EVILIN NANAME KOMEAE

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

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Dr^a Carla Lima da Silva

São Paulo

2010

RESUMO

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

As células B do compartimento de memória podem também ser formadas a partir de um subtipo não convencional de células B maduras, as chamadas células B1 que se distinguem das células B convencionais (B2) por apresentarem diferentes fenótipos de superfície, localização anatômica, capacidade de autoreabastecimento e repertório de anticorpos e por serem células com características de defesa inata e de vida longa (KANTOR e HERZENBERG, 1993).

As células B1 são conhecidas por serem uma fonte primária de anticorpos naturais IgM de baixa afinidade que apresentam papel importante em períodos iniciais de defesa contra bactérias, vírus e certos parasitas, antes do estabelecimento de respostas imunes adaptativas e são fontes de anticorpos de reações cruzadas com uma variedade de antígenos próprios tornando-se células produtoras de imunoglobulinas de todos os isotipos (HAYAKAWA et al., 1984; KANTOR e HERZENBERG, 1993) principalmente em resposta a estimulação antigênica por lipopolissacarídeo ou citocinas. Além disso, seus progenitores são abundantes no feto e no fígado, e recentemente progenitores destas células foram descobertos na medula óssea de animais adultos (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2006). Possuem capacidade de autoabastecimento principalmente nas cavidades peritoneal e pleural, sendo virtualmente ausentes no linfonodo e no sangue periférico onde é mais convencional a presença de células B2.

Fenotipicamente células B1a são caracterizadas por expressarem B220^{low} CD19^{high} IgM^{high} IgD^{low} CD43^{pos} CD5^{pos} CD23^{neg} e as B1b são B220^{low} CD19^{high} IgM^{high} IgD^{low} CD43^{pos} CD5^{neg} CD23^{neg}CD11b^{pos}. Ambos os subtipos de B1 expressam constitutivamente a cadeia alfa do receptor de IL-5 (IL-5R α) e os genes BLIMP-1 e XBP-1 o que explica sua capacidade de longa vida e a produção de IgM natural e contínua. Não está claro se esses dois subtipos são distintos tipos celulares ou dois

estágios de desenvolvimento da mesma população uma vez que o CD5 é um regulador negativo expresso em células anérgicas ou nas células B1a após exposição à autoantígenos (ROTHSTEIN, 2002).

Quando as células B1a são ativadas, na cavidade peritoneal ou pleural, induzem a ativação e produção de citocinas pelos linfócitos T de forma muito mais eficiente do que as células B convencionais. HA e colaboradores (2006) demonstraram que a sinalização por receptores do tipo *Toll Like Receptors* – TLRs nas células B1 induz uma rápida, específica e transiente regulação da expressão de integrinas e da molécula CD9, permitindo o deslocamento na matriz local com alta velocidade de movimento em resposta a quimiocinas. Essas células podem, portanto migrar para os órgãos linfóides secundários tornando-se células produtoras de anticorpos de vida longa. Além da capacidade das células B1 de produção de citocinas, apresentação de antígenos e diferenciação em ASC, a intensa expansão destas células tem sido bastante associada à autoimunidade (YANABA et al., 2008).

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

Figura 1. Regulação do desenvolvimento de plasmócitos.

Fonte: Shapiro-Shelef e Calame (2005)

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

No que diz respeito à sobrevivência das células de memória, a idéia mais aceita atualmente é a de que elas persistam mesmo na ausência do antígeno (MARUYAMA et al., 2000). Porém, alguns autores acreditam que a persistência do antígeno, por meses e até anos, na forma de imunocomplexos na superfície das células dendríticas foliculares é um fator essencial para a manutenção das células B de memória e produção de anticorpos específicos (TEW et al., 1997; GRAY, 2002; GATTO et al., 2007). Em alguns casos, a exposição crônica ao antígeno poderia ser responsável, embora seja improvável que isto explique a presença de anticorpos para antígenos transientes como o toxóide tetânico e o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) (ZINKERNAGEL et al., 1996).

Apesar das ASC manterem altos títulos de anticorpos por muito tempo sem reposição a partir de células B de memória (AHUJA et al., 2008) há fortes indícios de uma relação hierárquica entre os 2 tipos de células B: células B de memória B220+ CD19+ dão origem a células B com expressão intermediária da molécula B220 e estas por fim tornam-se células de longa vida, caracterizadas pela baixa expressão de B220 ou ausência deste marcador (MCHEYZER-WILLIAMS et al., 2000).

