

LIDIANE ZITO GRUND

**Influência das células T na diferenciação e manutenção de
células B de memória produtoras de anticorpos de longa vida (ASC)
induzidas na resposta imune crônica
ao veneno de *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
2013

LIDIANE ZITO GRUND

**Influência das células T na diferenciação e manutenção de
células B de memória produtoras de anticorpos de longa vida (ASC)
induzidas na resposta imune crônica
ao veneno de *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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Carla Lima da Silva

Co-Orientadora: Dra. Mônica Lopes-Ferreira

Versão original

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Grund, Lidiane Zito.

Influência das células T na diferenciação e manutenção de células B de memória produtoras de anticorpos de longa vida (ASC) induzidas durante resposta imune crônica ao veneno de *Thalassophryne nattereri* / Lidiane Zito Grund. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Carla Lima.

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

Versão do título para o inglês: Influence of T cell on differentiation and maintenance of long-lived antibody-secreting cells (ASC) induced during chronic immune response to *Thalassophryne nattereri* venom.

1. Linfócitos B de memória 2. Linfócitos T de memória 3. Citocinas
4. Resposta de anticorpos 5. Sinalização celular 6. Antígenos
I. Lima, Profa. Dra. Carla II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia
III. Título.

ICB/SBIB0167/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lidiane Zito Grund.

Título da Tese: Influência das células T na diferenciação e manutenção de células B de memória produtoras de anticorpos de longa vida (ASC) induzidas durante resposta imune crônica ao veneno de *Thalassophryne nattereri*.

Orientador(a): Profa. Dra. Carla Lima.

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:

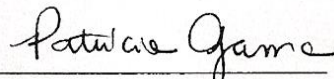
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **25** nas fls. **84** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Carla Lima, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Influência das células T na diferenciação e manutenção de células B de memória produtoras de anticorpos de longa vida (ASC) induzidas durante a resposta imune crônica ao veneno de *Thalassophryne nattereri*** do qual participou(ar) o(s) alunos **Lidiane Zito Grund e a pesquisadora Mônica Lopes Ferreira**, 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 NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **30.03.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 31 de março de 2010.



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



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



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

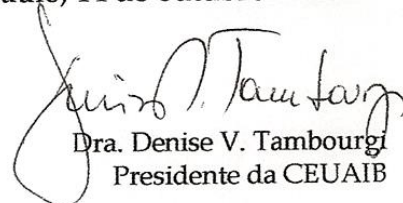
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência das células T na diferenciação e manutenção de células B de memória produtoras de anticorpos de longa vida (ASC) induzidas durante a resposta imune crônica ao veneno de *Thalassophryne nattereri*" protocolo n° 666/09, sob a responsabilidade de Carla Lima e Lidiane Zito Grund, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/10/2009.

We certify that the research entitled "Influence of T cell on differentiation and maintenance of memory B long-lived antibodies secreting cells (ASC) induced during a chronic immune response to *Thalassophryne nattereri* venom", protocol n° 666/09, under the responsibility of Carla Lima and Lidiane Zito Grund, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 10/13/2009

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Vigência do Projeto: 10/2009 – 10/2013 Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada LETA - CEPID | N° de animais/espécie 120/camundongos BALB/C (Macho) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|

São Paulo, 14 de outubro de 2009.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante,
Diretor do Instituto Butantan

A realização desta tese foi possível graças ao apoio científico da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo número 2009/53078-1

Dedico este trabalho aos meus pais **Carlos e Marta**, que com simplicidade e carinho não mediram esforços para manterem nossa família unida e souberam nos transmitir segurança e tranquilidade mesmo diante do medo e incerteza da vida e a minha irmã **Ludimyla**, cuja amizade, determinação e força são notórias de admiração.

AGRADECIMENTOS

A Dr^a Carla Lima pela orientação e atenção constantes e por ter me concedido a oportunidade de vicejar no aprendizado científico e amadurecimento pessoal. Meu sincero agradecimento por tantos anos de trabalho juntas, pela amizade, apoio pessoal, conquistas profissionais e por ter me ensinado muito mais do que experimentações científicas.

A Dr^a Mônica Lopes Ferreira, que nos irradia com seu entusiasmo, pela co-orientação. Sua experiência, sensatez e bom humor foram essenciais para realização deste trabalho e para minha formação. Tem sido um grande prazer compartilhar o dia a dia com você sempre com carinho e grande espírito de equipe.

Aos meus pais tão queridos Carlos e Marta, que me deram muito mais que à vida. Agradeço pela educação e pela formação que me proporcionaram. Não há ciência, graduação ou pós graduação que possa ensinar os valores e princípios que vocês me ensinaram. Obrigada pelo carinho, amor incondicional, confiança e por sempre apoiarem minhas escolhas. Agradeço todos os dias por fazer parte da família que vocês dois construíram.

A minha irmã Ludimyla, por ser minha melhor amiga e companheira de todas as horas. Ter irmãos é ter mais olhos e mais corações dentro da gente. É tomar emprestado experiências e força para entender e ver o mundo de outra forma. É amar de um jeito especial, sem querer nada, esperando tudo e oferecendo a própria alma. Nossa família aprendeu e amadureceu muito com tudo que passamos estes anos e você para mim é um exemplo de força, superação e amor pela vida.

Ao Erich, por estar ao meu lado como amigo durante todo o desenvolvimento desta tese e agora, pelo cuidado, carinho e dedicação como meu namorado. Obrigada pela companhia, pela paciência com meus estudos e afazeres e por verdadeiramente torcer por mim.

A Evilin Komegae, que dividiu comigo inúmeros experimentos e momentos de descontração. Obrigada pelas discussões científicas, palpites, viagens, risadas, conversas no café e companhia diária. Obrigada por me ajudar a manter o equilíbrio em um dos momentos pessoais mais difíceis da minha vida. Sem você tudo seria mais difícil. Vou sentir muita a sua falta. Se no mestrado você já foi o meu CD40L agora no doutorado você representou para mim o próprio BCR.

Ao Márcio Ferreira, pela gentileza e carinho durante esses anos de convivência. Aprendi a te respeitar e a te admirar pela pessoa maravilhosa e comprometida com a família e amigos que você é.

A todos os amigos que passaram pelo laboratório de Imunorregulação neste período: Érica Coutinho, Anderson Ramos, Edson Ishizuka, Fernanda Bruni e Fernanda Magalhães, que dividiram comigo tantas experiências profissionais e pessoais e as alunas novas Carolina, Vanessa e Jéssica que virão a dividir.

A todos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada pela boa convivência e ajuda em especial a Leda, Roberto, Maria José, Isaias e Cida.

A todos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas em especial a secretária da pós graduação: Eni.

Ao Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, ao Dr. Sandro Rogério de Almeida e a Dr^a Ana Flávia Popi, que, como membros da Banca de Qualificação, contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões.

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

A Fapesp pelo apoio científico e financeiro.

A todos os meus amigos e amigas de longa data que me acompanharam em tantas etapas e transições importantes da minha vida que, muito embora não tenham seus nomes impressos, direto ou indiretamente participaram deste período de profundo aprendizado para mim. Vocês estão com certeza, guardados no meu coração.

“Nada há de te fazer parar quando segues o caminho que faz teu coração vibrar”

(Carolina Salcides)

RESUMO

GRUND, L. Z. **Influência das células T na diferenciação e manutenção de células B de memória produtoras de anticorpos de longa vida (ASC) induzidas na resposta imune crônica ao veneno de *Thalassophryne nattereri***. 2013. 115 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Recentemente demonstramos que o veneno do peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri* (Niquim) induz a formação de uma resposta imune protetora de longa duração caracterizada por células B produtoras de anticorpos de memória (Bmem) e de longa vida (ASC – *antibody secreting cells*). Estas variam quanto à expressão de B220 e CD43 (B220^{high}CD43^{high}, B220^{high}CD43^{low}, B220^{low}CD43^{high} ou B220^{neg}CD43^{high}) e dependem das citocinas IL-5 e IL-17A para diferenciação terminal (B220^{neg}) e manutenção no local inflamado. Propusemos neste trabalho investigar a presença de subtipos de linfócitos T de memória, o papel exercido pela sinalização CD4 e CD28 sobre a diferenciação e manutenção das ASC e posteriormente analisar a relação hierárquica entre os 2 tipos de células B de memória. A partir de uma combinação de abordagens *in vivo* e *in vitro* demonstramos que a formação de ASC (B220^{neg}) em camundongos BALB/c está relacionada à produção de fatores de sobrevivência produzidos por mastócitos, eosinófilos e neutrófilos bem como por linfócitos T de memória efetores (TeM) CD4⁺CD44⁺CD40L⁺Ly6C⁺ produtores de IL-4, IL-5, IL-17A e IFN- γ na cavidade peritoneal inflamada e 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. Nossos resultados de transferência adotiva de células B de memória demonstram que quanto maior a expressão da molécula B220 nas ASC, independente da origem tecidual, maior é a dependência dos sinais gerados por ambas as moléculas CD4 e CD28 expressas nos linfócitos T dos diferentes compartimentos para a sua sobrevivência. Ainda, a sobrevivência na medula óssea das ASC no estágio final de diferenciação (ASC B220^{neg}) é regulada positivamente pelos 2 sinais. Podemos concluir que CD28 promove o processo hierárquico de diferenciação das ASC B220^{pos} para o estágio terminal ASC B220^{neg} no baço e, ao contrário, prioriza na medula óssea as ASC com alta expressão de B220. Garantindo assim que estas células em estágio intermediário de expressão de B220 possam, após contatos subsequentes com o antígeno, entrar em novos ciclos de diferenciação no GC e diversificar a resposta humoral de alta afinidade. Nossos resultados *in vitro* confirmam que o veneno conjuntamente com IL-17A induzem a diferenciação de maneira hierárquica em ASC B220^{neg} produtoras de IgG1.

Apoio: FAPESP e CNPq

Palavras-chave: *Thalassophryne nattereri*. Células B. Células T de memória. Citocinas. Anticorpos de alta afinidade. Antígeno cognato. IL-17A.

ABSTRACT

GRUND, L. Z. **Influence of T cell on differentiation and maintenance of long-lived antibody-secreting cells (ASC) induced during chronic immune response to *Thalassophryne nattereri* venom.** 2013. 115 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Recently we demonstrated that *Thalassophryne nattereri* (Niquim) fish venom induces the formation of a protective immune response characterized by memory B cells (Bmem) and the long-lived antibody-secreting cells (ASC) which vary in the expression of B220 and CD43 (B220^{high}CD43^{high}, B220^{high}CD43^{low}, B220^{low}CD43^{high} or B220^{neg}CD43^{high}) and depend on the IL-5 and IL-17A cytokines to terminal differentiation (B220^{neg}) and maintained in inflamed tissue. We have proposed in this work to investigate the presence of memory T lymphocytes subtypes, the role played by CD4 and CD28 signaling on differentiation and maintenance of ASC and subsequently analyze the hierarchical relationship between the two types of memory B cells. From a combined *in vivo* and *in vitro* approaches, we have demonstrated that formation of ASC (B220^{neg}) on BALB/c mice is related to the production of survival factors from mast cells, eosinophils and neutrophils as well as from CD4⁺ CD44⁺ CD40L⁺ Ly6C⁺ effector memory T lymphocytes (TeM) producing IL-4, IL-5, IL-17A e IFN- γ in peritoneal cavity and CD4⁺ CD44^{high} CD40L^{neg} Ly6C^{pos} central memory T lymphocytes (TcM) in spleen and bone marrow producing IL-5 e IL-23. Our results of adoptive transfer of memory B cells demonstrate that the larger expression of B220 molecule on ASC, regardless of tissue origin, the larger is the dependence of the signals generated by both CD4 and CD28 molecules expressed in T lymphocytes of different compartments for their survival. Furthermore, the survival of bone marrow ASC on the final stage of differentiation (ASC B220^{neg}) is positively regulated by 2 signals. We conclude that CD28 promotes the differentiation of the hierarchical process to ASC B220^{pos} to terminal stage of ASC B220^{neg} on the spleen and, in contrast, prioritizes on the bone marrow the ASC with high expression of B220. Ensuring then that those cells at an intermediate stage of B220 expression may, after subsequent contacts with the antigen, enter new cycles of GC differentiation and diversify the high affinity humoral response. Our *in vitro* results confirm that the venom together with IL-17A induce a hierarchical manner differentiation on ASC B220^{neg} producing IgG1.

Support: FAPESP e CNPq

Keywords: *Thalassophryne nattereri*. Memory B cells. Memory T cells. Cytokines. High affinity antibodies. Cognate antigen. IL-17A.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 OBJETIVO | 20 |
| 3 ETAPAS REALIZADAS | 21 |
| 3.1 Determinação da participação de células inatas e de fatores de sobrevivência na manutenção das ASC induzidas durante a resposta imune crônica ao veneno de <i>T. nattereri</i> | 21 |
| 3.2 Análise in vivo da indução pelo veneno de subpopulações de linfócitos T de memória | 21 |
| 3.3 Verificação da necessidade de sinais de CD4 ou CD28 na geração das ASC in vivo | 21 |
| 3.4 Verificação da necessidade de sinais de CD4 ou CD28 na manutenção de ASC usando transferência adotiva de células totais induzidas na resposta crônica ao veneno de <i>T. nattereri</i> | 21 |
| 3.5 Verificação da capacidade do veneno e o papel das citocinas na indução da diferenciação hierárquica das ASC | 21 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 22 |
| 4.1 Animais | 22 |
| 4.2 Obtenção dos peixes e extração do veneno | 22 |
| 4.3 Indução de resposta imune de memória pelo veneno | 22 |
| 4.4 Cultura de células esplênicas | 23 |
| 4.5 Obtenção das células da medula óssea | 23 |
| 4.6 Obtenção das células da cavidade peritoneal | 23 |
| 4.7 Purificação de linfócitos B | 24 |
| 4.8 Transferência adotiva de células para animais deficientes de CD4 ou CD28 | 25 |
| 4.9 Detecção de anticorpos veneno-específicos por ELISA | 25 |
| 4.10 PCA para determinação de IgE veneno-específica | 25 |
| 4.11 Quantificação de IL-23 por ELISA | 26 |
| 4.12 Cultura para diferenciação de ASC a partir de linfócitos B | 26 |
| 4.13 Proliferação celular por CFSE | 27 |
| 4.14 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo | 27 |
| 4.15 Avaliação da morte celular por Citometria de Fluxo | 28 |
| 4.16 Morfologia celular | 28 |
| 4.17 Análise estatística | 29 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| I Determinação da participação de células inatas, de distintos linfócitos T de memória e de fatores de sobrevivência na manutenção das ASC induzidas durante a resposta imune crônica ao veneno de <i>T. nattereri</i> | 30 |
| 5.1 O veneno de <i>T. nattereri</i> promove a permanência crônica de células inflamatórias | 30 |
| 5.2 O veneno de <i>T. nattereri</i> mantém a expressão crônica de IL5R nas ASC peritoneais e de Bcl-2 nas ASC dos 3 compartimentos | 34 |
| 5.3 A fase crônica da resposta humoral induzida pelo veneno é caracterizada por linfócitos T de memória e fatores no peritônio e por linfócitos T de memória central na medula óssea | 38 |
| II Verificação da necessidade dos sinais derivados de CD4 ou CD28 na geração das ASC in vivo | 43 |
| 5.4 A produção crônica de anticorpos específicos é dependente dos sinais gerados por CD4 e CD28 .. | 43 |
| 5.5 A geração de linfócitos B de memória na medula óssea e ASC B220 ^{neg} no baço é dependente dos sinais gerados por CD4 e CD28 | 47 |
| III Verificação da necessidade de CD4 ou CD28 na manutenção de ASC usando transferência adotiva de células totais induzidas na resposta crônica ao veneno de <i>T. nattereri</i> | 51 |
| 5.6 Quanto maior a expressão da molécula B220 nas ASC maior é a dependência para a sobrevivência dos sinais gerados por ambas as moléculas CD4 e CD28 | 51 |
| IV Confirmação do papel intrínseco das moléculas CD4 ou CD28 no compartimento de células B de memória gerado pelo veneno | 59 |
| 5.7 ASC B220 ^{pos} requerem a participação de CD4 para sobreviverem no peritônio e no baço | 59 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>5.8 Células Bmem se diferenciam em ASC B220^{pos} que necessitam dos sinais de CD4 para sobreviverem</i> | 65 |
| V Verificação da capacidade do veneno e o papel das citocinas na indução da diferenciação hierárquica das ASC | 69 |
| <i>5.9 O processo hierárquico de diferenciação de ASC depende de sinais integrados derivados do antígeno e de IL-17A</i> | 69 |
| 6 CONCLUSÃO | 70 |
| REFERÊNCIAS | 71 |
| APÊNDICE A - IL-5 e IL-17A são críticas para resposta IgE crônica e diferenciação de células produtoras de anticorpos de longa vida nos tecidos inflamados. | 80 |
| APÊNDICE B - O processo hierárquico de diferenciação de ASC depende de sinais integrados derivados do antígeno e de IL-17A. | 81 |

1 INTRODUÇÃO

A memória imunológica é um marco da resposta imune adaptativa de vertebrados superiores e é responsável pela imunidade de longo prazo contra uma enorme variedade de agentes infecciosos. A contribuição de linfócitos 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 (*germinal center* – GC) dos órgãos linfoides secundários: linfócitos B de memória (Bmem) e linfócitos B de memória de longa vida (*antibody secreting cells* – ASC; CALAME, 2005; MANZ; THIEL; RADBRUCH, 1997; SHAPIRO-SHELEF; SLIFKA et al., 1998).

Linfócitos B de memória proliferam e produzem rapidamente anticorpos IgG após novo contato com o antígeno (HO et al., 1986; SMITH et al., 1996). Essas células expressam tipicamente IgM, IgG ou IgA de membrana e carregam mutações somáticas dentro da região variável da porção CDR (KLEIN; RAJEWSKY; KUPPERS, 1998; RAJEWSKY, 1996; TANGYE et al., 1998) e podem expressar vários marcadores de superfície como CD19, CD20, CD27 e B220. Embora demonstrem preferência para se localizarem nos sítios de sua formação elas também recirculam (BAINE; THORBECKE, 1982) e montam respostas vigorosas para o antígeno original após uma segunda exposição. No entanto, a grande maioria dos anticorpos IgG séricos antígeno-específicos é produzida por ASC residentes na medula óssea (MANZ et al., 1998; McMILLAN et al., 1972) formadas principalmente no GC dos órgãos linfoides secundários (DILOSA et al., 1991).

As ASC, embora sejam parte do compartimento B de memória diferem fenotipicamente das células B de memória por não apresentarem marcadores de superfície como CD19, MHC de classe II, CD20 ou B220 e expressam moléculas como CD138 (sindecin-1), CD62L, CD43, CD38 e a molécula CD93 (CHEVRIER et al., 2009; KALLIES et al., 2004; McHEYZER-WILLIAMS; DRIVER; HEYZER-WILLIAMS, 2001). A medula óssea é descrita como o ambiente favorável para as ASC (frequência de 1%) por produzir fatores extrínsecos que contribuem para a sua sobrevivência como as citocinas IL-6, IL-5, TNF- α e a quimiocina CXCL12, APRIL e BAFF, e expressar o ligante da molécula de adesão CD44 (CASSESE et al., 2003; HOOIJKAAS et al., 1983; INGOLG et al., 2005; MANZ et al., 2005; O'CONNOR et al., 2004; SCHWALLER et al., 2007; TERSTAPPEN et al., 1990; THOMPSON et al., 2001).

A população de ASC mantém altos títulos de anticorpos de alta afinidade na circulação por longos períodos de tempo. Além de ocuparem nichos limitados na medula óssea também povoam o baço (SMITH et al., 1997) e locais inflamados (GRUND et al., 2012). ASC sobrevivem por mais de 1 ano em camundongos, e respondem tão rápido ao estímulo antigênico quanto à população de Bmem.

Nas últimas décadas vários esforços vem sendo feitos para compreender qual a importância evolutiva de se manter duas populações de memória. Os achados demonstram que além das

diferenças fenotípicas e de localização, as Bmem e as ASC apresentam BCR com diferentes afinidades (SMITH et al., 1997). Em experimentos com antígenos virais como influenza, HIV e vírus West Nile foi possível demonstrar que as Bmem apresentam menos mutações nos genes das cadeias pesadas (VH) do BCR comparadas as ASC (WRAMMERT et al., 2008), porém são capazes de reconhecer variações em patógenos mutantes que escapam da neutralização pelos anticorpos pré-existentes produzidos pelas ASC (PURTHA et al., 2011).

Quanto à sobrevivência, acredita-se que Bmem persistem em um estado de repouso na ausência do antígeno (KALIA et al., 2006; MARUYAMA; LAM; RAJEWSKY, 2000; VIEIRA; RAJEWSKY, 1990). Porém, alguns autores acreditam que a persistência do antígeno, por meses e até anos, na forma de imunocomplexos na superfície das células dendríticas foliculares (fDC) é um fator essencial para a manutenção das Bmem e a produção de anticorpos específicos (GRAY, 2002; IMAI; YAMAKAWA; KASAJIMA, 1998; SLIFKA; AHMED, 1998; TEW et al., 1997).

Acredita-se que o processo de diferenciação das ASC obedeça uma sequência hierárquica onde Bmem 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). A molécula de B220 modula a transdução de sinal via BCR e é negativamente regulada a partir do momento que as Bmem começam a expressar moléculas de localização como VLA-4, VLA-5, CD9, CD44, CD43, apontando uma maior necessidade destas células de migração e interação com o microambiente.

Vários modelos têm sido propostos para explicar a persistência de níveis séricos de anticorpos protetores e a longevidade das ASC como, por exemplo, infecção crônica, reexposição ao antígeno, reatividade cruzada com outros antígenos ou antígenos próprios, seleção de células produtoras de anticorpos de alta afinidade em virtude da apoptose de células com baixa afinidade (SLIFKA; AHMED, 1998) e recentemente a capacidade dessas células de responderem a sinais internos e do microambiente (CASSESE et al., 2003; SHAFFER et al., 2000).

Hoje se sabe que a sobrevivência das ASC é em parte derivada de fatores intrínsecos como aumento na resistência destas células aos estímulos apoptóticos com a repressão dos fatores Pax-5 e Bcl-6 por BLIMP-1 (NERA et al., 2006), aumento na expressão do gene IRF-4 (fator regulador de interferon 4), restrito a plasmócitos originados a partir da seleção no GC (PERNIS et al., 2002) e ainda aumento da expressão de Xbp-1 que controla o estresse intracitoplasmático causado pela secreção de anticorpos (SHAFFER et al., 2000).

Células T CD4⁺ desenvolvem um papel decisivo na regulação da resposta imune através da indução de citocinas-chave. Células T CD4⁺ desempenham múltiplas funções desde a ativação de células do sistema inato de defesa, ativação de linfócitos B, T citotóxicos, assim como a ativação de células não imunes, Também exercem um papel crítico na supressão e controle da resposta imune.

Células T CD4⁺ podem se diferenciar em diferentes subtipos dependendo do estímulo de citocinas no microambiente, de fatores de transcrição e modificações epigenéticas. Estudos recentes identificaram novos subtipos de células T CD4⁺ baseado na clássica identificação antagônica T-helper 1 (Th1) e T-helper 2 (Th2) descrita por Mosmann e Coffman (1989). Estes novos subtipos incluem: Th17, *follicular helper T cell* (Tfh), T-regulador induzido (iTreg), e T regulador tipo 1 (Tr1), assim como T-helper 9 (Th9). Estes diferentes subtipos celulares são caracterizados pelo perfil de citocinas produzidas e distintas funções efetoras.

Linfócitos T CD4⁺ são um componente chave da memória imunológica. Na sua ausência, a geração de Bmem ou ASC de alta afinidade (FRANCUS; FRANCUS; SISKIND, 1991; GERSHON; PAUL, 1971) ou a manutenção e a expansão secundária de linfócitos T CD8⁺ de memória são prejudicados. A perda selectiva de ASC na medula óssea em animais deficientes nas moléculas CD80/CD86 sugere o papel essencial da sinalização via CD28 em células estromais dentro do nicho de sobrevivência na medula (SHAPIRO-SHELEF; CALAME, 2005). Ainda a perda da expressão de CD28 nas ASC pode acarretar um prejuízo na sua capacidade de sobrevivência e consequentemente na produção duradoura de anticorpos (DELOGU et al., 2006).

