Fernanda Miriane Bruni Soliani

Anafilaxia induzida em camundongos pelo veneno do peixe

Thalassophryne nattereri

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2012

Fernanda Miriane Bruni Soliani

Anafilaxia induzida em camundongos pelo veneno do peixe

Thalassophryne nattereri

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Mônica Lopes Ferreira

Co-orientadora: Dra. Carla Lima

Versão original.

São Paulo

2012

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

Soliani, Fernanda Miriane Bruni.

Anafilaxia induzida pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* em camundongos / Fernanda Miriane Bruni Soliani. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Alergia e imunoregulação

Versão do título para o inglês: Anaphylaxis induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in mice.

Descritores: 1. Alergia 2. Anafilaxia 3. Resposta de fase tardia 4. Peixe peçonhento 5. *Thalassophryne nattereri* I. Ferreira, Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB015/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernanda Miriane Bruni Soliani.

Título da Tese: Anafilaxia induzida pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* em camundongos.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

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 "Anafilaxia induzida em camundongos pelo veneno de *Thalassophryne nattereri*", protocolo nº 552/08, sob a responsabilidade de Monica Lopes Ferreira e Fernanda Miriane Bruni, 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 11/02/2009.

We certify that the research entitled "Anaphylaxis induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in mice", protocol nº 552/08, under the responsibility of Monica Lopes Ferreira and Fernanda Miriane Bruni, 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 02/11/2009.

Vigência do Projeto: 02/2009 – 12/2013 Laboratório de Especial de Toxinologia aplicada	Nº de animais/espécie 150 camundongos Balb/C (fêmeas) 20 ratos Wistar (fêmeas)
---	--

São Paulo, 16 de Fevereiro de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

**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: ccb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **60** nas fls. **70** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Mônica Lopes Ferreira**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Anafilaxia induzida em camundongos pelo veneno de *Thalassophryne Nattereri*** do qual participou(aram) o(s) alunos **Fernanda Bruni e a pesquisadora Carla Lima** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **26.05.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 26 de maio de 2009.

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

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

RESUMO

BRUNI, FM. Anafilaxia induzida em camundongos pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*. [Tese (Doutorado em Imunologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

As alergias podem ser desencadeadas por substâncias químicas, medicamentos, proteínas de origem vegetal e animal como, por exemplo, ácaros, alimentos, fungos e venenos. Reações alérgicas desenvolvidas em resposta a venenos de animais marinhos vêm sendo pouco estudadas. Este é o primeiro estudo que descreve a indução de reação anafilática em camundongos pelo veneno de um peixe brasileiro, acompanhado da caracterização detalhada dos mediadores solúveis e celulares envolvidos no processo. Nossos resultados mostram que o veneno do peixe *T. nattereri* possui proteínas alergênicas capazes de desencadear um processo alérgico, caracterizado por anafilaxia mediada por IgE e IgG1 e inflamação eosinofílica de fase tardia dependente de citocinas Th2. Animais BALB/c submetidos à exposição ao veneno pela via intraperitoneal desenvolvem anafilaxia de escore 3 com níveis de histamina 3 vezes maiores em relação ao controle, uma produção de anticorpos IgG1 veneno-específicos 10 vezes maior em relação ao controle e títulos de anticorpos IgG1 e IgE anafiláticos de 40 e 320, respectivamente. A inflamação peritoneal na resposta de fase tardia nestes animais foi caracterizada pelo influxo de mastócitos e neutrófilos e principalmente por eosinófilos e pela síntese de IL-5, IL-17A e eotaxina. Ainda, a exposição repetida do trato respiratório ou da pele de animais sensibilizados com o veneno gera uma fraca resposta anafilática com sintomas leves, e é capaz de desencadear reação inflamatória de fase tardia, fenômeno IgE/Th2 dependente. A inflamação eosinofílica pulmonar desencadeada pela exposição única ao veneno é caracterizada também pelo influxo de linfócitos T CD4 produtores de IL-4 e IL-5; já indivíduos sensibilizados e expostos a múltiplas exposições ao veneno têm influxo de eosinófilos, neutrófilos e de linfócitos T CD4 produtores de IL-4 e IL-17A no pulmão. A dermatite induzida pelo veneno é caracterizada pela infiltração na região subcutânea de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T CD4 produtores de IL-5 e IL-4 e IL-17A. Usando camundongos C57BL/6 deficientes nos genes de IL-4, IL-12 ou IFN- γ confirmamos que a anafilaxia de escore 1 induzida pelo veneno nestes animais é positivamente regulada por IL-4 e negativamente regulada por IL-12 e IFN- γ . Ainda demonstramos que IL-4 regula positivamente a produção de histamina e de IgG1, e o influxo de eosinófilos, neutrófilos e mastócitos e negativamente o influxo de linfócitos B e macrófagos. Quanto aos animais deficientes em IL-12 e IFN- γ , podemos dizer que ambas as citocinas regulam positivamente o influxo de eosinófilos e neutrófilos, e IL-12 regula positivamente também o influxo das demais células (mastócitos, linfócitos B e macrófagos). Já IFN- γ regula negativamente o influxo de macrófagos e mastócitos. E finalmente podemos dizer que o processo alérgico desencadeado pelo veneno pode estar correlacionado à atividade proteásica das Natterinas presentes no veneno, uma vez que elas são responsáveis pela indução da síntese de anticorpos anafiláticos.

Palavras-chaves: Alergia - Anafilaxia – Reação de Fase Tardia – Peixe Peçonhento - *Thalassophryne nattereri*.

ABSTRACT

BRUNI, FM. Anaphylaxis induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in mice. [Thesis (PhD in Immunology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

Allergies are a significant and widespread public health problem. Anaphylaxis reactions are induced by foods, medications and venoms and are IgE mediated. In mice, allergy can be caused also by IgG1. The results presented here describe for the first time anaphylaxis induced by Brazilian fish venom, accompanied by detailed characterization of soluble and cellular mediators involved in the process. Our data show that intraperitoneal sensitization of BALB/c mice generated intense symptoms of anaphylaxis dependent of IgG1 and IgE anaphylactic antibodies. The late phase reaction developed after initial symptoms characterized by the influx of eosinophils, mast cells and neutrophils is dependent of IL-5, IL-17A and eotaxin produced in inflamed tissue. Our data in mice allow us to suggest that envenomated individuals and consequently sensitized with allergenic proteins of the *T. nattereri* fish venom when re-exposed to the venom can develop light symptoms of anaphylaxis and present eosinophilic inflammation in the lung and in the skin, dependent of IgE/Th2 cytokines. Using C57BL/6 deficient mice we demonstrated that IL-4 *KO* mice failed to develop anaphylactic symptoms or local Th2 inflammation, producing low levels of IgG1 and increased levels of IgG2a when compared with wild type mice. In IL-12 or IFN- γ *KO* group of mice, venom induced increased anaphylaxis with augmented anaphylactic IgG1 production and diminished levels of IgG2a. IFN- γ *KO* mice presented elevated macrophage influx and in a lesser extent of mast cells; and diminished influx of eosinophils and mainly of neutrophils. IL-12 *KO* mice presented a drastic reduction of all cell types to the peritoneal cavity. Together our results demonstrated that the venom of *T. nattereri* has allergenic proteins that can trigger allergic process, a phenomenon IgE-IgG1 dependent, IL-4 mediated and regulated by IFN- γ . Furthermore, we observed a positive participation of the cytokines IL-12 and IFN- γ in the exacerbation of the eosinophilic and neutrophilic inflammation induced in late phase reaction.

Keywords: Allergy - Anaphylaxis – Late Phase Reaction – Venomous Fish - *Thalassophryne nattereri*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O peixe peçonhento <i>Thalassophryne nattereri</i>	19
Figura 2 - Modelo de anafilaxia induzida pelo veneno de <i>Thalassophryne nattereri</i>	41
Figura 3 - O veneno de <i>T. nattereri</i> induz sintomas agudos em animais sensibilizados e desafiados pela via intraperitoneal.....	42
Figura 4 - A anafilaxia induzida pelo desafio intraperitoneal é acompanhada por histamina....	43
Figura 5 - O desafio intraperitoneal com o veneno induz a produção plasmática de anticorpos nos animais sensibilizados.....	45
Figura 6 - Anticorpos específicos IgG1 e IgE participam na anafilaxia induzida pelo veneno.....	46
Figura 7 - Resposta tardia induzida pelo desafio intraperitoneal com o veneno de <i>T. nattereri</i>	49
Figura 8 - Resposta tardia é dependente da produção de IL-5, IL-17A e eotaxina	50
Figura 9 - Modelo de indução de resposta alérgica tardia pulmonar ao veneno de <i>T. nattereri</i>	54
Figura 10 - Camundongos sensibilizados expostos a múltiplos desafiados por via nasal apresentam sintomas agudos de anafilaxia	55
Figura 11 - A exposição de animais ao desafio intranasal promove a liberação de histamina...56	
Figura 12 - O desafio único ou múltiplos induz a produção de anticorpos IgG1 específicos.....	57
Figura 13 - Anticorpos anafiláticos nos animais desafiados instilação nasal única ou múltipla.....	58
Figura 14 - O desafio único induz recrutamento celular para o tecido e BAL, enquanto o múltiplo promove a permanência no interstício pulmonar.....	59
Figura 15 - Presença de infiltrado celular nos pulmões dos animais expostos ao desafio único.....	60
Figura 16 - A resposta celular promovida pelo desafio único é acompanhada de linfócitos T produtores de IL-4 e IL-5.....	61
Figura 17 - Presença de células dos animais expostos a múltiplos desafios.....	62
Figura 18 - A resposta celular tardia promovida pelos múltiplos desafios é acompanhada preferencialmente da presença de linfócitos T produtores de IL-17A e IL-4.....	63
Figura 19 - Modelo de indução de resposta alérgica tardia na pele ao veneno de <i>T. nattereri</i>	65
Figura 20 - O desafio epicutâneo com o veneno induz a produção de anticorpos IgG1.....	66
Figura 21 - A resposta na pele é acompanhada por T produtores de IL-5, IL-4 e IL-17A.	67
Figura 22 - O desafio epicutâneo induz intenso infiltrado celular na epiderme dos animais..	68
Figura 23 - Regulação por citocinas da anafilaxia induzida pelo veneno de <i>T. nattereri</i>	73
Figura 24 - Os sintomas anafiláticos induzidos são positivamente regulados por IL-4 e negativamente regulados por IL-12 e IFN- γ	74
Figura 25 - A liberação de histamina é positivamente dependente de IL-4 e IL-12	75
Figura 26 - IL-4 regula a produção de anticorpos específicos IgG1	76
Figura 27 - IL-12 e IFN- γ regulam negativamente anticorpos anafiláticos específicos.....	77
Figura 28 - Regulação diferencial do influxo celular pelas citocinas IL-4, IFN- γ ou IL-12.....	78
Figura 29 - A regulação das citocinas na proliferação das células no baço.....	79
Figura 30 - Reconhecimento das proteínas do veneno de <i>T. nattereri</i> por anticorpos IgG.....	82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	26
ETAPAS REALIZADAS.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Animais.....	28
4.2 Obtenção de espécimes de <i>Thalassophryne nattereri</i> para extração de veneno.....	28
4.3 Indução de anafilaxia me camundongos.....	29
4.4 Avaliação dos sintomas anafiláticos.....	29
4.5 Indução da resposta inflamatória alérgica no pulmão e pele.....	30
4.6 Indução de anafilaxia em camundongos deficientes nos genes das citocinas IL-,IL-12 ou IFN- γ .	31
4.7 Dosagem de histamina por ELISA.....	31
4.8 Obtenção da suspensão celular da cavidade peritoneal.....	32
4.9 Obtenção do BAL.....	32
4.10 Deagregação do tecido pulmonar e análise histológica.....	32
4.11 Dosagem de anticorpos nos plasma dos animais por ELISA.....	33
4.12 Reação anafilática cutânea passiva.....	34
4.13 Cultura celular de órgãos linfóides.....	34
4.14 Quantificação de citocinas por ELISA.....	35
4.15 Caracterização da população celular por citometria de fluxo: marcação fenotípica e citocinas intracelulares.....	36
4.16 Ensaios de Western blot.....	37
4.17 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 O veneno de <i>T.nattereri</i> é capaz de induzir sintomas anafiláticos em camundongos.....	39
5.2 Anafilaxia induzida pelo veneno é mediada por anticorpos anafiláticos IgG1 e IgE.....	44
5.3 Perfil celular e citocinas característicos da resposta de fase tardia induzida pelo veneno de <i>T.nattereri</i>	47
5.4 O veneno desencadeia resposta inflamatória alérgica pulmonar.....	51
5.5 O veneno desencadeia resposta inflamatória alérgica na pele.....	64
5.6 Modulação da anafilaxia e da reação inflamatória tardia induzida pelo veneno de <i>T.nattereri</i> por citocinas Th1 e Th2.....	69
5.7 Reconhecimento das proteínas do veneno de <i>T.nattereri</i> por anticorpos IgG de camundongo alérgicos	81
6 DISCUSSÃO.....	83
7 CONCLUSÃO.....	96
REFERÊNCIA.....	97

1 INTRODUÇÃO

O termo anafilaxia (do grego *an* = contra, *filaxia* = proteção) foi empregado pela primeira vez por Charles Richet e Portier em 1902. Estes autores observaram que cachorros sensibilizados com baixas doses de veneno de espécimes do gênero *Physalia* (anêmona do mar ou caravela portuguesa) desenvolviam graves sintomas sistêmicos e morte após a re-exposição ao mesmo veneno (Portier e Richet, 1902; Cohen e Zelaya-Quesada, 2002). Atualmente, o termo anafilaxia é empregado para descrever reação alérgica sistêmica grave, potencialmente fatal, que acontece rapidamente após o contato com uma substância alergênica (Sampson et al., 2006).

A primeira etapa para o desenvolvimento de uma reação alérgica é a sensibilização a uma determinada substância com conseqüente produção de anticorpos anafiláticos. A primeira teoria sobre a formação de anticorpos teve início com Paul Ehrlich no ano de 1900, que propunha que receptores presentes na superfície celular poderiam ligar-se especificamente à toxinas e que essa ligação desencadearia a produção de mais anticorpos. A relação entre anticorpos e alergia foi especulada pela primeira vez em 1921 por Prausnitz e Küstner que demonstraram a existência de um fator reagínico sérico que mediava essas reações e que podiam ser transferidos para indivíduos normais levando a um quadro semelhante de alergia (Ring et al., 2010).

Trabalhos publicados na década de 1950 pelo pesquisador brasileiro Ivan da Motta e Albuquerque (1956 -*Nature* e 1957 -*The British Journal of Pharmacology*) sugeriam a existência de anticorpos capazes de aderir à superfície de mastócitos intactos e promover a liberação de histamina quando re-expostos ao antígeno. Esses anticorpos foram denominados pelo autor como *anaphylactic antibodies* e pertenciam a dois tipos distintos, um da classe IgG (resistentes ao aquecimento a 56 °C) e outro sensível a este tratamento, posteriormente descritos como IgE pelo grupo de Ishizaka e colaboradores (1968). IgE é a imunoglobulina secretada mais

estritamente regulada, com a mais baixa concentração sérica e a meia-vida mais curta: de 2 dias ou menos. Em contraste, a IgE ligada à receptores Fcε permanece por semanas na superfície celular (Tada et al., 1975; Stone et al., 2010). Infelizmente o nome do pesquisador brasileiro não é associado a essas importantes descobertas na área de alergia e anafilaxia.

A observação da coincidência do desenvolvimento de patologias respiratórias alérgicas em muitos pacientes com um histórico familiar associado à presença de anticorpos específicos levou Coca e Cooke em 1923 a introduzirem o termo *atopia* para definir a propensão ao desenvolvimento de respostas de hipersensibilidade após a exposição *natural* a alérgenos específicos. Atualmente o termo atopia implica em uma pré-disposição genética para produzir altos níveis de anticorpos da classe IgE contra alérgenos e uma tendência em manifestar isoladamente ou em combinação, doenças alérgicas tais como dermatite eczematosa, urticária, rinite (febre do feno), asma e alergias alimentares.

As reações alérgicas podem se manifestar em diferentes órgãos dependente da via de exposição ao alérgeno, particularmente na pele, no trato respiratório e no trato gastrointestinal. Os 2 sintomas mais comuns e que ocorrem em até 90% dos casos de alergia são: **a)** Urticária: uma erupção cutânea, muito pruriginosa, caracterizada por placas avermelhadas distribuídas pelo corpo; **b)** Angioedema: inchaço da pele ou mucosa. Os mais comuns são os edemas em volta dos olhos, nos lábios e na língua. O mais perigoso é o edema da laringe, também conhecido como edema de glote; **c)** e nos casos mais graves onde o paciente desenvolve dificuldade respiratória e choque circulatório, pode-se evoluir rapidamente para o óbito se não for tratado a tempo (Simons, 2010; Sicherer e Leung, 2010; Demain et al., 2010; Castells e Austen, 2002).

As doenças alérgicas são caracterizadas por duas fases: a) reação aguda/imediata: que é desencadeada em segundos ou minutos após a re-exposição alérgica, (b) reação de fase

tardia: que ocorre dentro de horas após a re-exposição ao alérgeno, quando os sintomas agudos estão em declínio, caracterizada pela presença de células. Ademais, a inflamação alérgica é uma resposta crônica que persiste por anos. O quadro sintomático presente na fase aguda é resultado da rápida liberação de uma variedade de mediadores estocados em grânulos de mastócitos teciduais e/ou basófilos sangüíneos. Estes mediadores coletivamente determinam a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, a inflamação local (chamada reação de eritema-edema) além de contração da musculatura brônquica e visceral. Se a reação aguda não for fatal, ela cessa em menos de uma hora e após um período sem sintomas, alguns pacientes podem apresentar um quadro inflamatório caracterizado pelo acúmulo de linfócitos Th2 e principalmente de eosinófilos (fase tardia).

A anafilaxia é classicamente mediada pela ligação cruzada entre as moléculas IgE ligadas à receptores FcεRI e antígenos multivalentes levando a rápida degranulação dos mastócitos ou basófilos resultando na liberação de moléculas pré-formadas contida em seus grânulos [como histamina e serotonina] e na síntese de derivados lipídicos [como prostaglandina D2 (PGD₂), PAF e leucotrienos (LT)]. A histamina, presente em grânulos de mastócitos, basófilos e plaquetas, age sobre células endoteliais aumentando a permeabilidade vascular e causando constrição do músculo liso intestinal e brônquico (Winbery e Lieberman, 2002; Strait et al., 2002). Sua ação sobre células-alvos se faz através de receptores (H1R-H4R), caracterizados pelo padrão de expressão e função (Dy; Schneider, 2004). H1R e H2R são amplamente expressos em células linfóides e não linfóides (Parsons et al., 2006). H3R e H4R estão principalmente expressos no cérebro e células hematopoiéticas, respectivamente (Morgan et al., 2007). Muitas das ações inflamatórias e alérgicas da histamina são mediadas pelos receptores H1R, que é heptatransmembranoso acoplado à proteína Gαq/11 com um domínio extracelular NH2 terminal glicosilado.

O avanço dos estudos de genética em relação à geração e reprodução de animais geneticamente modificados permitiu verificar que animais deficientes de mastócitos ($\text{Kit}^w/\text{Kit}^{w-5}$), ausentes de IgE e/ou do receptor $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ podem desenvolver resposta anafilática ativa e fatal, indicando que outros componentes do sistema imune estão envolvidos nesse processo (Takeishi et al., 1991; Martin et al., 1993; Oettgen et al., 1994).

