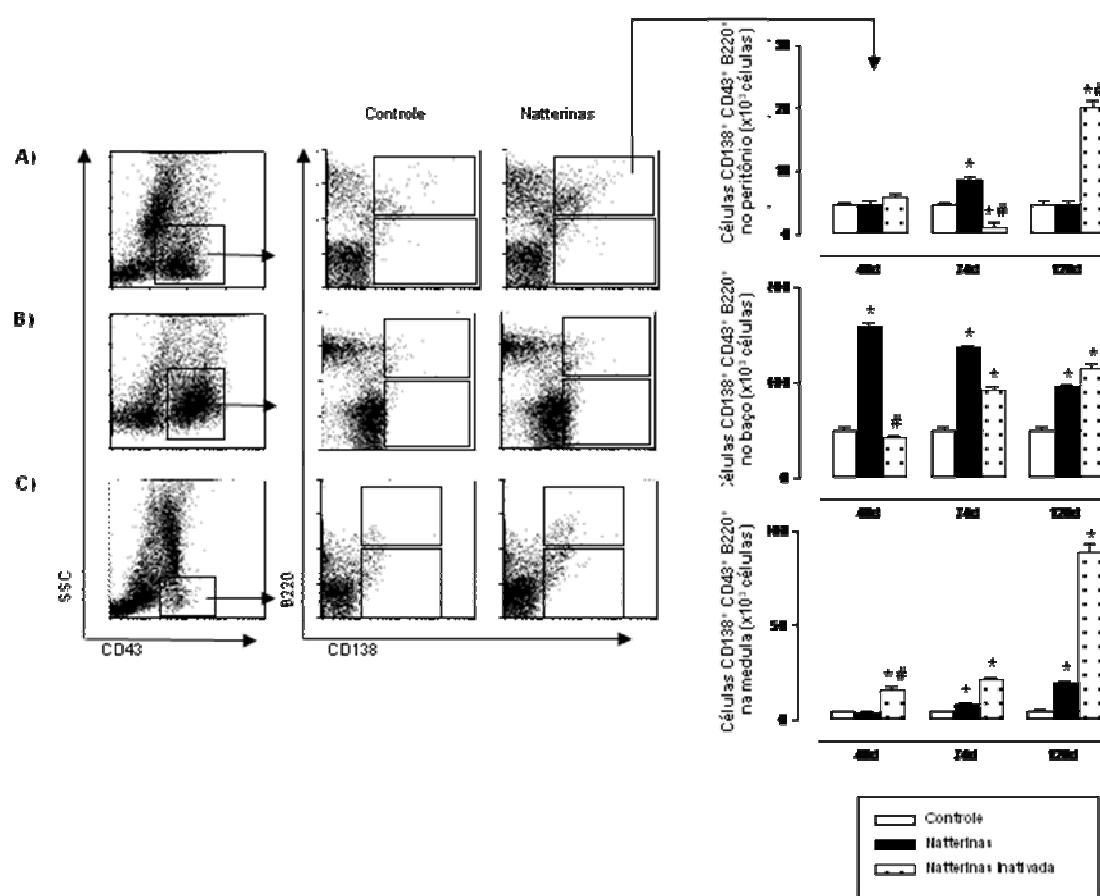


Figura 10. Células B de memória de vida longa (ASC) B220pos induzidas pelas Natterinas. Células ASCs B220pos CD138+ foram identificadas na população de células CD43+ no peritônio (A), no baço (B) e na medula (C) após 48, 74 e 120 dias da primeira imunização com as Natterinas. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. *p < 0,05 em relação ao controle.

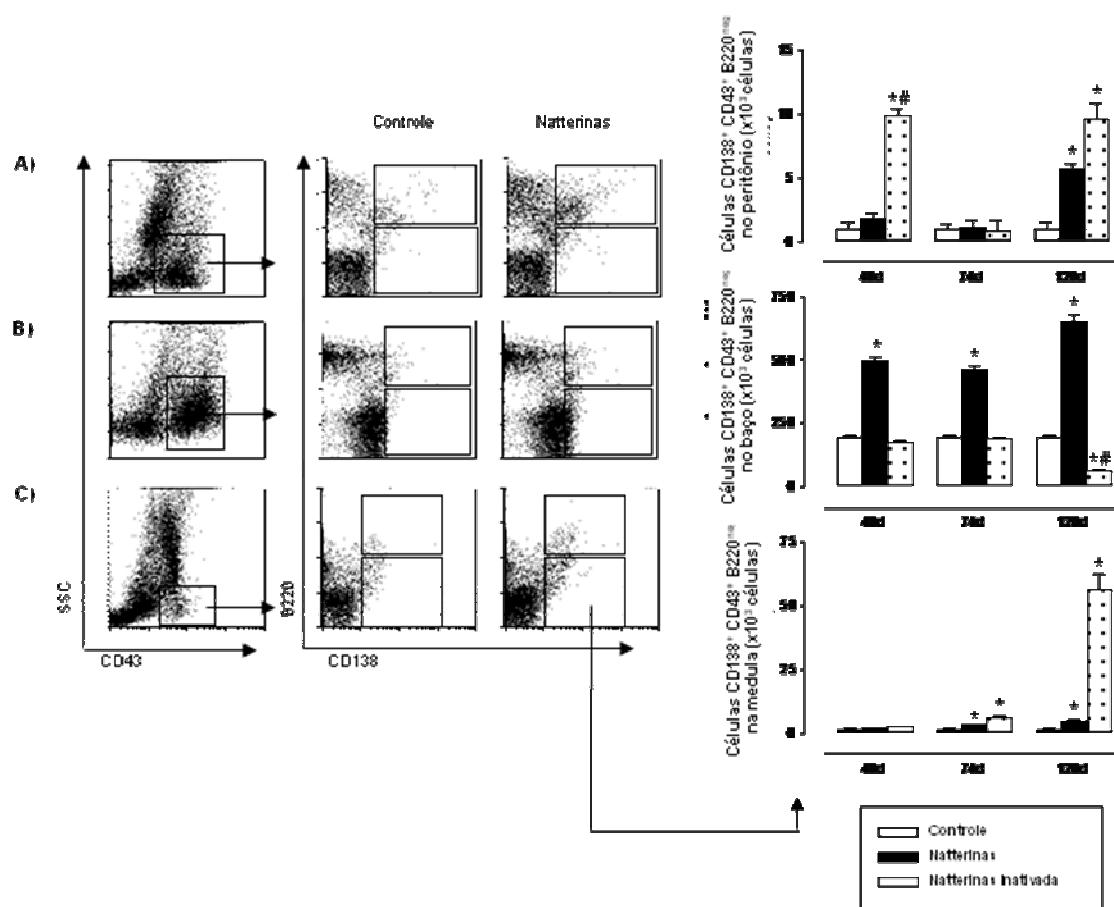


Figura 11. Células B de memória de vida longa (ASC) B220neg induzidas pelas Natterinas. Células ASCs B220neg CD138+ foram identificadas na população de células CD43+ no peritônio (A), no baço (B) e na medula (C) após 48, 74 e 120 dias da primeira imunização com as Natterinas. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

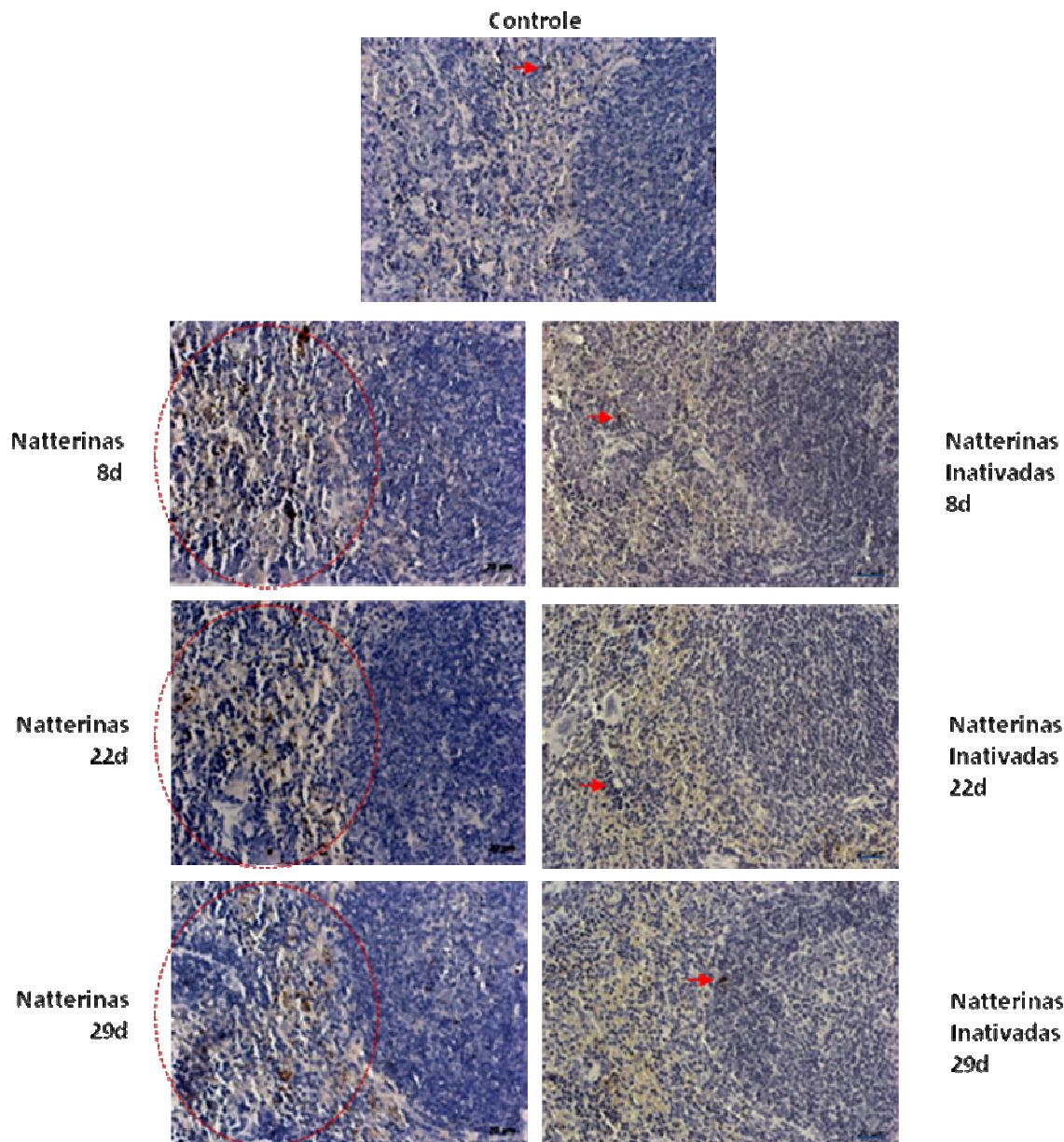


Figura 12. Imuno-histoquímica de MMP-9 em cortes histológicos do baço de camundongos BALB/c induzida com as Natterinas. Camundongos BALB/c machos ($n = 5$) foram imunizados pela via intraperitoneal com as Natterinas proteoliticamente ativa ou inativada por aquecimento adsorvidas em adjuvante. Após 7, 21 e 28 dias os animais receberam a mesma quantidade de Natterinas sem adjuvante. O baço foi coletado 24 horas após o desafio e armazenado em Formol 10%. Nos cortes histológicos foi feito imuno-histoquímica com anticorpos anti-MMP-9. Objetiva de 40X.

4.2 Regulação por TLR4 da Resposta Imune de Memória Induzida pelas Natterinas

4.2.1 Protocolo de indução de memória pelas Natterinas em camundongos funcionalmente deficientes do TLR4

Dentre os diferentes membros de receptores da família dos TLRs, TLR4 expresso na membrana celular de diversas células é capaz de ligar o lipopolissacarídio (LPS; endotoxina) de bactérias Gram-negativas, além de vários ligantes endógenos. Considerando que estímulos policlonais via TLR4 podem contribuir para as respostas imunes humorais e que a sinalização via TLR4 é suficiente para induzir e/ou manter a expressão de BLIMP-1 pelas células B, torna-se necessária a avaliação do papel de TLR4 na modulação da resposta humoral induzida pelas Natterinas.

Para avaliar a importância do receptor TLR4 na diferenciação de ASCs e na manutenção dos níveis de anticorpos plasmáticos por longos períodos, camundongos com o mesmo *background* genético, exceto para o TLR4, C3H/HePas (*Tlr4 wild type*) e C3H/Hej (*Tlr4 mutante*) machos foram submetidos ao mesmo protocolo de imunização com as Natterinas utilizado anteriormente para a indução de resposta imune de memória. Os níveis plasmáticos de anticorpos e os diferentes subtipos de linfócitos B no peritônio, no baço e na medula óssea foram avaliados. Animais controle foram submetidos às mesmas condições, entretanto foram injetados apenas com o adjuvante (Figura 13).

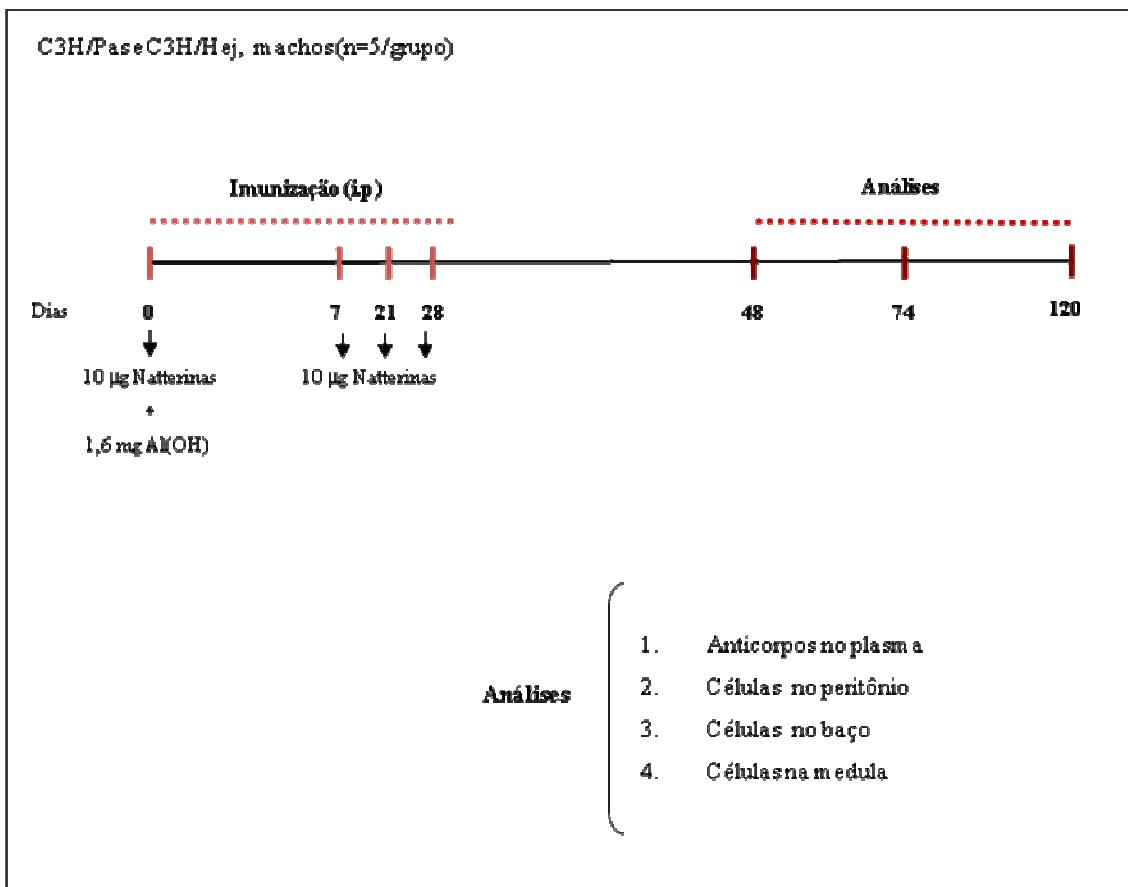


Figura 13. Efeito da ausência da sinalização via o receptor TLR4 na resposta imune de memória induzida pelas Natterinas. Camundongos com o mesmo background genético exceto para o TLR4, C3H/Pas e C3H/Hej machos ($n = 5$) foram imunizados pela via intraperitoneal com as Natterinas adsorvidas em adjuvante. Após 7, 21 e 28 dias os animais receberam a mesma quantidade de Natterinas sem adjuvante. Animais controle receberam apenas o adjuvante. Nos dias 48, 74 e 120 após a imunização, os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma para dosagem de anticorpos e mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral e identificação dos diferentes subtipos de linfócitos B nesses compartimentos.