O peixe *Thalassophryne nattereri*, conhecido popularmente como niquim, destaca-se entre os animais peçonhentos de importância médica no Brasil pelo número de acidentes em banhistas e pescadores, principalmente nas regiões norte e nordeste. Possui um aparelho inoculador de veneno completo com quatro espinhos canaliculados e pontiagudos que possuem comunicação com as glândulas de veneno. Os acidentes acometem principalmente banhistas e pescadores e ocorrem quando o peixe é pisado ou tocado, afetando principalmente mãos e pés, o que permite o rompimento do tegumento da glândula e a liberação do veneno pelo canal. Os sintomas decorrentes do envenenamento (dor, eritema e edema) e as sequelas 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; ROCHA, 1989; AUTO, 1992; FONSECA; LOPES-FERREIRA, 2000; FACÓ et al., 2005; HADDAD JR. et al., 2003).

O veneno de *T. nattereri* e suas toxinas vêm sendo amplamente estudados quanto a diferentes aspectos como: os efeitos tóxicos causados nas vítimas humanas (FONSECA; LOPES-FERREIRA, 2000) e em modelos experimentais (FACÓ et al., 2003; LOPES-FERREIRA et al., 1998, LOPES-FERREIRA et al., 2001; LOPES-FERREIRA et al., 2002), os aspectos bioquímicos e farmacológicos (LOPES-FERREIRA et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2006), e a capacidade de indução de anticorpos neutralizantes para os principais efeitos tóxicos em camundongos (LIMA et al., 2003; LOPES-FERREIRA et al., 2000; PIRAN-SOARES et al., 2007).

Os trabalhos realizados por nosso grupo na busca por uma terapia eficiente para o envenenamento causado pelo peixe peçonhento *T. nattereri* demonstraram a importância de

anticorpos específicos produzidos em altos e constantes níveis em coelhos ou equinos na neutralização das atividades tóxicas (LOPES-FERREIRA et al., 2000; PIRAN-SOARES et al., 2003) e comprovaram 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. Além da verificação da persistência de anticorpos IgG anti-veneno em camundongos, Piran-Soares e colaboradores (2007) demonstraram que pacientes acidentados pelo peixe apresentam altos níveis de IgG anti-veneno por até seis meses após o acidente.

Os estudos dos mecanismos de ação do veneno ou de suas toxinas no sistema imune tiveram início em 2006 e identificaram em camundongos que o veneno induz uma resposta 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-específico IgG1 e IgG2a. Ainda, observamos que os linfócitos B destes animais apresentavam baixos níveis da molécula CD45R/B220 (GRUND et al., 2006).

A presença de resposta T dirigida com altos níveis de anticorpos IgG específicos confirmaram que células B com funções efetoras e/ou de memória foram geradas e ainda, a produção de células B negativas para a molécula B220 sugeriu a diferenciação ASC que pode representar uma fonte importante de anticorpos protetores e garantir a imunidade de longo prazo.

Estudos adicionais para o melhor entendimento do compartimento de memória gerada pelo veneno (GRUND et al., 2012) confirmaram que o veneno de *T. nattereri* é capaz de desencadear uma resposta humoral crônica. Até 74 dias da imunização observamos uma aumentada produção de anticorpos específicos IgG2a que diminuem após 120 dias. Ao contrário, os níveis de IgG1 e de IgE específicos aumentam drasticamente após 120 dias, comparados aos níveis observados entre 21–74 dias. Estes resultados indicam que a persistente interação das proteínas do veneno com as células do centro germinativo do baço promovem uma mudança de direção da resposta de Th1 para Th2. Neste estudo também confirmamos uma relação hierárquica de desenvolvimento das ASC, uma vez que o veneno induziu dependente do tempo e do compartimento (peritônio, baço ou medula óssea) células com diferentes expressões de B220 e principalmente no peritônio inflamado a diferenciação e a manutenção de células ASC terminalmente diferenciadas (B220^{neg}). Observamos que a resposta humoral crônica foi acompanhada por um intenso processo inflamatório no peritônio, caracterizado por mastócitos, eosinófilos e principalmente por neutrófilos.

Ainda neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez o importante papel de IL-17A juntamente com IL-5 na diferenciação e na manutenção de ASC com fenótipo B220^{neg}, uma vez que o tratamento dos animais com anticorpos neutralizadores anti-IL-17A ou anti-IL-5 antes da imunização e da dose reforço com o veneno de *T. nattereri* impediu 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.

Ainda neste trabalho observamos que a fase de memória da resposta humoral induzida pelo veneno é composta 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. Em conjunto, observamos que a resposta humoral crônica induzida pelo veneno apresenta uma modulação complexa e é marcada por diferentes subtipos de linfócitos T produtores de citocinas típicas o que gera um microambiente rico em coestimulação e mediadores como citocinas.

2 OBJETIVO

Embora, muitos cenários tenham sido propostos para explicar a longevidade das Bmem e das ASC, o papel dos linfócitos T, das moléculas coestimuladoras assessorias, do antígeno ou de citocinas no microambiente têm sido pouco abordados e permanece uma boa área para investigações. Neste trabalho nosso objetivo foi investigar a presença de subtipos de linfócitos T de memória induzidos na resposta humoral crônica ao veneno de *T. nattereri*, assim como a influencia dos sinais gerados por CD4 ou CD28 na diferenciação e manutenção das ASC em experimentos *in vivo* e *in vitro*.

3 ETAPAS REALIZADAS

3.1 Determinação da participação de células inatas e de fatores de sobrevivência na manutenção das ASC induzidas durante a resposta imune crônica ao veneno de *T. nattereri*

- Determinação da presença de células inatas na cavidade peritoneal de animais BALB/c com resposta crônica ao veneno (15, 49 e 121 d)
- Avaliação da expressão de receptores e fatores nucleares nas ASC isoladas (CD138+) de animais com resposta crônica ao veneno (120 d)

3.2 Análise *in vivo* da indução pelo veneno de subpopulações de linfócitos T de memória

- Determinação da presença de células T de memória central (CD4⁺ CD44⁺ Ly6C⁺) ou efetora (CD4⁺ CD44⁺ CD40L⁺) no peritônio, baço e medula óssea de animais BALB/c com resposta crônica ao veneno
- Identificação da produção de citocinas por estas células T de memória e de IL-23 no sobrenadante do lavado da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea

3.3 Verificação da necessidade de sinais de CD4 ou CD28 na geração das ASC *in vivo*

- Determinação da resposta humoral (IgE, IgG1 e IgG2a veneno-específicos) em camundongos deficientes em CD ou CD28 com resposta de memória (121d)
- Análise de diferentes populações de células B de memória

3.4 Verificação da necessidade de sinais de CD4 ou CD28 na manutenção de ASC usando transferência adotiva de células totais induzidas na resposta crônica ao veneno de *T. nattereri*

- Avaliação da composição da células totais transferidas e purificação dos subtipos de B de memória
- Determinação da capacidade de células totais, Bmem ou ASC esplênicas ou medulares obtidas de animais com resposta crônica ao veneno de manterem a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a veneno-específicos em animais deficientes de CD4 ou CD28
- Determinação da capacidade de células totais, Bmem ou ASC esplênicas ou medulares obtidas de animais com resposta crônica ao veneno de manterem a expansão de subtipos de ASC nos animais deficientes de CD4 ou CD28

3.5 Verificação da capacidade do veneno e o papel das citocinas na indução da diferenciação hierárquica das ASC

- **The Hierarchical Process of Differentiation of Long-Lived Antibody-Secreting Cells Is Dependent on Integrated Signals Derived from Antigen and IL-17A.** Lidiane Zito Grund, Monica Lopes-Ferreira, Carla Lima. Research Article | published 18 Sep 2013 | PLOS ONE 10.1371/journal.pone.0074566.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, pesando entre 18 e 22 g fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e camundongos C57BL/6 selvagens (*WT*) ou deficientes nos genes de CD4 (*CD4 KO*) ou de CD28 (*CD28 KO*) obtidos do biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP. Antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos em estantes ventiladas em condições controladas de temperatura, umidade e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h), com água e ração *ad libitum*. Os experimentos estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelas Comissões de Ética Animal do Instituto Butantan (666/09) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (025).

4.2 Obtenção dos peixes e extração do veneno

Para a extração do veneno foram utilizados peixes da espécie *T. nattereri*, coletados em diferentes épocas do ano no estado de Alagoas, no encontro das águas da Lagoa Mundaú com a Praia de Barra Nova. As coletas dos peixes foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, Licença Permanente para Coleta de Material Zoológico N°14.693-1). A extração do veneno foi realizada através da compressão das glândulas na base dos espinhos forçando a expulsão do veneno (LOPES-FERREIRA et al., 1998). Logo após a extração, o veneno foi centrifugado e mantido à -20 °C. A concentração de proteína no veneno foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), usando como padrão soro albumina bovina (Sigma, Chemical Company; ST. Louis, MO, USA). Os níveis de endotoxinas foram avaliados pelo método cromogênico *Limulus amoebocyte lysate* (Bio-Whittaker) de acordo com as especificações do fabricante (resultando numa dose total menor que 0,8 pg de LPS). A quantidade de veneno foi expressa pelo seu conteúdo protéico em mg/mL.

4.3 Indução de resposta imune de memória pelo veneno

Camundongos BALB/c, C57BL/6 *WT*, *CD4 KO* ou *CD28 KO* (n = 5) foram imunizados pela via intraperitoneal (i.p.) com o veneno de *T. nattereri* (10 µg) adsorvido em hidróxido de alumínio (1,6 mg) em um volume final de 500 µL de salina estéril por animal. Os animais receberam até quatro doses de reforço com a mesma quantidade de veneno sem adjuvante. Animais controle receberam

apenas o adjuvante no dia 0. Após 15, 49 ou 121 d da primeira imunização, os animais foram sangrados para obtenção do plasma para análise dos anticorpos e mortos para obtenção das suspensões celulares do peritônio, do baço e da medula óssea femoral.

4.4 Cultura de células esplênicas

Os baços dos animais imunizados ou não com o veneno foram retirados de forma estéril e em seguida submetidos à maceração em homogeneizador com meio de cultura RPMI 1640 para recuperação da suspensão celular. Este homogenato foi centrifugado a 309,5 g durante 8 min à 4 °C e submetido a lavagens e hemólise. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultura suplementado (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado – SFB, 2 mM de L-glutamina, 0.1% 2-mercaptoetanol, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 1 mM de piruvato de sódio e 0.1% de penicilina/estreptomicina). Os eventuais grumos foram retirados por sedimentação por 5 min no gelo e a viabilidade da suspensão celular obtida pela contagem em azul de Trypan. Uma parte das células foi marcada com anticorpos específicos para análise das sub-populações por citometria de fluxo e 6×10^6 células/poço foram cultivadas em meio RPMI suplementado na presença ou na ausência de veneno de *T. nattereri* (10 µg/poço) por 72 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período de tempo, as placas foram centrifugadas a 309,5 g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes coletados e conservados à -20 °C para dosagem da citocina IL-23.

4.5 Obtenção das células da medula óssea

Os cordões medulares dos fêmures dos camundongos imunizados ou controle foram desprendidos das trabéculas ósseas com meio RPMI 1640 com auxílio de agulha (24 ¼ G). As células foram centrifugadas a 309,5 g por 8 min a 4 °C, o sobrenadante coletado para dosagem da citocina IL-23 e as células ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado. Após a lise das hemácias as células foram centrifugadas e ressuspensas novamente em PBS + 0.1 % BSA e marcadas com os diversos anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo.

4.6 Obtenção das células da cavidade peritoneal

Para obtenção das células do peritônio os animais imunizados e controle foram mortos e tiveram a cavidade peritoneal lavada com PBS + 10 mM EDTA para obtenção da suspensão celular que foi centrifugada a 309,5 g a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante foi separado e congelado à -20 °C

para dosagem da citocina IL-23, enquanto o botão celular foi ressuspense em PBS + 0.1% BSA e marcado com os diversos anticorpos para citometria de fluxo.

4.7 Purificação de linfócitos B

As purificações celulares foram feitas através do uso de kits com *microbeads* (MACS; Miltenyi Biotec.) seguindo as recomendações do fabricante e utilizando o separador automático AUTOMACS™ (Miltenyi Biotec.). Para os ensaios de transferência adotiva, as ASC foram separadas utilizando um kit de separação de plasmócitos CD138^{pos} formado por duas etapas. Primeiro, células não plasmáticas foram depletadas utilizando um coquetel com anticorpos anti-CD49b e anti-CD45R biotinizados. 1×10^8 células foram ressuspensas em 400 μ L de tampão de separação com adição de 100 μ L do coquetel. Estas foram incubadas por 10 min sob refrigeração, ressuspensas e centrifugadas à 309,5 *g* por mais 10 min, logo após o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500 μ L de tampão e incubadas por 10 min sob-refrigeração com 100 μ L de anti-biotina *microbeads*. Após lavagem e centrifugação, as células foram resuspensas em 500 μ L de tampão. No separador, o programa usado foi o DEPL025 para seleção negativa. As células negativas não aderidas à coluna foram coletadas e submetidas à segunda etapa de separação onde foram então ressuspensas em 400 μ L de tampão e 100 μ L de anti-CD138 *microbeads*. Estas foram incubadas por 15 min sob refrigeração, ressuspensas e centrifugadas à 309,5 *g* por 10 min, logo após o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500 μ L de tampão. No separador, o programa usado foi o POSSELD2 para seleção positiva. As células positivas aderidas à coluna foram coletadas e contadas em azul de Trypan. A pureza da separação foi determinada por citometria de fluxo.

Para os ensaios de transferência adotiva, as Bmem foram separadas utilizando um kit de separação de células IgG1 e IgG2a positivas. Para tanto, 1×10^7 células foram ressuspensas em 80 μ L de tampão e 20 μ L de anti-IgG1 mais 20 μ L de anti-IgG2a *microbeads*. Estas células foram incubadas por 15 min sob refrigeração, ressuspensas e centrifugadas à 309,5 *g* por 10 min, logo após o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500 μ L de tampão. No separador, o programa usado foi o POSSEL para seleção positiva. As células positivas aderidas à coluna foram coletadas e contadas em azul de Trypan. A pureza da separação foi determinada por citometria de fluxo.

Para os ensaios de diferenciação *in vitro*, as suspensões celulares do peritônio, do baço e da medula foram usadas para purificação de linfócitos B CD19 positivos utilizando anti-CD19 *microbeads*. 1×10^7 células foram ressuspensas em 90 μ L de tampão de separação com adição de 10 μ L de anticorpos anti-CD19 (Ly-1) *microbead*. Estas foram incubadas por 15 min sob refrigeração, ressuspensas e centrifugadas à 309,5 *g* por 10 min, logo após o sobrenadante foi descartado e as

células ressuspensas em 500 µL de tampão. No separador, o programa usado foi o *Posse1* para seleção positiva. As células positivas aderidas à coluna foram coletadas e contadas em azul de Trypan. A pureza da separação foi determinada por citometria de fluxo.

4.8 Transferência adotiva de células esplênicas e medulares para animais deficientes de CD4 ou CD28

As células totais, Bmem ou as ASC purificadas do baço ou da medula óssea femoral após 120 d de animais C57BL/6 *WT* controle ou imunizados com o veneno foram processadas, centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado. A viabilidade celular foi aferida com azul de Trypan. As células vivas foram contadas na câmara de Neubauer e injetadas endovenosamente (4×10^7 células/animal) em animais virgens C57BL/6 *WT*, CD4 *KO* ou CD28 *KO*. Após 7 d da transferência os animais recipientes foram desafiados pela injeção i.p. com o veneno de *T. nattereri* (10 µg) e foram submetidos a sangria exploratória após 80 d (HEBEIS et al., 2004), ou mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral que foram analisadas quando aos diferentes subtipos de células B de memória.

4.9 Detecção de anticorpos veneno-específicos por ELISA

Para determinação de IgG1 e IgG2a, placas de 96 poços foram recobertas com 3 µg/mL de veneno que após incubação, lavagem, bloqueio e lavagem foram adicionadas dos plasmas previamente diluídos. Em seguida as placas foram adicionadas de anticorpos de detecção biotinizados específicos para IgG1 ou IgG2a que após incubação e lavagem, receberam a adição da do conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, e finalmente o substrato cromógeno foi adicionado. A reação de cor foi lida em espectrofotômetro a 490 nm. Curvas-padrão, utilizando concentrações conhecidas de anticorpos murinos purificados foram realizadas para extrapolação da densidade óptica das amostras na curva e, assim, determinação da quantidade destes isotipos nas amostras. O limite de detecção para as duas imunoglobulinas foi de 1,56 µg/mL. Os resultados foram expressos como a média das concentrações acrescida do desvio-padrão das amostras de cada grupo.

4.10 PCA para determinação de IgE veneno-específica

A determinação de anticorpos anafiláticos IgE específicos foi feita pela reação de *anafilaxia cutânea passiva* -PCA, segundo as técnicas descritas por Mota e Wong (1969). Para a determinação de anticorpos anafiláticos IgE específicos para o veneno, ratos Wistar previamente depilados no dorso foram injetados intradermicamente com 100 µL das diluições seriadas dos plasmas obtidos de camundongos controle ou imunizados com o veneno. Após 18 h de sensibilização, os animais foram

desafiados intravenosamente com azul de Evans a 0,25% contendo 100 µg de veneno. Em seguida, a leitura da reação foi feita 30 min após o desafio, observando-se o diâmetro da reação na pele invertida do animal. Os títulos de IgE foram expressos como a recíproca da maior diluição dos plasmas que resultou em uma reação positiva maior que 5 mm de diâmetro. Todos os testes foram feitos em triplicata e diferenças entre os títulos de PCA maiores que 2 vezes foram consideradas significativas (FOX; CHIORAZZI; KATZ, 1976; ISHIZAKA; ADACHI, 1976).

4.11 Quantificação de IL-23 por ELISA

Os níveis da citocina IL-23 no sobrenadante do lavado da cavidade peritoneal, do baço ou da medula óssea femoral foram determinados por ELISA sanduíche. Microplacas (Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas por 18 h com o anticorpo monoclonal específico para IL-23. Após lavagem e distribuição das amostras foi adicionado o anticorpo específico conjugado à biotina. Para a revelação da ligação, solução contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno foi adicionada. A reação de cor foi lida em espectrofotômetro a 450 nm. Curva-padrão utilizando concentrações conhecidas da citocina recombinante foi realizada para quantificação das amostras. O limite de detecção para IL-23 foi de 39 pg/mL. Os resultados foram expressos como a média das concentrações das amostras de cada grupo acrescida do desvio-padrão.

4.12 Cultura para diferenciação de ASC a partir de linfócitos B

Linfócitos B CD19 positivos purificados a partir das suspensões celulares do peritônio, baço e medula obtidas após 48 d de animais controle (virgens) ou imunizados com veneno de *T. nattereri* (memória) foram cultivados em condições básicas que favorecem a diferenciação em ASC de acordo com Zhang e colaboradores (2001) usando meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM-Gibco Cell Culture, Invitrogen Corp., Grand Island, NY) suplementado com 10% SFB (Sigma-Aldrich, St, Lois, MO), L-glutamina, antibióticos (penicilina, gentamicina e streptomina, Gibco), HEPES (Invitrogen Corp., Grand Island, NY), pH 7,5. A viabilidade celular da cultura e a proliferação foram determinadas no primeiro dia para avaliação da qualidade técnica empregada e das características das células precursoras e também ao final da cultura. Na primeira etapa da cultura (fase de ativação da célula B: 0 a 4 d) os linfócitos B CD19 positivos purificados foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços ($1,5 \times 10^5$ células/mL) e cultivados a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ na presença das citocinas recombinantes básicas de manutenção como IL-2 (50 ng/mL), IL-4 (50 ng/mL) e IL-10 (50 ng/mL) e do anticorpo anti-CD40 mAb (50 ng/mL). Nesta etapa, o veneno de *T. nattereri* (20 µg/mL) ou o ligante de TLR9, CpG (oligodeoxynucleotides - 2,5 µg/mL) também foram

adicionados. Na segunda fase da cultura de geração de plasmablasto (4 a 6 d), as células foram lavadas e incubadas novamente com meio IMDM suplementado acrescido de citocinas recombinantes básicas de manutenção como IL-2 (50 ng/mL), IL-10 (50 ng/mL) e IL-6 (50 ng/mL). E as citocinas recombinantes também foram adicionadas: IL-17A (1 ng/mL), IL-21 (1 ng/mL), IL-23 (1 ng/mL), IL-33 (1 ng/mL), ou a combinação delas. Nos 3 últimos dias da cultura (fase de geração de plasmócito), as células foram lavadas e mantidas na presença de IL-6 (50 ng/mL). Ao final, as células foram recuperadas e centrifugadas para obtenção do sobrenadante celular para dosagem de anticorpos específicos e das células para análise fenotípica.

4.13 Proliferação celular por CFSE

Para monitorar a divisão celular, linfócitos B provenientes do primeiro e último dia de cultura (1×10^6 células/mL) foram incubados por 10 min a 37 °C com 5 mM CFSE (*5- and 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*; Molecular Probes). A presença remanescente de CFSE classifica a população de células proliferativas em grupos de acordo com o número de divisões celulares. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com meio de cultura gelado, permaneceram 5 min no gelo e foram centrifugadas a 309,5 g por 5 min. As células foram então distribuídas e cultivadas por 4 d a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ em meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM- Gibco) suplementado com 10% SFB (Sigma-Aldrich), L-glutamina, antibióticos (penicilina e streptomina, Gibco), HEPES, pH 7.5 e gentamicina (Invitrogen). Ao final da cultura, as células foram centrifugadas a 309,5 g por 5 min e ressuspensas em PBS. A proliferação das células foi determinada por citometria de fluxo (488 nm) no FACSCalibur (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA) e os dados foram analisados com o programa CellQuest Pro (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). A marcação do CFSE foi combinada com marcador do subtipo analisado.

4.14 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo

Para avaliar as diferentes populações de linfócitos B, a expressão de moléculas membranas ou intracelulares, as células purificadas dos diferentes compartimentos (peritônio, baço e medula óssea) foram primeiramente neutralizadas com o anticorpo purificado de rato IgG2bk anti-mouse CD16/CD32 por 30 min a 4 °C. Em seguida foram lavadas com meio RPMI 1640 e centrifugadas a 309,5 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante celular foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 e incubadas por 30 min à 4 °C no escuro com os seguintes anticorpos (BD Pharmingen, Oxford, UK) marcados com diferentes fluorocromos: controles isotópicos PE rat IgG2ak,

PE-Cy5 rat IgG2aκ, FITC rat IgG2aκ e PE rat IgG2bκ ou os anticorpos anti-mouse CD4, anti-mouse CD5, anti-mouse CD11c, anti-mouse CD11b, anti-mouse CD19, anti-mouse CD21, anti-mouse CD21/CD35, anti-mouse CD23, anti-mouse CD31, anti-mouse CD29, anti-mouse CD34, anti-mouse CD43, anti-mouse CD44, anti-mouse CD45R/B220, anti-mouse CD69, , anti-mouse CD105, anti-mouse CD117, anti mouse CD138, anti-mouse CD154 (CD40L), anti-mouse CD185 (CXCR5), anti-mouse CD125 (TRFK5, IL5R), anti-mouse CD217 (IL17R), anti-mouse CD268 (BAFFR), anti-mouse CD278 (ICOS), anti-mouse CCR3, anti-mouse IgG (específico para IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3,) anti-mouse Ly6C e anti-mouse Ly6G. Após nova lavagem e centrifugação as células foram ressuspensas em formaldeído a 1% e deixadas a 4 °C até a leitura.

Para marcação intracelular, as células foram fixadas e permeabilizadas por 20 min no gelo com a solução Cytotfix/Cytoperm (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). Em seguida, foram centrifugadas com a solução de lavagem específica e incubadas por 10 min a 4 °C com anticorpos anti-mouse Bcl-2, anti-mouse IgG, anti-mouse IL-17A, anti-mouse IFN-γ, anti-mouse IL-4 ou 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, San Diego, CA, USA). Os eventos (50.000) foram adquiridos e analisados com o programa CellQuest Pro (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) seguido de marcação específica e as células mortas foram dispensadas. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem ou pela intensidade média de fluorescência.