Em várias espécies animais foram identificados também anticorpos anafiláticos pertencentes à classe IgG, os quais ligam-se a receptores de baixa afinidade para $\text{Fc}\gamma$ nestas mesmas células e desencadeiam reações anafiláticas passivas após curto período de latência. A via alternativa para a indução da anafilaxia murina é mediada por moléculas IgG especificamente do subtipo IgG1, através da ativação de receptores de baixa afinidade $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ presentes em macrófagos, basófilos e mastócito (Finkelman et al., 2005; Miyajima et al., 1997; Finkelman, 2007). O principal mediador desse mecanismo é o PAF - *platelet activating factor* (*1-O-alkyl-2-acetyl-snglycero-3-phosphocholine*), sintetizado por mastócitos e macrófagos e o produto final da via de degradação envolvendo as enzimas PAF-acetil transferase e PAF-acetilhidrolase, respectivamente. Dentre as células que sofrem a ação do PAF estão: I) plaquetas, hoje reconhecidamente um importante componente envolvido em uma variedade de processos inflamatórias e choque anafilático sistêmico (Pinckard et al., 1979; Ishii et al., 2002); II) e eosinófilos que degranulam em resposta ao PAF (Dyer et al., 2010).

Vale ressaltar que, diferente da via clássica onde a indução de anafilaxia ocorre através da ligação de alérgenos multivalentes à IgE ligada aos receptores específicos presentes na membrana de mastócitos, a anafilaxia induzida por IgG exige a formação de imuno-complexos na circulação seguido da posterior ligação ao receptor específico para a porção Fc presente ($\text{Fc}\gamma\text{R}$) na membrana de macrófagos. Além disso, tem sido sugerido que grandes quantidades de anticorpos e alérgenos são necessárias para induzir anafilaxia sistêmica mediada por IgG quando comparado à IgE (Miyajima et al., 1997). Porém, recentemente Ishikawa e

colaboradores (2010) descreveram que doses pequenas de antígenos podem induzir grave anafilaxia quando os camundongos são sensibilizados passivamente com IgE ou IgG antígeno-específicos, sugerindo que a anafilaxia induzida por IgG não é rara e pode se desenvolver tanto quanto a anafilaxia por IgE.

Substâncias capazes de desencadear resposta alérgica em indivíduos atópicos são denominadas substâncias alergênicas ou alérgenos e alguns grupos são conhecidos como alérgenos potenciais. Entre eles destacam-se: a) substâncias químicas: dextrano de ferro (utilizado no tratamento de pacientes com anemias ferropênicas), látex (presentes em luvas, preservativos), níquel (utilizado na fabricação bijuterias); b) medicamentos: antibióticos como penicilina e cefalosporina, vitamina B12 e anestésicos; c) proteínas de origem vegetal: pólen de flores e árvores, frutas em seu estado natural ou processada e d) proteínas de origem animal: epitélio descamativo de pelos de animais, alimentos (leite, ovos, crustáceos, amendoim, castanhas e soja) esporos e proteases de fungos, e venenos como de abelhas, vespas, serpentes e peixes. Algumas alergias principalmente alimentares são resultado da contaminação do alimento, por exemplo, laticínios contaminados com a penicilina (Kemp, 2001).

Reações anafiláticas desencadeadas por venenos não são raras e as pesquisas nessa área têm aumentado muito uma vez que o desenvolvimento urbano tem aproximado os animais potencialmente perigosos dos seres humanos. Acidentes por Himenópteros, como abelhas (família *Apidae*), vespas (família *Vespidae*) e formigas (família *Formicidae*) são conhecidos por desencadear graves reações anafiláticas potencialmente fatais. O primeiro possível registro de óbito por choque anafilático refere-se aos hieróglifos encontrados no tumulo do faraó egípcio *Menes* datados de 2641 a.C. que descreve sua morte como

consequência da picada *Kneb*, algo parecido com abelha ou vespa (Ring et al., 2010). O envenenamento por abelha (*Apis mellifera*) é caracterizado por edema local imediato que irradia pelo membro afetado além de posterior constrição da laringe.

Parte dos efeitos alérgicos do veneno de abelha é atribuída à fosfolipase A2 secretória denominada HBV-sPLA₂ que é responsável pela ativação e produção de mediadores lipídicos por alguns tipos celulares (Mustafa et al., 2008). Além disso, o veneno possui um peptídeo constituído de 22 resíduos de aminoácidos, denominado MCD (*Mast Cell Degranulation*) capaz de desgranular mastócitos diretamente mesmo em pequenas doses (Dotimas; Hider, 1987).

Acidente por vespas tem sintomas muito semelhantes aos causados por abelhas, como edema extenso, vermelhidão e muita dor (Fitzgerald e Flood, 2006). Tal semelhança prejudica muito o diagnóstico do acidente e a busca por um tratamento ideal. O acidente causado por formigas *Pachycondyla chinensis* é caracterizado por urticária, vermelhidão, distúrbios respiratórios, hipotensão e perda de consciência. No soro dos pacientes é detectado alto níveis de IgE específica (Kim et al., 2001).

Diante da gravidade dos acidentes e da dificuldade de se evitar o contato com esses insetos, muito tem sido estudado no intuito de desenvolver uma imunoterapia baseada na dessensibilização dos indivíduos alérgicos levando a uma maior tolerância aos venenos com aumento de IgG específica, particularmente da classe IgG4, capaz de bloquear o antígeno antes que o mesmo se ligue a IgE fixada na membrana dos mastócitos (Schuerwegh et al., 2001; Pereira-Santos et al., 2007). A caracterização dos componentes responsáveis em induzir alergia permite o desenvolvimento de imunoterapia específicas e com menores efeitos colaterais, como já acontece com veneno de abelhas e formigas (Yun et al., 1999; Kim et al., 2001). Além da terapia de dessensibilização, moléculas com função inibitória estão sendo descritas, como o caso de uma pequena molécula (*small molecule*) capaz de inibir a desgranulação de mastócito *in vitro* e *in vivo* (por administração oral em camundongos através

do bloqueio da sinalização Syk (*spleen tyrosine kinase*) no receptor FcεRI (Mazuc et al., 2008). Hitomi e colaboradores (2010) identificaram um inibidor tipo imunoglobulina, denominado Allergin-1, o qual contém a seqüência ITIM em sua porção citoplasmática e inibe a desgranulação mediada por IgE em mastócitos derivados da medula óssea (BMMCs).

Acidentes causados por animais peçonhentos como serpentes, escorpiões, aranhas e lagartas são associados a importantes distúrbios patológicos resultantes do envenenamento. Juntos esse animais representam um grave problema médico e socioeconômico, de acordo com SINAM (Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Ministério da Saúde); acidentes causados por esse animais representam cerca de 90% (109.53 acidentes) do total notificado no ano de 2010. No entanto, apenas alguns trabalhos científicos publicados descrevem reações alérgicas desenvolvidas em resposta a exposição a esses venenos ou no envenenamento (Alonso et al., 1995; Demain e Goetz, 1995; Reimers et al., 2000, de Medeiros 2008 a, 2008 b).

O primeiro registro de sensibilização alérgica humana a um veneno de serpente data da década de 1930 (Zozaya; Staldelman, 1930). Alguns autores descrevem reações como urticaria, coceira nasal, edema e dermatite em tratadores e manipuladores de serpentes peçonhentas atribuindo esses sintomas a repetidas inalações e/ou contato da derme e mucosa com os venenos da família *Crotalinae* (Brooks; Graeme, 2004; Prescott; Potter, 2005). A sensibilização de trabalhadores do departamento de Herpetologia do Instituto Butantan pelo veneno de *B. jararaca* foi descrita por Medeiros e colaboradores (2008 a) que sugerem que a exposição ocupacional resulta em sensibilização por mecanismos mediados por IgE.

Diferentemente dos terrestres, acidentes causados por organismos aquáticos apresentam baixa incidência devido ao seu habitat, e ainda muitos existentes não sofrem notificação ou são sub-notificados. Entretanto por viverem em um ecossistema altamente

competitivo produzem um enorme número de metabólitos que constituem seus venenos e por isso são intensamente estudados e descrições médicas de reações alérgicas desenvolvidas em resposta a eles são freqüentes.

Curiosamente, o termo anafilaxia foi empregado pela primeira vez em estudos realizados com um organismo aquático e de acordo com o autor “*a descoberta não foi um achado, mas sim o resultado de uma observação, quase acidental*” (Richet, 1913). Diante do convite do príncipe de Mônaco, Paul Richet começou juntamente com Charles Portier suas pesquisas para desenvolver um *antídoto* para os efeitos observados nos acidentes com a caravela portuguesa do gênero *Physalia*. Os pesquisadores iniciaram os estudos administrando baixas doses do veneno em cachorros com o intuito de gerar *tolerância* nos animais. No entanto, o que observaram foi que os animais injetados com veneno em intervalos de alguns dias quando re-expostos desenvolviam intensos sintomas: arritmia cardíaca, intensa produção de muco, vômitos com a presença de sangue e evoluíam para óbitos após 25 min. Diante da observação os pesquisadores denominaram tal reação como *lack of protection* e titularam o termo anafilaxia. O reconhecimento internacional da descoberta aconteceu em 1913 quando Richet foi laureado com o Premio Nobel em Medicina e Fisiologia e um selo comemorativo dos 100 anos da descrição foi distribuído pela Europa (Ring et al., 2010).

Dentre os animais aquáticos de importância toxinológica estão os Cnidários (água viva, urtiga do mar), Equinodermos (ouriço), Poríferos (espojas), Moluscos (caramujos) e os peixes que podem ser agrupados em venenosos ou peçonhentos. Os peixes venenosos obtêm suas toxinas incorporando veneno de plantas, algas ou outros organismos através da cadeia trófica, ou possuem vias metabólicas para a produção de seus venenos. São representados principalmente por baiacu, garoupa, barracuda e bicuda. Já os peixes peçonhentos apresentam glândulas especializadas na secreção de substâncias tóxicas e um aparato especializado

constituído por espinhos ou acúleos canaliculados ou não para a inoculação, como é o caso das arraia, bagres, peixe-escorpião e niquim.

Os niquins pertencem à família *Batrachoididae* e estão agrupados em 15 espécies, das quais quatro são encontradas no Brasil; *Thalassophryne nattereri*, *Thalassophryne punctata*, *Thalassophryne reticulata* e *Thalassophryne amazonica*, entretanto os únicos relatos de acidentes referem-se à espécie *T. nattereri* (Froés, 1933 a, 1933 b, 1933 c). Ele é encontrado ao longo da costa norte e nordeste do Brasil, principalmente no encontro de águas marinhas e fluviais, vivendo entre rochedos ou plantas marinhas, encobertos pela areia ou lodo e em locais relativamente rasos. O *T. nattereri* possui o mais completo aparelho inoculador de veneno (Fig. **1A**), consistindo de quatro espinhos, sendo dois localizados na região dorsal e dois laterais (Fig. **1B**). Todos possuem comunicação com as glândulas produtoras e reservatórias de veneno. Estes espinhos são canaliculados, de forma cônica, pontiagudos e se articulam com o plano ósseo subjacente, encontrando-se encobertos por um prolongamento da pele do peixe que serve como bainha (Fig. **1C**).

Figura 1- O peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri* e seu aparato inoculador de veneno. Exemplar de *T. nattereri* coletado na Lagoa Mundaú no estado de Alagoas (A). Desenho representativo do peixe com a localização dos espinhos: 2 na região dorsal e 1 em cada lateral (B). Aparato inoculador de veneno: a pressão nas glândulas localizadas na base dos espinhos promove a passagem do veneno pelo canal do espinho (C).

(A)

(B)

(C)

FONTE: Fotos e ilustração gentilmente cedidas pela Dra. Mônica Lopes Ferreira.

Os acidentes provocados pelo *T. nattereri* geram um importante problema de ordem médica, econômica e social. Estes já foram notificados em Salvador (Almeida; Rocha, 1989), Alagoas (Auto, 1992), Fortaleza (Monteiro et al., 2003), Natal e Pará (Haddad Jr et al., 2003). Ocorrem através da liberação do veneno pelos espinhos por meio da pressão exercida por áreas corpóreas, como a região plantar ou palmar. Um dos principais sintomas decorrentes do envenenamento provocado pelo peixe *T. nattereri* é a dor que se instala imediatamente após o acidente e é de grande intensidade segundo relato das vítimas. Eritema e edema também são notados de imediato com eflorescência de bolhas com conteúdo seroso. Estes acidentes evoluem para necrose, que na maioria das vezes se instala precocemente após o acidente e permanece por um longo período de tempo sem que haja um eficiente processo de cicatrização (Fonseca; Lopes-Ferreira, 2000).

Os primeiros trabalhos com o peixe *T. nattereri* foram realizados por Fróes em 1932 e 1933 e descreveram principalmente o habitat, a maneira como o veneno é expelido e a correta identificação da espécie. Fróes também realizou experiências injetando o veneno de *T. nattereri* em aves e cobaias e por meio destes reproduziu experimentalmente os sintomas clínicos do envenenamento. Embora o *T. nattereri* provoque um grande número de acidentes por toda a costa brasileira, após os trabalhos de Fróes nenhum outro havia sido realizado até 1998, quando nosso grupo iniciou os estudos no Instituto Butantan. Utilizando o modelo murino em camundongos conseguimos reproduzir os principais sintomas locais do envenenamento observado em humanos: dor, edema e necrose. Estes estudos demonstraram que diferente de outros venenos como o de serpentes ou abelhas, os efeitos locais induzidos pelo veneno do peixe ocorrem independentemente da presença de toxinas com atividade hemorrágica ou do tipo fosfolipásica A2 (Lopes-Ferreira et al., 1998 a; Lopes-Ferreira et al., 1998 b).

A análise histológica da lesão provocada pelo veneno mostrou a presença de edema, mionecrose, hiperemia e/ou congestão nas veias e vênulas, presença de trombos, além de pouco infiltrado celular inflamatório. A regeneração tecidual mostrou-se comprometida até 28 dias após a injeção do veneno. O nível de creatina quinase no plasma se mostrou aumentado nas primeiras horas após o envenenamento, sendo que a massa muscular total e a quantidade dessa enzima no músculo gastrocnêmio estavam drasticamente reduzidas. Ao exame ultra-estrutural, observou-se o rompimento da membrana plasmática, edema mitocondrial e proeminente desorganização miofibrilar, inclusive com desaparecimento da linha Z (Lopes-Ferreira et al., 2001).

Em trabalho posterior foi mostrado por meio da microscopia intravital que o veneno provoca intensa coagulação intravascular, com parada do fluxo sangüíneo nas vênulas pós-capilares e em capilares, com pontos de estrangulamento periódico e reversível em toda a extensão das arteríolas, como também vasoconstrição. De maneira interessante, a coagulação intravascular ocorrida não pode ser correlacionada com a ação do veneno sobre os fatores solúveis da coagulação, uma vez que o veneno não induz coagulação em testes com o sangue total, plasma rico ou não em plaquetas. Com estes trabalhos sugeriu-se que a ação do veneno na microcirculação pode ser decorrente de uma ação indireta, após a liberação de mediadores de plaquetas ou células endoteliais, uma vez que o veneno promove a lise dessas células em cultura (Lopes-Ferreira et al., 2002). Também foi mostrado que o veneno, quando inoculado experimentalmente em ratos, altera a fisiologia renal interferindo principalmente nos parâmetros vasculares, atestando uma ação sistêmica do veneno (Facó et al., 2003).

Lopes-Ferreira e colaboradores (2004) demonstraram que somente o inibidor de caliceína tecidual (TKI, 100 mg/kg, i.p.) reduz a nocicepção e o edema induzidos pelo veneno. A participação do sistema caliceína-cininogênio-cinina foi confirmada uma vez que o veneno promove a clivagem de substratos sintéticos derivados do cininogênio humano liberando

calidina (Lys-BK), apresentando, portanto uma atividade cininogénica semelhante à calicreína tecidual. Esta atividade enzimática apresentada pelo veneno é inibida por agentes quelantes de metais inibidores de metaloproteínas como EDTA e orto-fenantrolina, mas ao contrário não é inibida por PMSF (inibidor de todas serino proteases), TLCK (inibidor de tripsina-like serino proteases), TPCK (inibidor de quimiotripsina-like serino proteases), E-64 (inibidor de cisteino proteases), e Pepstatin-A (inibidor de aspartil proteases). Além disso, as atividades tóxicas induzidas pelo veneno não são reduzidas por anti-inflamatórios comumente utilizados na clínica médica, como dexametasona ou indometacina, nem pelo inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME), bem como pelo antagonista do receptor de serotonina (ciproheptadina).

Sabendo da importância da resposta inata celular na contenção de antígenos ou patógenos e conseqüentemente na restauração da integridade do tecido lesado, investigamos a capacidade do veneno de induzir recrutamento de leucócitos para o sítio lesionado. Lima e colaboradores (2003) demonstraram que após a injeção do veneno no coxim plantar de camundongos há liberação de importantes citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, entretanto acompanhada por uma pobre resposta inflamatória celular. Além disso, foi verificado que o veneno afeta a viabilidade de células mononucleares (J774A1) em cultura.

Pareja-Santos e colaboradores (2009) demonstraram que o veneno de *T. nattereri* altera a estrutura da matriz extracelular do coxim plantar de camundongos pela ativação de metaloproteínas de matriz como MMP-2 e MMP-9, além de diminuir o conteúdo de fibras colágenas durante a fase de cicatrização da lesão. Foi também demonstrado que o veneno afeta a organização do citoesqueleto celular e a formação de *pseudopodia* de células epiteliais. Este cenário indica um papel ambíguo do veneno na resposta inflamatória. Por um lado ele demonstra uma potente atividade pró-inflamatória ilustrada pela superregulação de mediadores inflamatórios, e por outro, ele afeta a habilidade de regeneração tecidual devido à

desorganização da matriz extracelular causada pela atividade aumentada das MMPs, a qual dificulta a infiltração de células inflamatórias.

A caracterização das toxinas majoritárias encontradas no veneno de *T. nattereri* foi realizada através da abordagem de química de proteínas (isolamento e seqüenciamento de peptídeos internos e N-terminal) e de biologia molecular (transcriptoma da glândula venenífera do peixe e expressão dos cDNAs que codificam as toxinas). Utilizando estas abordagens sabemos da existência, na glândula venenífera do peixe, das seguintes toxinas: a família das Natterinas, constituída por 5 toxinas, Natterinas 1, 2, 3, 4 e P, na faixa de massa molecular de 30-45 kDa, que apresentam homologia entre si mas não com proteínas existentes nos bancos de dados, e a Nattectina com massa molecular de 15 kDa, que apresenta homologia com lectinas do tipo C (Magalhães et al., 2005; Magalhães et al., 2006). As Natterinas, como foram nomeadas, são capazes de clivar o cininogênio humano e peptídios sintéticos derivados de cininogênio liberando Lys-BK, calidina (Magalhães et al., 2005).

O veneno de *T. nattereri* e suas toxinas vêm sendo amplamente estudados quanto a diferentes aspectos toxinológicos, bioquímicos e farmacológicos demonstrando a sua complexidade. Entretanto, estudos dos mecanismos de ação do veneno ou de suas toxinas no sistema imunológico tiveram início em 2006 por Grund e colaboradores que identificaram que o veneno induz em camundongos uma resposta imune mista, com diferenciação de clones de linfócitos Th1 e Th2 identificados pela produção de IL-5 e IFN- γ por células esplênicas, além da produção de anticorpos IgE total e veneno-específicos IgG1 e IgG2a.