4.2.2 Resposta de anticorpos induzida pelas Natterinas na ausência do TLR4

A quantificação de anticorpos plasmáticos nos animais selvagens ou mutantes imunizados com as Natterinas, mostrou que os camundongos *Tlr4 wild type* produziram em torno de 2000 µg/mL de anticorpos IgG1 específicos desde o primeiro até o último período de tempo analisado. Interessantemente, a resposta de anticorpos IgG1 específicos para as Natterinas em camundongos *Tlr4 mutante* foi drasticamente reduzida em 48 dias (600 µg/mL), desenvolvendo-se em níveis equivalentes ao animal selvagem somente em períodos mais tardios da resposta (Figura 14A). A indução de anticorpos IgG1 anafiláticos (Figura 14B) foi observada em ambos os animais *Tlr4 wild type* ou *Tlr4 mutante* imunizados com as Natterinas em todos os períodos analisados.

Em animais com a expressão funcional do TLR4, as Natterinas foram capazes de gerar anticorpos totais IgE (Figura 14C) detectáveis somente em 48 e 74 dias (90 ng/mL e 70 ng/mL, respectivamente) e anticorpos IgE específicos e anafiláticos (Figura 14D) somente em 74 dias (título de PCA 1/20). Já em animais deficientes na expressão do TLR4, a produção de IgE total (Figura 14C) e anafilática (Figura 14D) foi totalmente abolida em 48 e 74 dias, porém em 120 dias, período onde os animais selvagens diminuíram a produção deste subtipo de anticorpo a níveis basais, os animais *Tlr4 mutante* induziram a síntese de baixos níveis de IgE total (40 ng/mL).

Além desta resposta de anticorpo mediada por linfócitos do subtipo Th2, em 74 dias as Natterinas conseguiram induzir também anticorpos IgG2a específicos (Figura 14E) nos animais *Tlr4 wild type* (1500 µg/mL) e de forma mais intensa nos animais *Tlr4 mutante* (2500 µg/mL). Em 120 dias ambos os grupos de animais atingiram níveis equivalentes de anticorpos IgG2a (2000 µg/mL).

Esses dados mostram que a síntese até 74 dias de anticorpos anafiláticos IgG1 e principalmente IgE induzidos pelas Natterinas é positivamente regulada pela sinalização via TLR4 e após 120 dias, os níveis de IgE total são negativamente regulados. Ademais, a produção de anticorpos IgG2a anti-Natterinas sofre regulação negativa de TLR4 em 74 dias.

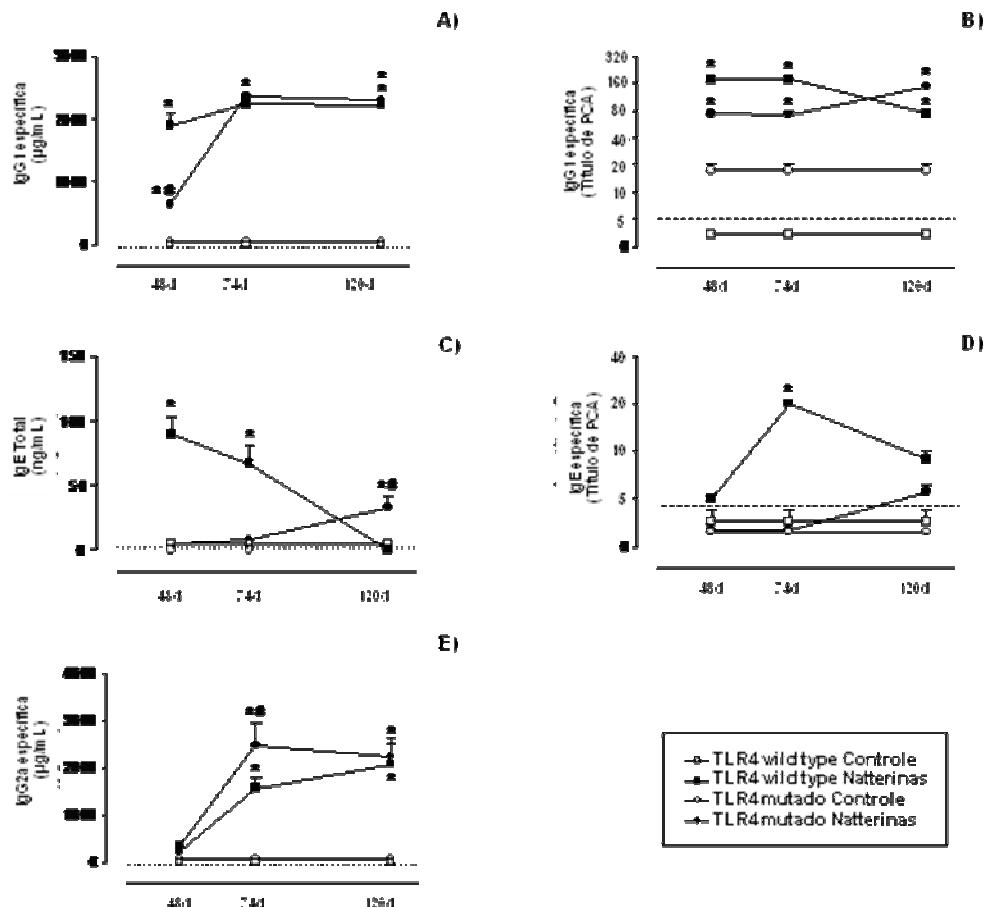


Figura 14. Níveis plasmáticos de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE. Camundongos com o mesmo *background* genético exceto para o TLR4, C3H/Pas e C3H/Hcj com resposta crônica as Natterinas foram sanguados após 48, 74 e 120 dias da imunização para obtenção do plasma e dosagem dos anticorpos IgG1 específicos por Elisa (**A**) e por PCA (**B**), anticorpos IgE totais por Elisa (**C**) e por PCA (**D**) e anticorpos IgG2a específicos por Elisa (**E**). Os títulos de PCA representam a recíproca da maior diluição do pool de plasmas que apresentaram uma reação cutânea positiva com diâmetro > 5 mm. Os dados representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação aos controles e # $p < 0,05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

4.2.3 Regulação por TLR4 da diferenciação de subtipos de células B na resposta anti-Natterinas

Conforme apresentado na Figura 15, a cavidade peritoneal (**A**) de animais *Tlr4 wild type* imunizados com as Natterinas apresentou uma redução em torno de 66% no número absoluto de células B1a em 74 e 120 dias em relação ao número dos animais controle. Já os animais *Tlr4 mutante* imunizados com as Natterinas tiveram aumento na população de células B1a no peritônio em 48 e em 120 dias em relação ao respectivo controle. Porém, quando compararmos os grupos de animais *Tlr4 wild type* e *Tlr4 mutante* imunizados com as Natterinas, observamos uma diminuição no número de células B1a nos animais *Tlr4 mutante* em 48 e 74 dias e um aumento em 120 dias (Figura 15A), mostrando uma regulação positiva de TLR4 até 74 dias e negativa em 120 dias. No baço, as Natterinas não induziram a expansão deste subtipo celular nos animais *Tlr4 wild type*, bem como nos *Tlr4 mutante*, exceto pelo grande número de células B1a observado em 48 dias (Figura 15B), mostrando uma regulação negativa de TLR4 neste período. Embora poucas células B1a tenham sido observadas na medula óssea de ambos os tipos de animais selvagens ou mutantes, a imunização dos animais *Tlr4 wild type* com as Natterinas gerou uma redução no número absoluto de células B1a em 74 e 120 dias em relação ao número dos animais controle e, nos animais *Tlr4 mutante*, as Natterinas induziram um aumento significativo no número destas células a partir de 74 dias (Figura 15C). Quando compararmos os grupos de animais *Tlr4 wild type* e *Tlr4 mutante* imunizados com as Natterinas, observamos uma diminuída resposta de células B1a nos animais *Tlr4 mutante* em 74 e 120 dias (Figura 15A), mostrando uma regulação positiva de TLR4.

Estes dados mostram que existe uma regulação positiva de TLR4 no peritônio até 74 dias e negativa em 120 dias, uma regulação negativa de TLR4 no baço em 48 dias e positiva de TLR4 na medula a partir de 74 dias.

Com relação às células B1b, as Natterinas não induziram a expansão desta subpopulação no peritônio (Figura 16A) ou na medula óssea (Figura 16C) dos animais *Tlr4 wild type*, exceto pelo aumento em 48 dias no compartimento esplênico (Figura 16B). Já nos animais *Tlr4 mutante* observou-se uma intensa expansão de células B1b na cavidade peritoneal em 120 dias (aumento de quase 6 vezes) (Figura 16A) e na medula óssea de quase 3 vezes em 48 dias (Figura 16C). No baço observamos um aumento destas células em 48 dias que mesmo diminuindo com o tempo permaneceu maior que o respectivo controle (Figura 16B), indicando assim uma regulação negativa de TLR4 no acúmulo deste subtipo celular nos 3 compartimentos durante o curso da resposta anti-Natterinas.

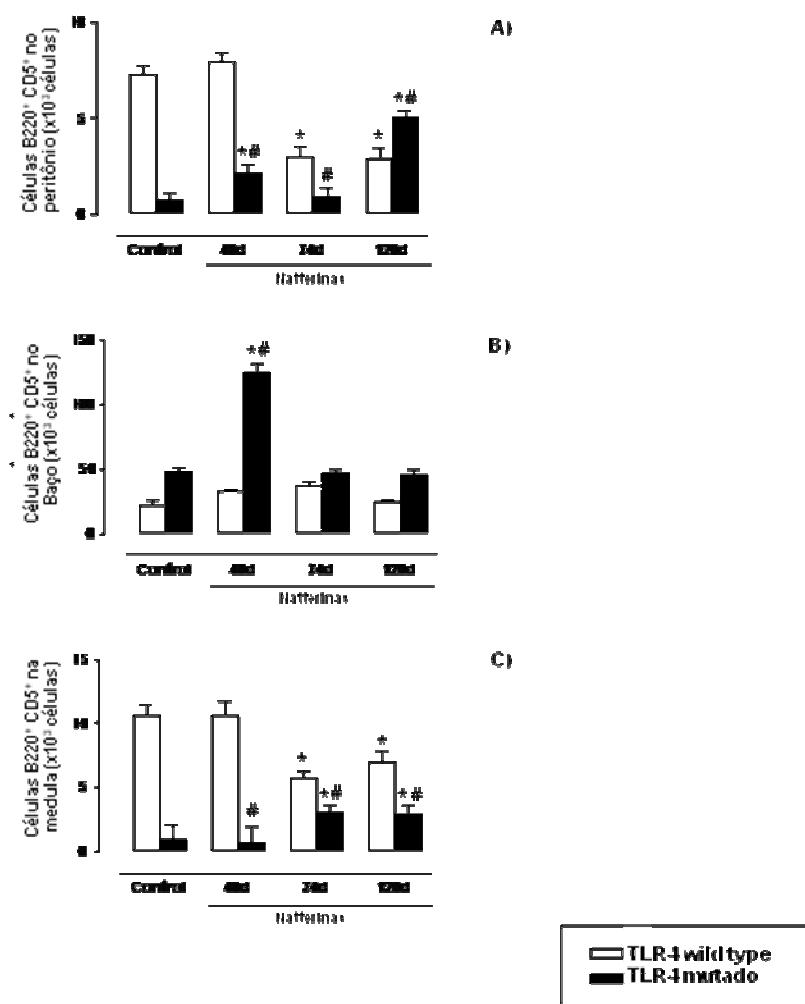


Figura 15. Celulas B1a geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta as Natterinas. Camundongos com o mesmo ôncogene genético exceto para o TLR4 (C3H/Pac e C3H-Hej imunizados com as Natterinas foram mortos nos dias 48, 74 e 120 e tiveram as celulas peritonais, esplênicas e medulares coletadas para marcação com anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Celulas B1a foram identificadas como B220⁺ CD5⁺. As barras representam o numero absoluto de celulas positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. *p < 0,05 em relação aos controles e **p < 0,05 em relação aos animais wild type imunizados com as Natterinas.

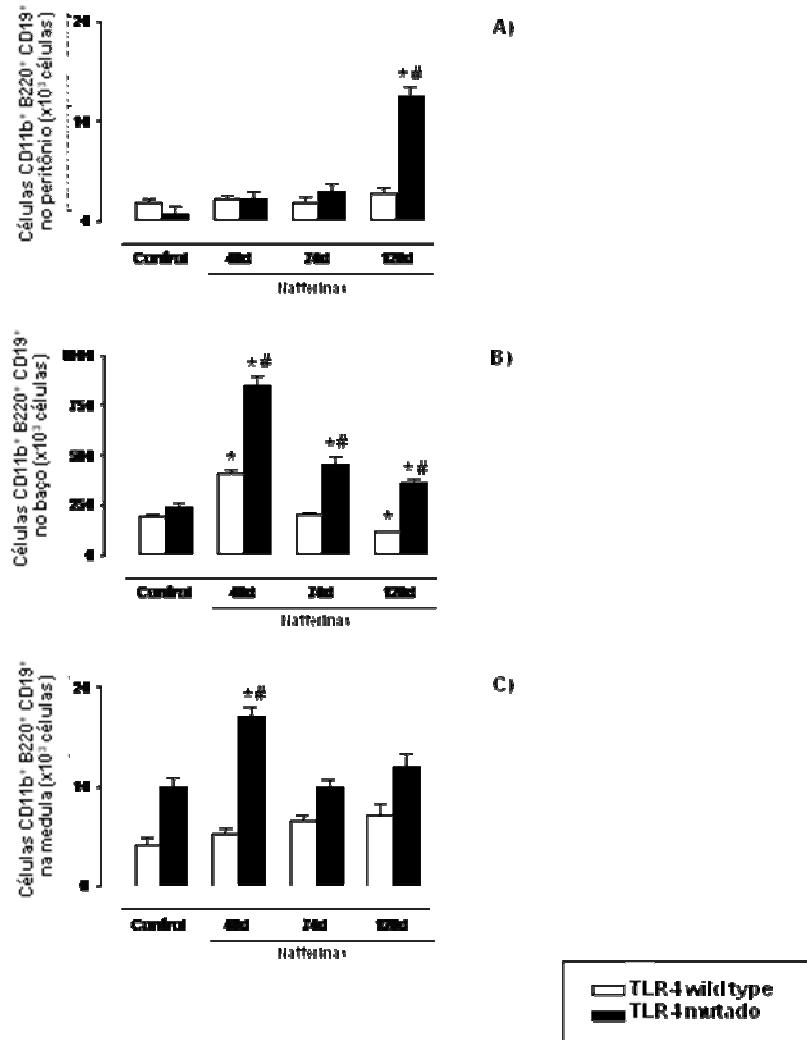


Figura 16. Celulas B1b geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta as Náttérinas. Camundongos com o mesmo background genético exceto para o TLR4, C3H/Pas e C3H/Hej imunizados com as Náttérinas foram mortos nos dias 48, 74 e 120 e tiveram as células peritoneais, esplênicas e medulares coletadas para marcação com os anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Celulas B1b foram identificadas como CD11b- na população duplamente positiva para B220 e CD19. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação aos controles e ** $p < 0,05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Náttérinas.

Os resultados apresentados na Figura **17** mostram que a imunização dos animais *Tlr4 wild type* com as Natterinas não induziu nos três compartimentos aumento no número de células B2, exceto pela presença em 48 dias no compartimento esplênico e na medula óssea (Figura **17B** e **17C**). Já os animais *Tlr4 mutante* imunizados com as Natterinas tiveram aumento no número desta subpopulação em 120 dias no peritônio e no baço (Figura **17A** e **17B**). Quando comparamos os grupos de animais *Tlr4 wild type* e *Tlr4 mutante* imunizados com as Natterinas, observamos que a resposta de células B2 em 120 dias no peritônio e no baço é regulada negativamente por TLR4, assim como a presença na medula óssea em 48 dias é regulada positivamente.