4.15 Avaliação da morte celular por Citometria de Fluxo

Para a detecção de células mortas tanto por necrose, quanto por apoptose usamos a dupla marcação com anexina-V FITC (556420) e iodeto de propídeo (PI, 556463), ambos provenientes da BD Pharmingen. As células antes ou após a cultura foram centrifugadas, ressuspensas e incubadas em 100 µL tampão de ligação (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4) por 15 min no escuro com 10 µL de PI e 5 µL de anexina-V FITC para em seguida serem analisadas por citometria de fluxo.

4.16 Morfologia celular

Para montagem das lâminas foram utilizados 100 µL das suspensões celulares após a cultura em citoblocos suspensos com lâminas de vidro. As lâminas foram submetidas à centrifugação a 309,5

g por 10 min utilizando centrífuga Serocito R-01000 e F-000679 e foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e examinadas ao microscópio óptico.

4.17 Análise estatística

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*1 Determinação da participação de células inatas, de distintos linfócitos T de memória e de fatores de sobrevivência na manutenção das ASC induzidas durante a resposta imune crônica ao veneno de *T. nattereri**

*5.1 O veneno de *T. nattereri* promove a permanência crônica de células inflamatórias*

No trabalho de mestrado nossos resultados demonstraram que o veneno de *T. nattereri* foi capaz de induzir ASC de diferentes fenótipos nos 3 compartimentos de camundongos BALB/c imunizados com resposta crônica, porém somente na cavidade peritoneal foi observada a presença de células terminalmente diferenciadas, negativas para a molécula B220: B220^{neg}CD43^{low}CD138^{pos} e fenômeno dependente de IL-5 e IL-17A. Neste trabalho, nosso primeiro passo foi avaliar se a resposta humoral crônica induzida pelo veneno com a presença de antígeno retido pelas fDC esplênicas foi acompanhada de infiltrado celular inflamatório nos diferentes compartimentos: peritônio, baço e medula. Para isto, camundongos BALB/c machos foram imunizados com as proteínas do veneno do *T. nattereri* nos dias 0 e 7. Após 14, 48 ou 120 d os animais receberam doses reforços de veneno sem adjuvante e foram avaliados nos dias 15, 49 ou 121 (Fig. 1).

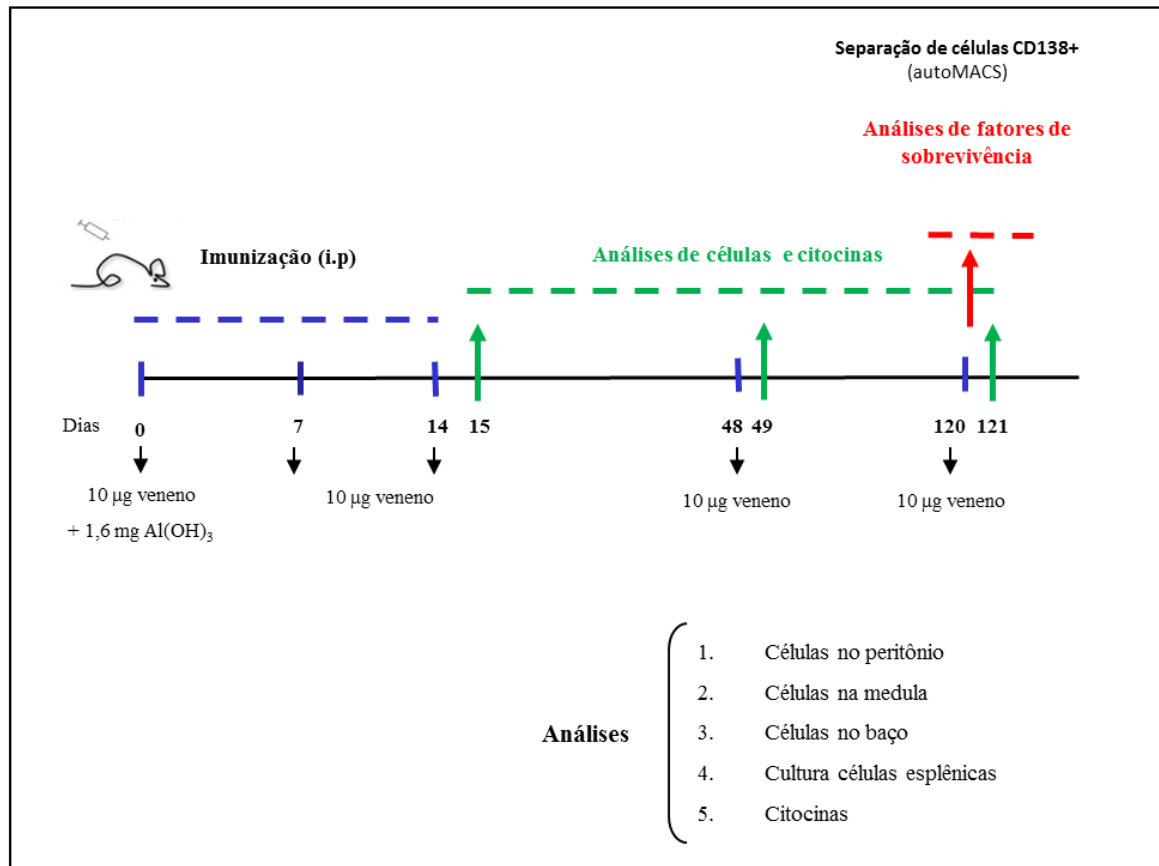
Na Figura **2A**, observamos um intenso infiltrado celular na cavidade peritoneal dos animais imunizados com o veneno em todos os períodos analisados em relação aos animais controle. No baço dos animais imunizados observamos um grande infiltrado de células que diminuiu com o tempo de observação, e, ao contrário, na medula óssea somente foi verificado aumento no número total de células no período crônico, 121 d. Na Figura **2B**, após análise por citometria de fluxo observamos que no peritônio, o aumentado recrutamento de células em 15 d foi caracterizado pelo influxo de neutrófilos e principalmente grande número de eosinófilos. Em 49 d o veneno induziu o influxo de macrófagos, eosinófilos e principalmente de neutrófilos para a cavidade peritoneal. No período crônico (121 d) foi observado um intenso influxo de neutrófilos e mastócitos e ainda a presença de poucos eosinófilos.

Este resultado corrobora os achados que mostram que a capacidade de formação de nichos alternativos para ASC em tecidos inflamados se deve à formação de um microambiente de citocinas e fatores de sobrevivência derivados de células inflamatórias (CASSESE et al., 2001; ODENDAHL et al., 2005). Recentemente, Huard e colaboradores (2008) demonstraram que o fator solúvel APRIL secretado por neutrófilos no tecido linfoide associado à mucosa inflamada sustenta a produção local de anticorpos pelas ASC. Lin e colaboradores (2011) demonstraram que as grandes fontes de IL-17A

em pele normal ou lesão por psoríase são mastócitos e neutrófilos e não células T, e o mecanismo pelo qual essa citocina é liberada envolve a morte do neutrófilo por necrose (NETosis) com a formação de redes denominadas NET (*Neutrophil Extracellular Traps*) (DENKERS; DEL RIO; BENNOUNA, 2003; PUGA, et al., 2011; TANI, et al., 2001). Chu e colaboradores (2011) demonstraram que eosinófilos também são uma importante fonte de fatores de sobrevivência como APRIL e IL-6 para as ASC e podem ser encontrados em íntimo contato com estas células.

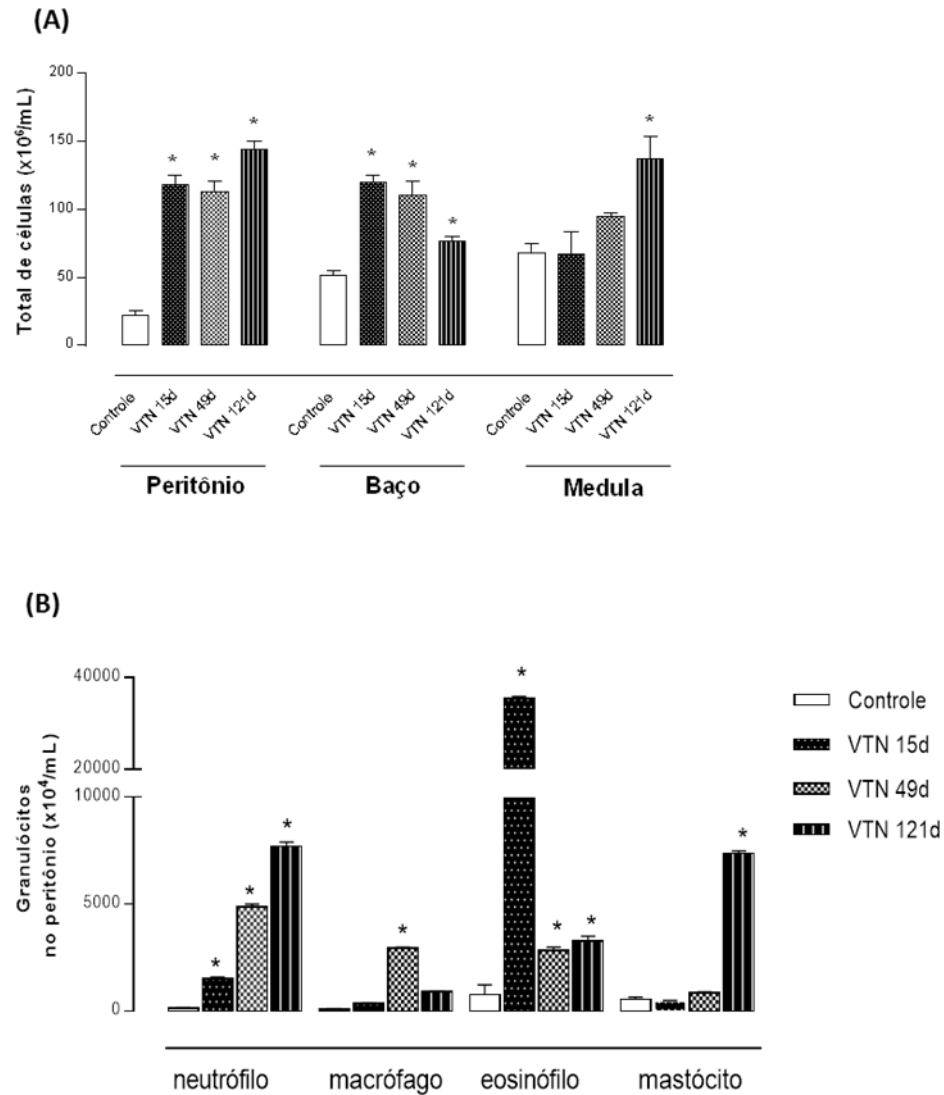
Em conjunto podemos dizer que a presença de células inatas como neutrófilos, eosinófilos e mastócitos mantidos cronicamente em resposta ao veneno podem colaborar via a produção localizada de fatores de sobrevivência como a IL-17A na manutenção de ASC terminalmente diferenciadas na cavidade peritoneal.

Figura 1. Resposta imune de memória induzida pelo veneno de *Thalassophryne nattereri*



BALB/c machos (n = 5) foram imunizados (i.p.) com o veneno de *T. nattereri* adsorvido em adjuvante nos dias 0 e 7. Nos dias 14, 48 e 120 os animais receberam a mesma quantidade de veneno sem adjuvante. Animais controle receberam apenas o adjuvante no dia 0. Nos dias 15, 49 e 121, os animais foram mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral para identificação dos diferentes subtipos de células nesses compartimentos. Para análise dos fatores de sobrevivência os animais foram mortos no dia 120 e as suspensões celulares foram coletadas e submetidas a separação usando autoMACS.

Figura 2. O veneno de *T. nattereri* mantém o infiltrado de células por longos períodos nos 3 compartimentos



Nos dias 15, 49 e 121 após a imunização, os animais foram mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral que foram processadas para contagem total (A) dos leucócitos com Azul de tripan em câmara de Neubauer e diferencial (B) por citometria de fluxo: neutrófilos (Ly6G^{high} CD11b^{pos}), macrófagos (Ly6G^{neg} CD11b^{pos} Ly6C^{pos}), eosinófilos (CD4^{neg} CCR3^{pos}) e mastócitos (CD117^{pos}). Cada barra representa a média do grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação a células de animais controle.

5.2 O veneno de *T. nattereri* mantém a expressão crônica de IL5R nas ASC peritoneais e de Bcl-2 nas ASC dos 3 compartimentos

Como uma forma direta de avaliar a ação dos fatores de sobrevivência produzidos pelas células inatas ou T de memória em nosso modelo, bem como a regulação intrínseca de genes antiapoptóticos na longevidade das ASC, analisamos *in vivo* a presença dos receptores de IL-5, de IL-17, e de BAFF, assim como a proteína antiapoptótica Bcl-2.

Para isto, camundongos BALB/c machos foram imunizados com as proteínas do veneno de *T. nattereri* no dia 0. Após 7 d, os animais receberam dose reforço de veneno sem adjuvante e no dia 120 foram mortos para obtenção de células B da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral (Fig. 1). ASC foram isoladas em duas etapas. Células plasmáticas foram diretamente marcadas com o anticorpo anti-CD138 acoplado a *microbeads* e isoladas por seleção positiva utilizando o separador automático auto-MACS e analisadas por citometria de fluxo a fim de determinar a pureza da separação e análise intracelular ou membranosa das proteínas celulares em ASC CD138^{pos} IgG^{pos} (Fig. 3).

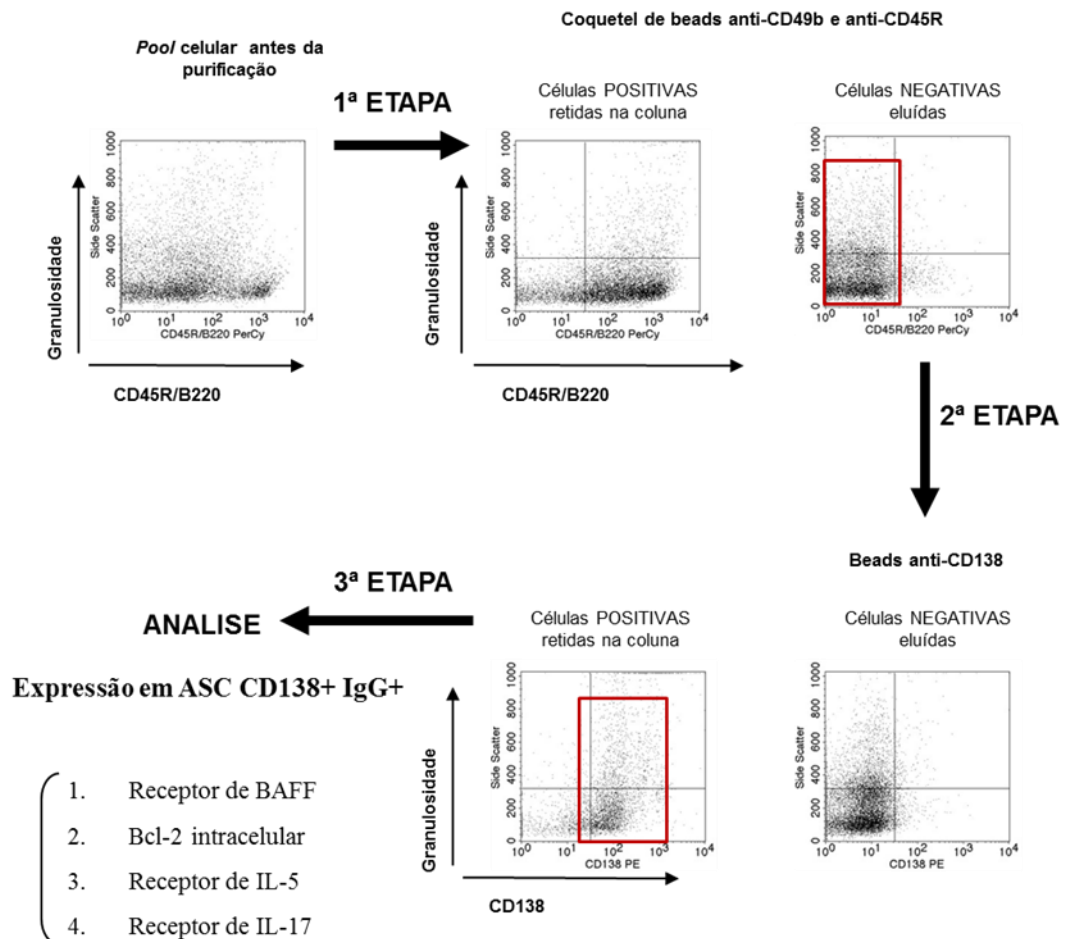
Na Figura 4A observamos que o veneno não foi capaz de induzir aumento significativo na expressão do receptor de BAFF nas ASC, quando comparado às células do grupo controle, em nenhum dos compartimentos analisados. Um estudo recente demonstra que os neutrófilos podem influenciar resposta imune humoral interagindo de forma direta com DC e células B através das NET, promovendo mudança de isótipo de imunoglobulina, hipermutação somática e a produção de anticorpos pela ativação de células B da zona marginal por mecanismos que envolvem não apenas BAFF, mas também APRIL e IL-21 (PUGA et al., 2011). Além disso, trabalhos mostram que células recém-diferenciadas a partir de células B de memória convencionais não requerem BAFF como sinal de sobrevivência (BENSON et al., 2008).

Recentemente demonstramos a necessidade *in vivo* da IL-17A e IL-5 e sua sinalização na diferenciação e manutenção de ASC B220^{neg} na cavidade peritoneal de animais com resposta ao veneno (GRUND et al., 2012). Na Figura 4B observamos que o veneno não foi capaz de induzir aumento significativo na expressão do receptor de IL-17 nas ASC, quando comparado às células do grupo controle, em nenhum dos compartimentos analisados. A literatura indica que a expressão aumentada deste receptor é mais encontrada em populações granulocíticas Gr-1 positivas ou macrófagos F4/80 positivos da medula óssea (TAN et al., 2006; TOY et al., 2006;) e sua expressão na superfície é diminuída rapidamente após a ligação de IL-17A (LINDEMANN et al., 2008).

Na Figura **4C** observamos que as ASC peritoneais de animais imunizados com o veneno apresentaram um aumento de 4 vezes na expressão do receptor de IL-5 quando comparada tanto com as ASC dos animais controle quanto com as ASC esplênicas ou medulares de animais imunizados. Na Figura **4D** observamos um aumento na expressão da proteína Bcl-2 nas ASC provenientes de animais imunizados com o veneno em todos os compartimentos, evidenciando que a maior longevidade destas células *in vivo* pode ser atribuída a uma regulação intrínseca de genes antiapoptóticos. A citocina IL-5, inicialmente identificada pela participação em respostas alérgicas é atualmente conhecida por sua habilidade em suportar o crescimento, a diferenciação e principalmente a proliferação de células B, super-regulando a expressão do gene Blimp-1 e a produção de IgM, IgG1 e IgE por células normais e tumorais (KIKUCHI et al., 1995; SWAIN et al., 1988; TAKATSU, 1998; TAKATSU; KOURO; NAGAI, 2009), e a diferenciação de plasmócitos (KNODEL et al., 2001; MESSIKA et al., 1998).

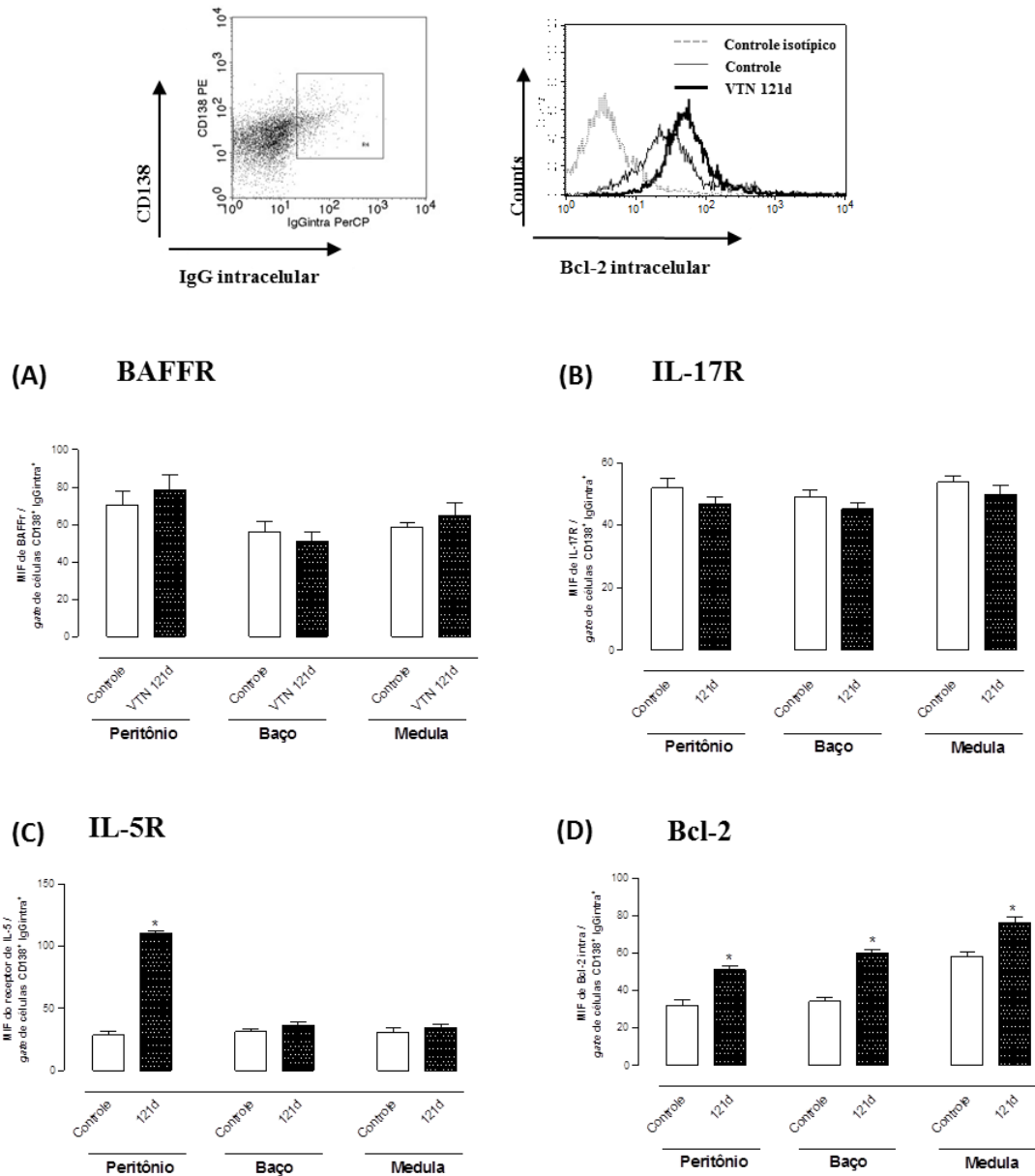
Estes resultados sugerem uma correlação positiva entre os sinais derivados do receptor de IL-5 e a ativação da molécula antiapoptótica Bcl-2 na sobrevivência de ASC em nichos inflamados por longos períodos, e revelam que a sobrevivência das ASC nos nichos esplênico ou medular mediada por Bcl-2 independe da sinalização derivada deste receptor assim como de BAFFR ou IL-17AR.

Figura 3. Purificação de ASC CD138 positivas de animais com resposta crônica ao veneno de *T. nattereri*



Células da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral obtidas após 120 d de animais BALB/c machos ($n = 5$) com resposta imune crônica ao veneno ou de animais controle foram utilizadas para a purificação de ASC CD138 positivas utilizando o separador automático Auto-MACS. Para a separação negativa 1×10^7 células foram incubadas com um coquetel de anticorpos anti-CD45R e anti-CD49b biotinilados e *beads* anti-biotina para exclusão de células não plasmáticas. Na seleção positiva) células negativas foram novamente incubadas com *beads* anti-CD138 para purificação das ASC. A pureza das células ASC CD138 positivas foi confirmada pela marcação com anticorpos anti-CD45R/B220 e anti-CD138.