A presença de resposta T dirigida com altos níveis de anticorpos IgG específicos confirmaram que células B com funções efectoras e/ou de memória foram geradas e ainda, a produção de células B negativas para a molécula B220 sugeriu a diferenciação de células produtoras de anticorpos de vida longa (*antibody-secreting cells* – ASC) que pode representar

uma fonte importante de anticorpos protetores e garantir a imunidade de longo prazo. Em 2007, Piran-Soares e colaboradores mostraram que o veneno mantém por até 6 meses após a imunização altos níveis de IgG específicos em camundongos semelhantes aos níveis encontrados em pacientes acidentados pelo peixe.

Mais recentemente, o trabalho de Grund e colaboradores (2012) demonstrou que o veneno de *T. nattereri* é capaz de desencadear e manter uma resposta inflamatória Th2 crônica com persistentes níveis de IgG1 e principalmente IgE produzidos por células ASC terminalmente diferenciadas (B220^{neg}). Os autores demonstraram que as ASC B220^{neg} são mantidas por fatores de sobrevivência produzidos por mastócitos, eosinófilos e principalmente por neutrófilos, nos tecidos inflamados. Ainda, a fase de memória da resposta humoral induzida pelo veneno é caracterizada por linfócitos T de memória efetores (TeM) CD4⁺CD44^{high}CD40L^{pos}Ly6C^{pos} no peritônio produtores de IL-4, IL-5, IL-17A e por linfócitos T de memória central (TcM) CD4⁺CD44^{high}CD40L^{neg}Ly6C^{pos} no baço e na medula óssea produtores de IL-5 e IL-23. A produção de fatores de sobrevivência pelas células inatas e das citocinas IL-5 e IL-17A por linfócitos TeM ativados (CD40L^{pos}) garantem a manutenção das ASCs B220^{neg} no peritônio, e as citocinas IL-5 e IL-23 promovem na medula óssea um nicho ideal para retenção de linfócitos TcM em estado de repouso (CD40L^{neg}).

Ainda neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez o importante papel de IL-17A na diferenciação e manutenção de ASC com fenótipo B220^{neg}, uma vez que o tratamento dos animais com anticorpos neutralizadores anti-IL-17A antes da imunização e da dose reforço com o veneno de *T. nattereri* impede completamente a diferenciação e manutenção de ASC B220^{neg} no local inflamado assim como a produção de IgE, induzindo a diferenciação de ASC com altos níveis da molécula B220 e a síntese preferencial de IgG2a.

Em conjunto estes trabalhos nos permitem identificar o veneno de *T. nattereri* como um bom imunógeno e ainda, capaz de induzir e sustentar uma resposta humoral Th2 crônica, à

semelhança das desordens alérgicas em indivíduos atópicos que são crônicas e Th2 mediadas. A análise deste quadro nos levou a questionar se o veneno também é capaz de desencadear sintomas alérgicos de anafilaxia ou inflamação alérgica com fase aguda e tardia localizada em órgãos alvos como o pulmão ou a pele, assim como fazem outros venenos de animais como abelhas, formigas, serpentes ou cnidários. O estabelecimento de um modelo murino para o estudo dos mecanismos patológicos das reações alérgicas induzidas pelo veneno do peixe brasileiro *T. nattereri* permitirão pela primeira vez a identificação de proteínas alergênicas em um veneno de um peixe peçonhento, um animal aquático de grande importância toxinológica.

2 OBJETIVOS

Diante do exposto o objetivo principal deste trabalho foi determinar se o veneno do peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri* conhecido por possuir proteínas com atividades tóxicas possui também proteínas alergênicas capazes de induzir reação anafilática em camundongos ou inflamação alérgica com fase aguda e tardia localizada em órgãos alvos como o pulmão ou a pele. Para isto padronizamos pela primeira vez um modelo murino de anafilaxia induzida pelo veneno e caracterizamos detalhadamente os diversos mediadores solúveis e celulares envolvidos no processo alérgico. Ainda estabelecemos a importância das diferentes citocinas como IL-4, IFN- γ e IL-12 na resposta sistêmica de anafilaxia e na resposta inflamatória alérgica de fase tardia.

3 ETAPAS REALIZADAS

- Padronização de modelo murino em camundongos BALB/c de anafilaxia induzida pelo veneno de *T. nattereri*;
- Estudos dos mediadores solúveis e componentes celulares envolvidos na resposta inflamatória alérgica induzida pelo veneno desencadeada no pulmão e na pele;
- Determinação do papel de citocinas características de respostas Th2 e Th1 na geração da resposta alérgica induzida pelo veneno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com 7 a 8 semanas de idade, ratos Wistar macho (para ensaios de PCA) foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais C57BL/6 selvagens (*WT*) e os deficientes nos genes das citocinas (*KO*) foram obtidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 e 25 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h), com água e ração. Os experimentos estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelas Comissões de Ética Animal do Instituto Butantan (545/08) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (sob nº 60 nas fls.70 do livro 02).

4.2 Obtenção de espécimes de *Thalassophryne nattereri* para extração do veneno

Espécimes de *T. nattereri* foram obtidos na Lagoa Mundaú no estado de Alagoas – Brasil. A extração do veneno de *T. nattereri* foi realizada comprimindo-se a base dos espinhos forçando a expulsão do veneno (Lopes-Ferreira et al., 1998a). Posteriormente o veneno foi centrifugado e estocado à -20 °C. A quantidade de veneno foi expressa pelo seu conteúdo protéico determinado pelo método colorimétrico de Bradford (1976) usando como padrão soro albumina bovina (Sigma, Chemical Company; ST. Louis, MO, USA). A coleta dos peixes foi autorizada pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico N°14693-1). *Endotoxin Detoxi-Gel™* (Pierce Protein Researcher -Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, USA) foi usado de

acordo com as instruções do fabricante para remover > 99% do LPS contaminante presente na solução de veneno resultando em dose total < 0.8 pg LPS, o qual foi determinado pelo método Limulus Amoebocyte Lysate (BioWhittaker).

4.3 Indução de anafilaxia em camundongos

A primeira etapa desse trabalho foi desenhar um modelo de anafilaxia em camundongos que reproduza os sintomas característicos da reação aguda (sintomas anafiláticos e liberação de histamina) e de fase tardia (inflamação celular). Camundongos BALB/c fêmeas ($n = 5$) foram imunizados por via intraperitoneal (500 μ L) com o veneno (10 μ g) adsorvido em hidróxido de alumínio (1,6 mg) no dia 0. Doses reforços foram administradas nos dias 7 (10 μ g/animal) e nos dias 14 e 21 (1 μ g/animal), sem adjuvante. No 35º dia após a primeira imunização, os animais foram expostos ao veneno (10 μ g/animal) por via intraperitoneal. Animais controle receberam salina no decorrer de todo o protocolo. Os sintomas anafiláticos induzidos pelo veneno foram avaliados nos primeiros 40 min após o desafio realizado no 35º dia. Os animais foram mortos 48 h após o desafio para obtenção das amostras e posterior análises.

4.4 Avaliação dos sintomas anafiláticos

Os sintomas anafiláticos foram registrados e classificados de acordo com Li e colaboradores (1999): 0 - animal apresenta nenhum sintoma clínico; 1 - lambida ou arranhadura com as patas da boca e da orelha; 2 - atividade diminuída, isolamento; 3 - períodos de paralisia por mais de 1 min; 4 - resposta reduzida ou ausência de resposta a estímulos ou à captura e 5 – *endpoint*: tremor, convulsão com morte do animal.

4.5 Indução de resposta inflamatória alérgica no pulmão e na pele

Com o objetivo de avaliar a capacidade do veneno de induzir reação inflamatória das vias aéreas animais BALB/c submetidos à imunização intraperitoneal foram expostos pela via intranasal (i.n.) no 35º dia após a primeira imunização a um único desafio (UNICO) ou a 3 sucessivos desafios (MULTIPLO). Para isto, os animais foram colocados em posição supina e com o auxílio de uma pipeta, a solução contendo 10 µg de veneno foi administrada pelo focinho do animal em um volume final de 50 µL/animal. No desafio único, os animais foram mortos após 72 h e nos múltiplos, após 24 h para lavagem do pulmão para obtenção do lavado broncoalveolar (BAL) e retirada do pulmão.

Para o desencadeamento da alergia na pele, os camundongos tiveram o dorso depilado 24 h antes do desafio. No 35º após a primeira imunização, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (100 e 10 µg/Kg, respectivamente), o dorso foi hidratado com uma gaze embebida em água estéril por 10 min. Com o auxílio de uma agulha (0,30 x 13 BD PrecisionGlide®) foram realizados fissuras superficiais no dorso dos animais. A gaze de fita dérmica hipoalergênica (BANDAID®) foi embebida em veneno (20 µg/300µL) e imediatamente colocada em contato com as fissuras, em ensaio semelhante ao *patch test* (Bobr et al., 2010). O grupo controle foi desafiado com fita dérmica embebida em salina sobre as fissuras. Os animais foram sangrados após 48 h do desafio para obtenção do sangue e posterior dosagem de anticorpos plasmáticos, e mortos para obtenção de amostras da pele e dos linfonodos drenantes.

4.6 Indução de anafilaxia em camundongos deficientes nos genes das citocinas IL-4, IL-12 ou IFN- γ

Para avaliação da participação das citocinas na modulação da anafilaxia induzida pelo veneno utilizamos animais C57BL/6 deficientes nos genes de IL-4, IFN- γ ou IL-12 (*KO*) e caracterizamos a resposta em animais C57BL/6 selvagens (*WT*) uma vez que os animais deficientes têm fundo genético nessa linhagem. Camundongos *WT* ou *KO* ($n = 5$) foram imunizados por via i.p. (500 μ L) com o veneno (10 μ g) adsorvido em hidróxido de alumínio (1,6 mg) no dia 0. Doses reforços foram administradas nos dias 7 (10 μ g/animal) e nos dias 14 e 21 (1 μ g/animal), sem adjuvante. No 35º dia após a primeira imunização, os animais foram expostos ao veneno (10 μ g/animal) por via i.p. Animais controle receberam salina no decorrer de todo o protocolo. Os sintomas anafiláticos induzidos pelo veneno foram avaliados nos primeiros 40 min após o desafio realizado no 35º dia. Os animais foram mortos 48 h após o desafio para obtenção das amostras e posterior análises.

4.7 Dosagem de histamina por ELISA de competição

A histamina foi dosada nas amostras acetiladas dos sobrenadantes do lavado da cavidade peritoneal e do BAL dos animais desafiados i.p. ou i.n., respectivamente. O ensaio para determinação quantitativa de histamina foi realizado por ELISA de competição com anticorpo anti-histamina imobilizado na placa e a amostra exercendo competição pela ligação ao anticorpo com enzima marcada, de acordo com as recomendações descritas pela fabricante do Kit (IBL International GMBH ref.59221). O limite inferior de detecção do método foi de 2,7 ng/mL e as concentrações das amostras foram calculadas mediante valores encontrados na curva-padrão.

4.8 Obtenção da suspensão celular da cavidade peritoneal

A cavidade peritoneal foi lavada com tampão PBS + 10 mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) para obtenção da suspensão celular. O lavado da cavidade peritoneal foi imediatamente centrifugado a 4 °C, os sobrenadantes separados e congelados a -20 °C e o botão celular foi ressuspensão em PBS + 0,1% BSA para contagem total das células em câmara de Neubauer com solução de Turk.

4.9 Obtenção do BAL

Os animais desafiados pela via intranasal foram mortos, traqueostomizados e tiveram a aorta abdominal rompida. Os pulmões foram lavados com 1,5 mL de PBS + EDTA 10 mM para coleta do BAL que foi então centrifugado a 800 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi armazenado a -20 °C e o botão celular ressuspensão em HBSS + 0,1% BSA (*bovine serum albumin*) para contagem total das células em câmara de Neubauer com solução de Turk.

4.10 Desagregação do tecido pulmonar e análise histológica

Uma fração do pulmão foi cortada e homogeneizada em meio de meio de cultura (RPMI 1640, Invitrogen) contendo 10% soro bovino fetal, 850 U/mL hialuronidase, 150 U/mL collagenase e 50 U/mL DNase I. Partes do tecido foram retidas por uma membrana de nylon com malhas de 55 µm e as hemácias lisadas. A suspensão celular resultante foi contada em câmara de Neubauer com solução de Turk e usada para determinação do número de linfócitos T CD4 positivos para citocinas intracelulares por citometria de fluxo (Lagranderie et al., 2010). Para a determinação da morfologia geral as seções dos pulmões foram fixadas em formaldeído 1%, embebidas em parafina e cortadas em seções de 5 µm de espessura e coradas com Hematoxilina/Eosina (H&E). Todos os cortes foram examinados usando microscópio Zeiss

Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Germany) com uma ampliação de 10, 40 ou 100x. Foram analisadas quatro seções pulmonares coradas de cada camundongo/grupo.

4.11 Dosagem de anticorpos no plasma dos animais por ELISA

Os animais de todos os grupos experimentais foram sangrados por punção oftálmica para coleta do sangue em PBS que foi imediatamente centrifugado a 2000 rpm por 10 min. O plasma foi separado e reservado a -20°C para as dosagens de anticorpos. A dosagem de anticorpos foi realizada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Para determinação de IgG1 e IgG2a, microplacas foram sensibilizadas com o veneno e posteriormente após incubação e lavagem, adicionadas dos plasmas em diluição previamente determinada. Para revelação foram adicionados anticorpos de detecção marcados com peroxidase específicos para IgG1 ou IgG2a. Ao final, a reação foi revelada pela adição de 100 μL da mistura cromógena mais substrato da enzima (1 mg de OPD/mL em tampão citrato 0,2 M, pH 5,5 + H_2O_2 0,06%, por poço) e a reação interrompida pela adição de 50 μL de ácido cítrico 0,2 M por poço e leitura feita em espectrofotômetro a 490 nm. Curvas-padrão, utilizando concentrações conhecidas dos anticorpos murinos purificados foram realizadas para quantificação das amostras. Para a dosagem de IgE total usamos os pares de anticorpos (553413 BD Biociences, San Diego/ CA, USA e 1130-08 Southern Biotech USA). A quantidade de IgE total nas amostras foi calculada a partir da curva-padrão obtida com a IgE purificada (0313ID, BD Pharmingen). Os resultados foram expressos como a média das concentrações acrescida do desvio-padrão das amostras de cada grupo.

4.12 Reação de anafilaxia cutânea passiva - PCA

A determinação da presença de anticorpos anafiláticos IgE e IgG1 específicos para o veneno foi realizada pela reação de PCA, segundo as técnicas descritas por Mota e Wong (1969) e Ovary (1958), respectivamente. Para determinação dos anticorpos IgE, ratos Wistar machos depilados no dorso foram sensibilizados intradermicamente com diluições seriadas dos plasmas obtidos de camundongos submetidos aos protocolos de avaliação de anafilaxia induzida pelo veneno de *T. nattereri* ou grupos controles. Após um período de 18 a 24 h de sensibilização, os animais foram desafiados intravenosamente com azul de Evans a 0,25%, contendo 100 µg de veneno de *T. nattereri*. Para a determinação de IgG1, camundongos previamente depilados foram injetados intradermicamente no dorso com 50 µL de diluições seriadas dos plasmas inativados a 56 °C, por 1 hora. Após 2 h de sensibilização, os animais foram desafiados intravenosamente com azul de Evans a 0,25%, contendo 30 µg de veneno de *T. nattereri*. Em ambos os testes, a leitura da reação foi realizada 30 min após o desafio intravenoso com veneno, observando-se o diâmetro da reação positiva 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 (Mota e Wong 1969; Ovary, 1958; Fox et al., 1976; Ishizaka et al., 1976).

4.13 Cultura celular de órgãos linfóides

Os baços dos animais foram retirados de forma estéril e em seguida submetidos à maceração em homogenizador com meio de cultura RPMI 1640 para recuperação da suspensão celular. Este homogenato foi centrifugado a 1200 rpm durante 8 min à 4 °C. Em

seguida, submetido a lavagens e hemólise. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultura suplementado (RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado – SFB, L-glutamina, 2-mercapto, penicilia e estreptomicina e piruvato de sódio). Os eventuais grumos foram retirados por sedimentação por 5 min no gelo e a viabilidade da suspensão obtida pela contagem celular em azul de Giemsa. As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado sem re-estímulo, com estímulo inespecífico com ConA (Concavalina A – 10 µg/mL) e na presença de veneno de *T. nattereri* (10 µg/mL) por 4 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O sobrenadante foi coletado por até 72 h e estocado para posterior dosagem de citocinas.

Camundongos submetidos ao desafio por via epicutânea foram mortos e os linfonodos drenantes coletados, cultivados e realizada a caracterização do perfil celular presente. O *pool* dos linfonodos drenantes foram macerados em homogeneizador de vidro em meio de cultura e cultivados em meio RPMI suplementado na presença ou na ausência de ConA (10 µg/mL) por 4 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. No meio de cultivo foi adicionado StopGolgi (BD Biosciences GolgiPlug – *protein transport inhibitor* – Brefeldina A) na concentração de 1 µg/mL. Posteriormente, as células foram centrifugadas à 1500 RPM, 4 °C por 10 min e ressuspensas em meio RPMI (Chen et al., 2004). O número celular na suspensão foi ajustado e incubado com anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos para identificação das distintas populações celulares positivas para citocinas intracelulares.

4.14 Quantificação de citocinas por ELISA

Os níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina (característicos da resposta Th2), IL-17A (produzida por linfócitos Th17) e IFN-γ (característico da resposta Th1) no sobrenadante do lavado peritoneal e no sobrenadante de células esplênicas foram determinados por ELISA sanduíche de acordo com Grund e colaboradores (2006). Microplacas (Costar, Cambridge, MA,

USA) para cada citocina foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos. Após lavagem e distribuição das amostras foram adicionados anticorpos específicos para as diferentes citocinas conjugados à biotina. Para a revelação da ligação, solução reveladora contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno foi adicionada. A reação de cor foi lida em espectrofotometro a 450 nm. Curvas-padrão, utilizando concentrações conhecidas das citocinas recombinantes foram realizadas para extrapolação da densidade óptica das amostras.

4.15 Caracterização da população celular por citometria de fluxo: marcação fenotípica e citocinas intracelulares

A suspensão celular do lavado peritoneal obtidos dos animais expostos ao veneno via intraperitoneal foram bloqueados pela incubação por 20 min em gelo com anti-anti-Fc γ RII (CD16/32, BD PharMingen) e marcadas por 30 min à 4 °C no escuro com anticorpo rat IgG2b anti-mouse Ly6G PE, rat IgM anti-mouse Ly6C FITC, rabbit IgG anti-mouse CCR3 adicionado de goat anti-IgG rabbit PE-Cy5, rat IgG2b anti-mouse CD117 FITC, anti-mouse CD45/B220 PECy 5, goat anti-mouse CD11b PE ou os isotipos controle: rat IgG2b PE, rat IgM FITC e hamster IgG PE-Cy5 (BD PharMingen). Após nova lavagem, as células foram fixadas com formaldeído a 1% e mantidas a 4 °C até o momento da aquisição dos dados (10.000 eventos) no FACSCalibur de 3 cores (BD-Pharmingen). Os dados foram analisados usando o programa Cellquest (BD-Pharmingen). As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) seguido de marcação específica e as células mortas e grumadas foram dispensadas. Os resultados de células positivas foram expressos em número absoluto corrigido pelo número total de células encontrado na suspensão de cada grupo.