Observamos na Figura **18** que as Natterinas induziram nos animais *Tlr4 wild type* a expansão de células B efetora/memória ($B220^{pos}CD19^{pos}Ig^{pos}$) no peritônio e na medula óssea a partir de 74 dias (Figura **18A** e Figura **18C**). Já os animais *Tlr4 mutante* tiveram após a imunização com as Natterinas um aumento de cerca de 9 vezes nesta subpopulação em 48 e 120 dias no peritônio (Figura **18A**), um aumento de cerca de 2 vezes em 74 e 120 dias no baço (Figura **18B**) e cerca de 2 vezes em 48 e em 120 dias na medula óssea (Figura **18C**) em relação ao respectivo controle. Ademais, estes dados demonstram uma regulação negativa de TLR4 na expansão desta subpopulação nos 3 compartimentos.

Quanto às células ASC $CD138^{pos}CD43^{pos}B220^{pos}$, observamos na Figura **19** que as Natterinas induziram aumento no seu número a partir de 74 dias no peritônio e a partir de 48 dias na medula óssea dos animais *Tlr4 wild type*. Já os animais *Tlr4 mutante* apresentaram após a imunização com as Natterinas uma diminuição nesta população de ASCs $B220^{pos}$ em 74 e 120 dias no peritônio (Figura **19A**), uma expansão em 48 dias no baço (Figura **19B**), sem, no entanto sofrerem influência na resposta na medula óssea (Figura **19C**). Quando comparamos os animais selvagens e mutantes imunizados com as Natterinas podemos sugerir uma regulação positiva de TLR4 na expansão de ASC $B220^{pos}$ no peritônio e negativa no baço, sem, no entanto interferir na resposta na medula óssea.

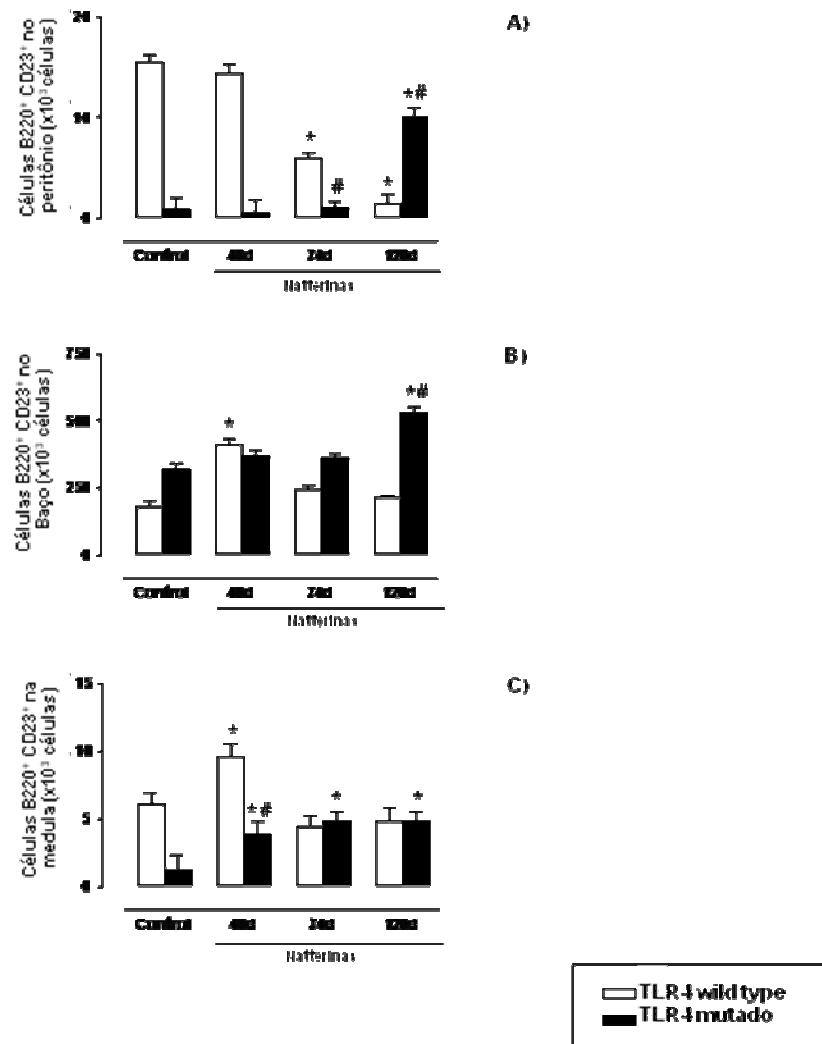


Figura 17. Celulas B2 geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta as Natterinas. Camundongos com o mesmo *background* genético exeto para o TLR4, C3H/Pas e C3H/Hej imunizados com as Natterinas foram mortos nos dias 48, 74 e 120 e tiveram as células peritoneais, esplênicas e medulares coletadas para marcação com anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Celulas B2 foram identificadas como B220+ CD23+. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação aos controles e ** $p < 0,05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

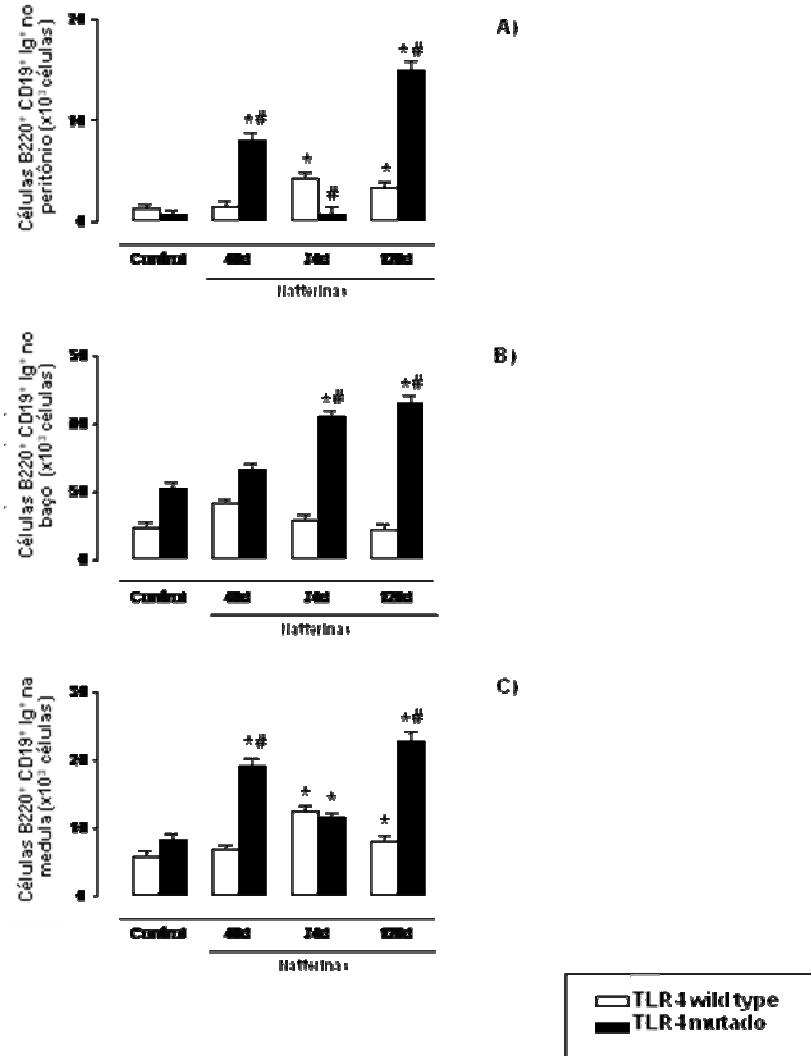


Figura 18. Células B efetoras/memória geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta às Natterinas. Camundongos com o mesmo *background* genético exceto para o TLR4, C3H/Pas e C3H/Hej imunizados com as Natterinas foram mortos nos dias 48, 74 e 120 e tiveram as células peritoneais, esplênicas e medulares coletadas para marcação com anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Células B CD19+ foram identificadas na população de células duplamente positiva para B220 e Ig. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação aos controles e ** $p < 0,05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

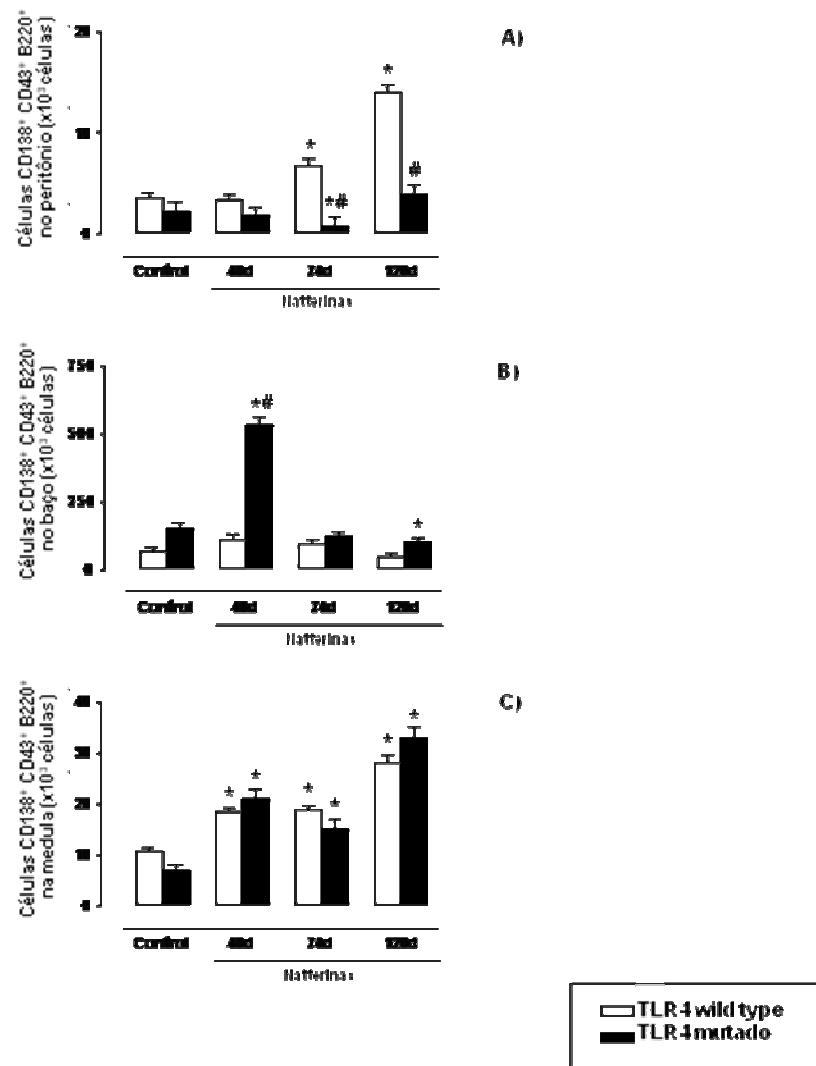


Figura 19. Células B de memória de vida longa (ASC) B220pos induzidas pelas Natterinas. Células ASCs B220pos CD138+ foram identificadas na população de células CD43+ no peritônio (A), no baço (B) e na medula (C) após 48, 74 e 120 dias da primeira imunização com as Natterinas. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação aos controles e # $p < 0,05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

Conforme apresentado na Figura 20, os animais *Tlr4 wild type* apresentaram aumento na população de ASCs B220^{neg} a partir de 48 dias na cavidade peritoneal e no baço e a partir de 74 dias na medula óssea. Já os animais *Tlr4 mutante* apresentaram um pequeno aumento no peritônio em 48 e 74 dias, no baço a partir de 74 dias e na medula óssea principalmente em 48 dias. Quando comparamos os animais selvagens e mutantes após a imunização com as Natterinas observamos uma regulação negativa de TLR4 nesta subpopulação celular no baço e na medula óssea e positiva no peritônio na fase crônica (120 dias).

Estes dados mostram que TLR4 regula positivamente a fase inicial da síntese de anticorpos anafiláticos IgG1 e principalmente IgE induzidos pelas Natterinas e negativamente a produção tardia destes anticorpos. Ademais, observa-se uma dependência positiva da sinalização via TLR4 no controle tardio de células B1a na medula óssea e de ASC B220^{pos} ou ASC B220^{neg} no peritônio. Um controle negativo na resposta tardia de células B1a foi visto no peritônio, de B1b e B2 no peritônio e no baço, de B efetora/memória nos três compartimentos e de ASCs B220^{pos} ou ASC B220^{neg} no compartimento esplênico.

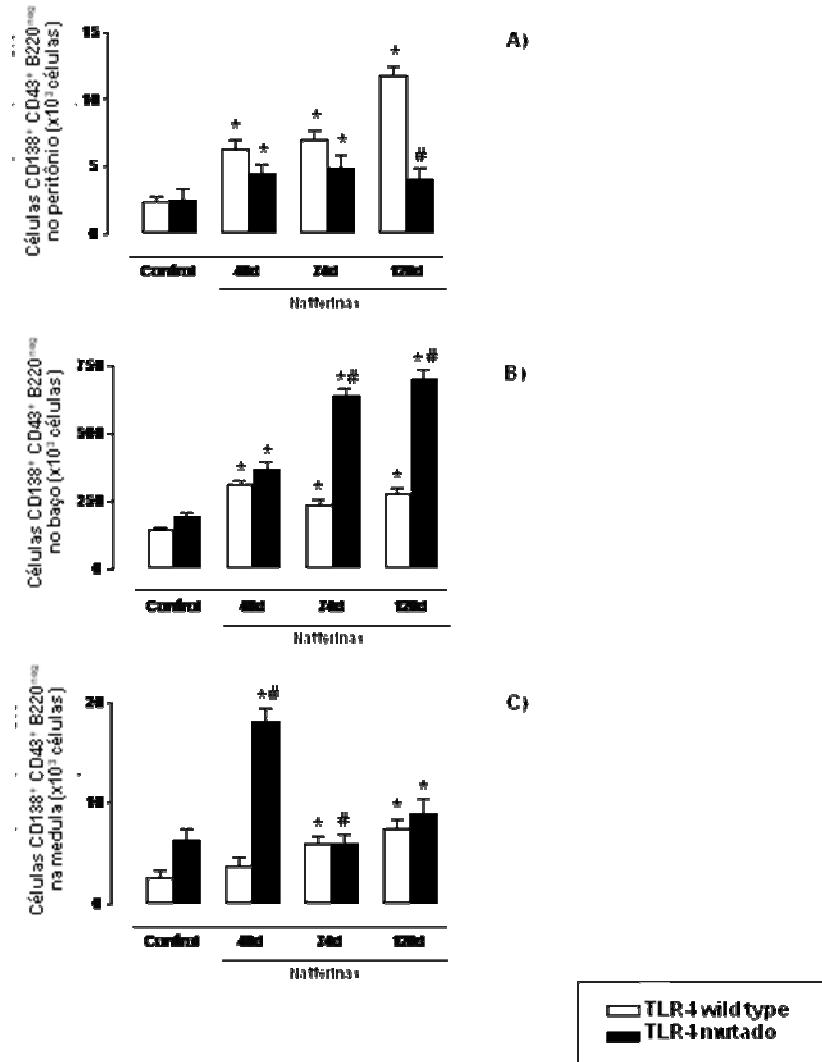


Figura 20. Células B de memória de vida longa (ASC) B220neg induzidas pelas Natterinas. Células ASCs B220negCD138+ foram identificadas na população de células CD43+ no peritônio (A), no baço (B) e na medula (C) após 48, 74 e 120 dias da primeira imunização com as Natterinas. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação aos controles e # $p < 0,05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

4.3 Efeito da Ausência da Sinalização via MyD88 na Resposta Imune de Memória Induzida pelas Natterinas

4.3.1 Protocolo de indução de memória pelas Natterinas em camundongos knockout de MyD88

Os receptores do tipo TLRs transmitem sinais através de uma entre quatro proteínas adaptadoras: *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), TICAM1 (também conhecido como TRIF - *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*), TIRAP (também conhecido como MAL) e TICAM2 (também conhecido como TRAM e TIRP). A ligação ao receptor TLR4 e a sua dimerização leva à sinalização via MyD88 e/ou TRIF (Revisto por RAKOFF-NAHOUUM e MEDZHITOV, 2009). A estimulação de TLR4/MyD88 leva à ativação de NF- κ B, quinases do tipo MAPKs e JUN N-terminal (JNKs), p38 e ERKs, e *interferon regulatory factor* (IRF3, IRF5 e IRF7), sinais essenciais na ativação das respostas imune inata e adaptativa.