Figura 4. ASC induzidas *in vivo* pelo veneno de *T. nattereri* expressam aumentados níveis de IL-5R e Bcl-2



ASC CD138^{pos}IgG^{pos} purificadas da cavidade peritoneal (*dot plot* representativo), do baço e da medula óssea femoral de animais com resposta crônica ao veneno ou de animais controle foram analisadas quanto à expressão de (A) BAFFR, (B) IL-17R, (C) IL-5R ou (D) Bcl-2. As células foram marcadas com anticorpos anti-IL-5R, anti-IL-17R, anti-BAFFR ou anti-Bcl-2 (intracelular) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi analisada por citometria de fluxo. Cada barra representa valores de MFI acrescidos do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação a células de animais controle.

5.3 A fase crônica da resposta humoral induzida pelo veneno é caracterizada por linfócitos T de memória efetores no peritônio e por linfócitos T de memória central na medula óssea

A ideia de que as células T CD4 são críticas para a formação de respostas primárias de células B, particularmente a antígenos protéicos, por sua habilidade em produzir citocinas (como fatores de mudança de isótipo IL-4 e IFN- γ) e interagir no GC através de suas moléculas de superfície (CD40, ICOS) já está bem caracterizada (FAZILLEAU et al., 2009). No entanto não está claro se as células T CD4 de memória CD44^{high} e seus subtipos são necessários para a longevidade de células B de memória.

O subtipo T de memória central (*central memory T cells*- TcM) mantém a habilidade de permanecer nos tecidos linfóides secundários como os linfonodos e expressam CD62L (L-selectina) que interage com PNA^d (*peripheral node addressin*) e com a integrina $\alpha 2$. Expressam também CCR7 que interage com CCL19 ou CCL21 (MASOPIUST et al., 2001; REINHARDT et al., 2001; SALLUSTO et al., 1999;). As respostas secundárias são mediadas por linfócitos TcM que originalmente vivem na medula óssea (FEUERER et al., 2004) e são capazes de patrulhar as zonas T dos tecidos linfóides secundários onde podem rapidamente proliferar em resposta aos antígenos apresentados por DC.

A segunda população de linfócitos T de memória, denominada T de memória efetor (*effector memory T cells* – TeM) é formada por células circulantes que examinam as barreiras teciduais e agem contra os patógenos após o seu reconhecimento produzindo citocinas como IL-4 e IFN- γ . A expressão da glicoproteína Ly6C nos linfócitos T regula a aderência endotelial e o extravasamento assim como a molécula coestimuladora CD40L regula positivamente a diferenciação de linfócitos B. Estas moléculas são importantes marcadores dos linfócitos T de memória efetores.

Observamos na Figura **5A** e **5B** que o veneno induziu nos linfócitos T de memória CD4⁺CD44^{high} na cavidade peritoneal dos animais imunizados altos níveis de CD40L e de Ly6C durante todo o período da resposta. No baço, os linfócitos T de memória CD4⁺CD44^{high} expressaram CD40L apenas no início da resposta (15 d) e Ly6C por até 49 d. Já os linfócitos T de memória CD4⁺CD44^{high} do compartimento medular que não expressaram CD40L expressaram níveis altos da molécula Ly6C a partir de 49 d, que se mantiveram elevados na fase crônica da resposta.

Nossos dados corroboram os achados de Tokoyoda e colaboradores (2009) que demonstraram que linfócitos T CD4 de memória específicos para os antígenos KLH, OVA ou NP-KLH expressam altos níveis de Ly6C e residem preferencialmente na medula óssea, enquanto poucos linfócitos T CD4 de memória esplênicos expressam esse marcador. Os autores sugerem que células

TCD4 de memória são mobilizadas quando reativadas e deixam a medula óssea. Este trabalho mostra também de forma bastante elegante que a interação entre as células TCD4 de memória e as células B ocorre no baço e não na medula óssea, e a rápida cinética e a alta frequência de citocinas após a reexposição é acompanhada de alta expressão de CD40L (CD154) formando interações ideais na ajuda às células B.

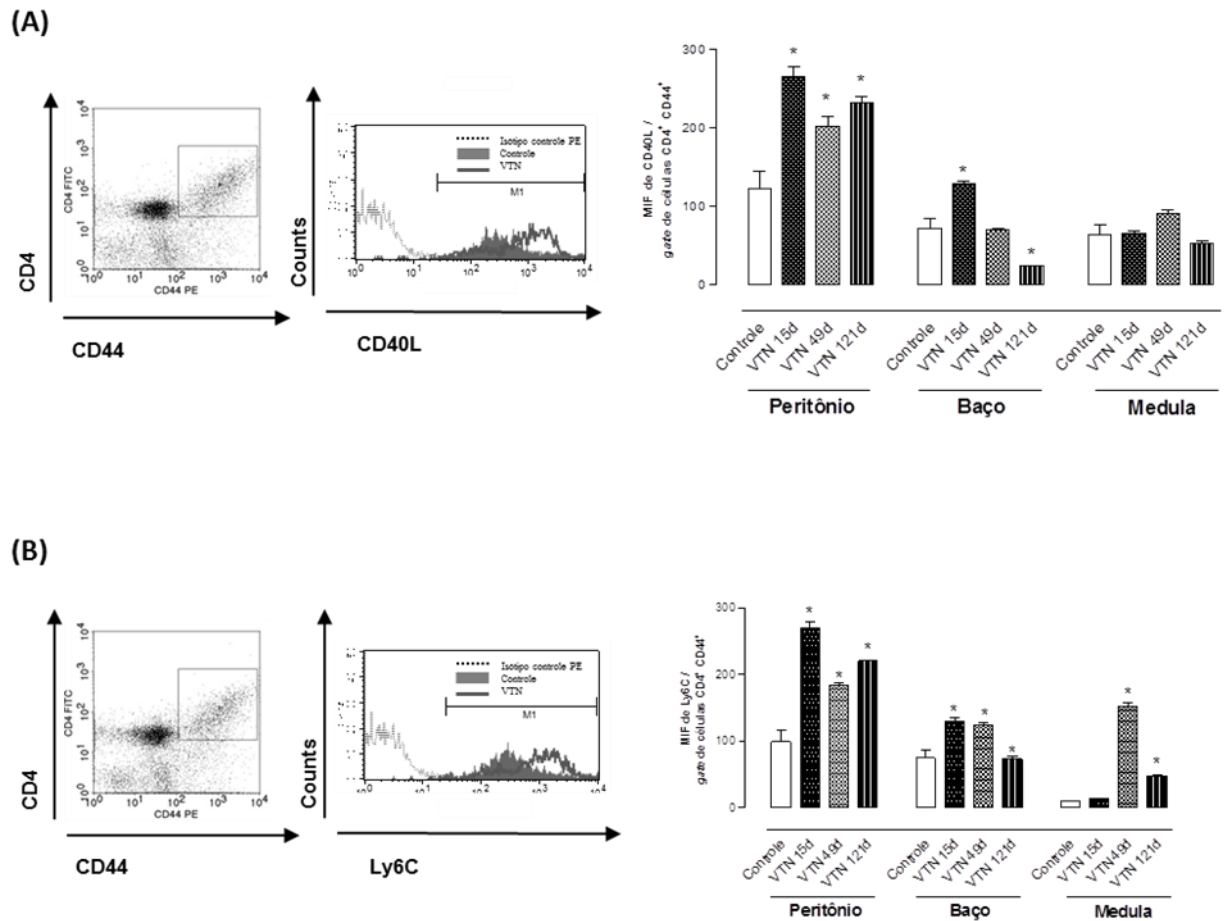
Com base na observação de que linfócitos T de memória efetor (TeM) são grandes produtores de citocinas quando comparados aos linfócitos T de memória central (TcM) ou às células T virgens (APPAY et al., 2002; DUTTON; BRADLEY; SWAIN, 2008; WHERRY et al., 2003), investigamos a produção intracelular de citocinas pelos linfócitos T de memória $CD4^+CD44^{high}$ 15 d após imunização nos diferentes compartimentos (Fig. 6). Nossos resultados mostram que linfócitos T de memória $CD4^+CD44^{high}$ peritoneais produziram 3 vezes mais IL-4, IL-5, IL-17A e IFN- γ que células de animais controle. No baço, os linfócitos T de memória $CD4^+CD44^{high}$ produziram quase 2 vezes mais IL-5 que nos animais controle, e os linfócitos de memória medulares produziram quase 2 vezes IL-4 e IL-5 em relação ao grupo-controle (Fig. 6A).

IL-23, uma citocina da família Th17, formada pelas subunidades p19 e p40 (OPPMANN et al., 2000) ativa STAT3 e preferencialmente age em linfócitos T $CD4^+$ de memória, induzindo diferenciação para Th17 e produção das citocinas IL-17 e IL-22 (AGGARWAL et al., 2003; ZHENG et al., 2007). Recentemente, trabalhos vêm demonstrando a importância da resposta imune Th17 polarizada e a produção de IL-23 na erradicação e controle de tumores, apresentando-se como candidatos adjuvantes nas vacinas antitumorais para aumentar a função de linfócitos T de memória efetores (MURANSKI et al., 2008, OVERWIJK et al., 2006). Logo nosso próximo passo foi investigar a produção de IL-23 pelas células peritoneais, esplênicas e medulares dos animais imunizados com o veneno. Os resultados da Figura 6B mostram que somente as células medulares foram capazes de produzir IL-23 durante a resposta crônica (121 d).

Estes resultados em conjunto demonstram que a resposta humoral de memória induzida pelo veneno com a presença de ASC terminalmente diferenciadas ($B220^{neg}$) está relacionada à produção de fatores de sobrevivência por eosinófilos e principalmente por mastócitos e 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 IFN- γ e por linfócitos T de memória central (TcM) $CD4^+CD44^{high}CD40L^{neg}Ly6C^{pos}$ na medula óssea produtores de IL-4, IL-5 e IL-23. A produção de fatores de sobrevivência pelas células inatas e das citocinas IL-5 e IL-17A também por linfócitos TeM ativadas ($CD40L^{pos}$) garantem a manutenção das ASC $B220^{neg}$ no peritônio, e as citocinas IL-5 e IL-23

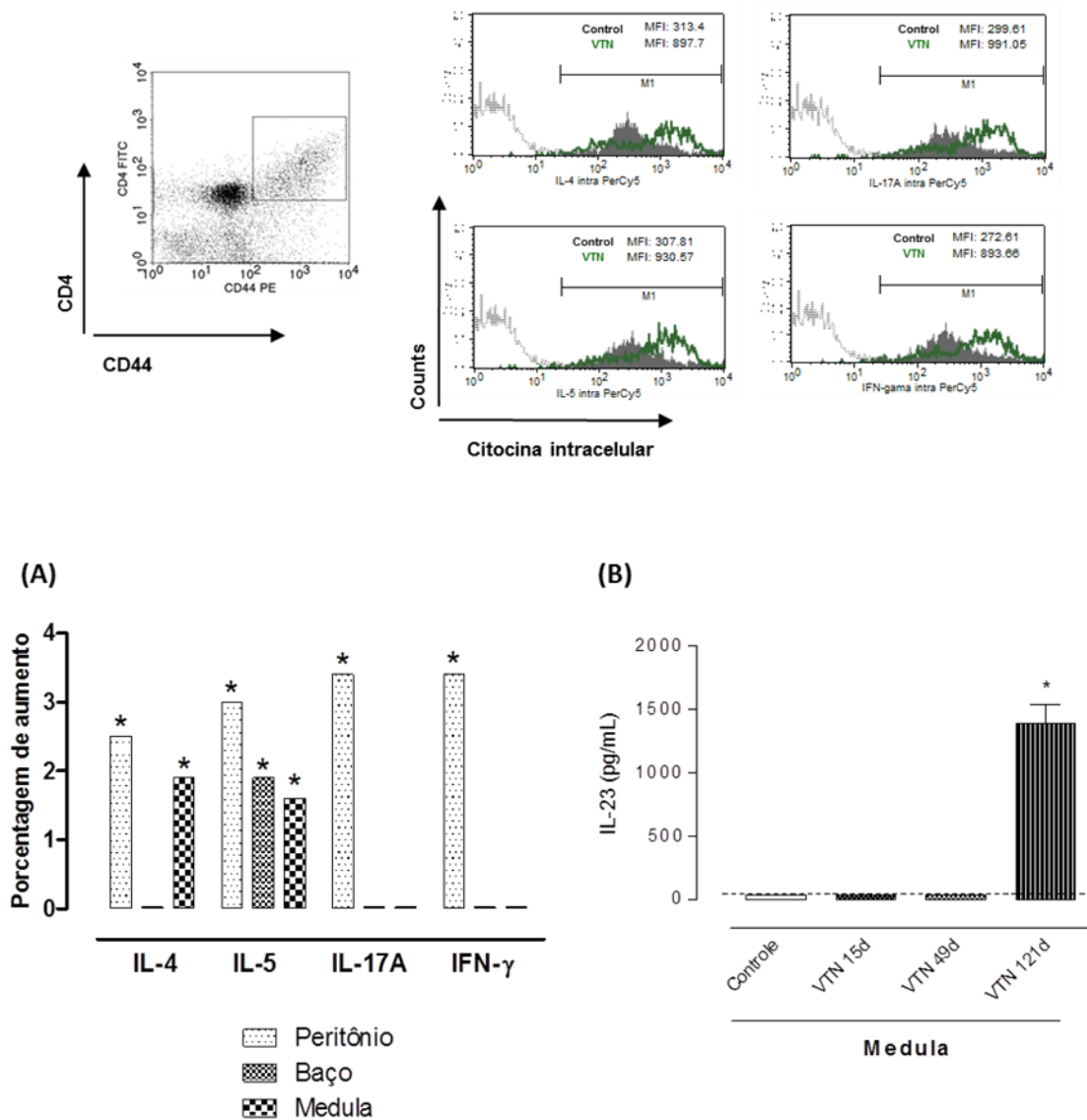
promovem na medula óssea um nicho ideal para retenção de linfócitos TcM em estado de repouso (CD40L^{neg}). Após a reexposição ao antígeno, linfócitos TcM residentes na medula óssea podem ser mobilizados rapidamente para os linfonodos ou baço onde poderão ser ativados e auxiliarão as ASC na produção de anticorpos (Apêndice A).

Figura 5. Linfócitos T de memória central e efetor populam o peritônio por longos períodos



Nos dias 15, 49 e 121, os animais foram mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço (*dot plot* representativo), e da medula óssea femoral que foram processadas, contadas e marcadas com anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo. Linfócitos T de memória CD4^{POS} CD44^{POS} foram analisados quanto à expressão de CD40L (A) ou Ly6C (B) (MFI). Cada barra representa a média de intensidade de fluorescência acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação a células de animais controle.

Figura 6. Produção de citocinas por linfócitos T CD4 de memória na resposta crônica ao veneno



Após a imunização os animais foram mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço (*dot plot* representativo), e da medula óssea femoral que foram processadas, contadas e marcadas com anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo. No dia 15 linfócitos T de memória CD4^{pos} CD44^{pos} foram analisados quanto à expressão intracitoplasmática de citocinas por citometria de fluxo (MFI) (A). Nos dias 15, 49 e 121 a presença de IL-23 no sobrenadante da suspensão peritoneal, medular ou da cultura do baço foi determinada por ELISA (B). O limite de detecção foi de 39 pg/mL. As barras representam a média do grupo acrescida do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação a células de animais controle.

II Verificação da necessidade dos sinais derivados de CD4 ou CD28 na geração das ASC in vivo

5.4 A produção crônica de anticorpos específicos é dependente dos sinais gerados por CD4 e CD28

A importância de linfócitos T de memória e o papel relativo dos subtipos T_{CM} e T_{EM} na proteção após a reexposição a um patógeno parece ser dependente da localização da infecção, se ela é sistêmica, seqüestrada em tecidos parenquimatosos ou mucosos, e da habilidade das células T de memória migrarem para o linfonodo proximal e responder ao antígeno. É sabido que as necessidades para desencadeamento das respostas de memória são menos rigorosas que para a indução da resposta primária.

O recrutamento dos co-receptores CD4 ou CD8 para os complexos TCR/MHC classe II ou I induz sinais distintos que permitem que o linfócito se comprometa com um programa de maturação. Os sinais gerados pelo engajamento de CD4 ao TCR parecem ser mais fortes (BASSON et al., 1998; HERNÁNDEZ-HOYOS et al., 2000; IWATA et al., 1996; LEGNAME et al., 2000) e mais duradouros (SINGER, 2002) que os sinais gerados por CD8. Sinais derivados de TCR/CD28 são suficientes para iniciar a progressão do ciclo celular (G1-S) e produzir moléculas antiapoptóticas. A sinalização TCR induz a produção de IL-2 enquanto a sinalização CD28 ativa a cascata PI3K, e ambos os sinais promovem a proliferação e a diferenciação dos linfócitos. Ainda, os sinais gerados por CD4 e CD28 cooperam para induzir a autofosforilação da proteína quinase Lck (*Src-related kinases*), a qual é essencial para a ativação do linfócito T. A ligação de CD4 à molécula de MHC II induz o recrutamento de Lck para a interface do linfócito T-APC ou do linfócito T-B e a ligação de CD28 às moléculas de CD80/CD86 sustenta a ativação de Lck (HOLDORF et al., 2002).

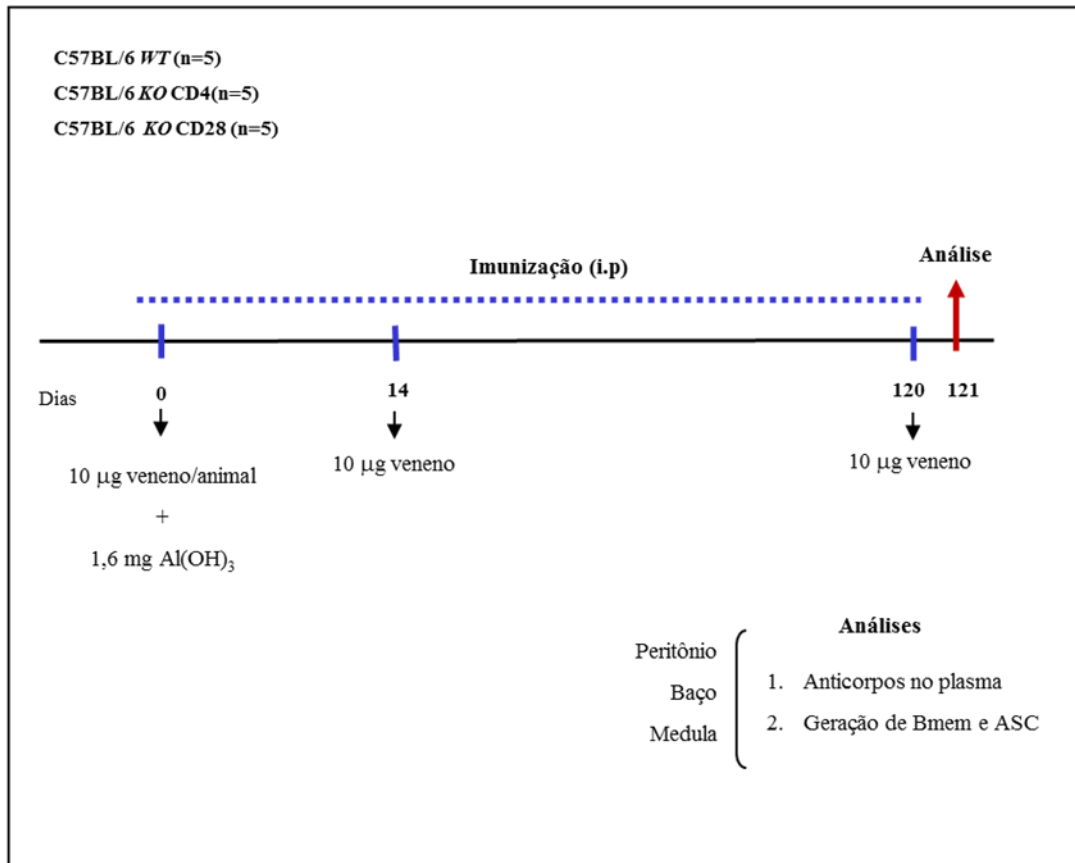
Para investigar a participação da sinalização CD4 e CD28 na indução de resposta humoral de memória pelo veneno de *T. nattereri* camundongos C57BL/6 *WT*, CD4 *KO* ou CD28 *KO* foram imunizados conforme descrito na Figura 7. A importância das células T na ativação de células B pode ser avaliada pela medida do acúmulo de anticorpos no sobrenadante da suspensão celular em experimentos *in vitro* ou no plasma de animais imunizados (EDDAHRI et al., 2009). Avaliamos a resposta humoral no período crônica da resposta de memória (121 d após a primeira imunização).

Nossos resultados mostram que o veneno é capaz de induzir em camundongos *WT* uma resposta imune humoral mista, com produção de altos níveis de anticorpos específicos IgG1 (Fig. 8A) e IgE anafilática (Fig. 8C), assim como níveis moderados de IgG2a (Fig. 8B). Anticorpos específicos IgG1 e IgG2a também foram detectados em camundongos CD4 ou CD28 *KO* imunizados com veneno, porém em níveis muito inferiores se comparados a produção destes anticorpos nos camundongos

WT. Por outro lado, camundongos CD4 ou CD28 *KO* não foram capazes de produzir anticorpos IgE anafiláticos após a imunização com o veneno. Estes resultados sugerem que os sinais derivados de CD4 ou de CD28 contribuem para a magnitude da resposta humoral (IgG1 e IgG2a) de memória induzida pelo veneno e que a produção de IgE específica é totalmente controlada pelos sinais derivados de CD4 e CD28.

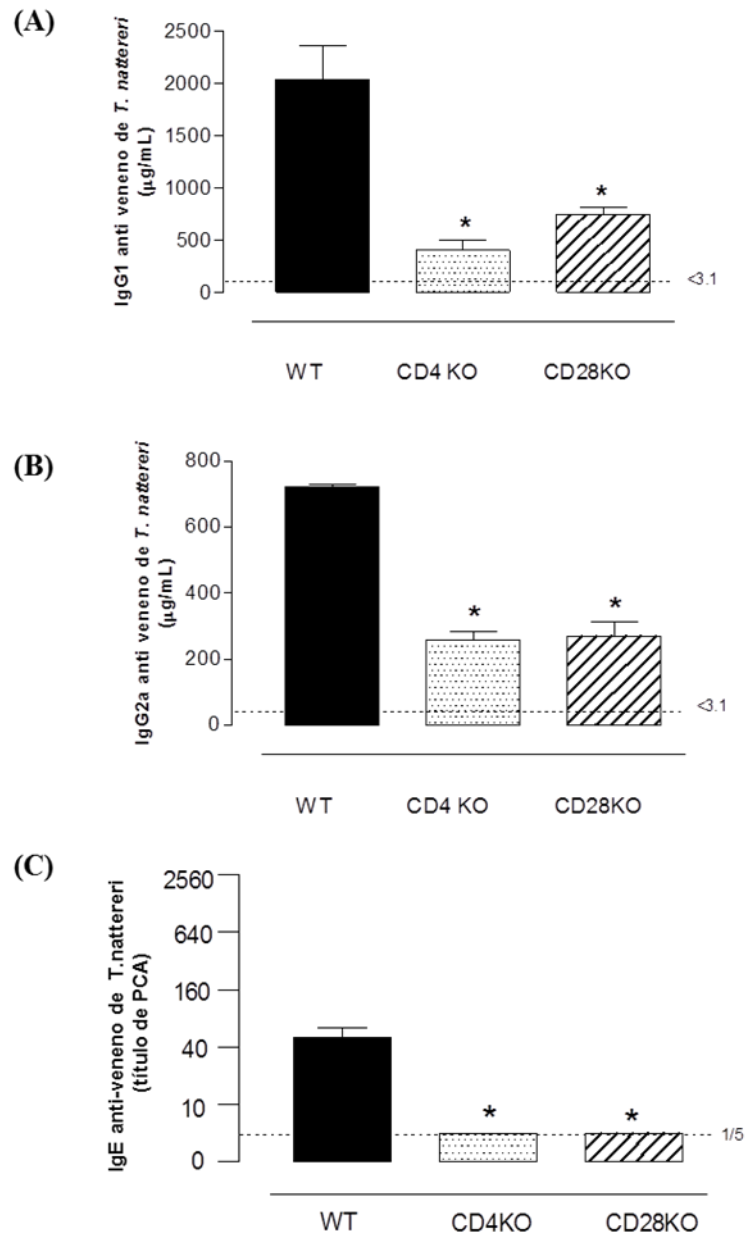
Ainda, nossos resultados estão de acordo com a literatura que mostra que camundongos deficientes em CD4 ou CD28 apresentam dificuldade de formação de GC e não fazem de forma plena a mudança de isótipos de IgG (LENSCHOW et al., 1996). Linfócitos T de camundongos deficientes em CD28 produzem quantidades normais de IFN- γ , mas tem uma grande redução na quantidade de IL-4 e IL-5 produzidas (RULIFSON et al., 1997). Em outro estudo, camundongos CD28 *KO* exibem uma grande redução na produção de IL-4, IgE, e IgG1 em resposta a estimulação com anti-IgD, embora a resposta para antígenos de *H. polygyrus* seja normal (GAUSE et al., 1997; ROZANSKI et al., 2011), indicando a dependência da sinalização de CD28 na resposta Th2 polarizada.