Para situações onde foi realizada marcação de citocinas intracelulares as células foram fixadas e permeabilizadas por 20 min no gelo com a solução Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences)

de acordo com Lagranderie e colaboradores (2010). Em seguida, foram centrifugadas com a solução de lavagem específica e incubadas por 10 min a 4 °C com anticorpos anti mouse IL-17A, anti mouse IFN- γ , anti mouse IL-4 e anti mouse IL-5. Após incubação, essas células foram ressuspensas em formaldeído a 1% e deixadas a 4 °C até a leitura no citometro de fluxo FACScalibur de três cores (BD-Pharmingen).

4.16 Ensaio de Western blot

O veneno de *Thalassophryne nattereri* foi submetido à eletroforese 12% (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970) e as proteínas foram transferidos sob corrente constante de 380 mA durante 2 h para uma membrana de nitrocelulose usando o sistema Trans Blot Pharmacia (Uppsala, Sweden), de acordo com a técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979). As proteínas presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidas à caracterização imunoenzimática. Para isso, as membranas foram incubadas por 18 h à 4 °C com solução bloqueadora (PBS contendo 3% de BSA). Após o bloqueio, a membrana foi lavada com tampão de lavagem (Tris/NaCl pH 7,5) e incubada por 3 h à temperatura ambiente em tampão de incubação (PBST contendo 1% de BSA) com um *pool* de plasmas obtidos de camundongos BALB/c com anafilaxia (diluídos 1/20). Em seguida foi realizado um novo ciclo de lavagens e as membranas foram incubadas com o segundo anticorpo conjugados à peroxidase anti-IgG de camundongo, por 2 h ambos na diluição 1/2000 em tampão de incubação. O excesso do segundo anticorpo HRP-conjugado foi removido por um novo ciclo de lavagens e os componentes antigênicos foram revelados pela adição do cromógeno 4-cloro-1 α -naftol 0,05% (p/v) em Metanol 15% (v/v) em presença de 0,03% de H₂O₂ (v/v). A reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água corrente. As bandas imunoreativas foram reveladas por quimioluminescência ECL (SuperSignal West Pico; Fisher Scientific, Illkirch, France). Os padrões de massa molecular utilizados foram miosina (azul) 197,4 kDa; β -galactosidase (magenta)

112,0 kDa; soroalbumina bovina (verde) 59,16 kDa; anidrase carbonica (violeta) 38,0 kDa e Lisozima (vermelha) 15,65 kDa.

4.17 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 $p < 0,05$. Será empregado o programa SPSS (Release 8.0, Standard Version, 1997).

5 RESULTADOS

5.1 O veneno de T. nattereri é capaz de induzir sintomas anafiláticos em camundongos

O desenvolvimento de modelos murinos de anafilaxia induzida por venenos que mimetizem as características patofisiológicas e imunológicas da anafilaxia humana visa o melhor entendimento dos componentes celulares e mediadores solúveis decisivos na indução da reação alérgica.

Os diferentes modelos desenvolvidos para diferentes tipos de alérgenos não só diferem entre si quanto ao tipo de alérgeno utilizado, mas também no protocolo de sensibilização e nos parâmetros aplicados à avaliação da sensibilização. Em particular, alguns modelos de sensibilização alérgica utilizam a sensibilização por via intraperitoneal na presença de adjuvante (Kweon et al., 2000), imunização oral com o adjuvante de mucosa toxina colérica (Li et al., 1999; Li et al., 2000), e mais recentemente, sensibilização intranasal ou epicutânea sem o uso de adjuvante (Hsieh et al., 2003; Arizmendi et al., 2011).

Portanto, os modelos animais em camundongos que visam reproduzir o fenômeno alérgico focam na reprodução de ambas as fases pela avaliação dos sintomas (sistêmico ou localizado) e dos mecanismos imunológicos que controlam o processo, como a avaliação dos níveis de IgE e IgG1 alérgeno-específicos, presença de mastocitose, diferenciação de células B produtoras dos anticorpos alérgeno-específicos, mediadores solúveis derivados de mastócitos (leucotrienos, prostaglandinas e histamina), diferenciação de linfócitos Th2, mediadores solúveis derivados de linfócitos Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, eotaxina) e mediadores solúveis derivados dos grânulos de eosinófilos ativados (proteína básica principal, neurotoxina derivada de eosinófilos, proteína catiônica de eosinófilos e peroxidase de eosinófilos). Ainda são também avaliadas as citocinas produzidas por linfócitos Th1, como IL-10, IFN- γ e a IL-12, responsáveis pelo controle da amplificação das alergias.

Inicialmente, desenvolvemos em camundongos BALB/c fêmeas, que apresentam maior suscetibilidade ao desenvolvimento de resposta imune do tipo Th2 (McIntire et al., 2001; Boyce e Austin, 2005) um modelo de anafilaxia para o veneno do peixe brasileiro *T. nattereri* sensibilizando os animais pela imunização e o desafio pela via intraperitoneal (Fig. 2). As concentrações de veneno utilizadas foram ajustadas de acordo com a capacidade de indução de morte, visando sempre manter o bem estar dos animais no decorrer do protocolo. No decorrer da imunização observamos que os camundongos apresentavam intensas reações de desconforto com forte estiramento intercostal e os pêlos arrepiados, principalmente após a segunda injeção. Assim, optamos por diminuir a concentração do veneno que seria administrada nas subseqüentes exposições e identificamos tal manifestação como sinais de anafilaxia e não como efeito tóxico do veneno uma vez que essa reação não foi observada na primeira injeção e que a dose administrada é muito inferior a LD₅₀ do veneno (4,54 mg/Kg i.p.), logo no total injetamos somente 32 µg de veneno por animal (142 vezes menos que a dose letal).

Como podemos observar na Figura 3 os animais desafiados com o veneno apresentaram sintomas clínicos de anafilaxia dentro de poucos minutos após o desafio. Começando com contínuas lambidas ou arranhaduras da boca e da orelha com as patas, diminuição da atividade e isolamento. Esse quadro se agravou após 10 min e evoluiu para paralisia por mais de 1 min, classificado em 3 na tabela de escores. Ademais, os animais apresentaram dificuldade respiratória com tiragem intercostal. Camundongos controle desafiados somente com salina não desenvolveram sintomas de anafilaxia.

Por esta via de desafio, o veneno induziu a produção e a liberação de histamina, uma importante molécula pré-formada contida nos grânulos de mastócitos (Fig. 4).

Figura 2- Modelo de anafilaxia induzida pelo veneno de *Thalassophryne nattereri*. Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados pela injeção de 500 µl (i.p.) contendo 10 µg de veneno adsorvidos em 1,6 mg de hidróxido de alumínio no dia 0. Doses reforços foram administradas nos dias 7 (10 µg/animal) e nos dias 14 e 21 (1 µg/animal). No 35º dia após a primeira imunização, os animais foram desafiados pela via intraperitoneal com o veneno (10 µg/animal). Durante os primeiros 40 min após o desafio o escore anafilático foi registrado e, após 48 h os animais foram mortos para a realização de diversas análises.

Anafilaxia

BALB/c

Figura 4- A anafilaxia induzida pelo desafio intraperitoneal com o veneno é acompanhada da liberação de histamina. A quantidade de histamina foi dosada no sobrenadante do lavado peritoneal obtido 48 h após o desafio intraperitoneal nos animais sensibilizados. Foi utilizando o Kit de ELISA de competição (IBL International, Germany) e o limite inferior de detecção do método foi de 2,7 ng/ml. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

5.2 Anafilaxia induzida pelo veneno é mediada por anticorpos anafiláticos IgG1 e IgE

As reações anafiláticas observadas segundos após a re-exposição ao alérgeno são dependentes de anticorpos específicos das classes IgE e IgG1 (em camundongos) ligados previamente a receptores específicos na membrana de mastócitos, basófilos e macrófagos. A ligação dos alérgenos a esses anticorpos acoplados aos receptores promove, entre outros efeitos, a desgranulação dos mediadores estocados nessas células, entre eles a histamina. Estes mediadores coletivamente determinam os graves efeitos imediatos observados. Para investigar o impacto da imunização na geração de resposta humoral, avaliamos os níveis plasmáticos de anticorpos específicos após 48 h do desafio intraperitoneal.

Na Figura 5 podemos observar que os animais desafiados com o veneno em relação aos animais controle apresentaram altas concentrações de anticorpos veneno-específicos IgG1 (Fig. 5A), alta produção de anticorpos IgE totais (Fig. 5B), e baixos níveis de anticorpos veneno-específicos IgG2a (Fig. 5C). Por anafilaxia cutânea passiva, em camundongos (IgG1) e em ratos (IgE), verificamos que o veneno induz a produção de anticorpos anafiláticos IgG1 (Fig. 6A) assim como de IgE (Fig. 6B). O plasma dos animais dos grupos controles foi negativo para anticorpos anafiláticos.

Figura 5- O desafio intraperitoneal com o veneno induz a produção plasmática de anticorpos nos animais sensibilizados. Os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico 48 h após o desafio com o veneno e tiveram o plasma processado para dosagem dos anticorpos veneno-específicos IgG1 (A), IgG2a (C) e IgE total (B) por ELISA. As barras representam a média de cada grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle/salina.

Figura 6- Anticorpos específicos IgG1 e IgE participam na anafilaxia induzida pelo veneno. Os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico 48 h após o desafio com o veneno e tiveram o plasma processado para dosagem dos anticorpos veneno-específicos IgG1 **(A)** e IgE **(B)** por PCA em camundongos e ratos, respectivamente. Os títulos de PCA representam a recíproca da maior diluição do *pool* de plasmas que apresentaram uma reação cutânea positiva com diâmetro > 5 mm. O ensaio foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

5.3 Perfil celular e citocinas característicos da resposta de fase tardia induzida pelo veneno de *T. nattereri*

A literatura mostra que após o término dos sintomas da reação anafilática aguda e um período sem sintomas, os pacientes apresentam um novo quadro inflamatório caracterizado pelo acúmulo de linfócitos Th2 e principalmente de eosinófilos, período este denominado de resposta de fase tardia. Neste contexto avaliamos o perfil celular da resposta de fase tardia gerada pelo veneno de *T. nattereri*.

Nossos resultados na Figura **7** mostram que o desafio (i.p.) com o veneno provocou após 48 h um influxo de leucócitos de quase 5 vezes maior que o controle (Fig. **7A**). E a análise por citometria de fluxo demonstra que o influxo leucocitário induzido pelo veneno na cavidade peritoneal foi caracterizado pela presença de eosinófilos (de quase 25 vezes), de mastócitos (de quase 15 vezes), de neutrófilos (de quase 10 vezes), de linfócitos B (de quase 6 vezes) e de macrófagos (de quase 4 vezes) (Fig. **7B**). Na Figura **7C** observamos os histogramas (expressão de CCR3 em eosinófilos) e as fotomicrografias representativos da eosinofilia induzida pelo veneno de *T. nattereri* em relação aos animais controle.

Em seguida avaliamos os níveis das citocinas e quimiocinas importantes no desencadeamento da inflamação alérgica característica da fase tardia. Estes mediadores foram avaliados no sobrenadante do lavado da cavidade peritoneal coletado 48 h. Observamos que o desafio com o veneno promoveu a produção de IL-5 (Fig. **8A**), importante citocina responsável por promover o crescimento, a diferenciação e o amadurecimento de eosinófilos na medula óssea; a produção de IL-17A (Fig. **8B**), responsável pelo recrutamento e sobrevivência de neutrófilos e macrófagos; e de eotaxina (Fig. **8C**), que durante o curso da resposta inflamatória, conjuntamente com IL-5 promove a rápida expansão de progenitores

eosinofílicos na medula óssea e, subsequente, a diferenciação terminal em eosinófilos maduros e a migração através da circulação sanguínea para o tecido inflamado.

Não foram detectados níveis significativos das citocinas IL-4, IL-13, IL-10 ou IFN- γ no sobrenadante do lavado peritoneal ou de IL-5, IL-13, IL-10, IL-17A ou IFN- γ no sobrenadante da cultura de células do baço estimulada *in vitro* com o veneno por até 72 h. No baço detectamos baixos níveis de IL-4, porém significativamente maior que o controle (dados não-mostrados).

Em conjunto estes resultados mostram que animais BALB/c submetidos à anafilaxia com o veneno apresentam escore 3 de anafilaxia com níveis de histamina 3 vezes maiores em relação ao controle, uma produção de anticorpos IgG1 e IgG2a veneno-específicos 10 vezes maior em relação ao controle e títulos de anticorpos IgG1 e IgE anafiláticos de 40 e 320, respectivamente. A inflamação peritoneal na resposta de fase tardia nestes animais foi caracterizada pelo influxo de mastócitos e neutrófilos e principalmente por eosinófilos (Fig. 2 a 8).

Figura 7- Resposta celular tardia induzida pelo desafio intraperitoneal com o veneno de *T. nattereri*. Os animais foram mortos 48 h após o desafio intraperitoneal com o veneno e tiveram a cavidade peritoneal lavada para obtenção da suspensão celular que foi processada para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer com solução de Turk **(A)** e diferencial por citometria de fluxo **(B)** após incubação com anticorpos específicos marcados com fluorocromos: neutrófilos (Ly6G^{pos}CD11b^{pos}), macrófagos (Ly6C^{pos}CD11b^{pos}Ly6G^{neg}), mastócitos (CD117^{pos}), eosinófilos (CCR3^{pos}) e linfócitos B (CD45R/B220^{pos}CD11b^{pos}) ajustado a partir do número total de células encontrado no peritônio. As barras representam a média do número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão. Fotomicrografias representativas da eosinofilia induzida pelo veneno em relação aos animais controle **(C)**. **p* < 0,05 em relação ao controle/salina.

Figura 8- Resposta celular tardia promovida pelo desafio intraperitoneal é dependente da produção de IL-5, IL-17A e eotaxina. Após 48 h do desafio os animais foram mortos e tiveram a cavidade peritoneal lavada para obtenção da suspensão celular que foi centrifugada para dosagem de IL-5 (**A**), IL-17A (**B**) e eotaxina (**C**) no sobrenadante por ELISA. A linha tracejada representa o limite de detecção de 7,8 pg/mL para IL-5 e eotaxina e 15,62 pg/mL para IL-17A. Cada barra representa a média do grupo acrescida do desvio-padrão. As citocinas IL-4, IL-13 e IFN- γ não foram detectadas. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

5.4 O veneno desencadeia resposta inflamatória alérgica pulmonar

Além de reação sistêmica, um indivíduo atópico sensibilizado pode apresentar reações localizadas, dependendo da via de contato com o antígeno. Antígenos inalados, por exemplo, provocam uma reação inicial no trato respiratório superior ou na traquéia e nos brônquios, resultando nos sintomas da rinite alérgica ou da asma. Avaliamos se a sensibilização dos animais pela via intraperitoneal poderia também induzir resposta inflamatória alérgica no pulmão, expondo os animais à instilação nasal do veneno. Grupos de animais foram submetidos a um desafio intranasal único e avaliados após 24 e 48 (dados não mostrados) ou 72 h (período de máxima resposta). Outro grupo foi exposto a 3 instilações nasais consecutivas e avaliado após 24 h do último desafio (Fig. 9).

Durante os primeiros 40 min após o último desafio com o veneno, os animais expostos a 3 consecutivas instilações nasais apresentaram uma fraca resposta anafilática (escore 1) caracterizada por lambidas ou arranhadura da boca e das orelhas (Fig. 10). Ao contrário, o desafio nasal único não foi capaz de induzir sintomas de anafilaxia (dados não mostrados). Porém, foi observada no BAL dos animais submetidos a ambos os desafios a presença de níveis significativos de histamina (Fig. 11).

Quanto à resposta humoral desencadeada pelo desafio pulmonar, observamos que os animais submetidos ao desafio único ou múltiplo produziram elevados e semelhantes níveis de IgG1 veneno-específicos (Fig. 12A), e baixas quantidades de IgG2a (Fig. 12B). Ainda observamos que ambos os desafios com o veneno (único ou múltiplo) induziram a produção de anticorpos anafiláticos do tipo IgG1 (Fig. 13A) e IgE (Fig. 13B).

Observamos na Figura 14 que o desafio intranasal único desencadeou a passagem de células do interstício pulmonar para o BAL (quase 6 vezes em relação ao controle) assim como manteve um grande número de células no tecido pulmonar (quase 5 vezes em relação ao

controle). Já nos animais submetidos aos múltiplos desafios com o veneno, somente podemos observar a presença células inflamatórias no parênquima pulmonar (quase 5 vezes mais que o controle).

Na Figura **15**, as fotomicrografias revelam a presença de infiltrado de células inflamatórias na região peribronquiolar e perivascular dos animais avaliados após 72 h do desafio único em comparação com o pulmão dos animais controle, indicando migração através da circulação sangüínea para o parênquima pulmonar e subseqüentemente para o espaço alveolar.

Por citometria de fluxo, podemos constatar que a exposição única ao veneno nos animais sensibilizados e avaliados após 72 h gerou a diferenciação com a conseqüente migração para o pulmão de linfócitos T CD4 produtores de IL-5 (10 vezes), IL-4 (4 vezes), IL-17A (quase 2 vezes) e de IFN- γ (quase 4 vezes) em relação ao número de células positivas encontradas nos animais controle (Fig. **16**).

Quando os animais foram expostos aos múltiplos desafios com o veneno, não foi possível observar influxo celular no BAL (Fig. **14A**), porém o veneno induziu aumento no número de células inflamatórias no pulmão (Fig. **14B**), principalmente dispersas ao redor das vênulas, como pode ser visto pelas fotomicrografias (Fig. **17**), indicativo de recente migração através da circulação sangüínea para o parênquima pulmonar.

Além disso, nossos resultados de citometria de fluxo mostram um aumentado número no pulmão de linfócitos T CD4 positivos para as citocinas intracelulares: IL-17A (3 vezes), IL-4 (2 vezes), IL-5 (quase 2 vezes), e IFN- γ (2 vezes) (Fig. **18**).

Estes resultados em conjunto confirmam que a exposição repetida do trato respiratório de animais sensibilizados com o veneno do peixe *T. nattereri* gera uma fraca resposta anafilática com sintomas leves, e é capaz de desencadear reação inflamatória de fase

tardia no pulmão. A inflamação eosinofílica pulmonar desencadeada pela exposição única ao veneno é caracterizada também pelo influxo de linfócitos T CD4 produtores de IL-4 e IL-5; já indivíduos sensibilizados e expostos a múltiplas exposições ao veneno têm influxo de eosinófilos, neutrófilos e de linfócitos T CD4 produtores de IL-4 e IL-17A no pulmão.

Figura 9- Modelo de indução de resposta alérgica tardia pulmonar ao veneno de *Thalassophryne nattereri*. Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados pela injeção de 500 µl (i.p.) contendo 10 µg de veneno adsorvidos em 1,6 mg de hidróxido de alumínio no dia 0. Doses reforços foram administradas nos dias 7 (10 µg/animal) e nos dias 14 e 21 (1 µg/animal). Para desencadeamento da resposta de fase tardia no pulmão, os animais foram submetidos no 35º a um único desafio ou a múltiplos desafios com o veneno pela via intranasal. Durante os primeiros 40 min após o desafio o escore anafilático foi registrado e após 72 ou 24 h, respectivamente, os animais foram mortos para obtenção das amostras para análises.