Para avaliar a importância da sinalização MyD88 na diferenciação de ASCs e na manutenção dos níveis de anticorpos plasmáticos por longos períodos, camundongos da linhagem C57BL/6 com o mesmo *background* genético, exceto para o MyD88 (*MyD88 wild type* e *MyD88 KO*) machos foram submetidos ao mesmo protocolo de imunização utilizado anteriormente para a indução de resposta imune de memória. Os níveis plasmáticos de anticorpos e diferentes subtipos de linfócitos B no peritônio, no baço e na medula óssea foram avaliados. Animais controle foram submetidos às mesmas condições, entretanto foram injetados apenas com o adjuvante (Figura 21).

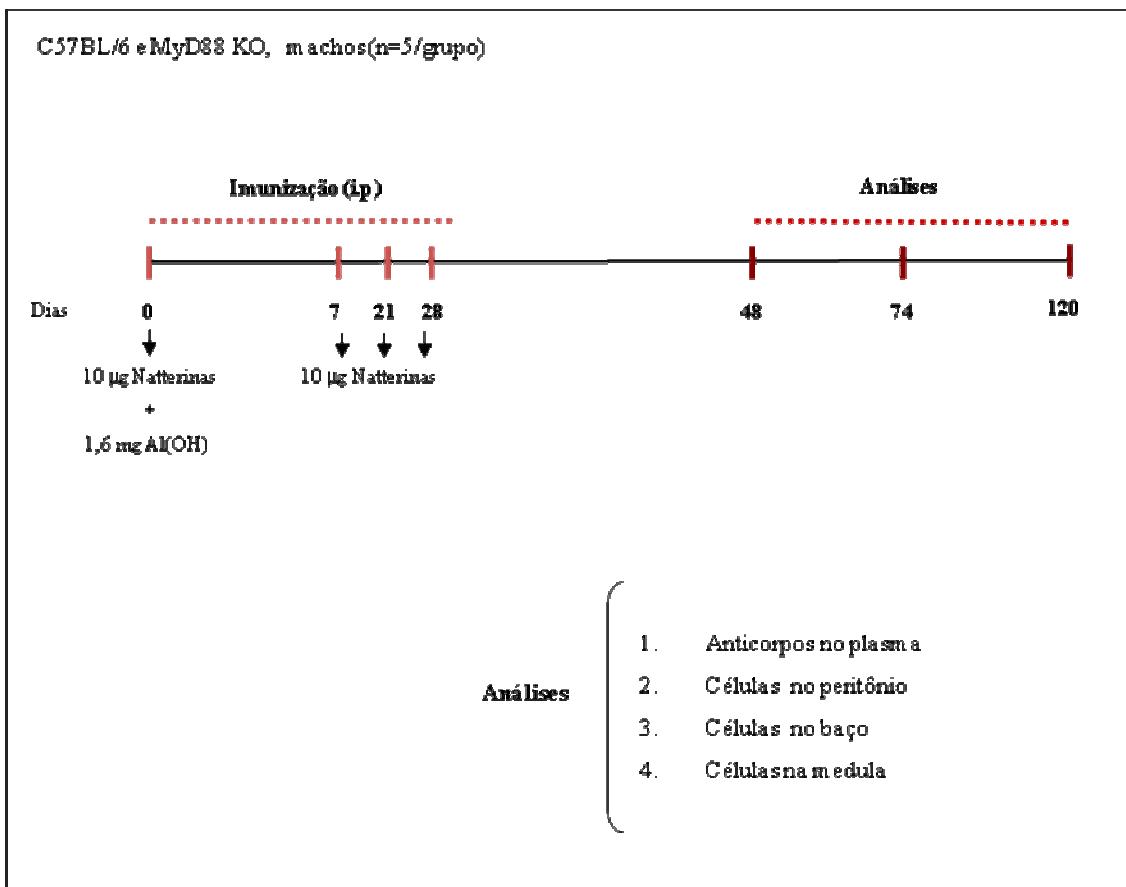


Figura 21. Efeito da ausência da sinalização via MyD88 na reposta imune de memória induzida pelas Natterinas. Camundongos com o mesmo *background* genético exceto para o MyD88, machos ($n = 5$) foram imunizados pela via intraperitoneal com as Natterinas adsorvidas em adjuvante. Após 7, 21 e 28 dias os animais receberam a mesma quantidade de Natterinas sem adjuvante. Animais controle receberam apenas o adjuvante. Nos dias 48, 74 e 120 após a imunização, os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma para dosagem de anticorpos e em seguida mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral e identificação dos diferentes subtipos de linfócitos B nesses compartimentos.

4.3.2 Resposta de anticorpos induzida pelas Natterinas na ausência da sinalização MyD88

A quantificação de anticorpos plasmáticos nos animais selvagens imunizados com as Natterinas mostrou uma produção em torno de 2000 µg/mL de anticorpos específicos IgG1 durante todo o curso da resposta humoral. Interessantemente, a resposta de anticorpos IgG1 específicos para as Natterinas em camundongos *MyD88 KO* foi significativamente intensificada (Figura 22A).

Em 48 e 74 dias os títulos de anticorpos IgG1 anafiláticos nos animais *MyD88 wild type* e *knockout* apresentaram-se equivalentes (título de PCA 1/80). Já em 120 dias, quando os animais *wild type* mantiveram a mesma titulação, uma diminuição na síntese de anticorpos IgG1 anafiláticos nos animais *MyD88 KO* foi observada (título de PCA 1/80 e 1/20, respectivamente).

Animais *MyD88 wild type* imunizados com as Natterinas foram capazes de gerar anticorpos totais IgE (Figura 22C) significativamente diferentes do controle em 74 e principalmente em 120 dias. Já os animais *MyD88 KO* imunizados foram mais responsivos à produção de IgE total, apresentando níveis significativamente maiores que os dos animais selvagens nos dois períodos (Figura 22C). Títulos de anticorpos IgE específicos anafiláticos (Figura 22D) e anticorpos do subtipo IgG2a (Figura 22E) não foram observados em ambos os animais *MyD88 wild type ou knockout* em resposta às Natterinas.

Nossos dados sugerem que a síntese de IgG1 específica e IgE total induzida pelas Natterinas é negativamente regulada pela sinalização MyD88, enquanto no período tardio, a síntese de IgG1 anafilática parece ser positivamente regulada por MyD88.

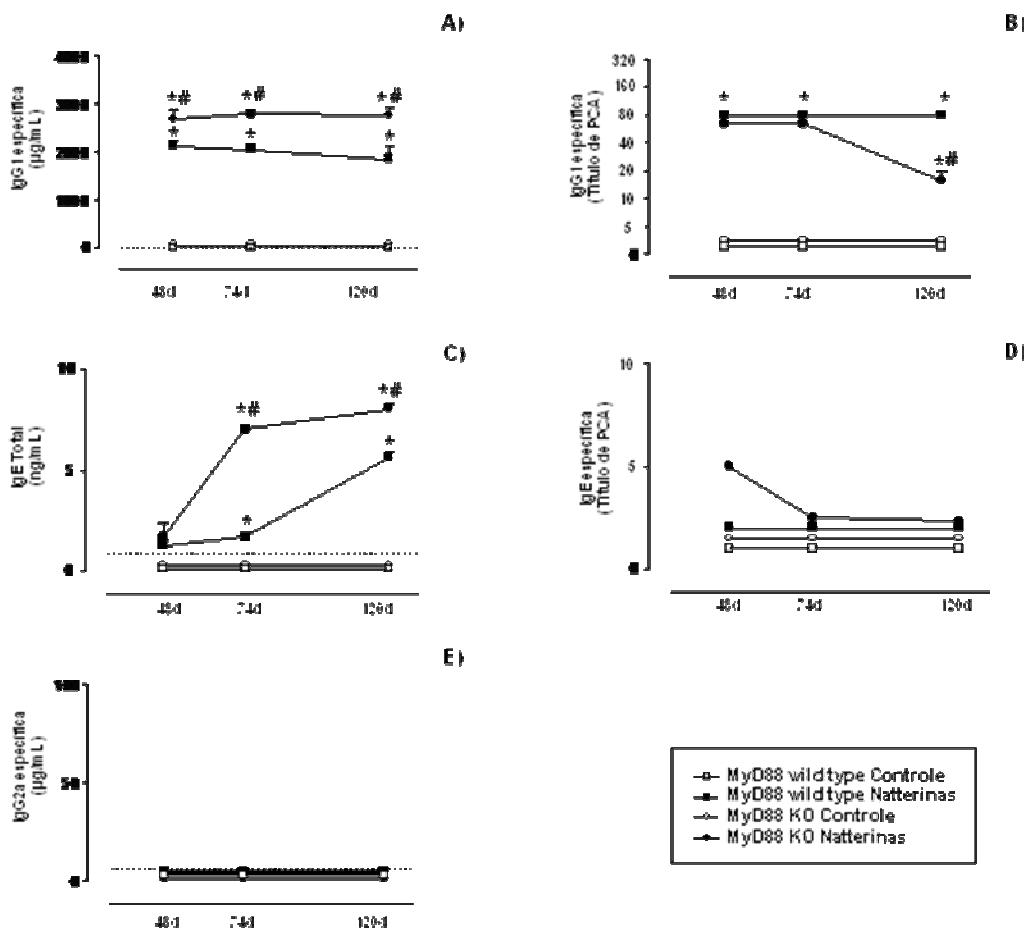


Figura 22. Níveis plasmáticos de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE. Camundongos com o mesmo *background* genético exceto para o *MyD88* com resposta crônica as Natterinas foram sanguinados após 48, 74 e 120 dias da imunização para obtenção do plasma e dosagem dos anticorpos IgG1 específicos por Elisa (**A**) e por PCA (**B**), anticorpos IgE totais por Elisa (**C**) e por PCA (**D**) e anticorpos IgG2a por Elisa (**E**). Os títulos de PCA representam a recíproca da maior diluição do pool de plasmas que apresentaram uma reação cutânea positiva com diâmetro > 5 mm. Os dados representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação aos controles e # $p < 0,05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

4.3.3 Regulação por MyD88 da diferenciação de subtipos de células B na resposta anti-Natterinas

Conforme apresentado na Figura 23, a cavidade peritoneal (**A**) de animais *MyD88 wild type* imunizados com as Natterinas apresentaram uma redução de 32%, 87% e 93% na quantidade absoluta de células B1a em 48, 74 e 120 dias, respectivamente em relação à quantidade vista nos animais controle. Os animais *MyD88 KO* imunizados com as Natterinas não apresentaram células B1a no peritônio (Figura 23A). No baço (Figura 23B), as Natterinas induziram uma redução deste subtipo celular em ambos os animais *MyD88 wild type e knockout* a partir de 74 dias. Ao contrário, na medula óssea as Natterinas induziram nos animais selvagens a expansão de células B1a em 48 dias que retornaram aos níveis basais em 74 e 120 dias e nos animais *MyD88 KO* induziram aumento no número destas células em 74 dias (Figura 23C). Quando comparamos os dois grupos *MyD88 wild type ou knockout* após a imunização com as Natterinas, observamos uma menor resposta quantitativa de células B1a nos animais *MyD88 KO* nos três compartimentos em 48 dias, mostrando que a resposta recente de células B1a induzida pelas Natterinas é regulada positivamente pela via MyD88.

Com relação às células B1b, as Natterinas induziram nos animais *MyD88 wild type* aumento desta subpopulação no peritônio em 74 dias (Figura 24A) e ao contrário uma diminuição no baço foi observada em todos os períodos de tempo analisados (Figura 24B). Na medula óssea destes animais um aumento significativo de células B1b foi observado em todos os tempos (Figura 24C). Na cavidade peritoneal de animais *MyD88 KO* grande aumento de B1b foi observado a partir de 74 dias (Figura 24A). No compartimento esplênico (Figura 24B) de animais *MyD88 KO*, observamos em 74 dias um aumento na população de células B1b e uma diminuição em 120 dias. Na medula óssea de animais *deficientes de MyD88* as Natterinas induziram uma diminuição na população de células B1b em 48 dias, porém aumento a partir de 74 dias (Figura 24C). Quando comparamos os dois grupos *MyD88 wild type ou knockout* após a imunização com as Natterinas, observamos que MyD88 exerceu uma regulação positiva na resposta de células B1b no peritônio e no baço e ao contrário, negativa na medula óssea.

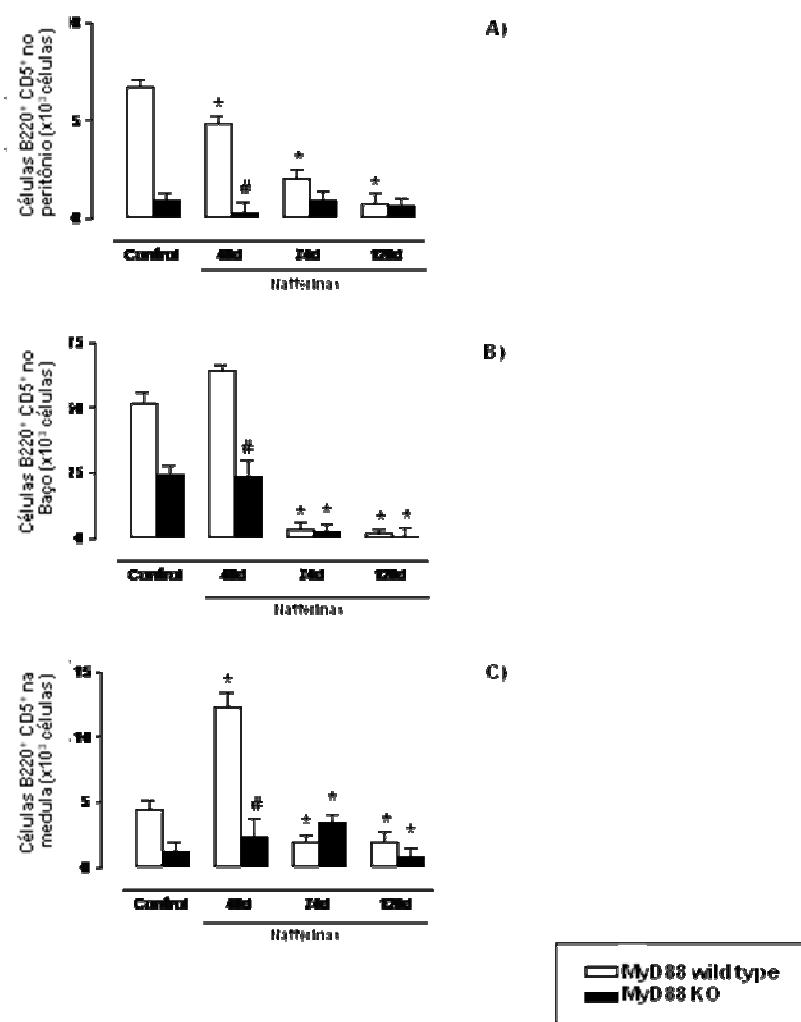


Figura 23. Celulas B1a geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta as Natterinas. Camundongos com o mesmo bocigroupo genético, exceto para o AtD22, imunizados com as Natterinas foram mortos nos dias 43, 74 e 120 e tiveram as celulas peritoneais, esplênicas e medulares coletadas para marcação com anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluo-e. Celulas B1a foram identificadas como B220⁺ CD5⁻. As barras representam o número absoluto de celulas positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0.05$ em relação aos controles e * $p < 0.05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