Figura 7. Participação da sinalização *in vivo* de CD4 ou CD28 na geração da resposta humoral crônica induzida pelo veneno



Camundongos C57BL/6 normais (*WT*) ou deficientes em CD4 ou CD28 (*KO*) machos foram imunizados (*i.p.*) com o veneno de *T. nattereri* adsorvido em adjuvante. Após 14 ou 120 d, os animais receberam doses reforço de veneno sem adjuvante. Os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico e mortos no dia 121 para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral e posterior identificação dos diferentes subtipos de células B nesses compartimentos.

Figura 8. A produção crônica de anticorpos específicos é dependente de CD4 e de CD28



Os animais foram sangrados no dia 121 para obtenção do plasma para análise por ELISA dos níveis de anticorpos-específicos IgG1 (A) e IgG2a (B) por ELISA. Anticorpos IgE específicos foram determinados por PCA (C). Os títulos de PCA representam a recíproca da maior diluição do *pool* de plasmas que apresentaram uma reação cutânea positiva com diâmetro > 5 mm. As barras representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão. A linha pontilhada representa a média da produção de anticorpos no plasma de animais controle não imunizados. * $p < 0,05$ em relação ao WT imunizado com veneno.

5.5 A geração de linfócitos B de memória na medula óssea e ASC B220^{neg} no baço é dependente dos sinais gerados por CD4 e CD28

Há descrições elucidativas na literatura que mostram que animais deficientes da sinalização do co-receptor CD28 expressam níveis baixos ou ausentes da molécula coestimuladora OX-40 e isso está frequentemente associado a alterações em receptores de quimiocinas envolvidos na formação de GC e a correta migração de linfócitos T para este centro, bem como à baixa produção de IL-4, importante para a manutenção de linfócitos B (WALKER et al., 1999). Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que animais deficientes para CD28 também apresentam defeito na organização de fDC esplênicas o que contribui para a má formação de GC e a resposta inadequada de formação de células B de memória e ASC. Interações entre CD28 (expresso em linfócitos T, mastócitos, células NK e em plasmócitos mas não em linfócitos B em estágios recentes de maturação) com as moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) são necessárias para a formação do GC, mas ainda não está claro se elas simplesmente suportam a ativação de linfócitos T CD4 virgens durante o início da resposta por células dendríticas (DC) ou se controlam diretamente a ativação de T_{fh}, ou se ainda influenciam diretamente a diferenciação de linfócitos B foliculares. Nossa próxima etapa foi avaliar papel intrínseco das moléculas CD4 ou CD28 no compartimento de células B de memória gerado pelo veneno.

A fase crônica da resposta humoral de memória induzida pelo veneno em animais C57BL/6 *WT* foi caracterizada pelo aumento na porcentagem de células B_{mem} (CD19^{pos}B220^{high}Ig^{pos}) no baço (Fig. **9B**) e na medula óssea (Fig. **9C**), com níveis inferiores aos do controle na cavidade peritoneal (Fig. **9A**). No peritônio dos animais deficientes, observamos que CD4 e CD28 regulam negativamente estas células e, ao contrário, ambas as moléculas regulam positivamente as B_{mem} na medula óssea. No baço a presença de células B_{mem} não sofreu regulação por estes sinais. Assim, podemos dizer que a sinalização via CD4/CD28 regula a saída de células B_{mem} do peritônio inflamado e induz a permanência destas células na medula óssea.

Na Figura **10A** observamos no peritônio que o veneno promoveu nos camundongos *WT* a diferenciação de ASC (CD43^{pos}CD138^{pos}) somente do subtipo B220^{high}, e que os sinais derivados de CD4 ou CD28 foram importantes para a manutenção destas células neste compartimento. Ao contrário dos nossos dados com a linhagem BALB/c, observamos que na linhagem C57BL/6 o veneno não induziu ASC com os fenótipos B220^{low} ou B220^{neg} no peritônio e que ainda assim, observamos que os sinais derivados de CD4 ou CD28 são necessários para a saída destas células deste compartimento.

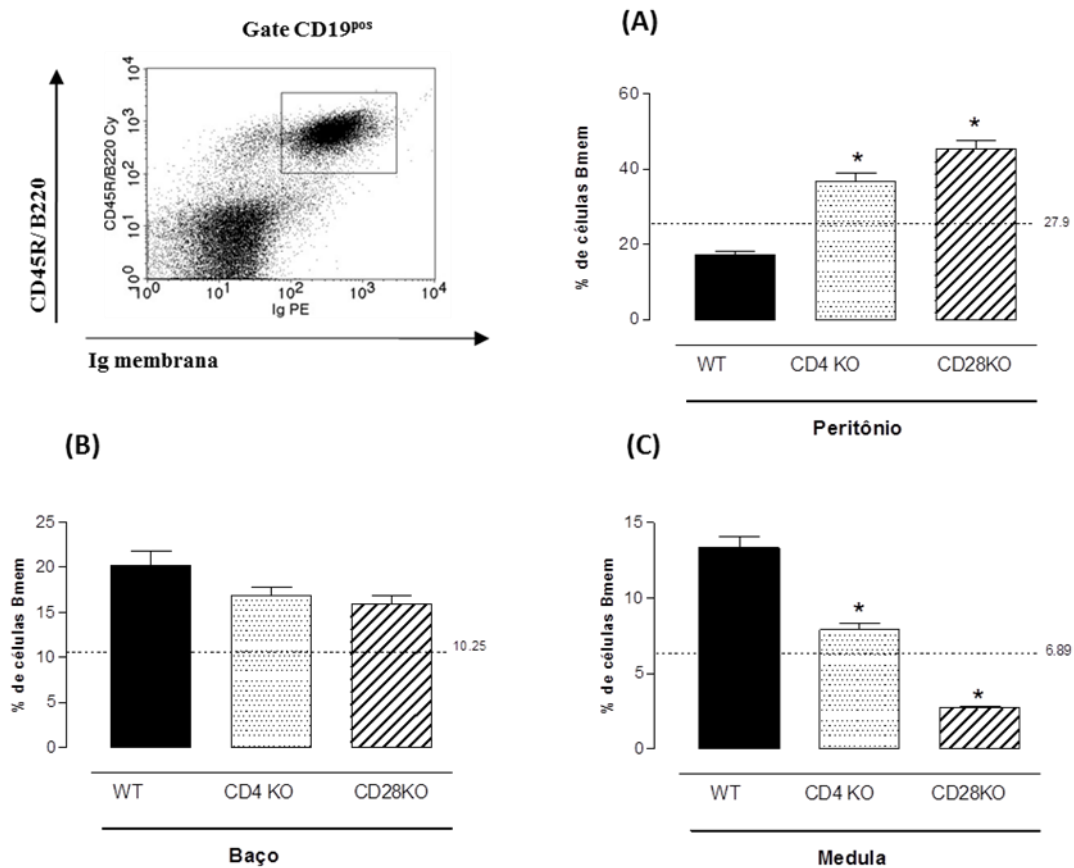
No baço (Fig. **10B**) observamos que o veneno induziu os 3 subtipos de ASC, principalmente do subtipo B220^{neg} que foi controlado positivamente por ambas as moléculas neste compartimento. Já os subtipos positivos (B220^{high} e B220^{low}) foram regulados negativamente pela molécula CD28. Isto demonstra que ambos os sinais são necessários para a manutenção das ASC B220^{neg} enquanto CD28 regula a magnitude das ASC positivas no baço.

Quanto às ASC medulares, observamos na Figura **10C** que o veneno induziu aumento na porcentagem de células com os fenótipos B220^{high}, B220^{low} e em menor proporção de B220^{neg}. A manutenção das ASC positivas (B220^{high} e B220^{low}) depende de ambos os sinais, e os animais CD28 *KO* apresentam uma maior frequência de ASC B220^{neg} neste compartimento, demonstrando uma regulação negativa de CD28 na resposta.

Em resumo, podemos dizer que a geração de Bmem na medula óssea e preferencialmente a diferenciação do subtipo de ASC B220^{neg} no compartimento esplênico de animais da linhagem C57BL/6 são dependentes das interações cognatas bidirecionais entre as moléculas CD4 e CD28 e seus ligantes nos GC. Ainda, os sinais gerados pelas moléculas CD4 e CD28 cooperam para a saída das Bmem e das ASC B220^{low} e B220^{neg} do peritônio, para a diferenciação das Bmem e das ASC positivas (B220^{high} e B220^{low}) na medula óssea; das ASC B220^{high} no peritônio e das ASC B220^{neg} no baço. Ainda, CD28 por regulação negativa age mantendo a magnitude das ASC positivas no baço e das ASC B220^{neg} na medula óssea.

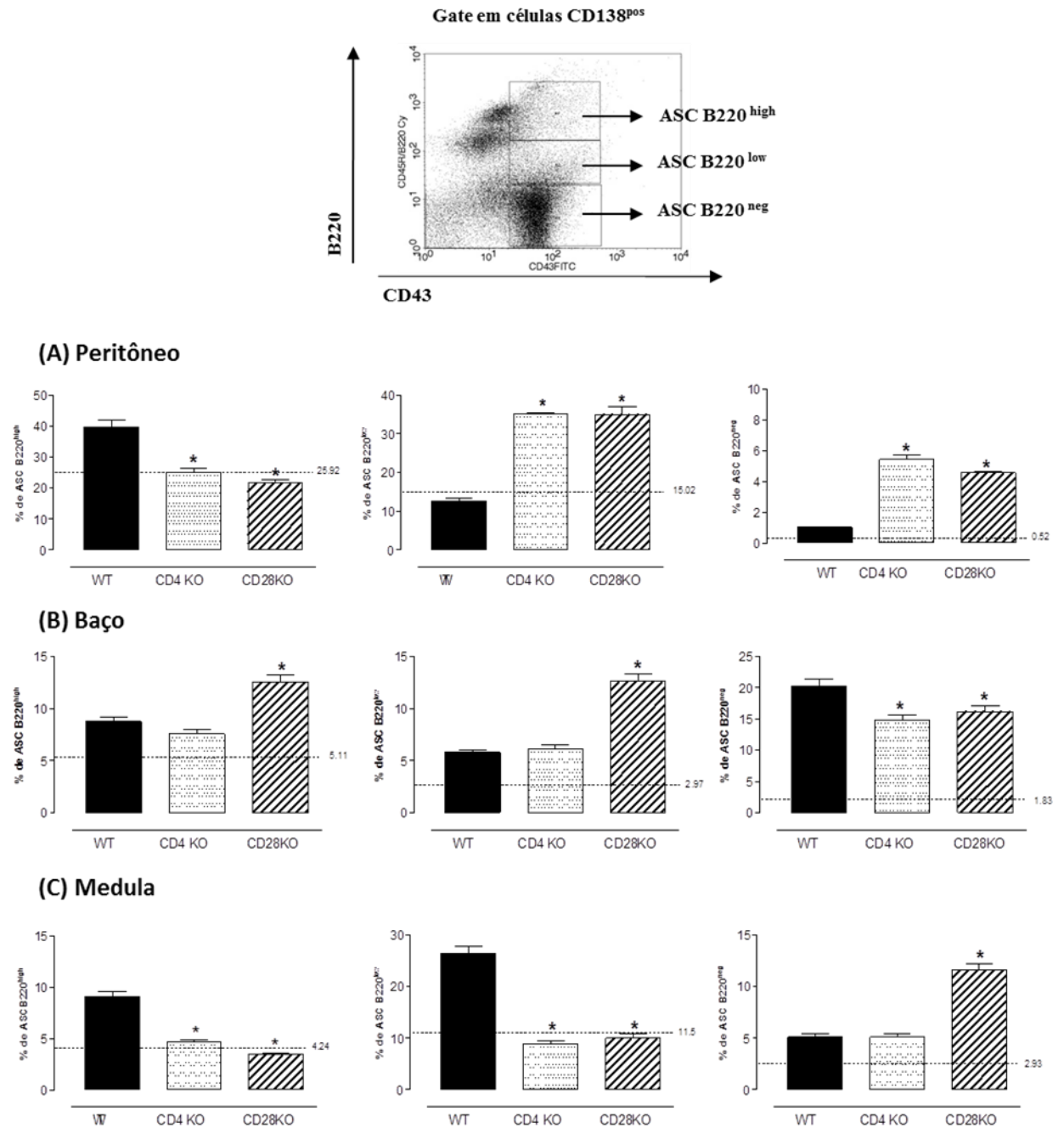
CD28 é uma molécula predominantemente expressa em linfócitos T e também em células plasmáticas, como as ASC e sua expressão é regulada por Pax5 (KOZBOR et al., 1987; ROBILLARD et al., 1998; KORNBLUTH, 1995; LEE et al., 1990). A sequência de eventos intracelulares após a ligação do receptor nas ASC desencadeia a sinalização PI3K/Akt que transduz a super-regulação do gene Bcl-xL induzindo sobrevivência (TU; GARDNER; LICHTENSTEIN, 2000), mantém sustentada a ativação NFκB (MITSIADES et al., 2002). Nossos dados corroboram os dados recentes de Njau e colaboradores (2012) que além de mostraram a importância de CD28 na produção de IgG1, também observaram que os animais CD28 *KO* apresentaram uma alta frequência de células ASC B220^{neg} no baço em relação aos animais *WT* com alta frequência de fatores de sobrevivência como BCMA, TACI e BAFFR. Isto demonstra que CD28 sinaliza inibindo a expressão de sinais de sobrevivência nas ASC B220^{neg} e gera menor sobrevivência destas células. Porém, nossos resultados apresentados da resposta crônica ao veneno em animais deficientes ainda não responde claramente se os sinais de CD4 ou de CD28 são importantes na sobrevivência das ASC, somente mostram a importância na geração destas células.

Figura 9. A geração *in vivo* de Bmem é positivamente regulada por CD4 e CD28 na medula óssea, e CD28 regula a saída do peritônio



Os lavados da cavidade peritoneal (A), do baço (*dot plot* representativo), (B) e da medula óssea femoral (C) dos camundongos WT ou camundongos CD4 KO ou CD28 KO foram coletados após 121 dias da imunização com o veneno de *T. nattereri* para obtenção da suspensão celular que foi processada para marcação das células com os anticorpos específicos para moléculas de superfície e análise por citometria de fluxo. Células B de memória (Bmem) foram identificadas como células duplamente positiva para B220 e Ig. Os números representam a média das porcentagens de células positivas acrescida do desvio-padrão. A linha pontilhada representa a média das porcentagens obtidas de células de animais controle não imunizados. * $p < 0,05$ em relação ao WT imunizado com veneno.

Figura 10. A expressão da molécula CD45R/B220 nas ASC determina a dependência dos sinais de CD4 e CD28 para a manutenção na medula óssea



Células da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral dos camundongos C57BL/6 WT ou CD4 KO e CD28 KO foram coletadas após 121 d da imunização e marcadas com os anticorpos específicos para moléculas CD45R/B220, CD43 e CD138 e análise por citometria de fluxo. Os números representam a média das porcentagens de células positivas acrescida do desvio-padrão. A linha pontilhada representa a média das porcentagens obtida de células de animais controle não imunizados. * $p < 0,05$ em relação ao WT imunizado com veneno.

III Verificação da necessidade de CD4 ou CD28 na manutenção de ASC usando transferência adotiva de células totais induzidas na resposta crônica ao veneno de *T. nattereri*

5.6 Quanto maior a expressão da molécula B220 nas ASC maior é a dependência para a sobrevivência dos sinais gerados por ambas as moléculas CD4 e CD28

Tendo em vista que nossos resultados mostram que a geração de linfócitos Bmem na medula óssea e do subtipo de ASC B220^{neg} no compartimento esplênico é dependente das interações cognatas bidirecionais entre as moléculas CD4 e CD28 e seus ligantes nos centros germinativos nosso próximo passo foi confirmar se estas interações bidirecionais entre as moléculas formadoras do complexo TCR participam na manutenção da sobrevivência das ASC. Para isto utilizamos o total de células dos baços ou das medulas ósseas obtidos de animais C57BL/6 *WT* com resposta crônica ao veneno de *T. nattereri* e as transferimos adotivamente para animais virgens *WT* ou deficientes em CD4 ou CD28. Estes animais receberam após 7 dias uma dose de veneno e foram deixados por até 80 dias para serem analisados quanto a necessidade destas moléculas na permanência das células B de memória (Figura 11).

Inicialmente observamos na Figura 12 que as células totais derivadas do baço ou da medula óssea quando transferidas para animais *WT* produziram altos níveis de anticorpos IgG1 veneno-específicos (Fig. 12A e 12B) e níveis moderados de IgG2a (Fig. 12C e 12D). Este perfil isotípico com razão Th2/Th1 observado após a transferência se assemelha ao perfil observado nos animais *WT* que foram imunizados diretamente com o veneno (Fig. 8). Com relação ao papel das moléculas CD4 e CD28 na manutenção da produção de anticorpos específicos pelas células B transferidas podemos observar que as células derivadas do baço quando transferidas não necessitaram de sinais derivados de CD4 ou CD28 para manterem a produção de IgG1, porém precisaram de sinais derivados de CD4 para a manutenção da produção de IgG2a. Ao contrário, as células derivadas da medula óssea quando transferidas requereram sinais derivados de CD4 para manterem a produção de IgG1 e dispensaram ambas os sinais para a continuada produção de IgG2a. Podemos dizer que a manutenção por longos períodos da produção de anticorpos por células B veneno-específicos requer a sinalização derivada do contato com linfócitos T CD4 positivos.

Verificamos em seguida se as células B de memória obtidas do baço ou da medula de animais *WT* com resposta crônica ao veneno quando transferidas para animais virgens conseguiriam manter-se vivas por longos períodos (80 d após a transferência) e se a sobrevivência dos distintos subtipos de ASC seria influenciada pelas moléculas CD4 ou CD28 expressas em células dos diferentes compartimentos (peritônio, baço e medula óssea).

Nas Figuras **13A** e **13B** observamos que as células derivadas do baço e da medula quando transferidas para animais *WT* permanecem vivas no peritônio nos fenótipos ASC B220^{high} e B220^{low}, sem no entanto se manterem no fenótipo ASC B220^{neg}. Nos animais deficientes observamos que as células derivadas do baço quando transferidas necessitam de sinais de CD4 e CD28 para sobreviverem no fenótipo B220^{high}; necessitam de sinais gerados de CD28 para sobreviverem no fenótipo B220^{low} e CD4 participa regulando negativamente a sobrevivência das ASC B220^{neg}. Já as células derivadas da medula óssea quando transferidas necessitam de sinais gerados de CD4 e CD28 para sobreviverem nos fenótipos B220^{high} e B220^{low} e a ausência de ASC B220^{neg} independe da regulação destas moléculas.

Nas Figuras **13C** e **13D** observamos que as células derivadas do baço e da medula óssea quando transferidas para animais *WT* permanecem vivas no baço nos fenótipos ASC B220^{high} e B220^{low}. Nos animais deficientes observamos que as células derivadas do baço e da medula óssea quando transferidas necessitam de ambos os sinais para sobreviverem expressando a molécula B220. Ainda observamos que o diminuído número das ASC B220^{neg} vindas do baço e da medula é regulado negativamente por CD4.

Nas Figuras **13E** e **13F** observamos que as células derivadas do baço quando transferidas para animais *WT* permanecem vivas na medula óssea nos fenótipos ASC B220^{high} e B220^{low}; já as células derivadas da medula óssea quando transferidas para animais *WT* permanecem vivas nos fenótipos ASC B220^{high}, B220^{low} e B220^{neg} (esta última em maior quantidade). Nos animais deficientes observamos que a sobrevivência das ASC B220^{high} derivadas do baço depende de sinais gerados de CD4 e CD28; e que a sobrevivência das ASC B220^{low} é regulada negativamente por ambos os sinais. A ausência das ASC B220^{neg} se deve ao efeito negativo da molécula CD28. Já a sobrevivência das ASC derivadas da medula óssea nos três fenótipos requer sinais gerados de CD4 e CD28.

Ainda devemos ressaltar que somente o *pool* de células vindas da medula óssea de animais *WT* imunizados consegue gerar ASC terminalmente diferenciadas (ASC B220^{neg}), sugerindo que o veneno *in vivo* na presença das moléculas CD4 e CD28 possibilitou a existência neste *pool* celular de certas características que sustentam a longevidade das ASC.

Em conjunto, estes resultados demonstram que quanto maior a expressão da molécula B220 nas ASC, independente da origem tecidual, maior é a dependência dos sinais gerados por ambas as moléculas CD4 e CD28 expressas nos linfócitos T dos diferentes compartimentos para a sua sobrevivência. Ainda, a sobrevivência na medula óssea das ASC no estágio final de diferenciação (ASC B220^{neg}) é regulada positivamente pelos 2 sinais. Estes resultados reforçam nossos dados publicados

que mostram que em nichos como o baço e principalmente o peritônio inflamado, as células terminalmente diferenciadas ASC B220^{neg} dispensam os sinais derivados do contato direto com linfócitos T, sendo sensíveis à ajuda de sinais solúveis como citocinas (IL-17A); e na medula óssea estas células requerem o contato direto de linfócitos (Tcm) para a sobrevivência (GRUND et al., 2012).

Vale ressaltar que estes achados estão num contexto de transferência adotiva de células totais, ou seja, a população de ASC B220^{pos}, ASC B220^{neg} e Bmem contidas no *pool* celular do baço ou da medula foram transferidas conjuntamente com outros subtipos celulares. Para responder quais as características peculiares de cada *pool* celular (baço ou medula) geradas pelo veneno *in vivo* realizamos uma fenotipagem celular.

Pelos resultados expressos na Figura **14A** demonstramos que a preparação esplênica dos animais *WT* imunizados diferem dos animais controle por apresentarem além de Bmem (13,79% x 9,94%), ASC B220^{pos} (14,25% x 10,0%), ASC B220^{neg} (1,01% x 0,28%) uma maior porcentagem de: B1b (15,05% x 11,53%), B2f (12,23% x 8,87%) e neutrófilos (3,47% x 2,48%).

A preparação medular (Fig **14B**) dos animais *WT* imunizados com o veneno apresentaram aumento significativo de Bmem (7,44% x 5,28%), ASC B220^{pos} (11,29% x 8,40%), e ASC B220^{neg} (1,45% x 0,27%), assim como também de: TcM (12,66% x 9,78%), TeM (1,35% x 0,83%), células dendríticas convencionais (cDC, 11,16% x 7,17%) e eosinófilos (4,27% x 3,76%).

O que estes dados nos sugerem é que a presença e as interações de cDC, eosinófilos e de linfócitos T de memória no microambiente medular do animal doador imunizado com o veneno de *T. nattereri* podem ter sido decisivas para a geração das ASC B220^{neg} terminalmente diferenciadas, ao contrário do compartimento esplênico que gerou somente ASC positivas.