Alergia pulmonar

BALB/c

Figura 10- Camundongos sensibilizados expostos a múltiplos desafios com o veneno por instilação nasal apresentam sintomas agudos de anafilaxia. Animais BALB/c sensibilizados e submetidos a múltiplos desafios com o veneno foram acompanhados por 40 min para registro dos sintomas anafiláticos. As observações foram registradas e classificadas de acordo com a tabela acima. Os resultados são expressos individualmente e a linha horizontal representa a média dos grupos. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina. Os animais sensibilizados e desafiados somente 1 única vez não apresentaram sintomas anafiláticos (dados não mostrados).

- 0 - nenhum sintoma clínico
- 1 - lambida ou arranhadura com as patas da boca e da orelha
- 2 - atividade diminuída; isolamento; inchaço ao redor da boca e dos olhos
- 3 - períodos de paralisia por mais de 1 min; vômitos
- 4 - nenhuma resposta a estímulos; resposta reduzida ou ausência de resposta à captura
- 5 - Endpoint: tremor; convulsão; morte

Figura 11- A exposição de animais sensibilizados ao desafio intranasal gera a liberação de histamina no BAL. Após 72 ou 24 h dos desafios único ou múltiplos, respectivamente, os animais foram mortos e tiveram o espaço alveolar lavado para obtenção do lavado broncoalveolar (BAL) que foi centrifugado e usado para avaliação dos níveis de histamina por ELISA no sobrenadante. Foi utilizando o Kit de ELISA de competição (IBL International, Germany) e o limite inferior de detecção do método foi de 2,7 ng/ml. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

Figura 12- A exposição a desafio único ou múltiplos com o veneno de animais sensibilizados induz a produção de grande níveis de anticorpos IgG1 veneno-específicos. Após 72 h do desafio único ou 24 h do ultimo desafio de uma serie de 3, os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma e posterior dosagem por ELISA de anticorpos veneno-específicos IgG1 (**A**) e IgG2a (**B**). As barras representam a média de cada grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

Figura 13- Anticorpos anafiláticos IgG1 e IgE estão presentes no plasma dos animais desafiados com o veneno por instilação nasal única ou múltipla. Após 72 h do desafio único ou 24 h do ultimo desafio de uma serie de 3, os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma e posterior dosagem de anticorpos veneno-específicos IgG1 (A) e IgE (B) por PCA em camundongos e em ratos, respectivamente. Os títulos de PCA representam a recíproca da maior diluição do *pool* de plasmas que apresentaram uma reação cutânea positiva com diâmetro > 5 mm. O ensaio foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

Figura 14- O desafio único induz recrutamento celular para o tecido pulmonar e extravasamento para o BAL, enquanto o desafio múltiplo induz a permanência no interstício pulmonar. Após 72 h do desafio único ou 24 h do ultimo desafio de uma serie de 3, os animais foram mortos e tiveram o espaço alveolar lavado para obtenção do lavado broncoalveolar (BAL) que foi centrifugado. O botão celular foi ressuspenso para a contagem total das células com solução de Turk (**A**). Em seguida, o lóbulo maior do pulmão foi processado para recuperação da suspensão celular que foi usada para contagem do número total de leucócitos com solução de Turk (**B**). As barras representam a média do número absoluto de células por animal acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

Figura 15- Presença de infiltrado celular nas regiões peribronquiolar e perivascular de pulmões dos animais expostos ao desafio único com o veneno. Camundongos sensibilizados e desafiados com o veneno por uma única instilação nasal foram mortos após 72 h tiveram o espaço alveolar lavado para coleta do BAL e, em seguida, os pulmões coletados e cortados (5 μm) para processamento histológico e coloração com H&E. Os slides representam um aumento de 10x (slides da esquerda) e 40x (slides da direita) em microscopia óptica. As setas indicam o influxo de leucócitos para as regiões peribronquiolar e perivascular dos pulmões de animais expostos ao veneno (**B**) em relação aos animais controle (**A**).

(A)

(B)

Figura 16- A resposta celular tardia promovida pelo desafio único é acompanhada preferencialmente da presença de linfócitos T produtores de IL-5 e IL-4. Camundongos desafiados com o veneno por uma única instilação nasal foram mortos após 72 h e tiveram o maior lóbulo do pulmão coletado e processado em meio de cultura (contendo soro bovino fetal, hialuronidase, collagenase e DNase I) para obtenção da suspensão celular que foi incubada com anticorpos monoclonais com fluorocromos para a molécula de superfície CD4 e das citocinas intracelulares IL-4, IL-5, IL-17A e IFN- γ . As amostras foram analisadas por citometria de fluxo. As barras representam a média do número absoluto de linfócitos T CD4 positivos para cada citocina acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

Figura 17- Presença de infiltrado celular na região perivascular de pulmões dos animais expostos a múltiplos desafios com o veneno. Camundongos sensibilizados e expostos aos múltiplos desafios com o veneno foram mortos após 24 h e tiveram o espaço alveolar lavado para coleta do BAL e em seguida os pulmões coletados e cortados (5 μ m) para processamento histológico e coloração com H&E. Os slides representam um aumento de 10x (slides da esquerda) e 40x (slides da direita) em microscopia óptica. As setas indicam o influxo de leucócitos para a região perivascular dos pulmões de animais expostos ao veneno (**B**) em relação aos animais controle (**A**).

Figura 18- A resposta celular tardia promovida pelos múltiplos desafios é acompanhada preferencialmente da presença de linfócitos T produtores de IL-17A e IL-4. Camundongos expostos aos múltiplos desafios com o veneno foram mortos após 24 h e tiveram o maior lóbulo do pulmão coletado e processado em meio de cultura (contendo soro bovino fetal, hialuronidase, collagenase e DNase I) para obtenção da suspensão celular que foi incubada com anticorpos monoclonais com fluorocromos para a molécula de superfície CD4 e das citocinas intracelulares IL-4, IL-5, IL-17A e IFN- γ . As amostras foram analisadas por citometria de fluxo. As barras representam a média do número absoluto de linfócitos T CD4 positivos para cada citocina acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

5.5 O veneno desencadeia resposta inflamatória alérgica na pele

Além de reação localizada no pulmão, indivíduos atópicos podem apresentar em resposta a exposição dérmica, reações urticariformes, constituídas de uma pápula (edema) eritematosa, como nas reações alérgicas a picadas de insetos e nos testes cutâneos. Para avaliação do desencadeamento de uma resposta alérgica na pele, animais sensibilizados pela via i.p. foram desafiados no 35^a dia pela fixação no dorso de fita dérmica hipoalergênica embebida em veneno (Fig. **19**). Após 48 h do desafio os animais foram sangrados e mortos para obtenção do sangue, da pele e dos linfonodos drenantes. Não foi possível quantificar os sintomas anafiláticos desencadeados pela exposição epicutânea do veneno uma vez que para a observação das lesões os animais foram mantidos anestesiados.

A resposta humoral foi caracterizada por um aumento na produção de anticorpos IgG1 veneno-específicos (Fig. **20A**) sem a produção de IgG2a (Fig. **20B**). Nos linfonodos drenantes dos animais expostos ao veneno, observamos a presença de principalmente linfócitos T CD4 produtores de IL-5 (quase 10 vezes), IL-4 (quase 7 vezes), IL-17A (quase 6 vezes) como também produtores de IFN- γ (quase 4 vezes) (Fig. **21**). A análise de cortes histológicos da pele revela uma dermatite com edema e infiltrado de células inflamatórias na região subcutânea, consistindo primariamente de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos (Fig. **22**).

Estes resultados em conjunto confirmam que a exposição da pele de animais sensibilizados com o veneno do peixe *T. nattereri* é capaz de gerar resposta humoral com níveis elevados de IgG1 e desencadear dermatite com edema e infiltração na região subcutânea de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T CD4 produtores de IL-5 e IL-4 e IL-17A.

Figura 20- O desafio epicutâneo com o veneno induz a produção de anticorpos IgG1 e não de IgG2a. Camundongos que sofreram no 35º dia o desafio epicutâneo com fitas dérmicas hipoalergênicas embebidas em solução de veneno (20 µg/300µL) foram sangrados pelo plexo oftálmico após 48 h do desafio para obtenção do plasma e posterior dosagem dos anticorpos veneno-específicos IgG1 (**A**) e IgG2a (**B**) por ELISA. As barras representam a média do grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

Figura 21- A resposta celular tardia na pele promovida pelo desafio epicutâneo é acompanhada preferencialmente da presença de linfócitos T produtores de IL-5, IL-4 e IL-17A. Camundongos desafiados pela via epicutânea foram mortos após 48 h para obtenção dos linfonodos drenantes, que foram processados para obtenção da suspensão celular usada para a contagem no número total de células realizada com azul de trypan (**A**). Em seguida, as células foram estimuladas *in vitro* por 4 h com ConA (Concavalina A – 10 µg/mL) na presença de Stop-Golgi contendo Brefeldina A. Após a estimulação, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais com fluorocromos para a molécula de superfície CD4 e das citocinas intracelulares IL-4, IL-5, IL-17A e IFN-γ. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (**B**). As barras representam a média do número absoluto de linfócitos T CD4 positivos para cada citocina acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle/salina.

Figura 22- O desafio epicutâneo com veneno induz intenso infiltrado celular na epiderme dos animais. Camundongos desafiados via epicutânea foram mortos após 48 h para obtenção da pele que foi fixada em pedaços de cortiça e submetida ao corte (5 μ m) e à coloração H&E. Os slides representam um aumento de 10x 1.6 optovar em microscopia óptica. As setas pretas indicam o influxo de leucócitos para a região subcutânea da derme, e observa-se regiões de edema nos animais expostos ao veneno (**B**) em relação aos animais controle (**A**).

(A)

(B)

*5.6 Modulação da anafilaxia e da reação inflamatória tardia induzida pelo veneno de *T. nattereri* por citocinas Th1 ou Th2*

Animais deficientes em determinados genes são uma importante ferramenta para a ciência, principalmente no estudo de mecanismos de desenvolvimento de patologias (alergias, auto-imunidade, infecções, inflamações, rejeição a transplantes, entre outras). Células T CD4⁺ ativadas são a principal fonte das citocinas (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) responsáveis pelo desenvolvimento de uma resposta inflamatória alérgica, tipicamente Th2, com predomínio de um infiltrado eosinofílico e a produção de IgE. A inflamação crônica eosinofílica e anticorpos IgE estão diretamente associados à gravidade da desordem alérgica. Assim, no nosso estudo a utilização de animais deficientes nos genes de IL-4, IFN- γ ou de IL-12 possibilitou o entendimento do papel destes fatores no desencadeamento e na manutenção do processo alérgico induzido pelo veneno.

Diante da eficiência do protocolo de anafilaxia (animais BALB/c são sensibilizados com imunização e desafio pela via i.p.) dependente de anticorpos anafiláticos acompanhada tardiamente de eosinofilia na cavidade peritoneal mediada por citocinas Th2, submetemos os animais C57BL/6 fêmeas (WT) ou deficientes nos genes de IL-4, IL-12 ou de IFN- γ (KO) a esse protocolo (Fig. 23).

Vale lembrar que os animais BALB/c, descritos como o mais susceptíveis ao desenvolvimento de resposta imune do tipo Th2, desenvolvem anafilaxia para o veneno com escore 3 e com níveis de histamina 3 vezes maiores em relação ao controle, com uma produção de anticorpos IgG1 e IgG2a veneno-específicos 10 vezes maior em relação ao controle e com títulos de anticorpos IgG1 e IgE anafiláticos de 40 e 320, respectivamente. A inflamação na resposta de fase tardia nestes animais foi caracterizada pelo influxo de mastócitos e neutrófilos e principalmente por eosinófilos (Fig. 2 a 8).

Na Figura **24** observamos que o desafio com o veneno de animais C57BL/6 *WT* sensibilizados desencadeou o aparecimento de sintomas anafiláticos de escore 1, em relação aos animais controle. A deficiência no gene de IL-4 nos animais aboliu a habilidade do veneno em induzir sintomas anafiláticos, e ao contrário os animais deficientes nos genes de IFN- γ ou de IL-12 apresentaram um escore aumentado (2) dos sintomas anafiláticos em relação aos animais C57BL/6 *WT* desafiados com o veneno. Em conjunto podemos dizer que os sintomas leves de anafilaxia são positivamente regulados por IL-4 e negativamente regulados por IFN- γ e IL-12.

Na Figura **25** verificamos no lavado da cavidade peritoneal dos animais C57BL/6 *WT* desafiados com o veneno a presença de grande quantidade de histamina em relação aos animais controle (3 vezes mais). Já nos animais *KO* de IFN- γ desafiados com o veneno os níveis de histamina não foram estatisticamente diferentes dos animais controle. Ao contrário, os animais *KO* de IL-12 desafiados com o veneno apresentaram níveis de histamina menores que os animais controle (que liberaram em resposta à salina uma grande quantidade de histamina). Nossos resultados mostram que a produção de histamina induzida pelo veneno é regulada positivamente pelas 3 citocinas analisadas, principalmente por IL-4 e IL-12.

IL-4 produzida por linfócitos Th2 modula diversas características da resposta alérgica como a eosinofilia, a mastocitose e a produção de anticorpos IgG1 e IgE são usados para definir a resposta humoral dependente de Th2. Já IFN- γ modula a produção de IgG2a é a marca da resposta humoral Th1. Nossos resultados apresentados na Figura **26** mostram que animais C57BL/6 *WT* sensibilizados e desafiados com o veneno produziram anticorpos veneno-específicos IgG1, 2 vezes mais em relação ao controle (Fig. **26A, C, E**) e quase 50 vezes mais IgG2a em relação ao controle (Fig. **26B, D, F**). Porém a deficiência no gene de IL-4 nestes animais diminuiu a produção de IgG1 e ao contrário intensificou a produção de IgG2a (Fig. **26A e 26B**). A ausência de IFN- γ não alterou a produção de IgG1, porém diminuiu drasticamente a

síntese de IgG2a, em comparação aos animais C57BL/6 *WT* desafiados com o veneno (Fig. **26C** e **26D**). A deficiência de IL-12 também não alterou a grande quantidade de IgG1 induzida pelo veneno (Fig. **26E**) e promoveu uma grande diminuição na síntese de IgG2a (Fig. **26F**). Em conjunto podemos dizer que ocorre uma regulação positiva de IL-4 na síntese de IgG1 induzida pelo veneno e negativa na síntese de IgG2a; e ao contrário, IFN- γ e IL-12 não participam na modulação da produção de IgG1 e são essenciais na produção de IgG2a induzida pelo veneno

Em seguida na Figura **27** observamos que o desafio com o veneno não induziu a produção de IgG1 anafilático nos animais selvagens C57BL/6 *WT* sensibilizados, porém nos animais *KO* de IFN- γ (Fig. **27B**) ou de IL-12 (Fig. **27C**) o veneno conseguiu promover a síntese de baixos títulos deste anticorpo. Quanto aos anticorpos IgE anafiláticos, o desafio com o veneno não promoveu a sua produção em nenhum grupo de animal imunizado, C57BL/6 *WT* ou *KO* (dados não-mostrados). Nossas observações em conjunto mostram que primeiramente animais da linhagem C57BL/6 *WT* não são bons respondedores quanto à produção de anticorpos IgG1 e IgE anafiláticos veneno-específicos se comparados aos animais da linhagem BALB/c, e ainda que IFN- γ e IL-12 regulam negativamente a sua produção.

Os resultados apresentados na Figura **28** mostram que o significativo recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal induzido pelo desafio com o veneno em animais C57BL/6 *WT* sensibilizados foi caracterizado pelo influxo de macrófagos, mastócitos e principalmente de eosinófilos e neutrófilos. Já a ausência funcional de IL-4 (Fig. **28A**) ou de IL-12 (Fig. **28E**) promoveu diminuição do influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais *KO* desafiados com o veneno e, ao contrário, a ausência de IFN- γ nos animais permitiu um maior influxo de células para o peritônio em resposta ao veneno (Fig. **28C**). A análise por citometria de fluxo demonstra que animais *KO* de IL-4 tiveram em resposta ao desafio com o veneno um maior influxo de macrófagos e linfócitos B, e ao contrário, uma diminuição drástica do influxo de eosinófilos, neutrófilos e mastócitos (Fig. **28B**). A deficiência no gene de IFN- γ permitiu que o

veneno induzisse um aumentado influxo de macrófagos e em menor grau de mastócitos, e diminuição no influxo de eosinófilos e principalmente de neutrófilos (Fig. **28D**). Por fim, animais *KO* de IL-12 tiveram em resposta ao veneno uma drástica diminuição do recrutamento de macrófagos e linfócitos B e principalmente de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos para a cavidade peritoneal (Fig. **28F**). Nossos dados em conjunto mostram que as células típicas do infiltrado inflamatório da resposta de fase tardia (eosinófilos e neutrófilos) induzidas pelo veneno são positivamente reguladas pelas citocinas IL-4 e IL-12 e parcialmente por IFN- γ ; e que os mastócitos são regulados positivamente por IL-4 e IL-12 e negativamente por IFN- γ . Ainda, os linfócitos B são regulados negativamente por IL-4 e positivamente por IL-12, e os macrófagos negativamente regulados por IL-4 e IFN- γ e positivamente regulado por IL-12.

Sabemos que a área rica em linfócitos B da zona marginal do baço é postulada como uma interface entre a circulação e o sistema imune (Martin e Kearney, 2002; Weill et al., 2009), tornando-o capacitado para montar respostas rápidas e vigorosas a antígenos provenientes da circulação. Logo, o hospedeiro responde a diversos antígenos induzindo a proliferação e diferenciação das células esplênicas com a produção de diversos mediadores solúveis. Nos resultados apresentados na Figura **29** observamos o número de células presentes neste compartimento como um reflexo da ativação e proliferação celular. Nossos resultados mostram que o desafio com o veneno dos animais C57BL/6 *WT* sensibilizados induziu um aumentado número de células em relação aos animais controle. Os animais *KO* de IL-4 sensibilizados tiveram ausência de resposta proliferativa no baço após o desafio com o veneno (Fig. **29A**), e ao contrário, os animais *KO* de IFN- γ (Fig. **29B**) ou de IL-12 (Fig. **29C**) apresentaram uma maior resposta de proliferação, em relação aos grupos controle ou C57BL/6 *WT* sensibilizados. Em conjunto podemos dizer que IL-4 exerce uma regulação positiva na proliferação celular no baço e que ambas as citocinas IFN- γ e IL-12 regulam negativamente a proliferação induzida pelo veneno neste compartimento.

Figura 23- Regulação por citocinas da anafilaxia induzida pelo veneno de *Thalassophryne nattereri*. Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) ou deficientes (KO) nos genes das citocinas IL-4, IL-12 ou IFN- γ , fêmeas foram imunizados pela injeção de 500 μ l (i.p.) contendo 10 μ g de veneno adsorvidos em 1,6 mg de hidróxido de alumínio no dia 0. Doses reforços foram administradas nos dias 7 (10 μ g/animal) e nos dias 14 e 21 (1 μ g/animal). No 35º dia após a primeira imunização, os animais foram desafiados pela via intraperitoneal com o veneno (10 μ g/animal). Durante os primeiros 40 min após o desafio o escore anafilático foi registrado e após 48 h os animais foram mortos para a realização de diversas análises.