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

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

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

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

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

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

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

Fonte: Rakoff-Nahoum e Medzhitov (2009)

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

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

Figura 2. Moléculas adaptadoras utilizadas pelo TLR4.

Fonte: O'Neill e Bowie (2007)

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

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

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

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

Os sintomas decorrentes do envenenamento (dor, eritema e edema) e as seqüelas deixadas pelo acidente (em alguns casos o quadro clínico avança para uma necrose de difícil cicatrização) são agravados pela inexistência de um tratamento que reverta tais efeitos patológicos (ALMEIDA e ROCHA, 1989; AUTO, 1992; FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000; HADDAD JR et al., 2003). Vale ressaltar, que o uso de analgésicos, antiinflamatórios esteroidais (dexametasona) e não-esteroidais (indometacina) ou inibidores de serotonina e da via L-arginina-óxido nítrico não é capaz de reverter o quadro decorrente do envenenamento que evolui independente da utilização dos medicamentos.

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

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

Um trabalho recente mais detalhado de investigação dos efeitos do veneno de *T. nattereri* na geração de memória imunológica e dos fatores envolvidos na manutenção das células ASCs desenvolvido por Grund et al. (2009) mostra que o veneno de *T. nattereri* é capaz de desencadear e sustentar uma resposta imunológica de memória dependente de citocinas de linfócitos T, IL-5 e IL-17A com altos e persistentes níveis de anticorpos específicos IgG2a, IgG1 e principalmente IgE produzidos por células de longa sobrevivência fenotipicamente caracterizadas como ASC B220^{high/low/neg}CD43^{high/low}CD138^{pos} presentes além da medula óssea também no baço e no peritônio. Ademais, este trabalho também suporta a idéia de que IL-5 e IL-17A participam na geração e na sobrevivência de ASC com fenótipo B220^{high/low/neg} e na manutenção esplênica de células B1a, uma vez que o uso de anticorpos neutralizantes para as duas citocinas conseguiram reverter a diferenciação das células ASCs induzidas pelo veneno.

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

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

CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS*

- AHUJA, A.; ANDERSON, S. M.; KHALIL, A.; SHLOMCHIK, M. J. Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, p. 4802-4807, 2008.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 675-680, 2001.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 4, p. 783-801, 2006.
- ALMEIDA, V. G.; ROCHA, C. M. Registro de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. **Rev. Soc. Bras. Toxicol.**, v. 2, p. 49-51, 1989.
- ARCE, S.; LUGER, E.; MUEHLINGHAUS, G.; CASSESE, G.; HAUSER, A.; HORST, A.; LEHNERT, K.; ODENDAHL, M.; HÖNEMANN, D.; HELLER, K. D.; KLEINSCHMIDT, H.; BEREK, C.; DÖRNER, T.; KRENN, V.; HIEPE, F.; BARGOU, R.; RADBRUCH, A.; MANZ, R. A. CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, p. 1022-1028, 2004.
- ASLAM, A.; QUINN, P.; MCINTOSH, R. S. Proteases from *Schistosoma mansoni* cercariae cleave IgE at solvent exposed interdomain regions. **Mol. Immunol.**, v. 45, p. 567-574, 2008.
- AUTO, H. F. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. **Rev. Esc. Ciênc. Méd. Alagoas**, v. 5, p. 35-36, 1992.
- BAINE, Y.; THORBECKE, G. J. Induction and persistence of local B cell memory in mice. **J. Immunol.**, v. 128, p. 639-643, 1982.
- BAXTER, E. H.; MARR, A. Seawasp (*Chironex fleckeri*) antivenene: neutralizing potency against the venom of three other jellyfish species. **Toxicon**, v. 12, p. 223-229, 1974.
- BERNASCONI, N. L.; TRAGGIAI, E.; LANZAVECCHIA, A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. **Science**, v. 5601, p. 2199-202, 2002.
- CARAMALHO, I.; LOPES-CARVALHO, T.; OSTLER, D.; ZELENAY, S.; HAURY, M.; DEMENGEOT, J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 403-411, 2003.
- CASSESE, G.; ARCE, S.; HAUSER, A. E.; LEHNERT, K.; MOEWES, B.; MOSTARAC, M.; MUEHLINGHAUS, G.; SZYSKA, M.; RADBRUCH, A.; MANZ, R. A. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. **J. Immunol.**, v. 171, p. 1684-1690, 2003.
- CASSESE, G.; LINDENAU, S.; DE, B. B.; ARCE, S.; HAUSER, A.; RIEMECASTEN, G.; BEREK, C.; HIEPE, F.; KRENN, V.; RADBRUCH, A.; MANZ, R. A. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 2726-2732, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FITZSIMMONS, C. M.; G. SCHRAMM, F. M.; JONES, I.W.; CHALMERS, K. F.; HOFFMANN, C. G.; GREVELDING, M.; WUHRER, C. H.; HOKKE, H.; HAAS, M. J.; DOENHOFF, M.J.; DUNNE, D.W. Molecular characterization of omega-1: a hepatotoxic ribonuclease from *Schistosoma mansoni* eggs. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 44, p. 123–127, 2005.