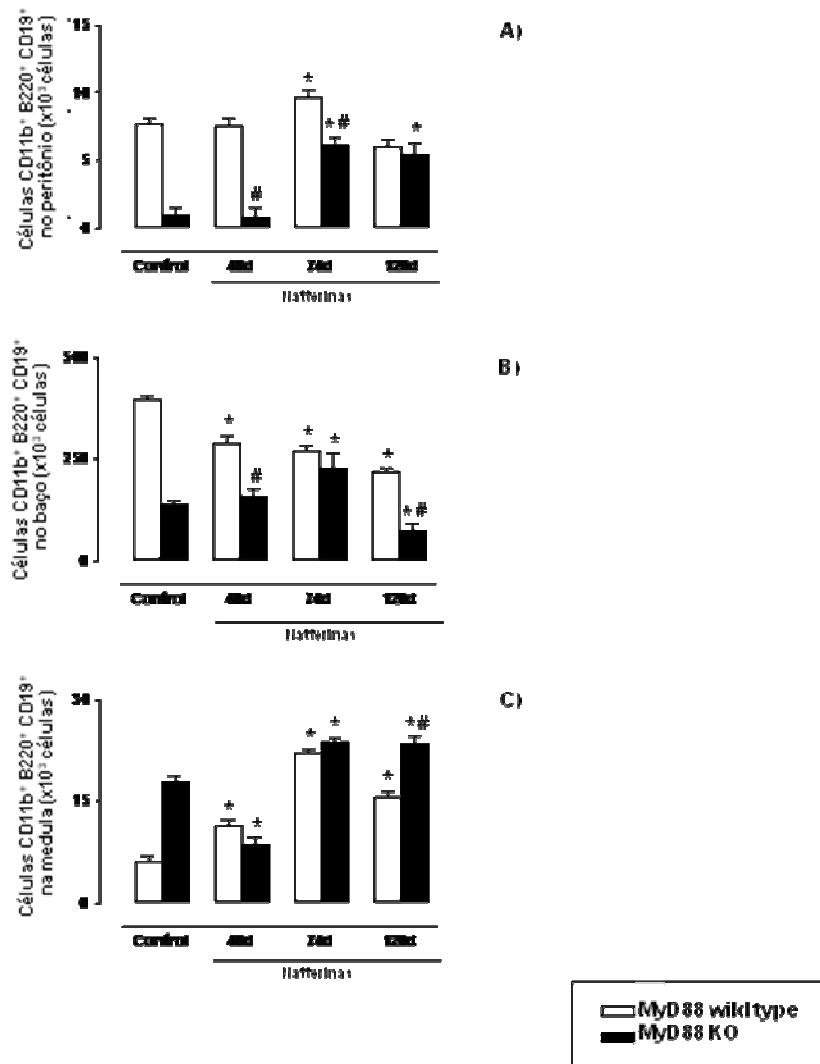


Figura 24. Células B1b geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta às Natterinas. Camundongos com o mesmo *background* genético exceto para o *MyD88*, imunizados com as Natterinas foram mortos nos dias 48, 74 e 120 e tiveram as células peritoneais, esplênicas e medulares coletadas para marcação com anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Células B1b foram identificadas como CD11b+ na população duplamente positiva para B220 e CD19. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. *p < 0,05 em relação aos controles e #p < 0,05 em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

A imunização dos animais *MyD88 wild type* com as Natterinas induziu na cavidade peritoneal um discreto aumento na quantidade de células B2 em 74 dias e diminuição pela metade no número destas células em 120 dias (Figura 25A). No compartimento esplênico, observamos um aumento de células B2 somente em 74 dias (Figura 25B) e a partir de 74 dias aumento no número absoluto destas células no compartimento medular (Figura 25C). Já os animais *MyD88 KO* imunizados com as Natterinas apresentaram uma diminuição na população de células B convencionais na cavidade peritoneal em 48 dias, seguido de um aumento a partir de 74 dias (Figura 25A). E ao contrário dos animais normais, a deficiência na sinalização MyD88 resultou em diminuição de células B2 no compartimento esplênico em 74 dias (Figura 25B). Na medula óssea de animais *MyD88 KO*, observamos uma expansão de células B2 a partir de 74 dias (Figura 25C). Quando comparamos os dois grupos *MyD88 wild type ou knockout* após a imunização com as Natterinas, observamos uma menor resposta quantitativa de células B2 nos animais *MyD88 KO* que evidencia a participação de MyD88 regulando positivamente células B2 em todos os compartimentos.

Observamos na Figura 26A que as Natterinas não induziram em animais selvagens células B efetora/memória ($B220^{pos}CD19^{pos}Ig^{pos}$) na cavidade peritoneal. Já no baço estas células foram observadas a partir de 48 dias e persistiram por até 120 dias (Figura 26B). Na medula óssea, o acúmulo de células B efetoras/memória só foi observado nos animais selvagens em resposta às Natterinas a partir de 74 dias (Figura 26C). Quanto aos animais *MyD88 KO*, as Natterinas provocaram uma grande expansão de células efetoras/memória na cavidade peritoneal em 48 e em 120 dias (Figura 26A) e um discreto aumento em 48 dias no baço seguido de diminuição a partir de 74 dias (Figura 26B) sem, no entanto provocar alterações na medula óssea (Figura 26C). Estes dados sugerem que a sinalização MyD88 regula as células B efetora/memória negativamente no peritônio e positivamente no baço e na medula óssea.

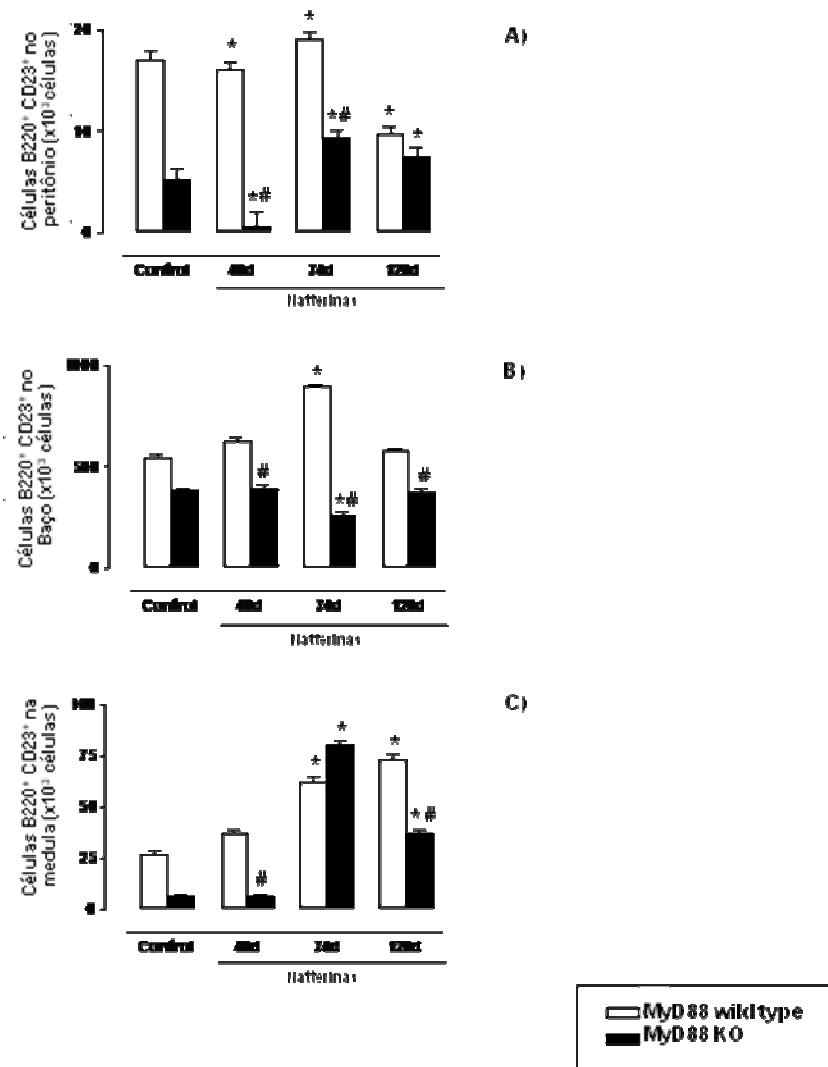


Figura 25. Células B2 geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta às Natterinas. Camundongos com o mesmo *background* genético exceto para o *MyD88*, imunizados com as Natterinas foram mortos nos dias 48, 74 e 120 e tiveram as células peritoneais, esplênicas e medulares coletadas para marcação com anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Células B2 foram identificadas como B220⁺ CD23⁻. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação aos controles e ** $p < 0,05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

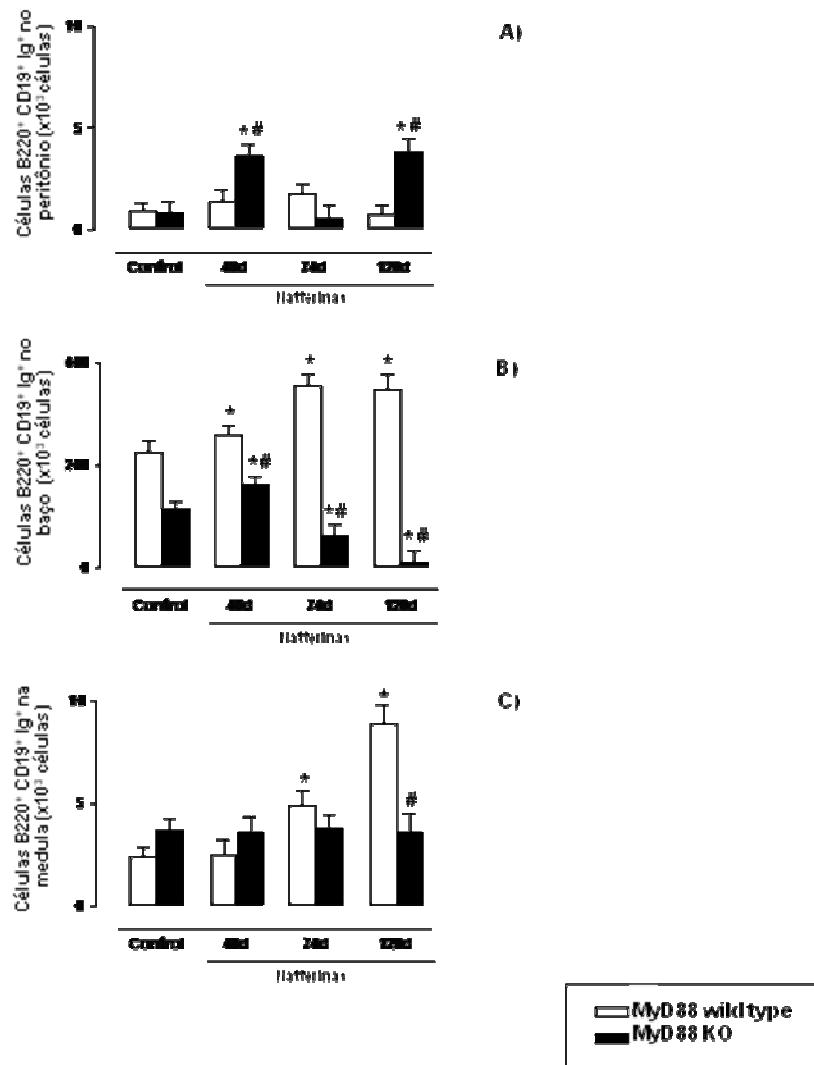


Figura 26. Células B efetoras/memória geradas no peritônio, no baço e na medula em resposta às Natterinas. Camundongos com o mesmo *background* genético exceto para o *MyD88*, imunizados com as Natterinas foram mortos nos dias 48, 74 e 120 e tiveram as células peritoneais, esplênicas e medulares coletadas para marcação com os anticorpos específicos para moléculas de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Células B CD19⁺ foram identificadas na população de células duplamente positiva B220 e Ig. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação aos controles e # $p < 0,05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

Observamos na Figura **27A** que as Natterinas induziram nos animais *MyD88 wild type* uma diminuição persistente de células ASCs CD138^{pos}CD43^{pos}B220^{pos} no peritônio. Já os animais *MyD88 KO* apresentaram aumento deste subtipo celular em todos os tempos sem, no entanto ser diferente em relação ao grupo selvagem. A mesma diminuição vista no peritônio foi observada para as células no baço dos animais selvagens. Porém, nos animais *MyD88 KO* observamos uma regulação positiva, com diminuição no seu número em 120 dias (Figura **27B**). Ao contrário, no compartimento medular as Natterinas induziram aumento discreto no número absoluto de ASC B220^{pos} nos animais selvagens a partir de 74 dias e nos animais deficientes de *MyD88*, após uma diminuição em 48 dias, uma grande quantidade de células foi observada a partir de 74 dias (Figura **27C**). Estes resultados sugerem que a regulação da resposta de células ASC B220^{pos} no peritônio é independente da sinalização via *MyD88* e ademais, existe uma regulação positiva desta molécula de sinalização na resposta no baço e uma regulação negativa na medula óssea.

Podemos observar na Figura **28** que as Natterinas induziram aumento significativo de células ASC B220^{neg} em 48 dias no baço (Figura **28B**), em 74 e 120 dias na medula óssea (Figura **28C**) e em todos os períodos de tempo analisados no peritônio dos animais *MyD88 wild type* (Figura **28A**). Já os animais deficientes em *MyD88* apresentaram em relação aos selvagens imunizados com as Natterinas reduzida resposta de células ASC B220^{neg} nos três compartimentos, demonstrando uma sinalização positiva desta molécula.

Nossos dados sugerem que a síntese de IgG1 específica e IgE (total e específica) induzida pelas Natterinas é negativamente regulada pela sinalização *MyD88*, enquanto em períodos mais tardios, a síntese de IgG1 anafilática parece ser regulada positivamente por *MyD88*. Ademais, observa-se uma dependência positiva da sinalização via *MyD88* no controle recente de células B1a nos três compartimentos, no controle tardio de B1b e ASC B220^{pos} no baço, B efetora/memória no baço e na medula e de B2 e de ASC B220^{neg} nos três compartimentos. Um controle negativo na resposta tardia de células B1b e ASC B220^{pos} foi visto na medula óssea e de B efetora/memória no peritônio.