Anafilaxia

C57BL/6 WT x C57BL/6 KO IL-4, KO IL-12 ou KO IFN- γ

Figura 24- Os sintomas anafiláticos induzidos pelo veneno são positivamente regulados pela citocina IL-4 e negativamente regulados por IL-12 e IFN- γ . Animais C57BL/6 WT ou KO de IL-4, IL-12 ou IFN- γ foram submetidos ao protocolo de anafilaxia e durante os primeiros 40 min do desafio foram avaliados quanto ao desenvolvimento de sintomas de anafilaxia de acordo com tabela descrita acima. Os resultados são expressos individualmente e a linha horizontal representa a média dos grupos. * $p < 0,05$ em relação ao controle da respectiva linhagem; # $p < 0,05$ em relação ao grupo C57BL/6 WT-veneno.

Escore dos sintomas anafiláticos

- 0 - nenhum sintoma clínico
- 1 - lambida ou arranhadura com as patas da boca e da orelha
- 2 - atividade diminuída; isolamento; inchaço ao redor da boca e dos olhos
- 3 - períodos de paralisia por mais de 1 min; vômitos
- 4 - nenhuma resposta a estímulos; resposta reduzida ou ausência de resposta à captura
- 5 - Endpoint: tremor; convulsão; morte

Figura 25- A liberação de histamina induzida pelo veneno é positivamente dependente de IL-4 e IL-12 e parcialmente de IFN- γ . A histamina foi dosada no sobrenadante do lavado peritoneal obtido após 48 h do desafio dos animais deficientes IL-4 (A), IFN- γ (B) e IL-12 (C), assim como nos animais C57BL/6 WT. Foi utilizado o Kit de ELISA de competição (IBL International, Germany) e o limite inferior de detecção do método foi de 2,7 ng/ml. * $p < 0,05$ em relação ao controle da respectiva linhagem; # $p < 0,05$ em relação ao grupo C57BL/6 WT-veneno.

Figura 26- IL-4 regula positivamente a produção de anticorpos específicos IgG1 e negativamente a produção de IgG2a, sendo esta última dependente da ação positiva de IL-12 e IFN- γ . Após 48 h do desafio com o veneno de *T. nattereri* os animais C57BL/6 WT ou KO de IL-4, KO de IL-12 ou KO de IFN- γ foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma e posterior dosagem dos anticorpos veneno-específicos IgG1 (**A**, **C**, **E**) e IgG2a (**B**, **D**, **F**) por ELISA. As barras representam a média do grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle da respectiva linhagem; # $p < 0,05$ em relação ao grupo C57BL/6 WT-veneno.

Figura 27- IL-12 e IFN- γ regulam negativamente a produção de anticorpos anafiláticos dos anticorpos IgG1 veneno-específicos. Após 48 h do desafio com o veneno de *T. nattereri* os animais C57BL/6 WT ou KO de IL-4 (A), KO de IL-12 (C) ou KO de IFN- γ (B) foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do plasma e posterior dosagem dos anticorpos veneno-específicos IgG1 por PCA em camundongos. Os títulos de PCA representam a recíproca da maior diluição do *pool* de plasmas que apresentaram uma reação cutânea positiva com diâmetro > 5 mm. O ensaio foi realizado em triplicata. * p < 0,05 em relação ao controle da respectiva linhagem; # p < 0,05 em relação ao grupo C57BL/6 WT-veneno.

Figura 28- Regulação diferencial do influxo celular induzido pelo veneno pelas citocinas IL-4, IFN- γ ou IL-12. Após 48 h do desafio com o veneno de *T. nattereri* os animais WT ou KO de IL-4, IL-12 ou IFN- γ foram mortos para lavagem da cavidade peritoneal e obtenção da suspensão celular e contagem do número total de leucócitos por Turk (**A, C, E**) e diferencial por citometria de fluxo com o uso de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos (**B, D, F**). As barras representam a média do número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle da respectiva linhagem; # $p < 0,05$ em relação ao grupo C57BL/6 WT-veneno.

Figura 29- A citocina IL-4 exerce uma regulação positiva e IFN- γ e IL-12 regulam negativamente a proliferação das células no baço. Quarenta e oito horas após o desafio os animais IL-4 KO (A), IFN- γ KO (B) ou IL-12 KO (C) foram mortos e o baço retirado para obtenção da suspensão celular que foi usada para contagem do número total de células por azul de trypan. As barras representam a média de dois ensaios independente acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle da respectiva linhagem; # $p < 0,05$ em relação ao grupo C57BL/6 WT-veneno.

Em conjunto podemos assim resumir a modulação exercida pelas citocinas da anafilaxia induzida pelo veneno em animais C57BL/6 WT:

Parâmetros	Citocinas		
	IL-4	IFN- γ	IL-12
Sintomas anafiláticos	+	-	-
Histamina	+	+	+
IgG1 veneno-específico (ELISA)	+	Não modula	Não modula
IgG2a veneno-específico (ELISA)	-	+	+
IgG1 veneno-específico (PCA)	Não determinado	-	-
Total de células peritônio	+	-	+
Eosinófilos e neutrófilos	+	+	+
Mastócitos	+	-	+
Linfócitos B	-	Não modula	+
Macrófagos	-	-	+
Proliferação celular	+	-	-

5.7 Identificação das proteínas do veneno de *T. nattereri* por anticorpos IgG de camundongos alérgicos

A caracterização das toxinas majoritárias encontradas na glândula venenífera do peixe *T. nattereri* demonstrou a existência das seguintes toxinas: a família das Natterinas, constituída por 5 toxinas, Natterinas 1,2,3,4 e P, na faixa de massa molecular de 30-45 kDa, e a Nattectina com massa molecular de 15 kDa, que apresenta homologia com lectinas do tipo C (Fig. 30 - banda 1). Nesta etapa investigamos se as proteínas (Natterinas ou Nattectina) são responsáveis pela indução da produção de anticorpos anafiláticos IgG1 e IgE em camundongos alérgicos realizando o ensaio de *western blot* com um *pool* dos plasmas dos camundongos BALB/c com anafilaxia.

Na Figura 30 observamos que anticorpos IgG presentes nos plasmas de camundongos BALB/c com anafilaxia (banda 2) reconhecem com forte intensidade as proteínas de massa molecular em torno de 38 kDa, descritas como a família Natterinas. Os ensaios para determinação de reconhecimento das proteínas do veneno por anticorpos IgE não geraram resultados positivos, mesmo tendo sido usados segundo-anticorpo anti-IgE de camundongos em diferentes concentrações e de diferentes procedências (dados não mostrados). Este resultado indica que para a geração de anticorpos IgG em camundongos as Natterinas parecem ser os antígenos imunodominantes.

Figura 30- Reconhecimento de proteínas do veneno de *T. nattereri* por anticorpos IgG veneno-específicos presentes no plasma de camundongos alérgicos. Plasmas obtidos do sangue de animais BALB/c com anafilaxia induzida pelo veneno de *T. nattereri* foram usados em ensaios de *western blot* para detecção do reconhecimento específico de proteínas do veneno (**A**). Para isto o veneno (10 µg) de *T. nattereri* (banda 1) foi submetido à corrida em gel de SDS-PAGE a 12% e em seguida as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e posteriormente incubadas com o *pool* dos plasmas de camundongos (banda 2). As membranas foram incubadas com segundo anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com HRP e reveladas por quimioluminescência ECL. O grupo de proteínas revelado corresponde à família Natterinas que apresentam massa molecular em torno de 38 kDa conforme padrão de massa molecular (banda 3). A caracterização das toxinas majoritárias encontradas no veneno foi realizada por biologia molecular (**B** - transcriptoma da glândula venenífera do peixe e expressão dos cDNAs que codificam as toxinas).

	Massa Molecular	pI	% na glândulas (Biblioteca cDNA)
Natterina 1	37.054,77	8,52	8,5
Natterina 2	39.370,71	8,90	3,5
Natterina 3	37.905,31	6,77	0,8
Natterina 4	41.374,28	7,73	1,7
Nattectina	15.094,09	9,73	0,8

6 DISCUSSÃO

A associação entre reação anafilática e venenos de origem animal é historicamente conhecida e amplamente divulgada quando se trata de venenos de abelhas (família Apidae), vespas (família Vespidae) e formigas (família Formicidae). Esses venenos são extensamente estudados pelos distúrbios alérgicos desencadeados, mediados por IgE (Klotz et al., 2007); e representam 34% dos casos de anafilaxia notificados (Bilò et al., 2005). Venenos de cnidários como *Chrysaora quinquecirrha* conhecida como urtiga do mar é um dos poucos venenos de organismos marinhos identificados como causadores de anafilaxia em humanos (Burnett; Calton, 1986; Burnett; Calton, 1987; Edwards Jr; Edwards, 2000).

Venenos de animais aquáticos são fonte potencial de toxinas uma vez que esses animais vivem em um ambiente altamente competitivo e a produção de toxinas é uma estratégia importante que garante sua sobrevivência. Assim, para defender-se ou defender seu território, estes animais produzem um número enorme de metabólitos, cujas combinações resultam em uma grande variedade de estruturas químicas e moléculas complexas como peptídeos e proteínas com propriedades químicas e farmacológicas diferentes das apresentadas pelos venenos de animais terrestres (Russell et al., 1971).

Os peixes de importância toxinológica podem ser agrupados em venenosos ou peçonhentos. Estes últimos apresentam glândulas especializadas na secreção de substâncias tóxicas e um aparato especializado (espinhos ou acúleos canaliculados ou não) na inoculação do veneno. Embora os acidentes causados por esses organismos apresentem baixa incidência devido ao seu habitat e não causam mortalidade em humanos, eles podem causar acidentes graves com diversos graus de morbidade e não possuem tratamento específico. O Brasil não possui soros anti-venenos capazes de neutralizar as principais atividades tóxicas induzidas por venenos de peixes. Um crescente número de acidentes pelo peixe peçonhento *Thalassophryne*

nattereri vem sendo notificado em algumas regiões do Brasil: Salvador (Almeida et al., 1989), Alagoas (Auto, 1992; Fonseca; Lopes-Ferreira, 2000), Fortaleza (Monteiro et al., 2003), Natal e Pará (Haddad Jr. et al., 2003) e os estudos toxinológicos, bioquímicos e farmacológicos vêm sendo realizados por nosso grupo desde 1998. Um dos principais sintomas decorrentes do envenenamento provocado pelo peixe *T. nattereri* é a dor que se instala imediatamente após o acidente e é de grande intensidade segundo relato das vítimas. Eritema e edema também são notados de imediato com eflorescência de bolhas com conteúdo seroso. Estes acidentes evoluem para necrose, que na maioria das vezes permanece por um longo período de tempo sem que haja um eficiente processo de cicatrização (Fonseca; Lopes-Ferreira, 2000).

Os trabalhos mais recentes (Grund et al., 2009; Grund et al., 2012) permitiram identificar as ações do veneno de *T. nattereri* no sistema imune de camundongos como sendo capaz de induzir e sustentar uma resposta humoral Th2 crônica, à semelhança das desordens alérgicas em indivíduos atópicos que são crônicas e Th2 mediadas. A análise deste quadro nos levou a questionar se o veneno também é capaz de desencadear sintomas alérgicos de anafilaxia ou resposta inflamatória tardia localizada em órgãos alvos como o pulmão ou a pele, assim como fazem outros venenos de animais como abelhas, formigas, serpentes ou cnidários.

Diante do exposto o objetivo principal deste trabalho foi determinar se o veneno do peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri* conhecido por possuir proteínas com atividades tóxicas possui também proteínas alergênicas capazes de induzir reação anafilática em camundongos ou inflamação alérgica tardia no pulmão ou na pele. Esse é o primeiro estudo que descreve a indução de reação anafilática por veneno de peixe peçonhento acompanhado da caracterização detalhada dos diversos mediadores solúveis e celulares envolvidos no processo.

Nossos dados confirmam que animais BALB/c sensibilizados com o veneno desenvolvem sintomas graves de anafilaxia (escore 3). O quadro sintomático presente na fase

aguda pode ser resultado da participação de histamina e anticorpos anafiláticos IgG1 e IgE. Os sintomas da fase aguda declinam e são substituídos após 48 h por uma resposta inflamatória de fase tardia caracterizada pelo influxo de mastócitos e neutrófilos e principalmente por eosinófilos (Fig. 2 a 8). Assim, em conjunto estes resultados nos permitem concluir que o veneno possui proteínas alergênicas capazes de desencadear um processo alérgico, caracterizados por anafilaxia mediada por IgE e inflamação eosinofílica de fase tardia dependente de citocinas Th2.

De maneira semelhante, Wang e colaboradores (2010) mostraram para alérgenos do amendoim que a sensibilização de camundongos BALB/c com o extrato bruto (500 µg) usando o mesmo protocolo de sensibilização usado por nós, induz após 30 min do último desafio por gavagem, sintomas anafiláticos de escore 3. Por outro lado, camundongos sensibilizados com o principal alérgeno do camarão (tropomiosina a 1 mg/animal) usando protocolo de sensibilização semelhante ao usado neste estudo, ou seja, associado a um adjuvante (toxina colérica) e injetado pela via i.p. nos dias 0, 12, 19 e 26 desenvolvem fracos sintomas imediatos de anafilaxia (escore 1) após desafio i.p. (Leung et al., 2008). Estes dados mostram que variados escores dos sintomas de anafilaxia e parâmetros aplicados à avaliação da sensibilização são observados para diferentes tipos de protocolos com alérgenos de diferentes origens (veneno de peixe, amendoim, camarão).

Diversos modelos experimentais com roedores foram usados para investigar os mecanismos imunes que controlam a resposta alérgica ao nematódeo *Anasakis simplex*, parasita presente em vários peixes comestíveis. Um modelo murino de anafilaxia em camundongos sensibilizados pela via i.p. com 100 µg do extrato do parasita e desafio intravenoso ou oral confirmou anafilaxia de escore 4 com um padrão misto Th1/Th2 de citocinas somente nos animais com anafilaxia induzida pelo desafio intravenoso. Este dado é semelhante aos nossos quando também demonstramos que o desafio intravenoso com o

veneno de *T. nattereri* induz em camundongos BALB/c sensibilizados sintomas anafiláticos de grau intenso – escore 4 (dados não mostrados).

A anafilaxia induzida em camundongos BALB/c pelo veneno promoveu uma grande produção de IgE e de IgG1 veneno-específicos, demonstrando a ativação tanto da via clássica (IgE-FcεRI) quanto da via alternativa (IgG1-FcγRIII). O papel de IgE na ativação clássica de mastócitos e no desencadeamento da reação imediata está bem estabelecido. Já os anticorpos IgG1 são também de grande importância na anafilaxia cutânea passiva e na resposta anafilática sistêmica em camundongos (Harada et al., 1991). A transferência passiva de anticorpos IgG1 leva ao desenvolvimento de sinais anafiláticos, como taquicardia, queda da temperatura corporal, sintomas associados à ligação de receptores FcγRIII em mastócitos (Miyajima et al., 1997; Finkelman, 2007).

Ainda podemos sugerir com base nestes resultados que além da indução da desgranulação e liberação de histamina, a ativação de mastócitos por anticorpos IgE veneno-específicos pode favorecer o desencadeamento ou a amplificação da resposta inflamatória tardia, uma vez que a sua ligação aos receptores FcεRI, ou na forma de imunocomplexos aos receptores FcγRIV (Mancardi et al., 2008) leva à síntese de citocinas pelos mastócitos que promoverão o desenvolvimento e o recrutamento de eosinófilos, a diferenciação de células Th2, a indução da produção de IgE por linfócitos B (Schleimer et al., 1986; Gordon et al., 1990; Broide et al., 1991; Kung et al., 1995).

Poderíamos aqui atribuir a síntese de IgE, IgG1 e a eosinofilia observada nos animais sensibilizados pela via intraperitoneal à ação do adjuvante hidróxido de alumínio, usado no dia 0 da imunização, uma vez que já foi demonstrado que ele induz resposta inflamatória Th2 caracterizada pelo acúmulo de eosinófilos no sítio da injeção do antígeno. Eosinófilos pela produção de IL-4, induzem o aumento nos níveis de moléculas de MHC classe II e ativação de linfócitos B promovendo a resposta aguda de IgM. O hidróxido de alumínio também induz a

conversão de monócitos em células apresentadoras de antígenos (DCs) (Kool et al., 2008). Porém, McKee e colaboradores (2009) alteraram esta visão usando um modelo de imunização intraperitoneal com diferentes formas hidróxido de alumínio. Eles demonstraram que as células do infiltrado peritoneal induzido pelos adjuvantes como eosinófilos, macrófagos ou mastócitos são dispensáveis para a resposta de células B com produção de anticorpos anafiláticos e para a resposta T-dependente. Os dados destes autores confirmam a ação do hidróxido de alumínio em macrófagos e mastócitos, ativando o inflamasoma e levando ao infiltrado celular sem, no entanto, ser necessário para mediar a resposta imune adaptativa Th2 polarizada. Sendo assim, a imunização pela injeção intraperitoneal de veneno adsorvido em hidróxido de alumínio pode ter provocado uma maior ativação de células inatas, porém os altos níveis de anticorpos IgG1 e IgE veneno-específicos são resultantes da ação do veneno e não do adjuvante.

O processo alérgico induzido pelo veneno foi caracterizado por sintomas agudos de anafilaxia e por inflamação eosinofílica de fase tardia, dirigida por eotaxina, IL-5 e IL-17A produzidos por clones de linfócitos Th2 e Th17. IL-5 é produzida por linfócitos Th2 e desempenha importante papel na diferenciação e no amadurecimento dos eosinófilos e juntamente com a eotaxina promove a rápida expansão de progenitores eosinofílicos na medula óssea e, maduros podem migrar para o local inflamado (Mould et al., 1997; Palframan et al., 1998). Células Th17 compõem um subtipo de células TCD4⁺ distintas das já conhecidas Th1 e Th2. A diferenciação deste subtipo de células Th é dependente da ativação de IL-6–STAT3 e do fator ROR γ t (*transcriptional regulator retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t*). Têm habilidade de produzir IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 e expressam o receptor para IL-23. Na asma é a citocina responsável pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o pulmão, aumentando a sobrevivência destas células (Sergejeva et al., 2005). Embora a presença de IL-17A seja diretamente associada a linfócitos Th17, Wang e colaboradores (2010) demonstraram a plasticidade de células Th2 de memória, as células patogênicas essenciais na

promoção da exacerbação da inflamação alérgica. Estes autores descreveram que células Th2 efectoras/memórias co-expressam os fatores de transcrição GATA3 e ROR γ T, além disso, co-produzem citocinas de Th2 e IL-17 sob estímulo inflamatório, como um microambiente rico nas citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-21 além de recrutar um perfil misto de células.

Já a presença de IgG2a (produzido em função de IFN- γ) juntamente com o influxo de neutrófilos e macrófagos indica que durante a evolução da inflamação alérgica induzida pelo veneno linfócitos Th1 também foram diferenciados e ativados, favorecendo uma piora da inflamação de maneira semelhante ao que ocorre em indivíduos asmáticos resistentes ao tratamento com corticóides que além de eosinófilos possuem neutrófilos e macrófagos no pulmão (Liu et al., 2006; Liu et al., 2004; Macdowell e Peters, 2007; Green et al., 2002).