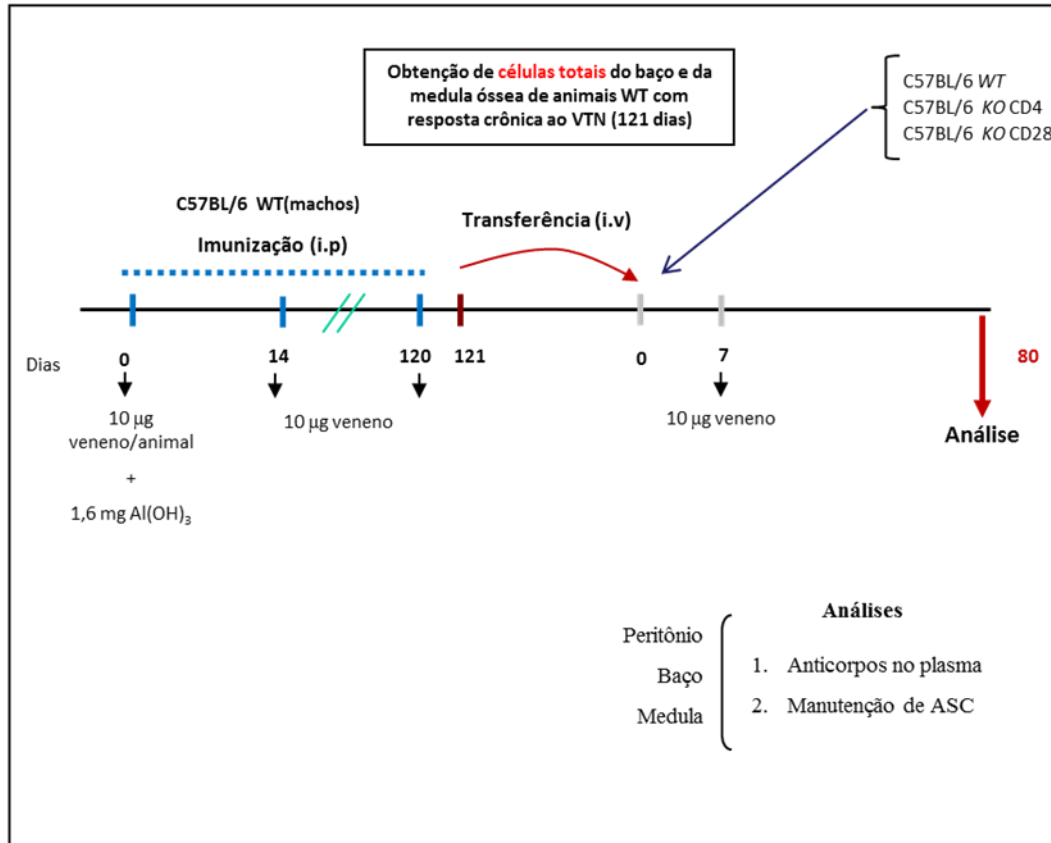
Em geral, as células B requerem interações cognatas com células T no GC dos folículos linfoides para gerarem anticorpos protetores. No entanto, evidências demonstram que as células B recebem ativação adicional de células dendríticas foliculares produtoras de BAFF, APRIL, ácido retinoico e metabólito de vitamina A (CASOLA et al., 2004). Células T foliculares via mecanismos que envolvem membros da família do TNF, CD40L, ICOS e citocinas como IFN- γ , IL-4, IL-21 e IL-10 induzem aumento da sobrevivência de células B de alta afinidade que se diferenciam em ASC (CHOI et al., 2011; KERFOOT et al., 2011; KING et al., 2009; OZAKI et al., 2002). Além disso, Tokoyoda e colaboradores (2009) demonstraram que células T de memória, particularmente as TcM que expressam altos níveis de Ly6C, são mobilizadas quando reativadas pelo antígeno proliferando e se diferenciando em células efetoras que interagem com células B nos órgãos linfoides secundários

promovendo amplificação da afinidade da resposta humoral. Além disso, tem sido descrito (CHU et al., 2011; CHU; BEREK, 2012) que eosinófilos medulares prolongam a sobrevivência de ASC pela produção de APRIL, IL-6, IL-4, IL-10 e TNF- α .

Estes resultados demonstram que as proteínas do veneno de *T. nattereri in vivo* são capazes de induzir o desenvolvendo do compartimento de células B de memória a partir de processo hierárquico no GC; estas células recirculam e alcançam a cavidade peritoneal inflamada (ASC B220^{pos}) e a medula óssea (Bmem e ASC B220^{pos}), nichos onde sobreviverão por longos períodos de maneira dependente de CD4 e de CD28. Especificamente, as ASC B220^{neg} diferenciadas no GC são mantidas em níveis baixos no nicho medular pela ação negativa de CD28. Porém quando as células B do compartimento de memória (Bmem, ASC B220^{pos} e ASC B220^{neg}) são mantidas por longos períodos na medula em íntimo contato com cDC, eosinófilos e linfócitos T de memória elas podem recircular novamente após um novo contato com o antígeno e voltar a repopular a medula na forma terminalmente diferenciada onde serão mantidas de maneira dependente de sinais de CD4 e CD28.

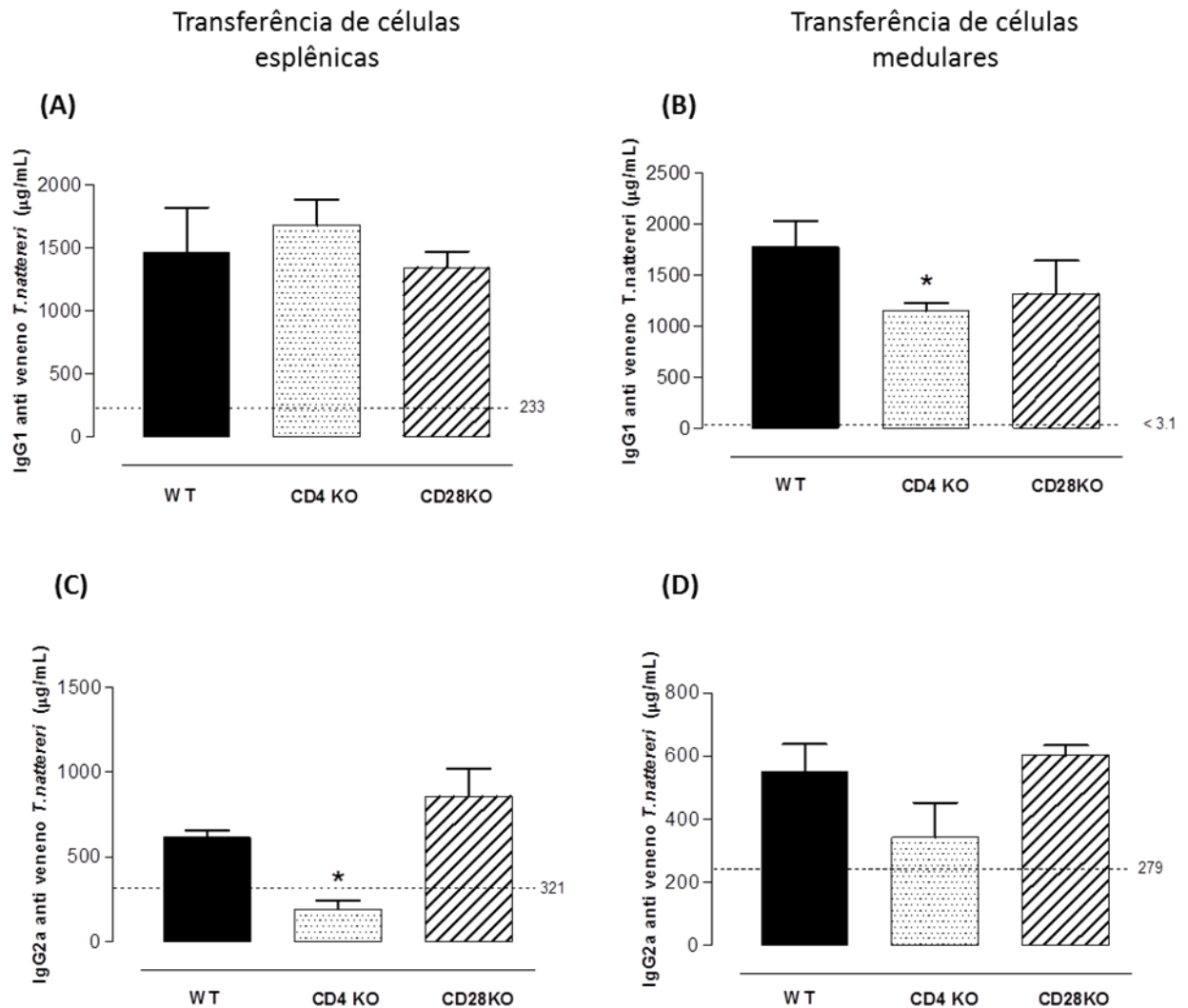
Podemos concluir que CD28 promove o processo hierárquico de diferenciação das ASC B220^{pos} para o estagio terminal ASC B220^{neg} no baço e, ao contrário, prioriza na medula as ASC com alta expressão de B220. Garantindo assim que estas células em estágio intermediário de expressão de B220 possam após contatos subsequentes com o antígeno entrarem em novos ciclos de diferenciação no GC e diversificar a resposta humoral de alta afinidade.

Figura 11. Transferência de células totais e verificação da participação da sinalização CD4 e CD28 na diferenciação e manutenção de ASC



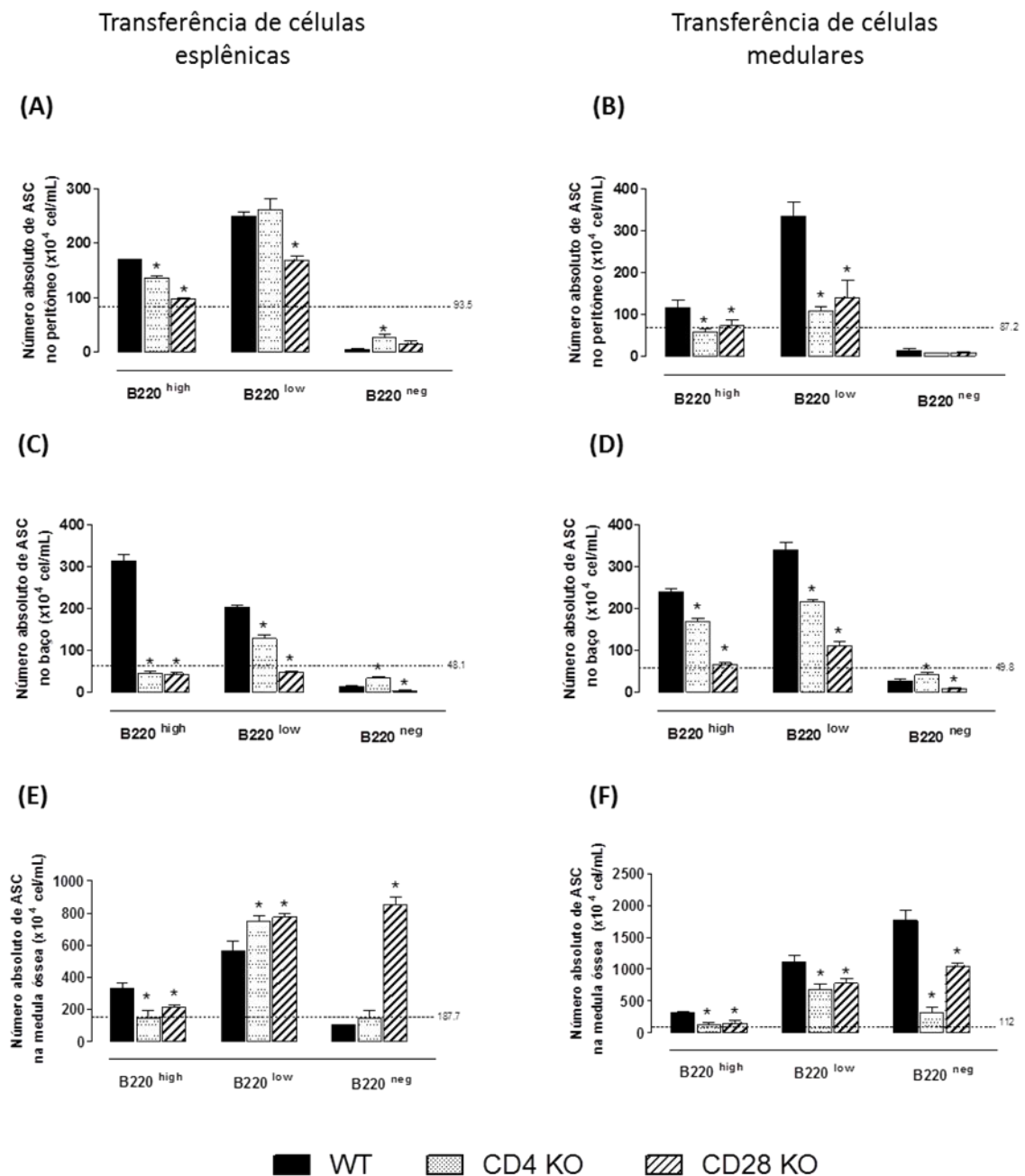
Camundongos C57BL/6 WT machos foram imunizados (i.p.) com o veneno de *T. nattereri* adsorvido em adjuvante. Após 14 e 120 d, os animais receberam veneno sem adjuvante. Os animais foram mortos após 121 d da imunização para obtenção das suspensões celulares total do baço e da medula óssea femoral e posterior transferência intravenosa para animais virgens WT, CD4 KO ou CD28 KO (4×10^7 cel/mL). Após 7 d da transferência, estes animais receberam um desafio com veneno de *T. nattereri* e as análises foram realizadas após 80 d. No último dia de estudo, os animais foram sangrados para obtenção do plasma e posterior dosagem de imunoglobulinas e foram mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral e análise de ASC por citometria.

Figura 12. Células B induzidas *in vivo* no baço e na medula óssea em resposta crônica ao veneno necessitam de CD4 para manterem a produção de anticorpos



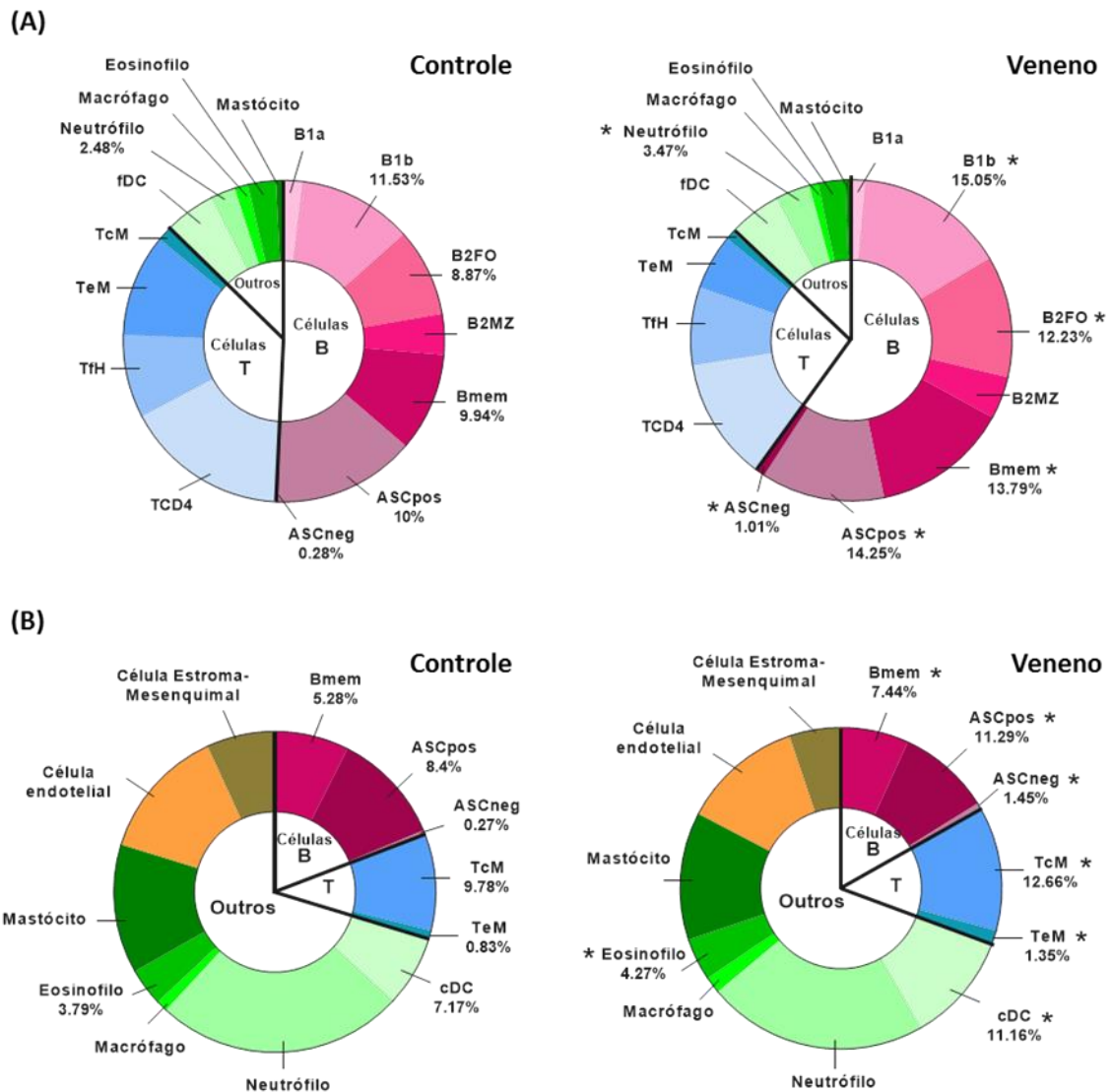
Suspensões celulares esplênicas ou medulares totais obtidas após 121 d da imunização com o veneno em camundongos *WT* foram transferidas para animais *WT* ou *CD4 KO* ou *CD28 KO*. Após 80 d, os animais foram sangrados para obtenção do plasma para dosagem por ELISA de anticorpos-específicos IgG1 (A-B) ou IgG2a (C-D). As barras representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão. A linha pontilhada representa a média da produção de anticorpos no plasma de animais controle não imunizados. * $p < 0,05$ em relação ao *WT* imunizado com veneno.

Figura 13. Células B induzidas *in vivo* na medula óssea em resposta crônica ao veneno se diferenciam em ASC negativas na medula óssea onde requerem os sinais de CD4 e CD28



Suspensões celulares esplênicas ou medulares totais obtidas após 121 d da imunização com o veneno em camundongos *WT* foram transferidas para animais *WT* ou *CD4 KO* ou *CD28 KO*. Após 80 d, os animais foram mortos para coleta da suspensão celular da cavidade peritoneal, baço e medula óssea que foi processada para marcação das células com os anticorpos anti-CD43 FITC, anti-CD45R/B220 PECy5, anti-CD138 PE e analisadas por citometria de fluxo. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão. A linha pontilhada representa a média do número absoluto de células animais controle não imunizados. **p* < 0,05 em relação ao *WT* imunizado com veneno.

Figura 14. Composição das células transferidas



Antes da transferência intravenosa para animais virgens *WT*, *CD4* ou *CD28 KO* uma alíquota da suspensão celular do baço (A) ou da medula óssea femoral (B) dos animais imunizados foi processada para contagem dos leucócitos com Azul de tripan em câmara de Neubauer e marcadas com anticorpos específicos para fenotipagem de linfócitos B dos subtipos B1a ($CD45R/B220^{low} CD5^{pos}$), B1b ($CD45R/B220^{low} CD5^{neg}$), B2 da zona marginal ($CD45R/B220^{high} CD21^{pos} CD23^{neg}$), B2 folicular ($CD45R/B220^{high} CD21^{neg} CD23^{pos}$), Bmem ($CD45R/B220^{pos} CD19^{pos} IgG^{pos}$) e ASC ($CD45R/B220^{pos/neg} CD43^{pos} CD138^{pos}$); linfócitos T dos subtipos T ativado ($CD4^{pos} CD69^{pos}$), T folicular ($CD4^{pos} ICOS^{pos} CXCR5^{pos}$), T de memória central ($CD4^{pos} CD44^{high} Ly6C^{pos}$) e T de memória efetor ($CD4^{pos} CD44^{high} CD40L^{pos}$); outros subtipos celulares incluindo células dendríticas convencionais ($CD11b^{pos} CD11c^{pos} MHCII^{pos}$) e foliculares ($CD11b^{pos} CD11c^{pos} CD21/CD35^{pos}$), macrófagos ($Ly6G^{neg} CD11b^{pos} Ly6C^{pos}$), neutrófilos ($Ly6G^{high} CD11b^{pos}$), eosinófilos ($CD4^{neg} CCR3^{pos}$), mastócitos ($CD4^{neg} CD117^{pos}$), células endoteliais ($CD31^{pos} CD11b^{neg}$), células estroma-mesenquimais ($CD105^{pos} CD29^{pos}$) e analisadas por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ em relação ao *WT* não imunizado com o veneno.

IV Confirmação do papel intrínseco das moléculas CD4 ou CD28 no compartimento de células B de memória gerado pelo veneno

5.7 ASC B220^{pos} requerem a participação de CD4 para sobreviverem no peritônio e no baço

Nossos resultados de transferência adotiva de células totais anteriormente apresentados mostram que quando as células B do compartimento de memória (Bmem, ASC B220^{pos} e ASC B220^{neg}) são mantidas por longos períodos na medula em íntimo contato com cDC, eosinófilos e linfócitos T de memória elas podem recircular novamente após um novo contato com o antígeno e voltar a repopular a medula na forma terminalmente diferenciada onde serão mantidas de maneira dependente de sinais de CD4 e CD28.

Tendo em vista a complexidade das populações esplênicas e medulares transferidas (Fig. 14), nossa próxima etapa foi avaliar a dependência das moléculas CD4 e CD28 na sobrevivência de ASC CD138^{pos} ou das Bmem IgG^{pos} purificadas do *pool* celular, excluindo assim a interferência dos fatores dos microambientes como células ou moléculas solúveis produzidas por elas. Para isto, as suspensões celulares do baço ou da medula de animais C57BL/6 *WT* imunizados com o veneno foram coletadas após 121 d e as ASC foram purificadas usando anticorpos anti-CD138 acoplados a *beads* magnéticas e as células Bmem foram purificadas usando anticorpos anti-IgG1 e IgG2a acoplados a *beads* magnéticas. Estas células foram transferidas adotivamente para animais virgens *WT* ou deficientes em CD4 e CD28 (Fig. 15). A pureza das populações isoladas foi determinada por citometria de fluxo e está representada na Figura 16.

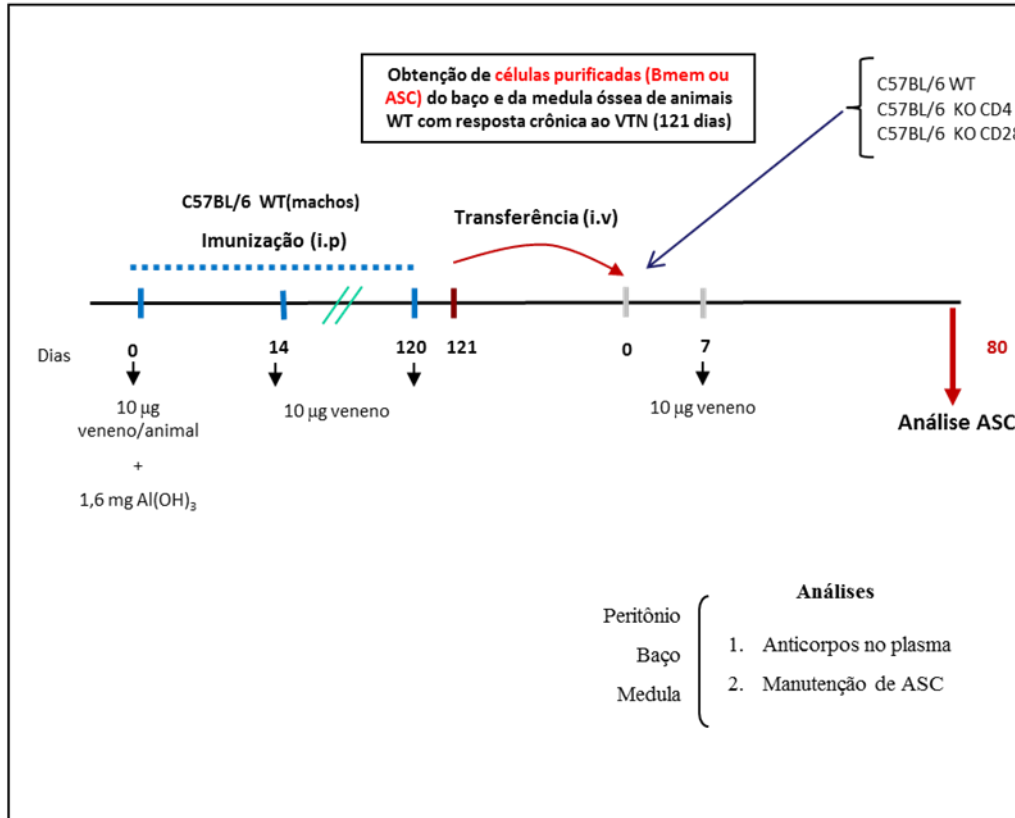
Observamos na Figura 17 que as ASC CD138^{pos} derivadas do baço ou da medula óssea quando transferidas para animais *WT* produziram anticorpos veneno-específico das sub-classes IgG1 (Fig. 17A e 17B) e somente as ASC CD138^{pos} derivadas do baço transferidas para *WT* produziram baixos níveis de IgG2a (Fig. 17C) em contraste às ASC derivadas da medula óssea (Fig. 17D). Com relação à regulação das moléculas CD4 e CD28 na manutenção da produção de anticorpos específicos pelas ASC transferidas podemos observar que as células derivadas do baço ou da medula óssea quando transferidas foram incapazes de produzir anticorpos na ausência de CD4 ou de CD28, demonstrando a dependência destas moléculas.