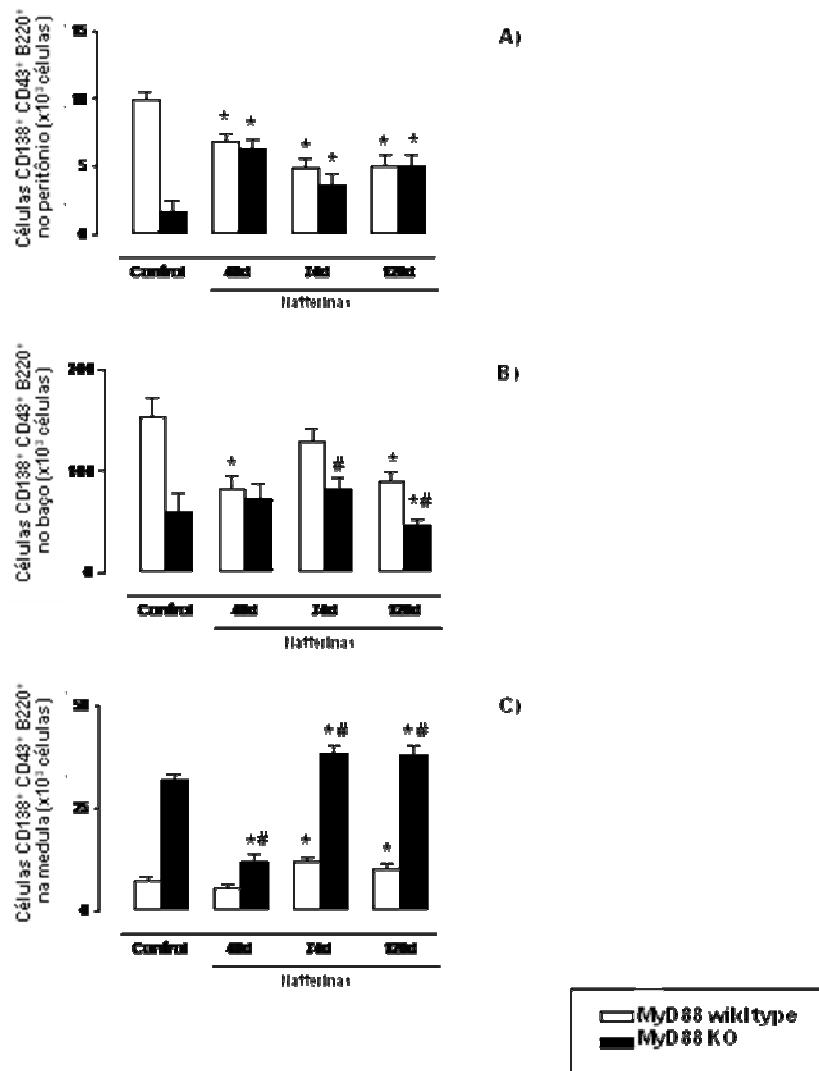


Figura 27. Células B de memória de vida longa (ASC) B220⁺ é induzidas pelas Natterinas. Células ASCs B220⁺CD138⁺ foram identificadas na população de células CD43⁺ no peritônio (A**), no baço (**B**) e na medula (**C**) após 48, 74 e 120 dias da primeira imunização com as Natterinas. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. *p < 0,05 em relação aos controles e **p < 0,05 em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.**

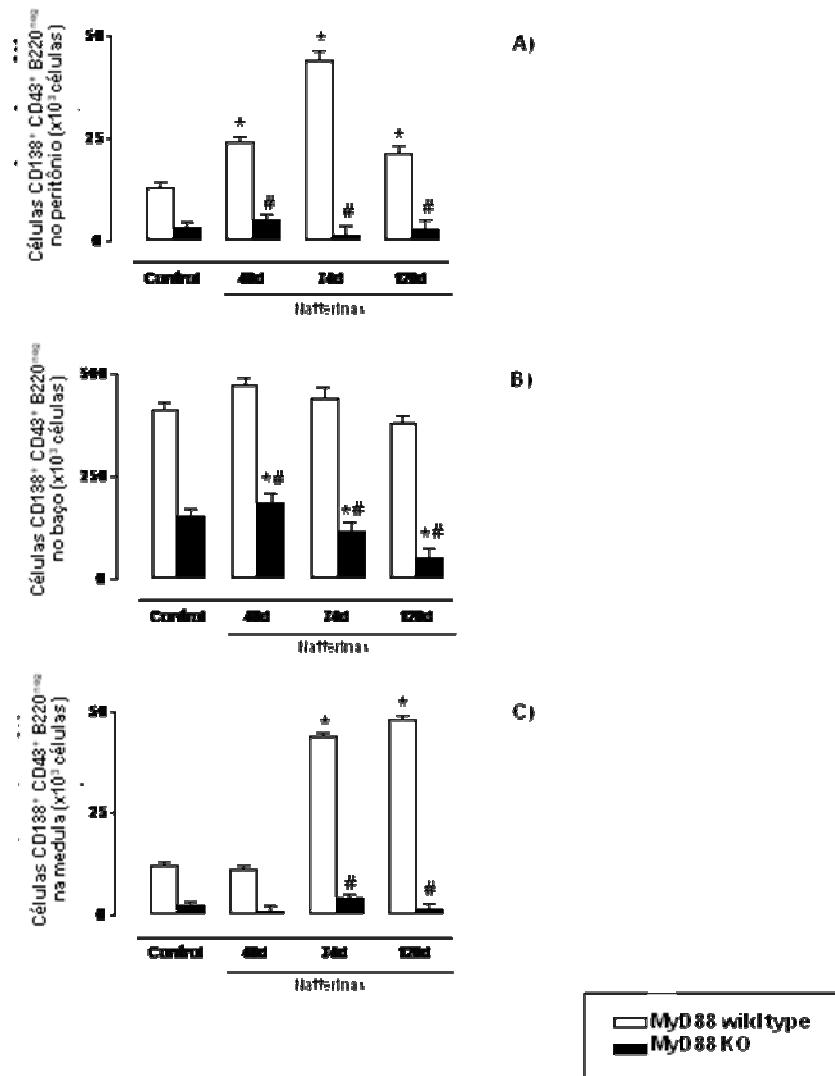


Figura 28. Células B de memória de vida longa (ASC) B220neg induzidas pelas Natterinas. Células ASCs B220neg CD138+ foram identificadas na população de células CD43+ no peritônio (A), no baço (B) e na medula (C) após 48, 74 e 120 dias da primeira imunização com as Natterinas. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação aos controles e # $p < 0,05$ em relação aos animais *wild type* imunizados com as Natterinas.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Um trabalho recente desenvolvido por nosso grupo investigou os efeitos do veneno de *T. nattereri* na geração de memória imunológica em camundongos e os fatores envolvidos na manutenção das células ASCs (GRUND et al., 2009). Neste trabalho foi mostrado que o veneno 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 sobrevida ASC na medula óssea ($B220^{\text{low}}CD43^{\text{low}}CD138^{\text{pos}}$), no baço ($B220^{\text{high}}CD43^{\text{high}}CD138^{\text{pos}}$ e $B220^{\text{low}}CD43^{\text{high}}CD138^{\text{pos}}$) e também no peritônio ($B220^{\text{neg}}CD43^{\text{low}}CD138^{\text{pos}}$). Ademais, este trabalho revelou a importância das citocinas IL-5 e IL-17A na geração e na sobrevivência das diferentes ASC nos 3 compartimentos e na manutenção esplênica de células B1a, uma vez que o uso de anticorpos neutralizantes para as duas citocinas conseguiu reverter a diferenciação das células ASCs induzidas pelo veneno.

Recentemente, uma nova família de proteínas com atividade cininogenásica e estrutura primária única foi caracterizada no veneno de *T. nattereri* (MAGALHÃES et al., 2006). As Natterinas (1, 2, 3, 4 e P), como foram nomeadas, possuem massa molecular em torno de 35 kDa, são capazes de induzir edema e nocicepção semelhante ao veneno (LOPES-FERREIRA et al., 2004), além de serem capazes clivar o cininogênio humano e os peptídeos sintéticos derivados de cininogênio, além de serem as proteínas majoritárias do veneno de *T. nattereri* (MAGALHÃES et al., 2005).

Diante da necessidade de maiores dados para o esclarecimento da formação de memória humoral de memória com a diferenciação e manutenção de células de longa sobrevida - ASCs e da participação dos receptores TLRs na modulação da resposta de memória, o objetivo do atual trabalho foi avaliar em um modelo murino a resposta de memória humoral e os compartimentos celulares desenvolvidos pela imunização com a nova classe de proteínas encontradas no veneno do peixe *T. nattereri*. Assim, avaliamos em camundongos com resposta de memória às Natterinas a diferenciação de células secretoras de anticorpos de longa sobrevida, bem como o papel do receptor do tipo TLR4 e da sinalização MyD88 na modulação desta resposta.

A imunização intraperitoneal de camundongos BALB/c com as proteases Natterinas é capaz de desencadear e manter uma resposta imune específica com produção de anticorpos com perfil Th2 (IgE e IgG1) por longos períodos. A capacidade das proteases em induzir anticorpos IgE totais e específicos foi descrita inicialmente nas respostas contra o parasita *Schistosoma mansoni*, onde cisteinoproteases (SmB1, catepsina L) derivadas dos ovos deste helminto foram demonstradas capazes de induzir a síntese de IgE pelas células B (VERWAERDE al., 1988; PEARCE e MACDONALD,

2002). Mais tarde foi sugerido que a capacidade das proteases em induzir resposta Th2 era dependente de sua atividade proteolítica (GOUGH et al. 1999). Comparando a resposta de anticorpos desencadeada pelas Natterinas proteoliticamente ativa e inativa, nossos resultados corroboram com estes dados, uma vez que as Natterinas inativa perdem a capacidade de induzir e manter respostas de perfil Th2.

Para uma proteína ser reconhecida como imunogênica e ativar o sistema imune, primeiramente ela precisa ser degradada em peptídeos抗gênicos por proteases intracelulares no proteassoma de células apresentadoras de antígenos (APCs). Estes peptídeos devem possuir de 13–18 resíduos de aminoácidos, que se ligarão às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e serão transportadas para a superfície celular. Eventualmente, o complexo peptídeo-MHC será reconhecido por linfócitos T auxiliares que estimularão a síntese de anticorpos específicos por linfócitos B (GOLDBERG e ROCK, 1992). Entretanto, quando um imunógeno como as Natterinas é também uma protease, elas podem não serem processadas como uma molécula de proteína sem atividade proteolítica, e ao contrário degradar proteínas envolvidas na função de processamento de antígeno das APCs (DARANI e DOENHOFF, 2009). O que podemos apreender de nossos resultados é que as Natterinas foram processadas adequadamente pelas APCs e desencadearam resposta imune humoral T-dependente e de memória. Porém, ainda resta ser investigado se as Natterinas além de induzirem resposta humoral são também capazes de agir proteoliticamente sobre qualquer tipo celular como DCs, linfócitos T ou B, ou ainda clivando proteínas de membrana como anticorpos em células B ou proteases no compartimento endossomal de APCs (KONG et al., 1994; PRUETT JR, 1993; ASLAM et al., 2008).

A atividade proteásica de vários alérgenos tem sido demonstrada antes mesmo da comprovação de sua capacidade de indução de respostas Th2 ou da produção de IgE (KHERADMAND et al., 2002; GOUGH et al., 1999; SHAKIB et al., 1998). Entretanto, o mecanismo e o alvo molecular ou celular das proteases incluindo as Natterinas na indução da diferenciação de resposta Th2 aguardam completa identificação.

Na tentativa de elucidar o mecanismo molecular de ação das proteases, Donnelly et al. (2010) trabalhando com a protease FheCL1 derivada do helminto *F. hepatica*, conhecida por dirigir resposta imune com perfil Th2, demonstraram que uma simples injeção da protease FheCL1 em camundongos suprime a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos peritonais ativados pelo LPS sem, no entanto diminuir a expressão de CD14 ou TLR4/MD2. Ademais, os autores propõem que a inibição da ativação dos macrófagos induzida pela protease se dá após a sua captura e a

subseqüente degradação de TLR3 no compartimento endossomal, evitando assim a sinalização dependente de TRIF e o desenvolvimento de resposta Th1.

Recentemente foi confirmada a ação direta de omega-1, uma T2 ribonuclease de 32 kDa secretada de ovos do *S. mansoni* (FITZSIMMONS et al., 2005) na indução da alteração da capacidade imunogênica de células dendríticas (DCs). Esta protease altera o citoesqueleto das DCs impedindo a sinalização eficiente via MHC ao TCR dos linfócitos e gerando diferenciação para Th2 (STEINFELDER et al., 2009). Ademais, Everts et al. (2009) confirmaram por experimentos *in vitro* com DCs e *in vivo* em camundongos que a protease omega-1 do *S. mansoni* é um potente indutor de resposta Th2, dependente da produção de TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) e da sinalização OX40-OX40L (LIU et al., 2007).

Evidências de que a alergenicidade do *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) presente no pó doméstico está ligada a sua atividade cisteínoprotease foi sugerida por experimentos *in vitro* que mostraram que ela é capaz de clivar CD23 na forma membranosa em linfócitos B humanos (HEWITT et al., 1995; SCHULZ et al., 1995) e por experimentos *in vivo* que mostraram que a imunização de camundongos com a Der p 1 proteoliticamente inativa pelo inibidor E-64 ou pelo calor resulta na ausência da produção de anticorpos IgE total e específico e IgG1 específico (KIKUCHI et al., 2006).

Recentemente, foi demonstrado que proteases derivadas de alérgenos ou do fungo *Alternaria alternata* ativam células epiteliais brônquicas para produzirem TSLP via o receptor PAR-2. Também, Sokol et al. (2008) demonstraram que basófilos são ativados diretamente por proteases, mecanismo dependente da atividade proteolítica, e dirigidos para os linfonodos drenantes, onde uma vez ativados produzem IL-4, IL-13, IL-31 e TSLP, citocinas determinantes para a polarização da resposta Th2.

Diversos trabalhos que aliam metodologias como microarray, PCR em tempo real e fenotipagem da superfície celular ou intracelular por citometria de fluxo, revelaram que em murinos, células B de memória têm expressão aumentada de membros da superfamília de receptores de TNF, SLAM (*signaling lymphocytic activation molecule*), B7 e Bcl2, assim como de receptores TLR (de 1 a 10) e da molécula CD180 (RP105) relativa à família dos TLR (RICHARD et al., 2008). Tentando explicar o mecanismo pelo qual a sinalização via receptores TLRs pode contribuir para a autoimunidade e inflamação crônica, Hwang et al. (2009) demonstraram por microscopia intravital que a sinalização via TLR4 aumenta o transito de linfócitos B para os linfonodos, induzindo a colocalização e a

interação com células estromais dos folículos linfóides, gerando a proliferação e aumento na diferenciação para células B de memória e de longa vida (ASC).

Assim, a exposição ambiental a proteases derivadas de fungos, alérgenos ou toxinas de venenos de peixes peçonhentos como as Natterinas podem ser decisivas para o desencadeamento de resposta imune do tipo Th2, caracterizada pela alta produção de IgE. Podemos então especular que as Natterinas se apresentam como抗ígenos e a eficiência na indução de resposta humoral Th2 pode ser o resultado adjuvante de sua ação proteásica por múltiplos mecanismos como *i*) em células do sistema inato como macrófagos, degradando TLR3 e impedindo a polarização da resposta para Th1, *ii*) ativando DCs ou células epiteliais na produção de citocinas (e.g. TSLP) que dirigirão a diferenciação de linfócitos T para o subtipo Th2, *iii*) diretamente sobre basófilos ativando-os para a produção de citocinas ou *iv*) diretamente sobre linfócitos B, dirigindo o transito para o centro germinativo dos folículos linfóides.

Este estudo com as proteases Natterinas permitiu um maior esclarecimento da resposta humoral de memória induzida pelo veneno do peixe *T. nattereri* uma vez que mostra que as Natterinas, toxinas majoritárias do veneno, são capazes de induzir em camundongos BALB/c resposta imune humoral do tipo Th2 com a produção de altos níveis de anticorpos com atividade anafilática IgG1 e principalmente IgE. Ademais, indica que a resposta mista com produção de IgG1, IgE e IgG2a desencadeada pelo veneno pode ser decorrente da ação de outra toxina presente no veneno como a Natrectina, uma lectina tipo C (MAGALHÃES et al., 2006).

De maneira interessante, o estudo da resposta humoral de longo prazo induzida pelas Natterinas se tornou uma área promissora, pois permitiu o estudo da complexa organização do compartimento de células B de memória, principalmente do subtipo de longa sobrevida (ASC) com distintos fenótipos e muito provavelmente com subespecialidades funcionais. Desta forma, mostramos que as Natterinas alteraram o compartimento de células B, expandindo células B do compartimento inato como células B1a no baço, B1b no peritônio e baço e B2 nos três compartimentos. Permitiu também correlacionar os altos níveis de anticorpos da resposta secundária com as numerosas células B efetora/memória no baço e células ASCs nos 3 compartimentos: diferentemente do veneno que induziu células ASC B220^{pos} no baço e na medula e células ASC B220^{neg} no peritônio, as Natterinas promoveram a expansão de numerosas ASCs B220^{neg} em todos os compartimentos, assim como também de células ASCs B220^{pos} no baço e na medula óssea.

Ainda, nossos resultados comparando a resposta imune desencadeada pelas Natterinas proteoliticamente ativa e inativa, podemos evidenciar que a atividade proteásica desencadeia um distinto perfil de resposta. As Natterinas inativas induzem uma resposta mais precoce, de perfil Th1 e principalmente local, ao contrário, as Natterinas proteoliticamente ativa são capazes de gerar uma resposta imune crônica, de perfil Th2 e que abrange distintos compartimentos (local efetor, órgãos linfóides secundários e medula óssea). Além disso, ao contrário das Natterinas inativadas, as Natterinas ativas são capazes de induzir MMP-9 no baço dos animais imunizados. Este fenômeno, talvez possa ser associado a capacidade das Natterinas ativas em induzir respostas imunes de perfil Th2, uma vez que as MMP-9 na forma ativa são capazes de clivar a molécula CD23 (Fc ϵ RII, receptor de baixa afinidade para IgE) expressa em linfócitos B esplênicos, levando a sua circulação na forma solúvel (sCD23) que contribui para a síntese aumentada de IgE (HIBBERT et al., 2005; FORD et al., 2006). A indução de MMP-9 pelas Natterinas proteoliticamente ativas também podem ser associadas à resposta imune de células B em distintos compartimentos, uma vez que as metaloproteinases de matriz são importantes componentes para a migração celular (MELAMED et al., 2006).