As reações alérgicas podem se manifestar em diferentes órgãos dependente da via de exposição ao alérgeno, particularmente na pele, no trato respiratório e no trato gastrointestinal. Dados clínicos de pacientes com alergia alimentar revelam um aumento na incidência de reações dermatológicas (Sicherer; Sampson, 1999; Hsieh et al., 2003). A pele é a interface entre o corpo e o ambiente, providenciando a primeira linha de defesa contra agressões químicas e físicas. Controlar a intensidade da resposta na pele é o maior desafio do sistema imune, uma vez que é um órgão que constantemente está em contato direto com patógenos potenciais. Assim ambos os mecanismos, de defesa e de tolerância, são essenciais para manter a homeostasia do indivíduo. A pele humana tem dois compartimentos principais: a epiderme e a derme. A epiderme tem uma histologia complexa composta por quatro laminae de diferentes tipos celulares além da presença de células de Langerhans e raros linfócitos T CD8⁺. Na derme, embora mais simples quanto à histologia (colágeno, fibras elásticas) é o local residente de importantes células imunes responsáveis pelo desenvolvimento de resposta contra patógenos que rompem a barreira física desse órgão. Entre as células imunes estão: as células dendríticas (dermal e plasmocitóide), célula T CD4⁺ dos subtipos Th1, Th2 e Th17,

Natural Killer (NKT), macrófagos e mastócitos. É intensamente irrigada por vasos sanguíneos e linfáticos através dos quais ocorre o trânsito das células (Nestle et al., 2009).

Também vem sendo demonstrado que a exposição aerossol ou dérmica de bio-produtos derivados de peixes em profissionais da indústria da pesca favorece o desenvolvimento de alergia ocupacional, com quadros de rinite, asma e dermatite (Jeebhay et al., 2001; Weytjens et al., 1999). A exposição intranasal com o parasita de peixes o nematódeo *Anasakis* (responsável por alergias alimentares e ocupacionais), revela que o desafio nasal de animais sensibilizados por via intraperitoneal com o extrato de *Anasakis* resulta em profunda inflamação eosinofílica pulmonar, hiperreatividade pulmonar (AHR) e dermatite. A larva infectante L3 induz uma forte resposta Th2 sistêmica e localizada no pulmão com a síntese das citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e ainda de IFN- γ (Nieuwenhuizen et al., 2006).

Nossos resultados corroboram os dados da literatura que mostram que reações alérgicas podem se manifestar na pele ou no trato respiratório independente da rota primária de sensibilização. Podemos sustentar a visão a partir de nossos dados experimentais em camundongos que indivíduos acidentados e conseqüentemente sensibilizados com as proteínas alergênicas do veneno do peixe *T. nattereri* quando re-expostos ao veneno podem desenvolver sintomas leves de anafilaxia e apresentarem inflamação eosinofílica de fase tardia no pulmão e na pele, fenômeno IgE/Th2 dependente.

O balanço entre células Th1 e Th2 leva a uma resposta imune apropriada e direcionada para tipos específicos de infecções patogênicas. A resposta Th1, induzida por bactérias ou infecções virais, é dirigida pela citocina IL-12 e por fatores de transcrição como STAT4 e T-bet (Lighvani et al., 2001; Szabo et al., 2000). A diferenciação de células Th2, a qual está predominantemente associada a infecções por parasitas helmínticos é dirigida por citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, IL-18 e IL-33. Existem evidências consideráveis que o fator TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) também participa na diferenciação de linfócitos Th2. O fator de

transcrição GATA3, c-maf e NFATc são conhecidos por controlar a diferenciação destas células (Neurath et al., 2002; Zhu et al., 2006). A citocina IL-4 é essencial na doença alérgica, sendo responsável por direcionar a diferenciação de células T para o perfil Th2, além de promover mudança de classe de anticorpos para IgE e IgG1 (Berton et al., 1995). Diversos trabalhos mostram que IFN- γ é capaz de controlar o desencadeamento da resposta alérgica Th2 ou minimizar a inflamação induzida pelo desafio com o alérgeno. Infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, mediada por linfócitos Th1, é capaz de prevenir o desenvolvimento de asma experimental, efeito esse dependente das altas concentrações de IFN- γ no pulmão (Von Hertzen et al., 1999; Erb et al., 1998).

Alterações nas respostas Th1 ou Th2 resultam em falhas no controle de patógenos (Kawakami, 2003) e podem causar respostas inapropriadas para antígenos inócuos ou próprios resultando em respostas exacerbadas como, por exemplo, doenças autoimunes e as alergias (Capron et al., 2004).

Uma vez que citocinas são componentes importantes que participam de várias etapas no desenvolvimento, manutenção e na exacerbação de respostas alérgicas avaliamos a participação de IL-4, IFN- γ e IL-12 na anafilaxia e na inflamação alérgica tardia induzida pelo veneno. O uso de camundongos geneticamente modificados é uma ferramenta riquíssima para estudos dos mecanismos finos envolvidos na resposta. Nessa etapa utilizamos animais deficientes dos genes responsáveis pela expressão dessas citocinas, no entanto o fundo genético desses animais é C57BL/6 fato que acrescentou uma nova variável a esse estudo. Conhecidamente o fundo genético dos animais experimentais pode alterar tanto a intensidade quanto o direcionamento da própria resposta desencadeada a um mesmo antígeno. Em modelos de asma experimental camundongos da linhagem BALB/c apresentam maior suscetibilidade ao desenvolvimento de resposta imune do tipo Th2 (McIntire et al., 2001;

Boyce; Austin, 2005) e AHR quando comparados aos animais C57BL/6 que por sua vez apresentam maior inflamação pulmonar (Gueders et al., 2009).

Vale lembrar que os animais BALB/c desenvolveram anafilaxia para o veneno com escore 3 e com níveis de histamina 3 vezes maiores em relação ao controle, com uma produção de anticorpos IgG1 e IgG2a veneno-específicos 10 vezes maior em relação ao controle e com títulos de anticorpos IgG1 e IgE anafiláticos de 40 e 320, respectivamente. A inflamação na resposta de fase tardia nestes animais foi caracterizada pelo influxo de mastócitos e neutrófilos e principalmente por eosinófilos e pelos mediadores IL-5, IL-17A e eotaxina (Fig. 2 a 8).

Nossas observações mostram primeiramente que animais da linhagem C57BL/6 *WT* não são bons respondedores quanto à produção de anticorpos IgG1 e IgE anafiláticos veneno-específicos se comparada à produção induzida pelo veneno nos animais da linhagem BALB/c, e ainda que IFN- γ e IL-12 regulam negativamente a sua produção. Ainda confirmamos que a anafilaxia de escore 1 induzida pelo veneno nestes animais C57BL/6 é positivamente regulada pela citocina IL-4 e negativamente regulada por IL-12 e IFN- γ .

Ainda demonstramos que IL-4 regula positivamente a produção de histamina e de IgG1, e o influxo de eosinófilos, neutrófilos e mastócitos e negativamente o influxo de linfócitos B e macrófagos. Quanto aos animais deficientes em IL-12 e IFN- γ , podemos dizer que ambas as citocinas regulam positivamente o influxo de eosinófilos e neutrófilos, e IL-12 regula positivamente também o influxo das demais células (mastócitos, linfócitos B e macrófagos). Já IFN- γ regula negativamente o influxo de macrófagos e mastócitos.

A regulação positiva por IL-4, IL-12 e IFN- γ de importantes células responsáveis pela alergia como eosinófilos, e de mastócitos por IL-4 e IL-12 confirma como citocinas produzidas por diferentes clones de linfócitos T (Th2 e Th1) podem desempenhar (dependendo da dose ou

do tempo de produção, por exemplo) papéis co-adjuvantes na manutenção e na exacerbação de manifestações alérgicas.

Reforçando nossos resultados encontramos o trabalho de Koch e colaboradores (2005) que demonstraram o papel de IFN- γ na regulação positiva da resposta alérgica, quando animais transgênicos que super-expressam IFN- γ localmente no pulmão, apresentam após o desafio com OVA um aumento na produção de IL-5 e IL-13 acompanhado do aumento de eosinofilia no BAL. A citocina IL-12 tem um importante papel na geração de linfócitos Th1 possivelmente pelo *feedback* positivo que exerce sobre o IFN- γ , podendo assim, suprimir respostas com perfil Th2. Porém, os dados de Kuipers e colaboradores (2004) mostram que o desafio de animais sensibilizados com alérgeno e desafiados com DC que super-expressam IL-12 apresentam aumento na eosinofilia pulmonar com aumentada produção de IL-5 e IL-13 no BAL. A contribuição da IL-12 na regulação positiva da inflamação alérgica pulmonar experimental foi descrita também utilizando anticorpo monoclonal, onde o bloqueio da IL-12 durante os desafios e não na sensibilização dos animais reduziu significativamente a AHR e o número de eosinófilos e linfócitos no BAL (Meyts et al., 2006). Já na dermatite atópica dependente de IgE foi observada uma correlação positiva entre os altos níveis de IL-12 e o estado de ativação de linfócitos Th2 em crianças (Piancatelli et al., 2008). Ainda, Zhang e colaboradores (2007) investigando a influência da IL-12 na expressão de receptores do tipo PAR (*proteinase-activated receptor*), importantes na ativação de mastócitos por proteases derivadas de alérgenos, e conseqüentemente na síntese de IL-4 por essas células em ensaios *in vitro* utilizando células P815 e triptase e/ou tripsina, observaram que a IL-12 é capaz de induzir a síntese de IL-4 por mastócitos via Akt e ERK.

No entanto, o mecanismo pelo qual a IL-12 e IFN- γ são capazes de regular a resposta alérgica desencadeada pelo veneno regulando positivamente o influxo de neutrófilos ainda resta ser investigado com maiores detalhes. Precisamos averiguar se outros antígenos

presentes no veneno, além dos alérgenos, podem induzir a neutrofilia mediante ativação de receptores TLR (*Toll like receptors*) com produção de KC (*keratinocyte chemokine*) e MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*), como é descrito para a exacerbação da alergia induzida por infecções bacterianas (Rodriguez et al., 2005).

Finalmente, com o intuito de identificar quais as proteínas presentes no veneno de *T. nattereri* são responsáveis pela indução da produção de anticorpos anafiláticos realizamos o ensaio de *western blot* com o *pool* de plasma dos animais BALB/c sensibilizados e desafiados i.p. com o veneno. Nossos resultados são interessantes e mostram que anticorpos IgG presentes nos plasmas de camundongos BALB/c com anafilaxia (Fig. 30 - banda 2) reconhecem somente e com grande afinidade as proteínas de massa molecular em torno de 38 kDa, descritas no veneno como a família Natterinas (Magalhães et al., 2005; Magalhães et al., 2006), e não as proteínas com massa acima de 60 kDa ou a lectina tipo C Nattectina ,de 15 kDa. As Natterinas 1, 2, 3, 4 e P, apresentam homologia entre si, mas não com proteínas existentes nos bancos de dados, e apresentam atividade proteolítica sobre o cininogênio humano e peptídios sintéticos derivados de cininogênio liberando Lys-BK, calidina (Magalhães et al., 2005). As Natterinas são as toxinas responsáveis em camundongos pela indução da nocicepção e do edema, efeito semelhante ao induzido pelo veneno (Lopes-Ferreira et al., 2005).

Um trabalho recente desenvolvido pelo nosso grupo confirmou o papel determinante da atividade proteolítica de um alérgeno na indução de resposta de memória. Mostramos que a atividade proteásica das Natterinas é determinante para a indução de resposta de memória com perfil Th2 e produção de IgE específica em camundongos BALB/c, e importante para a manutenção da cronicidade de células B nos três compartimentos analisados (peritônio, baço e medula óssea), uma vez que as Natterinas inativas pela inibição com agentes quelantes de metal (EDTA e o-PHE) ou pela alta temperatura geram resposta com perfil Th1 precoce e

principalmente local (Komegae et al., 2012). Desta forma podemos concluir que a anafilaxia e a inflamação eosinofílica pulmonar ou dérmica induzida pelo veneno do peixe *T. nattereri* está correlacionada à atividade proteásica das Natterinas presentes no veneno, uma vez que são responsáveis pela indução da síntese de anticorpos anafiláticos.

As proteases alergênicas já descritas na literatura apresentam diferenças com relação à estrutura (solubilidade, estabilidade, tamanho e susceptibilidade à ação de proteases), especificidade do sítio de ligação, a classe a que pertencem (cisteino, serino, metalo, etc) e a fonte de origem (vegetal e animal). Porém há um consenso que sua capacidade alergênica de induzir a síntese de IgE está relacionada à sua capacidade proteolítica.

Alérgenos derivados de ácaros de poeira como o *Dermatophagoides pteronyssinus* são classificados em 20 grupos e são amplamente distribuídos. A maioria dos pacientes alérgicos aos ácaros (>80%) tem anticorpos IgE contra os alérgenos do grupo 1: Der p 1 e Der f 1. O grupo 1 de alérgenos é formado por cisteíno-proteases e sua atividade proteolítica contribui para a alergenicidade (Gough et al., 1999). Um trabalho recente de Chruszcz e colaboradores (2011) mostra que anticorpos monoclonais IgE dirigidos (mAb 4C1) e específicos para Derp-1 e Der f 1 reconhecem epítomos dominantes (Arg18, Ser19, Arg21, Arg157, Gln182, Tyr186 e Asp199) localizados longe do sítio de ligação ao cálcio (Ca^{2+}) como também do sítio catalítico das proteases. Isto mostra que na estrutura da protease existem diferentes epítomos capazes de dirigir a síntese de IgE, incluindo a porção catalítica, e quando estes alérgenos (as proteases) entram nas mucosas (epitelial, dérmica ou intestinal) do hospedeiro e são reconhecidos pelos anticorpos IgE, previamente ligados à superfície de mastócitos, ainda ficam com a porção catalítica disponível para a clivagem de substratos alvos.

Der p 1 é responsável pela quebra das junções finas e degradação da ocludina entre as células epiteliais do pulmão (Wan et al., 2000; Chen et al., 2011), pela clivagem de CD23 (Hewitt et al., 1995; Ford et al., 2006) e de CD25 (Gough et al., 1999). A clivagem destes

receptores e de receptores do tipo PAR2 (Schulz et al., 1995; Asokanathan et al., 2002) favorece a resposta Th2 e a indução da liberação de citocinas próinflamatórias pelas células epiteliais brônquicas, por mastócitos, basófilos (Phillips et al., 2003) e por células dendríticas (Lewkowich et al., 2011). O resultante aumento na síntese de anticorpos IgE específicos e a inflamação pulmonar com perfil Th2/Th17 explicam o porque alérgenos de ácaros estão associados ao desenvolvimento de asma em humanos. Trabalhos com serino proteases do fungo *Penicillium* sp como Pen c 13 (Tai et al., 2006; Chen et al., 2011) mostram que a capacidade de produção de IgE e inflamação eosinofílica pulmonar está relacionada à sua capacidade inicial de degradar as junções intercelulares das células epiteliais brônquicas e degradação das proteínas juncionais occludina, ZO-1 e E-cadherin (identificadas pela metodologia espectrometria nano-LC-MS/MS).

Esquema representativo da possível sinalização induzida pelo alérgeno Pen c 13 na inflamação alérgica pulmonar.

7 CONCLUSÃO

Esse é o primeiro estudo que descreve a indução de reação anafilática por um veneno de um peixe brasileiro acompanhado da caracterização detalhada dos diversos mediadores solúveis e celulares envolvidos no processo. Nossos resultados em conjunto nos permitem concluir que o veneno possui proteínas alergênicas capazes de desencadear o processo alérgico, caracterizado por anafilaxia mediada por IgE e inflamação eosinofílica de fase tardia dependente de citocinas Th2. O processo alérgico desencadeado pelo veneno pode estar correlacionado à atividade proteásica das Natterinas presentes no veneno, uma vez que elas são responsáveis pela indução da síntese de anticorpos anafiláticos. E finalmente, nossos dados confirmam que a anafilaxia induzida pelo veneno de *T. nattereri* em animais sensibilizados é um fenômeno IgE/IgG1-mediado, dependente da citocina IL-4 produzida por linfócitos Th2 alérgeno-específicos e regulado negativamente por como IL-12 e principalmente IFN- γ . Ademais, observamos uma participação positiva de ambas as citocinas (IL-12 e IFN- γ) na indução da exacerbação do quadro inflamatório localizado, controlando juntamente com IL-4 o influxo de eosinófilos e neutrófilos.

REFERÊNCIAS*

- Almeida VG, Rocha CM. Registros de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. *Rev Soc Bras Toxicol*. 1989; 7:26-30.
- Alonso A, Scavini LM, Marino GA, Rodríguez SM. IgE antibodies against snake venoms. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1995; 5(1):31-4.
- Arizmendi NG, Abel M, Puttagunda L, Asaduzzaman M, Davidson C, Karimi K, Forsythe P, Vliagoftis H. Mucosal exposure to cockroach extract induces allergic sensitization and allergic airway inflammation. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2011; 14;7(1):22-32.
- Asokanathan N, Graham PT, Stewart DJ, Bakker AJ, Eidne KA, Thompson PJ, Stewart GA. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunol*. 2002; 169(8):4572-8.
- Auto HF. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. *Revista da Escola de Ciências Médicas de Alagoas*, 1992: 34-40.
- Berton MT, Linehan LA. IL-4 activates a latent DNA-binding factor that binds a shared IFN- γ and IL-4 response element present in the germ-line g1 Ig promoter. *J Immunol*. 1995; 154:4513–25.
- Bilò MB, Rueff F, Mosbech H, et al. Diagnosis of hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2005; 60:1339–49.
- Bobr A, Olvera-Gomez I, Igyarto BZ, Haley KM, Hogquist KA, Kaplan DH. Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *J Immunol*. 2010;15;185(8):4724-8.
- Boyce JA, Austen KF. No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. *J Exp Med*. 2005; 201: 1869-1873.
- Brooks DE, Graeme KA. Airway compromise after first rattlesnake envenomation. *Wilderness Environ Med*. 2004;15(3):188-93.
- Burnett JW, Calton GJ. Jellyfish envenomation syndromes updated. *Ann Emerg Med*. 1987; 16:1000–05.
- Burnett JW, Calton GJ, Burnett HW. Jellyfish envenomation syndromes. *J Am Acad Dermatol*. 1986; 14:100–106.
- Castells M, Austen KF. Mastocytosis: mediator-related signs and symptoms. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127:147–52.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003- Available from: <http://www.icmje.or> [2004 May 06].

- Chen JC, Chuang JG, Su YY, Chiang BL, Lin YS, Chow LP. The protease allergen Pen c 13 induces allergic airway inflammation and changes in epithelial barrier integrity and function in a murine model. *J Biol Chem*. 2011;286(30):26667-79.
- Chen I, Martinez O, Overbergh I, Mathieu C, Prabhakar BS, Chan IS. Early up-regulation of th2 cytokines and late surge of th1 cytokines in an atopic dermatitis model. *Clin Exp Immunol*. 2004;138 (3):375-87.
- Chruszcz M, Pomés A, Glesner J, Vailes LD, Osinski T, Porebski PJ, Majorek KA, Heymann PW, Platts-Mills TA, Minor W, Chapman MD. Molecular determinants for antibody binding on the group 1 house dust mite allergens. *J Biol Chem*. 2011 Dec 30. [Epub ahead of print].
- Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol*. 1923; 8:163- 82.
- Cohen SG, Zelaya-Quesada M. Portier, richet, and the discovery of anaphylaxis: a centennial. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 110(2):331-6.
- De Medeiros CR, Barbaro KC, De Siqueira França FO, Zanotti AP, Castro FF. Anaphylactic reaction secondary to Bothrops snakebite. *Allergy*. 2008; 63(2):242-3.
- De Medeiros CR, Barbaro KC, Lira MS, França FO, Zaher VL, Kokron CM, Kalil J, Castro FF. Predictors of Bothrops jararaca venom allergy in snake handlers and snake venom handlers. *Toxicon*. 2008;51(4):672-80.
- Demain JG, Goetz DW. Immediate, late, and delayed skin test responses to *Centruroides vittatus* scorpion venom. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;30:135-7.
- Demain JG, Minaei AA, Tracy JM. Anaphylaxis and insect allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(4):318-22.
- Dotimas EM, Hider RC. Koneybee venom. *Bee Word*. 1987; 2:51:71.
- Dy M., Schneider E. Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004; 15:393–410.
- Dyer KD, Percopo CM, Xie Z, Yang Z, Kim JD, Davoine F, Lacy P, Druey KM, Moqbel R, Rosenberg HF. Mouse and human eosinophils degranulate in response to platelet-activating factor (PAF) and lysoPAF via a PAF-receptor-independent mechanism: evidence for a novel receptor. *J Immunol*. 2010;184(11):6327-34.
- Edwards Jr E.K. And E.K. Edwards Sr, Immediate, anaphylactic and delayed reactions to jellyfish, Contact Dermatitis. 2000;43:244–245.
- Erb KJ, Holloway JW, Sobeck A, Moll H, Le Gros G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-Bacillus Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med*. 1998; 187(4):561-9.