Na Figura 18A, 18C e 18E observamos que as ASC derivadas do baço quando transferidas para animais *WT* permanecem vivas nos três compartimentos no fenótipo B220^{low}. Nos animais deficientes observamos que a ausência de CD4 induz diminuição do número destas células no peritônio e no baço, mostrando que são reguladas positivamente por CD4; e que a ausência de CD28

gera um aumento no número de ASC B220^{low} nos 3 compartimentos, o que demonstra uma regulação negativa.

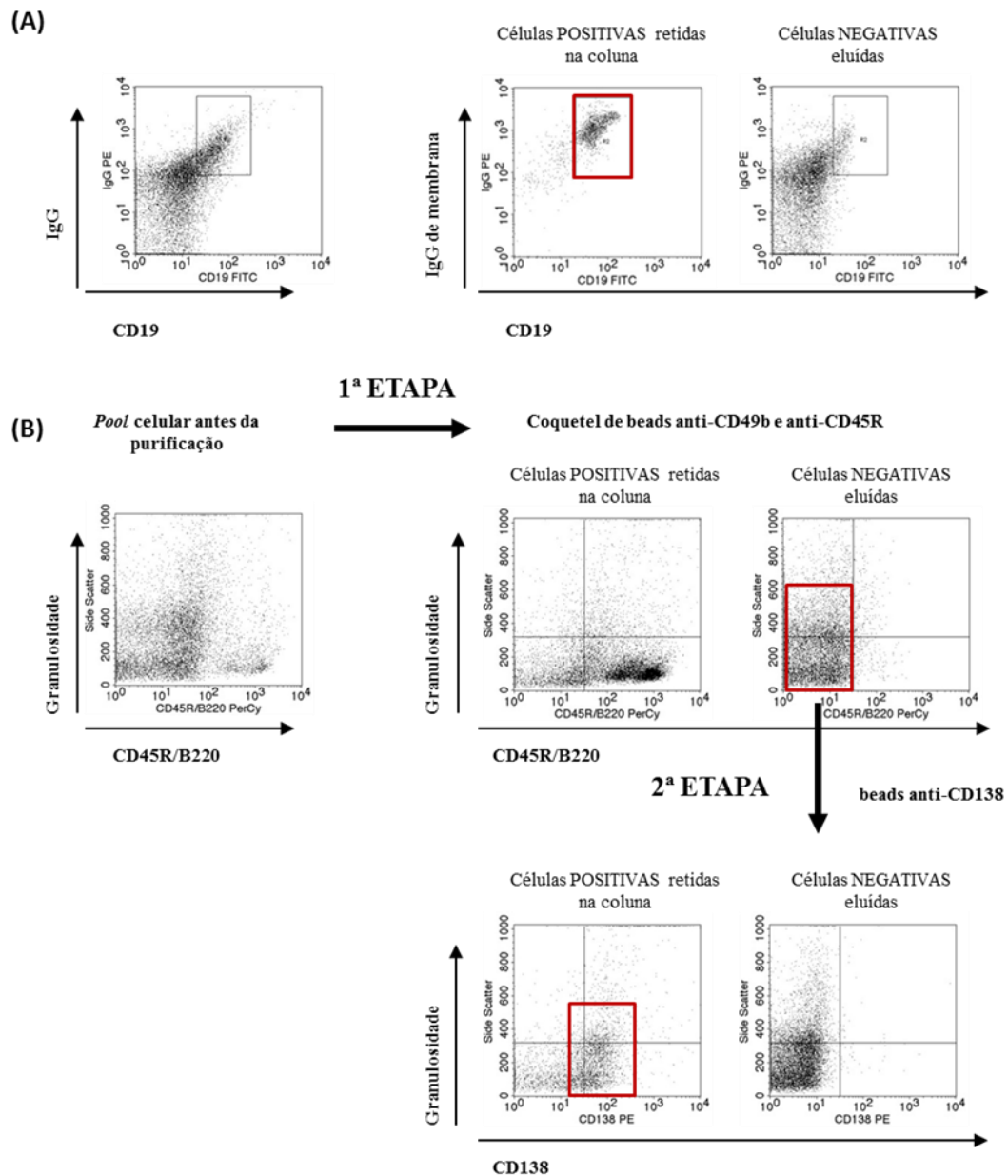
Quando ASC CD138^{pos} medulares foram transferidas para animais *WT* observamos na Figura **18B** uma sobrevivência de ASC no peritônio no fenótipo B220^{high} e B220^{low} e na medula poucas ASC no fenótipo B220^{low} (Fig. **18F**). A ausência de CD4 gerou uma diminuição de células no peritônio e a ausência de CD28 induziu um aumento nos 3 compartimentos. Nenhuma ASC foi encontrada no baço dos animais *WT* transferidos com células medulares (Fig. **18D**).

Figura 15 . Transferência de células Bmem ou ASC purificadas e verificação da participação da sinalização CD4 e CD28



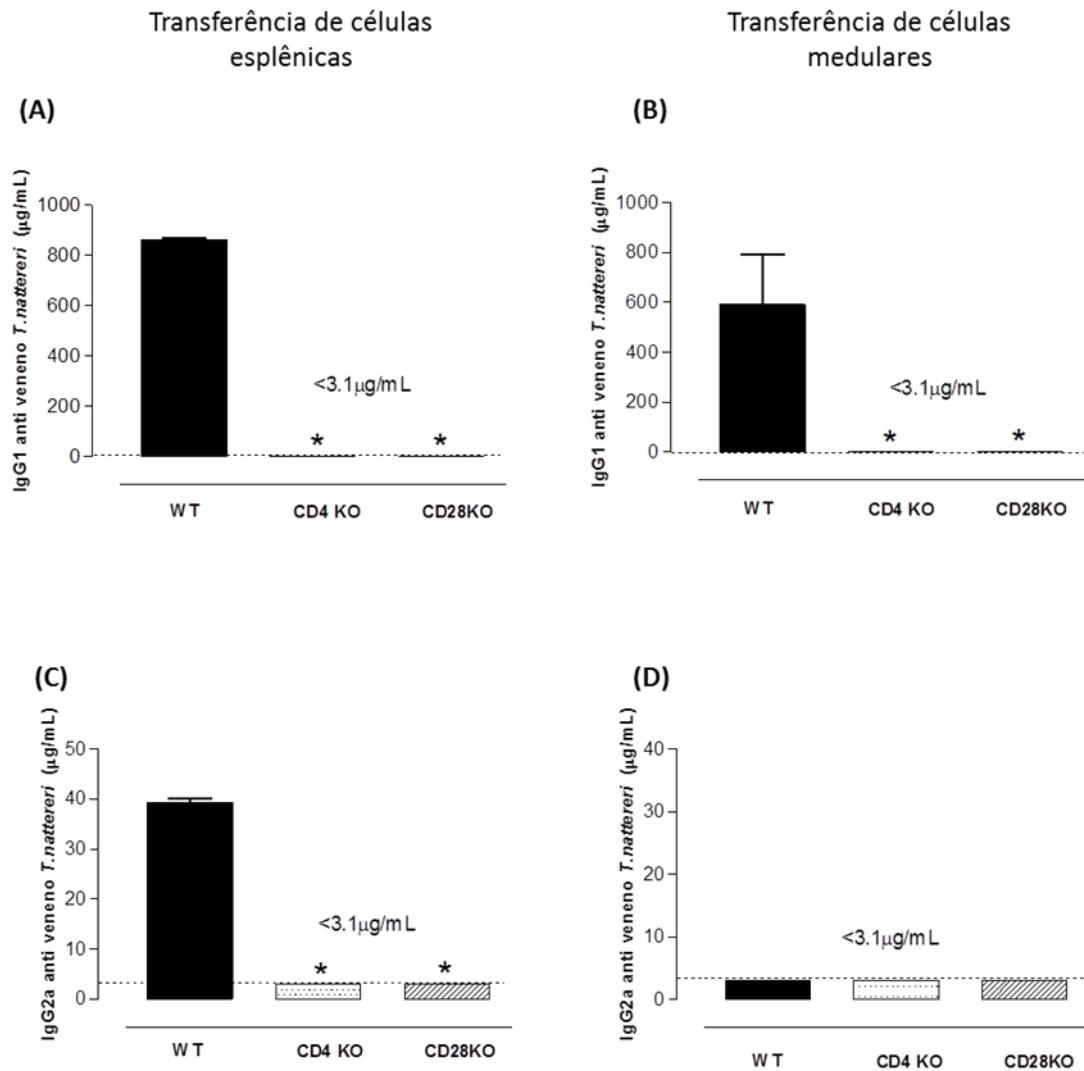
Camundongos C57BL/6 WT machos foram imunizados (i.p.) com o veneno de *T. nattereri* adsorvido em adjuvante. Após 14 e 120 d, os animais receberam a mesma quantidade de veneno sem adjuvante. Os animais foram mortos 121 d após a imunização para obtenção das suspensões celulares do baço e da medula óssea femoral, purificação de células Bmem ou de ASC através de *beads* magnéticas (AutoMACS) e posterior transferência intravenosa para animais virgens WT, CD4 KO ou CD28 KO (4×10^7 cel/mL). Após 7 d da transferência, estes animais receberam um desafio com veneno de *T. nattereri* e as análises foram realizadas após 80 dias. No último dia de estudo, os animais foram sangrados para obtenção do plasma e posterior dosagem de imunoglobulinas e foram mortos para obtenção das suspensões celulares da cavidade peritoneal, do baço e da medula óssea femoral e análise de ASC por citometria .

Figura 16. Purificação de células Bmem IgG1/IgG2a-positivas ou ASC CD138-positivas de animais com resposta crônica ao veneno de *T. nattereri* para transferência adotiva



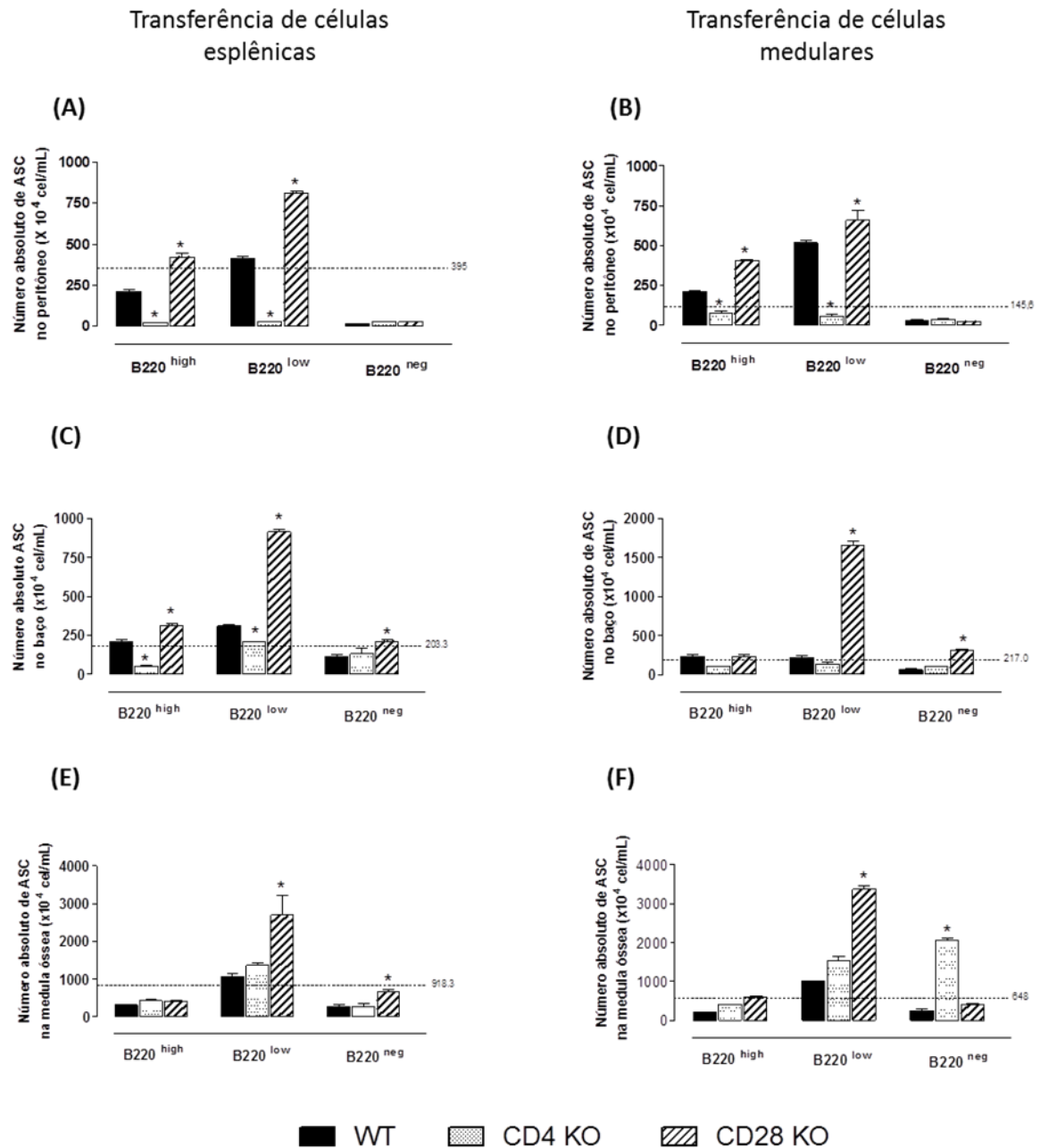
Células do baço e da medula óssea femoral obtidas após 121 d de animais C57BL/6 WT machos ($n = 5$) com resposta imune crônica ao veneno foram utilizadas para a purificação celular utilizando *beads* magnéticas e o separador automático Auto-MACS. Para separação positiva de Bmem (A), 1×10^7 células foram incubadas com um coquetel de *beads* anti-IgG1 e anti-IgG2a. A separação de ASC (B) consistiu em duas etapas. Para a 1ª etapa (separação negativa) 1×10^7 células foram incubadas com um coquetel de anticorpos anti-CD45R e anti-CD49b biotinizados e *beads* anti-biotina para exclusão de células não plasmáticas. Na 2ª etapa (seleção positiva), células negativas foram novamente incubadas com *beads* anti-CD138 para purificação das ASC. A pureza das células Bmem foi confirmada pela marcação com anticorpos anti-IgG e anti-CD19 e a pureza da ASC foi confirmada pela marcação com anticorpos anti-CD45R/B220 e anti-CD138.

Figura 17. ASC previamente diferenciadas *in vivo* necessitam de sinais de CD4 e CD28 para manterem a produção de anticorpos específicos



ASC esplênicas ou medulares obtidas após 121 d da imunização com o veneno em camundongos WT foram transferidas para animais WT ou CD4 KO ou CD28 KO. Após 80 d, os animais foram sangrados para obtenção do plasma para dosagem por ELISA de anticorpos-específicos IgG1 (A-B) ou IgG2a (C-D). As barras representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão. A linha pontilhada representa a média da produção de anticorpos no plasma de animais controle não imunizados. * $p < 0,05$ em relação ao WT imunizado com veneno.

Figura 18. ASC previamente diferenciadas *in vivo* sobrevivem no peritônio e no baço expressando a molécula CD45R/B220 de maneira dependente de CD4



ASC esplênicas ou medulares obtidas após 121 d da imunização com o veneno em camundongos *WT* foram transferidas para animais *WT* ou *CD4 KO* ou *CD28 KO*. Após 80 d, os animais foram mortos para coleta da suspensão celular da cavidade peritoneal que foi processada para marcação das células com os anticorpos anti-CD43 FITC, anti-CD45R/B220 PECy5, anti-CD138 PE e analisadas por citometria de fluxo. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão. A linha pontilhada representa a média do número absoluto de células animais controle não imunizados. * $p < 0,05$ em relação ao *WT* imunizado com veneno.

5.8 Células Bmem se diferenciam em ASC B220^{pos} que necessitam dos sinais de CD4 para sobreviverem

Nossos dados anteriores mostram que a transferência de ASC CD138^{pos} purificadas do baço ou da medula de animais imunizados com o veneno somente gerou a sobrevivência de ASC B220^{pos} e, ao contrário, não levou à sobrevivência das ASC com fenótipo negativo (ASC B220^{neg}) que podem ter sido suprimidas no baço e na medula pela ação negativa da molécula CD28.

Para finalizar, avaliamos a capacidade da transferência adotiva de Bmem IgG^{pos} para animais *WT* na produção de anticorpos veneno-específico. Observamos na Figura **19** que as Bmem IgG^{pos} purificadas do baço ou da medula óssea quando transferidas para animais *WT* produziram anticorpos IgG1 veneno-específico (Fig. **19A** e **19B**) e níveis moderados de IgG2a (Fig. **19C** e **19D**). Este perfil isotípico com razão Th2/Th1 é típico da resposta ao veneno de *T. nattereri* (Fig. **8**). A transferência adotiva para animais deficientes promoveu uma falha na produção de ambos os anticorpos mostrando novamente a dependência dos sinais de CD4 ou CD28 para se manterem produtoras de IgG1 e IgG2a.

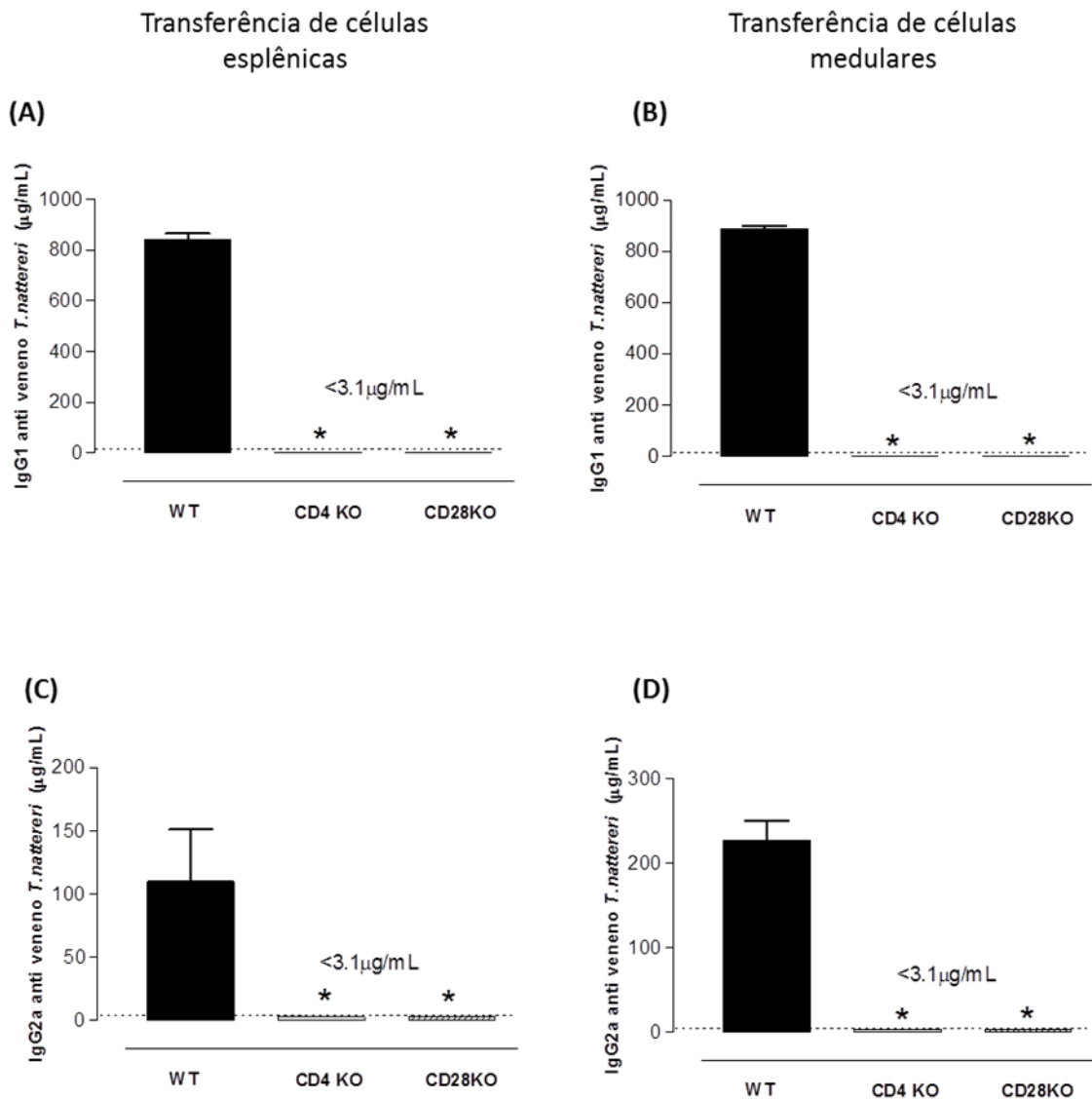
Avaliamos ainda se a transferência adotiva de Bmem IgG^{pos} para animais *WT* suportaria a diferenciação em distintos subtipos de ASC e se a manutenção destas células seria influenciada pelas moléculas CD4 ou CD28. Na Figura **20A** e **20B** observamos que as células Bmem IgG^{pos} purificadas do baço e da medula quando transferidas se diferenciaram em ASC B220^{high} e B220^{low} no peritônio onde sofreram influência positiva dos sinais de CD4 para sobreviverem, uma vez que os animais CD4 *KO* apresentaram número de células inferiores aos dos animais controle (linha pontilhada). A transferência adotiva de Bmem IgG^{pos} purificadas do baço não gerou ASC no baço (Fig. **20C**), local de expressiva regulação negativa da molécula CD28. Ao contrário, as células purificadas da medula (Fig. **20D**) se mantiveram neste compartimento também no fenótipo positivo. Animais CD4 *KO* apresentaram intensa diminuição destas ASC B220^{pos} e os animais CD28 *KO* tiveram um exacerbado aumento em seu número, demonstrando uma regulação positiva induzida por CD4 e uma regulação negativa induzida por CD28 na manutenção da sobrevivência. Na Figura **20E** e **20F** observamos que as células Bmem IgG^{pos} derivadas do baço ou da medula óssea quando transferidas se diferenciam em ASC B220^{low} na medula onde foram reguladas positivamente por CD4 e negativamente por CD28.

Em conjunto, nossos dados comprovam que o veneno *in vivo* modula o compartimento de células B de memória induzindo a diferenciação das Bmem IgG^{pos} em ASC num processo hierárquico, porém neste modelo de transferência adotiva de células purificadas as ASC não sobrevivem no

último estágio de diferenciação (B220^{neg}). Comprovamos também que CD28 exerce um forte efeito negativo regulando a manutenção da sobrevivência destas células.