O próximo passo neste estudo foi avaliar a participação do receptor TLR4 e da sinalização via MyD88 na modulação da resposta humoral de memória induzida pelas Natterinas. Diversos autores confirmam que a ativação de receptores inatos como os TLRs é decisiva para a geração de respostas T dependentes de memória de grande magnitude, qualidade e de longa duração. Os receptores TLR4 transmitem sinais através da molécula adaptadora MyD88 assim como através de TRIF. Para determinar se receptores TLR4 estão envolvidos na resposta humoral de memória induzida pelas Natterinas, utilizamos animais deficientes na expressão de TLR4 (C3H/Hej) comparados com animais de *background* genético semelhante, porém com expressão funcional do TLR4 (C3H/HePas). Ademais, para excluir a contribuição da ativação alternativa de múltiplos receptores TLRs que sinalizam via esta proteína adaptadora realizamos experimentos com animais deficientes no gene de MyD88.

Nossos resultados mostraram que a ausência funcional da molécula TLR4 influenciou positivamente a síntese de anticorpos IgG1 e principalmente IgE nos períodos recentes da resposta e negativamente de IgG2a, sugerindo a participação destes receptores na indução de resposta humoral com perfil Th2. Ademais, com a cronicidade da resposta TLR4 parece ser importante para regular negativamente a produção dos anticorpos IgG1 anafiláticos e IgE total. Assim, sugerimos uma ação adjuvante do receptor TLR4 acelerando a síntese preferencial de anticorpos de perfil Th2. Ademais, com os animais deficientes em MyD88 verificamos que a síntese de IgG1 específica e IgE total induzida pelas Natterinas é negativamente regulada pela sinalização MyD88, enquanto no período

tardio, a síntese de IgG1 anafilática parece ser positivamente regulada por MyD88, diferente da regulação via TLR4, sugerindo que a regulação positiva de IgG1 anafilática e de IgE total no período recente seja dependente da sinalização TLR4 via outra molécula adaptadora, TRIF. O papel da molécula adaptadora TRIF na sinalização por TLR4 foi demonstrado em macrófagos derivados de camundongos deficientes para o gene de TRIF, os quais apresentaram incapacidade de produção de citocinas inflamatórias em resposta a agonistas de TLR4, e não em resposta a outros ligantes de TLR (YAMAMOTO et al., 2003). Em uma publicação de 2005 do grupo de pesquisa do Dr. Medhitzov (PASARE e MEDHITZOV, 2005) foi demonstrado que enquanto a produção de IgM, IgG1 e IgG2c é dependente da proteína MyD88 expressa em células B, a produção de IgE e IgA parece ser independente da sinalização MyD88, necessitando de mecanismos alternativos de sinalização, como o TRAM e TRIF.

Em 2009, Jackson et al. a partir de dados experimentais sugeriram que o contato do sistema imune desenvolvido ou maduro com o LPS gera simultaneamente resposta imune com produção de citocinas do tipo Th1 e aumento da síntese de IgE, o que contribui para a exacerbção de doenças alérgicas. Os dados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a exposição ao LPS dependente da sinalização via TLR4/MyD88 gera a secreção da metaloproteinase de matriz MMP-9 que na forma ativa cliva a molécula CD23 (FcεRII, receptor de baixa afinidade para IgE) expressa em linfócitos B esplênicos, levando a sua circulação na forma solúvel (sCD23) que contribui para a síntese aumentada de IgE (HIBBERT et al., 2005; FORD et al., 2006). Em humanos, altos níveis plasmáticos de sCD23 se correlaciona positivamente com a gravidade da doença alérgica, os quais diminuem após a imunoterapia com baixas doses de alérgenos (JUNG et al., 1995).

Mediante estes resultados, resta verificarmos se além da sinalização TLR4/MyD88 a sinalização TLR4/TRIF é também capaz de induzir a produção de MMP-9 e clivar a molécula CD23, uma vez que em nosso modelo ela foi importante para a síntese de anticorpos anafiláticos anti-Natterinas.

Quanto à análise do perfil celular, nossos resultados corroboram os dados na literatura que mostram que a emigração de células B1 do peritônio pode ser dependente de sinais oriundos de receptores TLRs. Demonstramos que as Natterinas induziram uma diminuição de células B1a na cavidade peritoneal de animais *MyD88 wild type* e *MyD88 KO*, mas que os animais *Tlr4 mutante* apresentaram um acúmulo de células B1a no peritônio. Sabendo-se que a sinalização do TLR4 pode ocorrer via TRIF independente de MyD88 (YAMAMOTO et al., 2003) e que animais *MyD88 KO* são capazes de suprimir a expressão de integrinas α4, α6, β1 e CD9 nas células B1 quando estimuladas

com LPS (HA et al., 2006) sugerimos que o TLR4 independente de MyD88 (via sinalização TRIF), regula negativamente os genes de integrinas, permitindo a emigração de células B1 da cavidade peritoneal.

Outro dado importante em nossos resultados pôde ser elucidado através da comparação da resposta anti-Natterinas em animais com o mesmo *background* genético exceto para o TLR4. No período crônico da resposta, animais *Tlr4 wild type* apresentam uma diminuição a níveis basais de células B efetora/memória acompanhado por um aumento de ASC^{pos} e ASC^{neg} na cavidade peritoneal. Ao contrário, animais que carregam uma mutação no TLR4 apresentaram um acúmulo de células B efetora/memória acompanhado por uma drástica diminuição de ambas as ASCs no local efetor da resposta. Estes dados reforçam a idéia da relação hierárquica entre os 2 tipos de células B de memória ($B220^{pos}CD19^{pos}$ x ASC $B220^{neg}$) quando mostram que estímulos do TLR4 são suficientes para ativar células B efetora/memória para se diferenciarem em ASCs *in vivo*. Dados da literatura mostram que agonistas de TLRs são suficientes para induzir a expressão de BLIMP-1 pelas células B diferenciando-as em ASCs *in vitro* e os nossos resultados mostram então esta função reguladora de TLR4 na diferenciação de ASC *in vivo* (SHAPIRO-SHELEF e CALAME, 2005; LIN et al., 2002; SHAFFER et al., 2002, 2004).

Interessantemente, nossos resultados mostram que a sinalização TLR4/MyD88 é essencial para a manutenção de ASCs $B220^{neg}$ por longos períodos no compartimento efetor da resposta, o peritônio, uma vez que a ausência de ambas as proteínas sinalizadoras refletiu na total ausência de ASCs $B220^{neg}$ no período crônico da resposta. Isto pode ser associado ao fato de que células B deficientes de MyD88 superexpressam o fator apoptótico Bcl-6 e diminuem a expressão de BLIMP-1. Assim, demonstrando que TLR4/MyD88 induzem a diferenciação/manutenção de células ASC pela continua expressão de BLIMP-1, um importante fator de regulação gênica para a sobrevivência de células B secretoras de anticorpos de longa duração (PASARE e MEDHITZOV, 2005).

Em conjunto, podemos dizer que existe uma interdependência de ambas as sinalizações TLR4/MyD88 na regulação da resposta humoral e celular induzida pelas Natterinas que pode ser assim resumida (Figura 29):

- Regulação negativa de IgE total no período tardio;
- Regulação positiva de células B1a e B2 no peritônio e na medula óssea no período recente e de B1a na medula no período tardio;
- Regulação positiva de células ASC $B220^{neg}$ no peritônio no período tardio.

- Regulação negativa de células B efetora/memória no peritônio durante todo o curso da resposta.

Finalmente, os fenômenos celulares observados na resposta crônica às Natterinas induzidos pela sinalização TLR4 independente de MyD88 ou pela via MyD88 independente de TLR4 indicam claramente que a ativação de TLR4 pode desencadear a sinalização pela proteína adaptadora TRIF e que as Natterinas geram uma resposta simultânea de ativação de múltiplos receptores TLRs, respectivamente. Assim, a regulação positiva de IgG1 anafilática e de IgE total no período recente e de IgE anafilática durante todo o curso da resposta humoral bem como a presença de ASCs B220^{pos} no peritônio é dependente da sinalização TLR4/TRIF (Figura 29).

É importante salientar que as Natterinas são conhecidas por se ligarem e degradarem os colágenos tipo I e tipo IV, impedindo a aderência de células HeLa à matriz extracelular, além de apresentam efeito citotóxico, induzindo morte e subsequente desaderência celular (KOMEGAE et al., *submetido*). Desta maneira, é possível especular que a fagocitose deficiente de células apoptóticas e a consecutiva liberação de antígenos nucleares (ligantes endógenos de TLRs) característicos da imunopatologia induzida pelas Natterinas podem gerar a ativação de alternativos receptores TLRs.

Vem sendo descrito que a injuria tecidual induzida por proteases induz a liberação de mediadores proinflamatórios (ligantes de TLR2), como *high mobility group box protein 1* (HMGB1) e *heat shock protein 70*. HMGB1 finamente aderido a cromatina de células apoptóticas induz a secreção de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α e de moléculas co-estimuladoras em macrófagos e DCs, respectivamente (URBONAVICIUTE et al., 2008) e que a ativação de múltiplos receptores TLR por ligantes endógenos amplifica a resposta humoral em diversos modelos animais (TIAN et al., 2007).

Por fim, podemos acrescentar que as Natterinas agem também induzindo v) a ativação de receptores TLR4 dependente da via MyD88 ou TRIF dependente e vi) a liberação de ligantes endógenos de múltiplos TLRs.

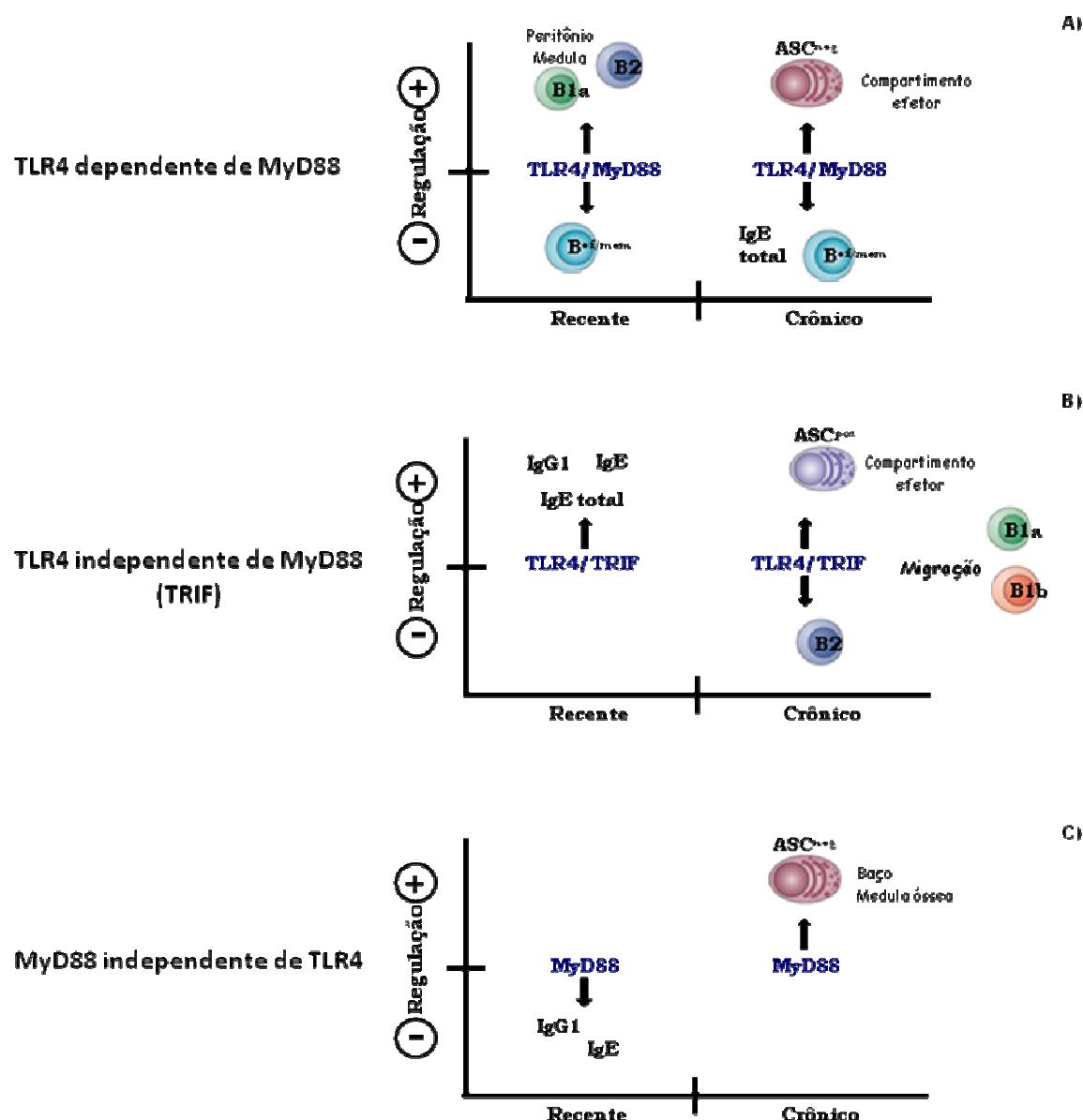


Figura 29. Regulação da resposta imune humoral induzidas pelas Natterinas. Nossos resultados em conjunto sugerem uma interdependência de TLR4/MyD88 (A), mecanismos dependentes de TLR4 independentes de MyD88 (B) e mecanismos dependentes de MyD88 independentes de TLR4 (C).

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Este estudo com as proteases Natterinas permitiu um maior esclarecimento da resposta humoral de memória induzida pelo veneno do peixe *T. nattereri* e se mostrou uma área promissora e interessante, pois permitiu o estudo da complexa organização do compartimento de células B de memória, principalmente do subtipo de longa sobrevida (ASC). Mostramos que atividade proteásica das Natterinas é importante não só pela indução do perfil de resposta Th2, mas pela manutenção da cronicidade de resposta de células B nos três compartimentos analisados (peritônio, baço e medula óssea), uma vez que as Natterinas inativas tendem ao perfil de resposta Th1, induzindo uma melhor resposta precoce e principalmente local. A ativação de receptores inatos como os TLRs é decisiva para a geração e manutenção de células ASCs B220^{pos/neg} em resposta às Natterinas, dependentes de MyD88 assim como através da molécula adaptadora TRIF. Estas sinalizações controlam a magnitude, a qualidade e a longa duração da resposta humoral de memória através da ação em diferentes subtipos de células B, em diferentes estágios de diferenciação e em diferentes microambientes.

Referências

REFERÊNCIAS*

- 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.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 675-680, 2001.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 4, p. 783-801, 2006.
- 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.
- 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.
- ASLAM, A.; QUINN, P.; MCINTOSH, R. S. Proteases from *Schistosoma mansoni* cercariae cleave IgE at solvent exposed interdomain regions. **Mol. Immunol.**, v. 45, p. 567–574, 2008.
- 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.
- BAINES, Y.; THORBECKE, G. J. Induction and persistence of local B cell memory in mice. **J. Immunol.**, v. 128, p. 639-643, 1982.
- BAXTER, E. H.; MARR, A. Seawasp (*Chironex fleckeri*) antivenene: neutralizing potency against the venom of three other jellyfish species. **Toxicon**, v. 12, p. 223-229, 1974.
- BERNASCONI, N. L.; TRAGGIAI, E.; LANZAVECCHIA, A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. **Science**, v. 5601, p. 2199-202, 2002.
- CARAMALHO, I.; LOPES-CARVALHO, T.; OSTLER, D.; ZELENAY, S.; HAURY, M.; DEMENGEOT, J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 403-411, 2003.
- CASSESE, G.; ARCE, S.; HAUSER, A. E.; LEHNERT, K.; MOEWES, B.; MOSTARAC, M.; MUEHLINGHAUS, G.; SZYNSKA, 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.