- Facó PE, Havt A, Barbosa OS, Nobre AC, Bezerra GP, Menezes DB, Fonteles MC, Lopes-Ferreira M, Monteiro HS. Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney. *Toxicon*. 2003; 42(5): 509-14.
- Finkelman FD, Rothenberg ME, Brandt EB, Morris SC, Strait RT. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(3):449-57.
- Finkelman FD. Anaphylaxis: lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 3: 506-15.
- Fitzgerald KT, Flood A A. Hymenoptera stings. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2006; 4:194-204.
- Fonseca LA, Lopes-Ferreira M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *T. nattereri* (niquim). *An Bras Dermatol*. 2000; 75: 435-43.
- Ford JW, Kilmon MA, Haas KM, Shelburne AE, Chan-Li Y, Conrad DH. In vivo murine CD23 destabilization enhances CD23 shedding and IgE synthesis. *Cell Immunol*. 2006;243(2):107-17.
- Fróes HP. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (*Thalassophrynidae*). *Bahia Med*. 1933c; 4: 225-7.
- Fróes HP. Peixes toxíforos do Brasil. *Bahia Med*. 1933; 4: 69-75.
- Fróes HP. Studies on venomous fishes of tropical countries. *J. Trop. Med. Hyg*. 1933b; 36: 134-5.
- Fróes HP. Sur un poisson toxiphore brésilien: le “niquim” *Thalassophryne maculosa*. *Rev. Sud. Am Me Chl*. 1932; 3:871-8.
- Gough L, Schulz O, Sewell HF., and Shakib F. 1999. The Cysteine Protease Activity of the Major Dust Mite Allergen Der P 1 Selectively Enhances the Immunoglobulin E Antibody Response. *J. Exp. Med*. 1999; 20:1897–901.
- Green RHCE, Brightling G, Woltmann D, Parker AJ, Wardlaw ID, Pavord. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2000; 57: 875–9.
- Grund L Z, Souza VMO, Mauro-Faquim EL, Lima C, Lopes-Ferreira M. Experimental immunization with *Thalassophryne nattereri* fish venom: Striking IL-5 production and impaired of B220+ cells. *Toxicon*. 2006; 48(5): 499-508.
- Grund LZ, Komegae EN, Lopes-Ferreira M, Lima C. IL-17A is critical for the Th2 chronic response and differentiation of long-lived plasma cells in inflamed tissues. *Cytokine* 2012. (In press).
- Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, Tournoy K, Louis R, Foidart JM, Noël A, Cataldo DD. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res*. 2009;58(12):845-54.

- Haddad Jr V, Pardal PPO, Cardoso JL, Martins IA. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): Repor of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Serjipe State). Ver. Inst. Med. Trop. 2003; 4: 221-3.
- Harada M, Nagata M, Takeuchi M, Ohara T, Makino S, Watanabe A. Age-dependent difference in susceptibility to IgE antibody- and IgG1 antibody-mediated passive anaphylactic shock in the mouse. Immunol Invest. 1991; 5-6: 515-23.
- Hewitt CR, Brown AP, Hart BJ, Pritchard DI. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. J Exp Med. 1995; 182(5):1537-44.
- Hitomi K, Tahara-Hanaoka S, Someya S, Fujiki A, Tada H, Sugiyama T, Shibayama S, Shibuya K, Shibuya A. An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits immunoglobulin E-mediated immediate hypersensitivity reactions. Nat Immunol. 2010; 11(7):601-7.
- Hsieh KY, Tsai CC, Wu CH, Lin RH. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. Clin Exp Allergy. 2003; 33:1067–75.
- Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 1968; 69:599–609.
- Ishikawa R, Tsujimura Y, Obata K, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. IgG-mediated systemic anaphylaxis to protein antigen can be induced even under conditions of limited amounts of antibody and antigen. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 402(4):742-6.
- Ishizaka K, Ishizaka T. Human reaginic antibodies and immunoglobulin E. J Allergy. 1968; 42(6):330-63.
- Jeebhay MF, Robins TG, Lehrer SB, Lopata AL: Occupational seafood allergy: a review. Occup Environ Med. 2001; 58: 553–62.
- Kawakami K. Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases. J. Infect. Chemother. 2003; 9: 201-9.
- Kim SS, Park HS, Kim HY, Lee SK, Nahm DH. Anaphylaxis caused by the new ant, *Pachycondyla chinensis*: demonstration of specific IgE and IgE-binding components. J Allergy Clin Immunol. 2001; 107(6):1095-9.
- Klotz JH, Klotz SA, Pinnas JL. Animal bites and stings with anaphylactic potential. J Emerg Med. 2009; 36(2):148-56.
- Koch M, Witzenrath M, Reuter C, Herma M, Schütte H, Suttorp N, Collins H, Kaufmann SH. Role of local pulmonary IFN-gamma expression in murine allergic airway inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006; 35(2):211-9.

- Komegae EN, Grund LZ, Lopes-Ferreira M, Lima C. Crucial commitment of proteolytic activity of a major toxin from *Thalassophryne nattereri* fish venom to the generation of specific survival niches for long-lived antibody-secreting cells. *Immunobiol*, 2012. *Submitted*.
- Kuipers H, Heirman C, Hijdra D, Muskens F, Willart M, van Meirvenne S, Thielemans K, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Dendritic cells retrovirally overexpressing IL-12 induce strong Th1 responses to inhaled antigen in the lung but fail to revert established Th2 sensitization. *J Leuk Biol*. 2004; 5: 1028-38.
- Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Jones H, Umland SP, Kreutner W, Egan RW, Chapman RW. Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995; 12:404-9.
- Kweon MN, Yamamoto M, Kajiki M, Takahashi I, Kiyono H. Systemically derived large intestinal CD4(+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. *J Clin Invest*. 2000; 106: 199–206.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.
- Lagranderie M, Abolhassani M, Vanoirbeek J, Lima C, Balazuc AM, Huerre M, Vargaftig BB, Marchal G. Mycobacterium bovis BCG killed by extended freeze-drying targeted plasmacytoid dendritic cells to regulate lung inflammation. *J Immunol*. 2010;15; 184(2):1062-70.
- Leung PS, Lee YS, Tang CY, Kung WY, Chuang YH, Chiang BL, Fung MC, Chu KH. Induction of shrimp tropomyosin-specific hypersensitivity in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008; 147(4):305-14.
- Lewkowich IP, Day SB, Ledford JR, Zhou P, Dienger K, Wills-Karp M, Page K. Protease-activated receptor 2 activation of myeloid dendritic cells regulates allergic airway inflammation. *Respir Res*. 2011;21:12-22.
- Li X M, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103:206–14.
- Li, X. M.; Serebrisky, D.; Lee, S.Y.; Huang, C.K.; Bardina, L.; Schofield, B.H.; Stanley, J.S.; Burks, A.W.; Bannon, G.A.; Sampson, H.A. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106:150–8.
- Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'shea JJ. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 15137-42.

- Lima C, Clissa PB, Piran-Soares AA, Tanjoni I, Moura-Da-Silva AM, Lopes-Ferreira M. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon*. 2003; 42: 499-507.
- Liu L, Jarjour NN, Busse WW, Kelly EA: Enhanced generation of helper T type 1 and 2 chemokines in allergen-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 169:1118-24.
- Liu LY, Mathur SK, Sedgwick JB, Jarjour NN, Busse WW, Kelly EA: Human airway and peripheral blood eosinophils enhance Th1 and Th2 cytokine secretion. *Allergy*. 2006; 61:589-97.
- Lopes-Ferreira M, Bárbaro KC, Cardoso DF, Moura-Da-Silva AM, Mota I. *T. nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*, 1998 a; 36:405-10.
- Lopes-Ferreira M, Emim JAS, Oliveira V, Puzer L, Cezari MH, Araújo MS, Juliano L, Lapa AJ, Souccar C, Moura-Da-Silva AA. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Bioch Pharmacol*. 2004. 68: 2151-57.
- Lopes-Ferreira M, Emim JAS, Souccar C, Lapa AJ, Cezari MHS, Juliano L, Moura-Da-Silva AM, Mota I. Characterization of the nociceptive and edematogenic activities of the *T. nattereri* fish venom. *Toxicon*. 1998 b; 36:1304-08.
- Lopes-Ferreira M, Moura-Da-Silva AM, Mota I, Takehara HA. Neutralization of *T. nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. *Toxicon*. 2000; 38:1149-56.
- Lopes-Ferreira M, Moura-Da-Silva AM, Piran-Soares AA, Ângulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Farsky SHP. Hemostatic effects induced by *T. nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. *Toxicon*. 2002;40: 1141-47.
- Lopes-Ferreira M, Núñez N, Rucavado A, Farsky SH, Lomonte B, Angulo Y, Moura-Da-Silva A M, Gutiérrez JM. Necrosis induced by *thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in murine skeletal muscle: a novel tool to study muscle degeneration and regeneration. *International J Exp Pathol*. 2001; 82: 55-64.
- Macdowell AL, Peters SP. Neutrophils in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007; 7(6):464-8.
- Magalhães GS, Lopes-Ferreira M, Junqueira De Azevedo IMJ, Spencer PJ, Araujo MS, Portaro FCV, Ma L, Valente RH, Juliano L, Fox JW, Ho PL, Moura-Da-Silva AM. Natterins, a new class of protein with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochimie*. 2005; 87: 687-99.
- Magalhães KW, Lima C, Piran-Soares AA, Marques EE, Hiruma-Lima CA, Lopes-Ferreira M. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. *Toxicon*. 2006; 47: 575-83.

- Mancardi DA, Iannascoli B, Hoos S, England P, Daëron M, Bruhns P: FcγRIIb is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcεRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J Clin Invest* 2008, 118:3738-50.
- Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2:323–35.
- Martin TR, Ando A, Takeishi T, Katona IM, Drazen JM, Galli SJ. Mast cells contribute to the changes in heart rate, but not hypotension or death, associated with active anaphylaxis in mice. *J Immunol.* 1993;151(1):367-76.
- Mazuc E, Villoutreix BO, Malbec O, Roumier T, Fleury S, Leonetti JP, Dombrowicz D, Daëron M, Martineau P, Dariavach P. A novel druglike spleen tyrosine kinase binder prevents anaphylactic shock when administered orally. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 1:188-94.
- McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, Freeman GJ, Umetsu DT, Dekruyff RH. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol.* 2001; 2:1109-16.
- McKee A S, Munks M W, MacLeod MKL, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, Marrack P. Alum Induces Innate Immune Responses through Macrophage and Mast Cell Sensors, But These Sensors Are Not Required for Alum to Act As an Adjuvant for Specific Immunity. *J Immunol.* 2009; 183(7): 4403-14.
- Meyts I, Hellings PW, Hens G, Vanaudenaerde BM, Verbinnen B, Heremans H, Matthys P, Bullens DM, Overbergh L, Mathieu C, De Boeck K, Ceuppens JL. IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma. *J Immunol.* 2006; 177(9):6460-70.
- Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and FcγRIII. *J Clin Invest.* 1997;99:901-14.
- Monteiro HSA, Bezerra GP, Facó PEG, Havt A, Siva-Jr GB. Epidemiologia dos acidentes pelo peixe Niquim (*T. nattereri*) no estado do Ceará no período de 1992 a 2002. In: 49 Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Fortaleza – CE. p.11, 2003.
- Morgan RK, McAllister B, Cross L, Green DS, Kornfeld H, Center DM. Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3+ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model. *J Immunol.* 2007; 178: 8081–9.
- Mota I, Wong D. "Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization." *Life Sci.* 1969; 8(16): 813-20.
- Mould AW, Matthaai KI, Young IG, Foster PS. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J Clin Invest.* 1997;99:1064-71.
- Mustafa FB, Ng FS, Nguyen TH, Lim LH. Honeybee venom secretory phospholipase A2 induces leukotriene production but not histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol.* 2008; 151(1):94-100.

- Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(10):679-91.
- Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med*. 2002; 8:567-73.
- Nieuwenhuizen N, Lopata AL, Jeebhay MF, Herbert DR, Robins TG, Brombacher F. Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(5):1098-105.
- Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen J M, Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature*. 1994; 370:367-70.
- Ovary Z. "Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse." *J Immunol*. 1958;81(4):355-7.
- Palframan RT, Collins PD, Willhians TJ, Rankin SM. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood*. 1998; 91:2240-8.
- Pareja-Santos A, Saraiva TC, Costa EP, Santos MF, Zorn TT, Souza VM, Lopes-Ferreira M, Lima C. Delayed local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. *Int J Exp Pathol*. 2009; 90(1):34-43.
- Parsons M.E., Ganellin C.R. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol*. 2006; 147:127–35.
- Pereira-Santos MC, Baptista AP, Melo A, Alves RR, Soares RS, Pedro E, Pereira-Barbosa M, Victorino RM, Sousa AE. Expansion of circulating Foxp3+D25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2008; 2:291-7.
- Phillips C, Coward WR, Pritchard DI, Hewitt CR. Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites. *J Leukoc Biol*. 2003;73(1):165-71.
- Piancatelli D, Bellotta L, Del Beato T, Duse M, Della Penna MR. Total IL-12 levels are increased in paediatric atopic dermatitis: correlations with age and disease severity. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008. 21(2):359-65.
- Pinckard N, Farr RS, Hanahan DJ. Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) Released In Vivo during IgE anaphylaxis with PAF released In Vitro from IgE sensitized basophils. *J Immunol*. 1979; 123(4):1847-57.
- Piran-Soares AA, Komegae EN, Oliveira Souza VM, Fonseca LA, 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*. 2007; 49:920–30.
- Portier, Richet C. Action anaphylachque dès quelques venins. *CR Soc Biol*. 1902; 54:170-2.
- Prescott RA, Potter PC. Hypersensitivity to airborne spitting cobra snake venom. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005; 94(5):600-3.

- Reimers AR, Weber M, Müller UR. Are anaphylactic reactions to snake bites immunoglobulin E-mediated? *Clin Exp Allergy*. 2000; 30(2):276-82.
- Ring J, Behrendt H, de Weck A. History and classification of anaphylaxis. *Chem Immunol Allergy*. 2010; 95:1-11.
- Rodriguez N, F Fend, L Jennen, M Schiemann, N Wantia, CU Prazeres da Costa, S Dürr, U Heinzmann, H Wagner, T Miethke. Polymorphonuclear neutrophils improve replication of *Chlamydia pneumoniae* in vivo upon MyD88-dependent attraction. *J. Immunol*. 2005; 174: 4836–44.
- Russell FE. Poisonous marine animals. New York: TFH Publications, 1971.
- Sampson H A, Muñoz-Furlong A, Campbell R L, Adkinson NF Jr, Bock SA, Branum A, Brown SG, Camargo CA Jr, Cydulka R, Galli SJ, Gidudu J, Gruchalla RS, Harlor AD Jr., Hepner DL, Lewis LM, Lieberman PL, Metcalfe DD, O'Connor R, Muraro A, Rudman A, Schmitt C, Scherrer D, Simons FE, Thomas S, Wood JP, Decker W W. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report-second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *Ann Emerg Med*. 2006; 47(4):373-80.
- Schleimer RP, Mac Glashan DW, Peters SP, Pinckard RN, Adkinson NF, Lichtenstein LM. Characterization of inflammatory mediator release from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis*. 1986; 133:614-7.
- Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Bridts CH, Stevens WJ. Wasp venom immunotherapy induces a shift from IL-4-producing towards interferon-gamma-producing CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Clin Exp Allergy*. 2001; 31(5):740-6.
- Schulz O, Laing P, Sewell HF, 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*. 1995; 25: 3191-4.
- Sergejeva S, Ivanov S, Lotvall J, Linden A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(3):248-53.
- Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2010. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127(2):326-35.
- Simons FE; World Allergy Organization. World Allergy Organization survey on global availability of essentials for the assessment and management of anaphylaxis by allergy-immunology specialists in health care settings. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010 May;104(5):405-12.
- Stone KD, C Prussin, DD Metcalfe. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125:73–80.

- Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(4):658-68.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000; 100: 655-69.
- Tada T, K Okumura, B Platteau, A Beckers, H Bazin. Half-lives of two types of rat homocytotropic antibodies in circulation and in the skin. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1975; 48:116–31.
- Tai HY, Tam MF, Chou H, Peng HJ, Su SN, Perng DW, Shen HD. Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occluding protein of human lung epithelial cells. *Allergy.* 2006; 61(3):382-8.
- Takeishi T, Martin TR, Katona IM, Finkelman FD, Galli SJ. Differences in the expression of the cardiopulmonary alterations associated with anti-immunoglobulin E-induced or active anaphylaxis in mast cell-deficient and normal mice. Mast cells are not required for the cardiopulmonary changes associated with certain fatal anaphylactic responses. *J Clin Invest.* 1991; 88(2):598-608.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4.
- Von Hertzen L, Klaukka T, Mattila H, Haahtela T. Mycobacterium tuberculosis infection and the subsequent development of asthma and allergic conditions. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 6: 1211-4.
- Wan H, Winton HL, Soeller C, Gruenert DC, Thompson PJ, Cannell MB, Stewart GA, Garrod DR, Robinson C. Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1. *Clin Exp Allergy.* 2000;30(5):685-98.
- Wang M, Takeda K, Shiraishi Y, Okamoto M, Dakhama A, Joetham A, Gelfand EW. Peanut-induced intestinal allergy is mediated through a mast cell–IgE–FcεRI–IL-13 pathway. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(2):306-16.
- Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 267–285.
- Weytjens K, Cartier A, Malo JL, Chretien P, Essiembre F, Lehrer S, Swanson M: Aerosolized snow-crab allergens in a processing facility. *Allergy* 1999; 54: 892–3.
- Winbery SL, Lieberman PL. Histamine and antihistamines in anaphylaxis. *Clin. Allergy Immunol.* 2002; 17:287–317.

Yun YY, Ko SH, Park JW, Hong CS. Anaphylaxis to venom of the *Pachycondyla* species ant. J Allergy Clin Immunol. 1999;104:879-82.

Zhang H, Yang X, Yang H, Zhang Z, Lin Q, Zheng Y, Chen S, Yang P, He S. Modulation of mast cell proteinase-activated receptor expression and IL-4 release by IL-12. Immunol Cell Biol. 2007; 7:558-66.

Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. Cell Res. 2006;16(1):3-10.

Zozaya J, Stadelman RE. Hypersensitiveness to snake venom proteins. A case report. Bull Antivenin Inst. Am. 1930; 3:93-5.