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

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

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

GATTO, D.; MARTIN, S. W.; BESSA, J.; PELLICOLI, E.; SAUDAN, P.; HINTON, H. J.; BACHMANN, M. F. Regulation of memory antibody levels: the role of persisting antigen versus plasma cell life span. **J. Immunol.**, v. 1, p. 67-76, 2007.

GERONDAKIS, S.; GRUMONT, R. J.; BANERJEE, A. Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, p. 471-475, 2007.

GOLDBERG, A. L.; ROCK, K. L. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. **Nature**, v. 357, p. 375-379, 1992.

GOUGH, L.; SCHULZ, O.; SEWELL, H. F.; SHAKIB, F. The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. **J. Exp. Med.**, v. 190, p. 1897-1902, 1999.

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

GRUND, L. Z. **Papel das citocinas IL-5 e IL-17A na diferenciação de células produtoras de anticorpos de vida longa (ASC) induzida pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri***. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

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

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

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

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

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

HAWGOOD, B. J. Pioners of anti-venomous serotherapy: Dr. Vital Brazil (1865-1950). **Toxicon**, v. 30, p. 573-579, 1992.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LOPES-FERREIRA, M.; EMIM, J. A.; OLIVEIRA, V.; PUZER, L.; CEZARI, M. H.; ARAÚJO, M. S.; JULIANO L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, n. 11, p. 2151-2157, 2004.

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

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIRAN-SOARES, A. A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; FARSKY, S. H. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. **Toxicon**, v. 40(8), p. 1141-147, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OVARY, Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. **J. Immunol.**, v. 81, n. 4, p. 355-7, 1958.

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunol. Rev.**, v. 227, n. 1, p. 221-33, 2009.

PAREJA-SANTOS, A.; SARAIVA, T. C.; COSTA, E. P.; SANTOS, M. F.; ZORN, T. T.; SOUZA, V. M. O.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C. Delayed local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 90, p. 34-43, 2009.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. **Nature**, v. 17;438(7066), p. 364-368, 2005.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

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

PRUETT, J. H. JR. Proteolytic cleavage of bovine IgG by hypodermin A, a serine protease of *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). **J. Parasitol.**, v. 79, p. 829-33, 1993.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. **Cell**, v. 4, p. 849-863, 2006.

QUIGLEY, M.; MARTINEZ, J.; HUANG, X.; YANG, Y. A critical role for direct TLR2-MyD88 signaling in CD8 T-cell clonal expansion and memory formation following vaccinia viral infection. **Blood**, v. 10, p. 2256-2264, 2009.

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

RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and cancer. **Nat. Rev. Canc.**, v. 9, n. 1, p. 57-63, 2009.

RICHARD, K.; PIERCE, S. K.; SONG, W. The agonists of TLR4 and 9 are sufficient to activate memory B cells to differentiate into plasma cells in vitro but not in vivo. **J. Immunol.**, v. 3, p. 1746-1752, 2008.

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

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

SCHULZ, O.; LAING, P.; SEWELL, H.F.; SHAKIB, F. Der p I, a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23). **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 11, p. 3191-3194, 1995.

SHAFFER, A. L.; LIN, K. I.; KUO, T. C.; YU, X.; HURT, E. M.; ROSENWALD, A.; GILTANE, J. M.; YANG, L.; ZHAO, H.; CALAME, K.; STAUDT, L. M. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. **Immunity**, v. 1, p. 51-62, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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