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

CASTELLINO, F.; GALLI, G.; DEL GIUDICE, G.; RAPPOLI, R. Generating memory with vaccination. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, p. 2100-2105, 2009.

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.

DARANI, H. Y.; DOENHOFF, M. J. Anomalous Immunogenic Properties of Serine Proteases. **Scan. J. Immunol.**, v. 70, p. 384-388, 2009.

DASARI, P.; NICHOLSON, I. C.; HODGE, G.; DANDIE, G. W.; ZOLA, H. Expression of Toll-like receptors on B lymphocytes. **Cell. Immunol.**, v. 236, p. 140-145, 2005.

DONNELLY, S.; O'NEILL, S. M.; STACK, C. M.; ROBINSON, M. W.; TURNBULL, L.; WHITCHURCH, C.; DALTON, J. P. Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 3383-3392, 2010.

EDDAHRI, F.; DENANGLAIRE, S.; BUREAU, F.; SPOLSKI, R.; LEONARD, W. J.; LEO, O.; ANDRIS, F. Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities. **Blood**, v. 113, p. 2426-2433, 2009.

ELLYARD, J. I.; AVERY, D. T.; PHAN, T. G.; HARE, NJ; HODGKIN P. D.; TANGYE S. G. Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow. **Blood**, v. 103, p. 3805-3812, 2004.

EVERTS, B.; PERONA-WRIGHT, G.; SMITS, H. H.; HOKKE, C. H.; VAN DER HAM, A. J.; FITZSIMMONS, C. M.; DOENHOFF, M. J.; VAN DER BOSH, J.; MOHRS, K.; HAAS, H.; MOHRS, M.; YAZDANBAKHSH, M.; SCHRAMM, G. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. **J. Exp. Med.**, v. 206, p. 1673-1680, 2009.

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.

FITZSIMMONS, C. M.; G. SCHRAMM, F. M.; JONES, I.W.; CHALMERS, K. F.; HOFFMANN, C. G.; GREVELDING, M.; WUHRER, C. H.; HOKKE, H.; HAAS, M. J.; DOENHOFF, M.J.; DUNNE, D.W. Molecular characterization of omega-1: a hepatotoxic ribonuclease from *Schistosoma mansoni* eggs. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 44, p. 123-127, 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.

FORD, J.W.; KILMON, M.A; HAAS, K.M.; SHELBURNE, A.E.; CHAN-LI, Y.; CONRAD, D.H. In vivo murine CD23 destabilization enhances CD23 shedding and IgE synthesis. **Cell. Immunol.**, v. 243(2), p. 107-117, 2006.

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.

- GATTO, D.; MARTIN, S. W.; BESSA, J.; PELLICOLI, E.; SAUDAN, P.; HINTON, H. J.; BACHMANN, M. F. Regulation of memory antibody levels: the role of persisting antigen versus plasma cell life span. *J. Immunol.*, v. 1, p. 67-76, 2007.
- GERONDAKIS, S.; GRUMONT, R. J.; BANERJEE, A. Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol. Cell Biol.*, v. 85, p. 471–475, 2007.
- GOLDBERG, A. L.; ROCK, K. L. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*, v. 357, p. 375–379, 1992.
- GOUGH, L.; SCHULZ, O.; SEWELL, H. F.; SHAKIB, F. The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. *J. Exp. Med.*, v. 190, p. 1897–1902, 1999.
- GRAY, D. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 2, p. 60-65, 2002.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- HARDY R.R.; HAYAKAWA K. B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 19, p. 595–621, 2001.
- HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv. Immunol.*, v. 55, p. 297-339, 1994.
- 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.
- HAWGOOD, B. J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr. Vital Brazil (1865-1950). *Toxicon*, v. 30, p. 573-579, 1992.
- 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.

HEWITT, C. R.; BROWN, A. P.; HART, B. J.; PRITCHARD, D. I. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J. Exp. Med.*, v. 182, n. 5, p. 1537-1544, 1995.

HIBBERT, R. G.; TERIETE, P.; GRUNDY, G. J.; BEAVIL, R. L.; RELJIC, R.; HOLERS, V. M.; HANNAN, J. P.; SUTTON, B. J.; GOULD, H. J.; MCDONNELL, J. M. The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. *J. Exp. Med.*, v. 202, n. 6, p. 751-760, 2005.

HWANG, I. Y.; PARK, C.; HARRISON, K.; KEHRL, J. H. TLR4 signaling augments B lymphocyte migration and overcomes the restriction that limits access to germinal center dark zones. *J. Exp. Med.*, v. 206, n. 12, p. 2641-2657, 2009.

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.

JACKSON, L.; CADY, C. T.; CAMBIER, J. C. TLR4-mediated signaling induces MMP9-dependent cleavage of B cell surface CD23. *J. Immunol.*, v. 183, n. 4, p. 2585-2592, 2009.

JANOSSY, G.; GOMEZ DE LA CONCHA, E.; LUQUETTI, A.; SNAJDR, M. J.; WAXDAL, M. J.; PLATTS-MILLS, T. A. T-cell regulation of immunoglobulin synthesis and proliferation in pokeweed (Pa-1)-stimulated human lymphocyte cultures. *Scand. J. Immunol.*, v. 6, p. 109-123, 1977.

JUNG, C. M.; PRINZ, J. C.; RIEBER, E. P.; RING, J. A reduction in allergen-induced Fc epsilon R2/CD23 expression on peripheral B cells correlates with successful hyposensitization in grass pollinosis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 95, p. 77-87, 1995.

KABELITZ, D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 1, p. 39-45, 2007.

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

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.*, v. 11, p. 460-469, 2007.

KHERADMAND, F.; KISS, A.; XU, J.; LEE, S.H.; KOLATTUKUDY, P.E.; CORRY3, D.B. A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease. *J. Immunol.*, v. 169, p. 5904-5911, 2002.

KIKUCHI, Y.; TAKAI, T.; KUHARA, T.; OTA, M.; KATO, T.; HATANAKA, H.; ICHIKAWA, S.; TOKURA, T.; AKIBA, H.; MITSUISHI, K.; IKEDA, S.; OKUMURA, K.; OGAWA, H. Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p1 to sensitization toward IgE and IgG responses. *J. Immunol.*, v. 177, n. 3, p. 1609-1617, 2006.

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.

KONG, Y.; CHUNG, Y. B.; CHO, S. Y.; KANG, S. Y. Cleavage of immunoglobulin G by excretory-secretory cathepsin S-like protease of *Spirometra mansoni* plerocercoid. *Parasitology*, v. 109, p. 611-21, 1994.

LEADBETTER, E. A.; RIFKIN, I. R.; HOHLBAUM, A. M.; BEAUDETTE, B. C.; SHLOMCHIK, M. J.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, v. 6881, p. 603-607, 2002.

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.

LIN, K. I.; ANGELIN-DUCLOS, C.; KUO, T. C.; CALAME, K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol. Cell Biol.*, v. 13, p. 4771-4780, 2002.

LIU, Y. J.; SOUMELIS, V.; WATANABE, N.; ITO, T.; WANG, Y. H.; DE MALEYFT, W. R.; OMORI, M.; ZHOU, B.; ZIEGLER, S.F. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 25, p. 193-219. 2007.

LOPES-FERREIRA, M.; BÁRBARO, 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, MDA. S.; JULIANO L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem. Pharmacol.*, v. 68, n. 11, 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(8), p. 1141-147, 2002.

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

MAGALHÃES, G. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; LOPES-FERREIRA, M.; LORENZINI, D. M.; HO, P. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. *Biochimie*, v. 88, p. 693-699, 2006.

MAGALHÃES, G. S.; LOPES-FERREIRA, M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; SPENCER, P. J.; ARAÚJO, M. S.; PORTARO, F. C. V.; MA, L.; VALENTE, R. H.; JULIANO, L.; FOX, J. W.; HO, P. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochimie*, v. 87, p. 687-699, 2005.

MAMANI-MATSUDA, M.; COSMA, A.; WELLER, S.; FAILI, A.; STAIB, C.; GARÇON, L.; HERMINE, O.; BEYNE-RAUZY, O.; FIESCHI, C.; PERS, J.O.; ARAKELYAN, N.; VARET, B.; SAUVANET, A.; BERGER, A.; PAYE, F.; ANDRIEU, J.M.; MICHEL, M.; GODEAU, B.; BUFFET, P.; REYNAUD, C.A.; WEILL, J.C. The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. **Blood**, v. 111, n. 9, p. 4653-4659, 2008.

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

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

MCGETTRICK, A. F.; O'NEILL, L. A. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, p. 20-27, 2010.

MCHEYZER-WILLIAMS, L. J.; COOL, M.; MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel b220(-) memory B cell compartment. **J. Exp. Med.**, v. 7, p. 1149-1166, 2000.

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.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; KOPP, E.; STADLEN, A.; CHEN, C.; GHOSH, S.; JANEWAY, C.A. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Mol. Cell**, v. 2, p. 253–258, 1998.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 135-145, 2001. MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. JR. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunol. Rev.**, v. 173, p. 89-97, 2000.

MELAMED, D.; MESSIKA, O.; GLASS-MARMOR, L.; MILLER, A. Modulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion in B lymphopoiesis. **Internat. Immunol.**, v. 18, p. 1355-1362, 2006.

MEIER, J.; WHITE, J. (Eds.) **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Florida: CRC Press, Inc, 1995.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; LEATHERS, H.; DORSHKIND, K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor, **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 293–301, 2006.

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.

NAGASAWA T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 107-116, 2006.

OGATA, H.; SU, I.; MIYAKE, K.; NAGAI, Y.; AKASHI, S.; MECKLENBRAUKER, I.; RAJEWSKY, K.; KIMOTO, M.; TARAKHOVSKY, A. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 23–29, 2000.

- OVARY, Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. **J. Immunol.**, v. 81, n. 4, p. 355-7, 1958.
- PALM, N. W.; MEDZHITOY, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunol. Rev.**, v. 227, n. 1, p. 221-33, 2009.
- PAREJA-SANTOS, A.; SARAIVA, T. C.; COSTA, E. P.; SANTOS, M. F.; ZORN, T. T.; SOUZA, V. M. O.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C. Delayed local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 90, p. 34-43, 2009.
- PASARE, C.; MEDZHITOY, R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. **Nature**, v. 17;438(7066), p. 364-368, 2005.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.
- PIRAN-SOARES, A. A.; KOMEgae, 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.
- PRUETT, J. H. JR. Proteolytic cleavage of bovine IgG by hypodermin A, a serine protease of Hypoderma lineatum (Diptera: Oestridae). **J. Parasitol.**, v. 79, p. 829-33, 1993.
- PULENDRA, B.; AHMED, R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. **Cell**, v. 4, p. 849-863, 2006.
- QUIGLEY, M.; MARTINEZ, J.; HUANG, X.; YANG, Y. A critical role for direct TLR2-MyD88 signaling in CD8 T-cell clonal expansion and memory formation following vaccinia viral infection. **Blood**, v. 10, p. 2256-2264, 2009.
- RAJEWSKY, K. Clonal selection and learning in the antibody system. **Nature**, v. 381, p. 751-758, 1996.
- RAKOFF-NAHOUIM, S.; MEDZHITOY, R. Toll-like receptors and cancer. **Nat. Rev. Canc.**, v. 9, n. 1, p. 57-63, 2009.
- RICHARD, K.; PIERCE, S. K.; SONG, W. The agonists of TLR4 and 9 are sufficient to activate memory B cells to differentiate into plasma cells in vitro but not in vivo. **J. Immunol.**, v. 3, p. 1746-1752, 2008.
- RIDLEY, R. C.; XIAO, H.; HATA, H.; WOODLIFF, J.; EPSTEIN, J.; SANDERSON, R. D. Expression of sialic acid regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. **Blood**, v. 81, p. 767-774, 1993.
- ROTHSTEIN, T. L. Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4257-4261, 2002.
- SCHULZ, O.; LAING, P.; SEWELL, H.F.; SHAKIB, F. Der p I, a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23). **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 11, p. 3191-3194, 1995.
- SHAFFER, A. L.; LIN, K. I.; KUO, T. C.; YU, X.; HURT, E. M.; ROSENWALD, A.; GILTNANE, J. M.; YANG, L.; ZHAO, H.; CALAME, K.; STAUDT, L. M. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. **Immunity**, v. 1, p. 51-62, 2002.

SHAFFER, A. L.; SHAPIRO-SHELEF, M.; IWAKOSHI, N. N.; LEE, A. H.; QIAN, S. B.; ZHAO, H.; YU, X.; YANG, L.; TAN, B. K.; ROSENWALD, A.; HURT, E. M.; PETROULAKIS, E.; SONENBERG, N.; YEWDELL, J. W.; CALAME, K.; GLIMCHER, L. H.; STAUDT, L. M. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*, v. 1, p. 81-93, 2004.

SHAKIB, F.; SCHULZ, O.; SEWELL, H. A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity. *Immunology*, v. 19, p. 313-6, 1998.

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

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.

SOKOL, C. L.; BARTON, G. M.; FARR, A. G.; MEDZHITOVA, R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat. Immunol.*, v. 9, n. 3, p. 310-8, 2008.

STEINFELDER, S.; ANDERSEN, J. F.; CANNONS, J. L.; FENG, C. G.; JOSHI, M.; DWYER, D.; CASPAR, P.; SCHWARTZBERG, P. L.; SHER, A.; JANKOVIC, D. The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *J. Exp. Med.*, v. 206, p. 1681-1690, 2009.

SUTHERLAND, S. K.; TIBBALLS, J. **Australian animal toxins**. The creatures, their toxins and care of the poisoned patient. 2nd ed. Australia: Melbourne, 2001.

TANGYE, S. G.; TARLINTON, D. M. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur. J. Immunol.*, v. 39, n. 8, p. 2065-2075, 2009.

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.

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.

TIAN, J.; AVALOS, A. M.; MAO, S. Y.; CHEN, B.; SENTHIL, K.; WU, H.; PARROCHE, P.; DRABIC, S.; GOLENBOCK, D.; SIROIS, C.; HUA, J.; AN, L. L.; AUDOLY, L.; LA ROSA, G.; BIERHAUS, A.; NAWORTH, P.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; CROW, M. K.; FITZGERALD, K. A.; LATZ, E.; KIENER, P. A.; COYLE, A. J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.*, v. 8, n. 5, p. 487-496, 2007.

URBONAVICIUTE, V.; FURNROHR, B. G.; MEISTER, S.; MUÑOZ, L.; HEYDER, P.; DE MARCHIS, F.; BIANCHI, M. E.; KIRSCHNING, C.; WAGNER, H.; MANFREDI, A. A.; KALDEN, J. R.; SCHETT, G.; ROVERE-QUERINI, P.; HERRMANN, M.; VOLLMER, R. E. Induction of inflammatory and immune responses by

HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J. Exp. Med.*, v. 205, n. 13, p. 3007-3018, 2008.

VERWAERDE, C.; AURIAULT, C.; NEYRINK, J. L.; CAPRON, A. Properties of serine proteases of *Schistosoma mansoni* schistosomula involved in the regulation of IgE synthesis. *Scand. J. Immunol.*, v. 27, p. 17, 1988.

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.

WILLIAMSON, J. A.; FENNER, P. J.; BURNETT, J. W.; RIFKIN, J. F. **Venomous e poisonous marine animals**. Sydney: University of New South Wales Press, 1996.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; SANJO, H.; TAKEUCHI, O.; SUGIYAMA, M.; OKABE, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, v. 301, n. 5633, p. 640-643, 2003.

YANABA, K.; BOUAZIZI, J. D.; HAAS, K. M.; POE, J. C.; FUJIMOTO, M.; TEDDER, T. F. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, v. 28, p. 639–650, 2008.

ZHU, J.; HUANG, X.; YANG, Y. The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J. Clin. Invest.*, v. 119, n. 8, p. 2388-2398, 2009.

ZHU, J.; MARTINEZ, J.; HUANG, X.; YANG, Y. Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN- β . *Blood*, v. 109, p. 619-625, 2007.

ZINKERNAGEL, R. M.; BACHMANN, M. F.; KÜNDIG, T. M.; OEHEN, S.; PIRCHET, H.; HENGARTNER, H. On immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 14, p. 333-367, 1996.