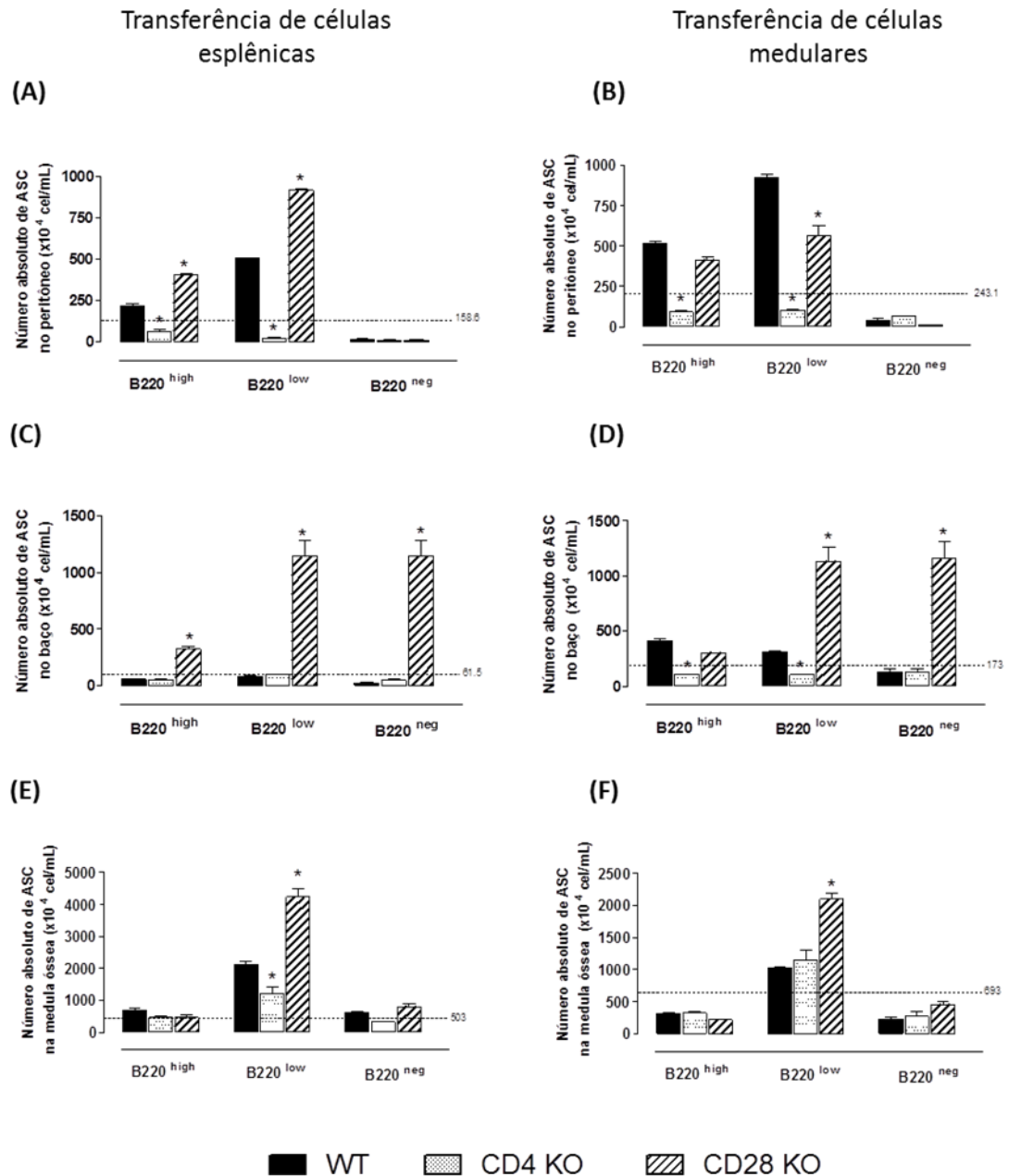
Podemos concluir que a geração de ASC e a diferenciação terminal no fenótipo B220^{neg} se dá exclusivamente no GC e requer os sinais oriundos de CD4 e CD28. Porém o microambiente medular rico em cDC, linfócitos T de memória e eosinófilos e seus produtos pode substituir o nicho esplênico suportando a diferenciação de ASC B220^{neg}. Finalmente, a manutenção da sobrevivência das ASC é regulada positivamente por CD4 e negativamente por CD28. Esses achados além de reforçarem o papel de CD4 e CD28 no controle da formação de GC e da troca de classe de imunoglobulina (LENSCHOW et al., 1996) também demonstram um papel essencial na modulação da magnitude da resposta humoral fornecendo sinais adicionais estimuladores ou inibitórios para a manutenção da longevidade das células de memória produtoras de anticorpos.

Figura 19. Bmem induzidas pelo estímulo do veneno *in vivo* necessitam dos sinais de CD4 e CD28 para manterem a produção de anticorpos específicos



Bmem esplênicas e medulares obtidas após 121 d da imunização com o veneno em camundongos *WT* foram transferidas para animais *WT* ou *CD4 KO* ou *CD28 KO*. Após 80 d, os animais foram sangrados para obtenção do plasma para dosagem por ELISA de anticorpos-específicos IgG1 (**A-B**) ou IgG2a (**C-D**). As barras representam a média de diferentes amostras acrescida do desvio-padrão. A linha pontilhada representa a média da produção de anticorpos no plasma de animais controle não imunizados. * $p < 0,05$ em relação ao *WT* imunizado com veneno.

Figura 20. Bmem induzidas pelo estímulo do veneno *in vivo* se diferenciam em ASC positivas e populam os 3 compartimentos de maneira dependente de CD4



Bmem esplênicas ou medulares obtidas após 121 d da imunização com o veneno em camundongos *WT* foram transferidas para animais *WT* ou *CD4 KO* ou *CD28 KO*. Após 80 d, os animais foram mortos para coleta da suspensão celular da cavidade peritoneal que foi processada para marcação das células com os anticorpos anti-CD43 FITC, anti-CD45R/B220 PEcy5, anti-CD138 PE e analisadas por citometria de fluxo. As barras representam o número absoluto de células positivas acrescida do desvio-padrão. A linha pontilhada representa a média do número absoluto de células animais controle não imunizados. * $p < 0,05$ em relação ao *WT* imunizado com veneno.

V Verificação da capacidade do veneno e o papel das citocinas na indução da diferenciação hierárquica das ASC

5.9 O processo hierárquico de diferenciação de ASC depende de sinais integrados derivados do antígeno e de IL-17A (Apêndice B).

6 CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu para a expansão do entendimento dos fatores envolvidos na diferenciação e principalmente na manutenção da sobrevivência das células produtoras de anticorpos de longa vida (ASC). Utilizando experimentos *in vivo* e *in vitro* com animais BALB/c ou C57BL/6 com resposta imune crônica ao veneno de *T. nattereri* demonstramos que as ASC requerem mediante a sua localização (tecido inflamado, baço ou medula) ou a expressão da molécula B220 diferentes tipos de sinais cognatos (de células inatas, de linfócitos T de memória e da sinalização CD4 ou CD28) ou solúveis (IL-17A e IL-23) para a sua diferenciação terminal, sobrevivência e amplificação da produção de anticorpos específicos de memória.

REFERÊNCIAS*

- AGGARWAL, S.; GHILARDI, N.; XIE, M. H.; DE SAUVAGE, F. J.; GURNEY, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 3, p. 1910-1914, 2003.
- 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.
- APPAY, V.; DUNBAR, P. R.; CALLAN, M.; KLENERMAN, P.; GILLESPIE, G. M.; PAPAGNO, L.; OGG, G. S.; KING, A.; LECHNER, F.; SPINA, C. A.; LITTLE, S.; HAVLIR, D. V.; RICHMAN, D. D.; GRUENER, N.; PAPE, G.; WATERS, A.; EASTERBROOK, P.; SALIO, M.; CERUNDOLO, V.; McMICHAEL, A. J.; ROWLAND-JONES, S.L. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. **Nat. Med.**, v. 8, n. 4, p. 379-385, 2002.
- 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.
- BASSOM, M. A.; BOMMARDT, U.; MEE, P. J.; TYBULEWICZ, V. L.; ZAMOYSKA, R. Molecular requirements for lineage commitment in the thymus-antibody-mediated receptor engagements reveal a central role for Ick in lineage decisions. **Immunology**, v. 165, p. 181-194, 1998.
- BENSON, M. J.; DILLON, S. R.; CASTIGLIONE, GEHA, R. S.; XU, S.; LAM, K. P.; NOELLE, R. J. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. **J. Immunol.**, v. 180, n. 6, p. 3655-3659, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CASOLA, S.; OTIPOBY, K. L.; ALIMZHANOV, M.; HUMME, S.; UYTTERSROT, N.; KUTOK, J. L.; CARROLL, M. C.; RAJEWSKY, K. B cell receptor signal strength determines B cell fate. **Nat. Immunol.**, v. 5, n. 3, p. 317-327, 2004.
- CASSESE, G.; ARCE, S.; HAUSER, A. E.; LEHNERT, K.; MOEWES, B.; MOSTARAC, M.; MUEHLINGHAUS, G.; SZYSKA, M.; RADBRUCH, A.; MANZ, R. A. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. **J. Immunol.**, v. 171, p. 1684-1690, 2003.
- CASSESE, G.; LINDENAU, S.; DE, B. B.; ARCE, S.; HAUSER, A.; RIEMEKASTEN, G.; BEREK, C.; HIEPE, F.; KRENN, V.; RADBRUCH, A.; MANZ, R. A. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 2726-2732, 2001.

*De acordo com:

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

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

CHOI, Y. S.; KAGEYAMA, R.; ETO, D.; ESCOBAR, T. C.; JOHNSTON, R. J.; MONTICELLI, L.; LAO, C.; CROTTY, S. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. **Immunity**, v. 34, n. 6, p. 932-946, 2011.

CHU, V. T.; BEREK, C. Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. **Eur J. Immunol.**, v. 42, p. 130-137, 2012.

CHU, V. T.; FRÖHLICH, A.; STEINHAUSER, G.; SCHEEL, T.; ROCH, T.; FILLATREAU, S.; LEE, J. J.; LÖHNING, M.; BEREK, C. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. **Nat Immunol.**, v. 12, n. 2, p. 151-159, 2011.

DELOGU, A.; SCHEBESTA, A.; SUN, Q.; ASCHENBRENNER, K.; PERLOT, T.; BUSSLINGER, M. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. **Immunity**, v. 24, n. 3, p.269-281, 2006.

DENKERS, E. Y.; DEL RIO, L.; BENNOUNA, S. Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. **Chem. Immunol. Allergy**, v. 83, p. 95-114, 2003.

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

DUTTON, R. W.; BRADLEY, L. M.; SWAIN, S. L. T cell memory. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 201-223, 2008.

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

FAZILLEAU, N.; MARK, L.; McHEYZER-WILLIAMS, L. J.; McHEYZER-WILLIAMS, M.G. Follicular helper T cells: lineage and location. **Immunity**, v. 30, n. 3, p. 324-335, 2009.

FEUERER, M.; BECKHOVE, P.; MAHNKE, Y.; HOMMEL, M.; KYEWSKI, B.; HAMANN, A.; UMANSKY, V.; SCHIRRMACHER, V. Bone marrow microenvironment facilitating dendritic cell: CD4 T cell interactions and maintenance of CD4 memory. **Int. J. Oncol.**, v. 25, n. 4, p. 867-876, 2004.

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.

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.

FRANCUS, T.; FRANCUS, Y.; SISKIND, G. W. Memory T cells enhance the expression of high-avidity naive B cells. **Cell Immunol.**, v. 134, n. 2, p. 520-527, 1991.

GAUSE, W. C. S. J.; CHEN, R. J.; GREENWALD, M. J.; HALVORSON, P.; LU, X.; DI ZHOU, S. C.; MORRIS, K. P.; LEE, C. H.; JUNE, F. D.; FINKELMAN, J. F.; URBAN, R. CD28 dependence of T cell differentiation to IL-4 production varies with the particular type 2 immune response. **J. Immunol.**, v. 158, p. 4082, 1997.

GERSHON, R. K.; PAUL, W. E. Effect of thymus-derived lymphocytes on amount and affinity of anti-hapten antibody. **J. Immunol.**, v. 106, p. 872-874, 1971.

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

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

GRUND, L. Z.; KOMEGAE, E. N.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA C. IL-5 and IL-17A are critical for the chronic IgE response and differentiation of long-lived antibody-secreting cells in inflamed tissues. **Cytokine**, v. 59, n. 2, p. 335-351, 2012.

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.

HEBEIS, B. J.; KLENOVSEK, K.; ROHWER, P.; RITTER, U.; SCHNEIDER, A.; MACH, M.; WINKLER, T. H. Activation of virus-specific memory B cells in the absence of T cell help. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 593-602, 2004.

HERNÁNDEZ-HOYOS, G.; SOHN, S. J.; ROTHENBERG, E. V.; ALBEROLA-ILA, J. Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment. **Immunity**, v.12 ,p. 313-322, 2000.

HO, F.; LORTAN, J. E.; MACLENNAN, I. C.; KHAN, M. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. **Eur. J. Immunol.**, v. 16, n. 10, p. 1297-1301, 1986.

HOLDORF, A. D.; LEE, K. H.; BURACK, W. R.; ALLEN, P. M.; SHAW, A. S. Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 3, p. 259-264, 2002.

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

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

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

INGOLD, K.; ZUMSTEG, A.; TARDIVEL, A.; HUARD, B.; STEINER, Q. G.; CACHERO, T.G.; QIANG, F.; GORELIK, L.; KALLED, S. L.; ACHA-ORBEA, H.; RENNERT, P.D.; TSCHOPP, J.; SCHNEIDER, P.

Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. **J. Exp. Med.**, v. 20, p. 1375–1383, 2005.

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

IWATA, M.; KUWATA, T.; MUKAI, M.; TOZAWA, Y.; YOKOYAMA, M. Differential induction of helper and killer T cells from isolated CD4+CD8+ thymocytes in suspension culture. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 2081-2086, 1996.

KALIA, V.; SARKAR, S.; GOURLEY, T. S.; ROUSE, B. T.; AHMED, R. Differentiation of memory B and T cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, n. 3, p. 255-264, 2006.

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

KERFOOT, S.M.; YAARI, G.; PATEL, J.R.; JOHNSON, K.L.; GONZALEZ, D.G.; KLEINSTEIN, S.H.; HABERMAN, A. M. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. **Immunity**, v. 34, n. 6, p. 947-960, 2011.

KIKUCHI, Y.; YASUE, T.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M.; TAKATSU, K. CD38 ligation induces tyrosine phosphorylation of Bruton tyrosine kinase and enhanced expression of interleukin 5-receptor alpha chain: synergistic effects with interleukin 5. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, n. 25, p. 11814-11818, 1995.

KING, I.L.; MOHRS, M. IL-4-producing CD4+ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. **J. Exp. Med.**, v. 206, n. 5, p. 1001-1007, 2009.

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.

KNÖDEL, M.; KUSS, A.W.; BERBERICH, I.; SCHIMPL, A. Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 7, p. 1972-1980, 2001.

KORNBLUTH, J. Potential role of CD28-B7 interactions in the growth of myeloma plasma cells. **Curr Top. Microbiol. Immunol.**, v. 194, p. 43-49, 1995.

KOZBOR, D.; MORETTA, A.; MESSNER, H.A.; MORETTA, L.; CROCE, C.M. Tp44 molecules involved in antigen-independent T-cell activation are expressed on human plasma cells. **J. Immunol.**, v. 138, p. 4128-4132, 1987.

LEE, K.P.; TAYLOR, C.; PETRYNIAK, B.; TURKA, L.A.; JUNE, C.H.; THOMPSON, C.B. The genomic organization of the CD28 gene: implications for the regulation of CD28 mRNA expression and heterogeneity. **J. Immunol.**, v. 145, p. 344-352, 1990.

LEGNANE, G.; SEDDON, B.; LOVATT, M.; TOMLINSON, P.; SARNER, N.; TOLAINI, M.; WILLIAMS, K.; NORTON, T.; KIOUSSIS, D.; ZAMOYSKA, R. Inducible expression of a p56Lck transgene reveals a central role for Lck in the differentiation of CD4 SP thymocytes. **Immunity**, v. 12, p. 537–546, 2000.

LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. **Annu. Ver. Immunol.**, v. 14, p. 233-258, 1996.

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, A. M.; RUBIN, C. J.; KHANDPUR, R.; WANG, J. Y.; RIBLETT, M.; YALAVARTHI, S.; VILLANUEVA, E. C.; SHAH, P.; KAPLAN, M. J.; BRUCE, A. T. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. **J. Immunol.**, v. 187, p. 490, 2011.

LINTERMAN, M. A.; PIERSON, W.; LEE, S.K.; KALLIES, A.; KAWAMOTO, S.; RAYNER, T.F.; SRIVASTAVA, M.; DIVEKAR, D.P.; BEATON, L.; HOGAN, J. J.; FAGARASAN, S.; LISTON, A.; SMITH, K. G.; VINUESA, C. G. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. **Nat. Med.**, v. 17, n. 8, p. 975-982, 2011.

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

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

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

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

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

MAGALHÃES, G. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. M. J.; LOPES-FERREIRA, M.; LORENZINI, D. M.; HO, P. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Transcriptome analyses 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.

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

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

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

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

MASOPUST, D.; VEZYS, V.; MARZO, A. L.; LEFRANCOIS, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. **Science**, v. 291, p. 2413–2417, 2001.

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

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

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

MESSIKA, E. J.; LU, P. S.; SUNG, Y. J.; YAO, T.; CHI, J. T.; CHIEN, Y. H.; DAVIS, M.M. Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 3, p. 515-525, 1998.

MITSIADES, C. S.; MITSIADES, N.; POULAKI, V.; SCHLOSSMAN, R.; AKIYAMA, M.; CHAUHAN, D.; HIDESHIMA, T.; TREON, S. P.; MUNSHI, N. C.; RICHARDSON, P. G.; ANDERSON, K. C. Activation of NF- κ B and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. **Oncogene**, v. 21, p. 5673-5683, 2002.

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.

MURANSKI, P.; BONI, A.; ANTONY, P. A.; CASSARD, L.; IRVINE, K. R.; KAISER, A.; PAULOS, C. M.; PALMER, D. C.; TOULOUKIAN, C. E.; PTAK, K.; GATTINONI, L.; WRZESINSKI, C.; HINRICHS, C. S.; KERSTANN, K. W.; FEIGENBAUM, L.; CHAN, C. C.; RESTIFO, N. P. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. **Blood**, v. 112, p. 362–373, 2008.

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

NJAU, M. N.; KIM, J. H.; CHAPPELL, C. P.; RAVINDRAN, R.; THOMAS, L.; PULENDRAN, B.; JACOB, J. CD28-B7 interaction modulates short- and long-lived plasma cell function. **J. Immunol.**, v. 189, n. 6, p. 2758-2767, 2012.

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

ODENDAHL, M.; MEI, H.; HOYER, B. F.; JACOBI, A. M.; HANSEN, A.; MUEHLINGHAUS, G.; BEREK, C.; HIEPE, F.; MANZ, R.; RADBRUCH, A.; DÖRNER, T. Generation of migratory antigen-specific plasma

blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. **Blood**, v.105, n. 4, p. 1614-1621, 2005.

OPPMANN, B.; LESLEY, R.; BLOM, B.; TIMANS, J. C.; XU, Y.; HUNTE, B.; VEGA, F.; YU, N.; WANG, J.; SINGH, K.; ZONIN, F.; VAISBERG, E.; CHURAKOVA, T.; LIU, M.; GORMAN, D.; WAGNER, J.; ZURAWSKI, S.; LIU, Y.; ABRAMS, J. S.; MOORE, K. W.; RENNICK, D.; DE WAAL-MALEFYT, R.; HANNUM, C.; BAZAN, J.F.; KASTELEIN, R. A. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 715–725, 2000.

OVERWIJK, W. W.; DE VISSER, K. E.; TIRION, F. H.; DE JONG, L. A.; POLS, T. W.; VAN DER VELDEN, Y. U.; VAN DEN BOORN, J. G.; KELLER, A. M.; BUURMAN, W. A.; THEORET, M. R.; BLOM, B.; RESTIFO, N. P.; KRUISBEEK, A. M.; KASTELEIN, R. A.; HAANEN, J. B. Immunological and antitumor effects of IL-23 as a cancer vaccine adjuvant. **J. Immunol.**, v. 176, p. 5213–5222, 2006.

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

PERNIS, A. B. The role of IRF-4 in B and T cell activation and differentiation. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 22, p. 111-120, 2002.

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

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

PUGA, I.; COLS, M.; BARRA, C. M.; HE, B.; CASSIS, L.; GENTILE, M.; COMERMA, L.; CHORNY, A.; SHAN, M.; XU, W.; MAGRI, G.; KNOWLES, D. M.; TAM, W.; CHIU, A.; BUSSEL, J. B.; SERRANO, S.; LORENTE, J. A.; BELLOSILLO, B.; LLORETA, J.; JUANPERE, N.; et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. **Nat. Immunol.**, v.13, n. 2, p. 170-180, 2011.

PURTHA, W. E.; TEDDER, T. F.; JOHNSON, S.; BHATTACHARYA, D.; DIAMOND, M. S. Memory B cells, but not long-lived plasma cells, possess antigen specificities for viral escape mutants. **J. Exp. Med.**, v. 208, n. 13, p. 2599-2606, 2011.

RAJEWSKY, K. Clonal selection and learning in the antibody system. **Nature**, v. 381, p. 751-758, 1996
REINHARDT, R. L.; KHORUTS, A.; MERICA, R.; ZELL, T.; JENKINS, M.K. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. **Nature**, v. 410, p. 101-105, 2001.

ROBILLARD, N. ; JEGO, G. ; PELLAT-DECEUNYCK, C. ; PINEAU, D. ; PUTHIER, D. ; MELLERIN, M. P. ; BARILLÉ, S. ; RAPP, M. J. ; HAROUSSEAU, J. L. ; AMIOT, M. ; BATAILLE, R. CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. **Clin. Cancer Res.**, v. 4, p.1521-1526, 1998.

ROZANSKI, C. H.; ARENS, R.; CARLSON, L. M.; NAIR, J.; BOISE, L. H.; CHANAN-KHAN, A. A.; SCHOENBERGER, S. P.; LEE, K. P. Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. **J. Exp. Med.**, v. 208, n. 7, p. 1435-1446, 2011.

RULIFSON, I. C.; SPERLING, A. I.; FIELDS, P. E.; FITCH, F. W.; BLUESTONE, J. A. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. **J. Immunol.**, v. 158, p. 658, 1997.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; FÖRSTER, R.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, p. 708–712, 1999.

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

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

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

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

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

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

SWAIN, S. L.; DUTTON, R. W.; MCKENZIE, D.; HELSTROM, H.; ENGLISH, M. Role of antigen in the B cell response. Specific antigen and the lymphokine IL-5 synergize to drive B cell lymphoma proliferation and differentiation to Ig secretion. **J. Immunol.**, v. 140, n. 12, p. 4224-4230, 1988.

TAKATSU, K. Interleukin 5 and B cell differentiation. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 9, n. 1, p. 25-35, 1998.

TAKATSU, K.; KOURO, T.; NAGAI, Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. **Adv. Immunol.**, v. 101, p. 191-236, 2009.

TAN, W.; HUANG, W.; ZHONG, Q.; SCHWARZENBERGER, P. IL-17 receptor knockout mice have enhanced myelotoxicity and impaired hemopoietic recovery following gamma irradiation. **J. Immunol.**, v. 176, n. 10, p. 6186-6193, 2006.

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.

TANI, K.; MURPHY, W. J.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J. J.; WANG, J. M. The neutrophil granule protein cathepsin G activates murine T lymphocytes and upregulates antigen-specific Ig production in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 282, n. 4, p.971-976, 2001.

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

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

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

TOKOYODA, K.; ZEHENTMEIER, S.; HEGAZY, A.N.; ALBRECHT, I.; GRÜN, J.R.; LÖHNING, M.; RADBRUCH, A. Professional memory CD4⁺ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 721-730, 2009.

TOY, D.; KUGLER, D.; WOLFSON, M.; VANDEN BOS, T.; GURGEL, J.; DERRY, J.; TOCKER, J.; PESCHON, J. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. **J. Immunol.**, v. 177, n. 1, p. 36-39, 2006.

TU, Y.; GARDNER, A.; LICHTENSTEIN, A. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. **Cancer Res.**, v. 60, p. 6763-6770, 2002.

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

WALKER, L. S.; GULBRANSON-JUDGE, A.; FLYNN, S.; BROCKER, T.; RAYKUNDALIA, C.; GOODALL, M.; FÖRSTER, R.; LIPP, M.; LANE, P. Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers. **J. Exp. Med.**, v. 190, n. 8, p. 1115-1122, 1999.

WHERRY, E. J.; TEICHGRÄBER, V.; BECKER, T. C.; MASOPIST, D.; KAECH, S.M.; ANTIA, R.; VON, ANDRIAN, U.H.; AHMED, R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 225-234, 2003.

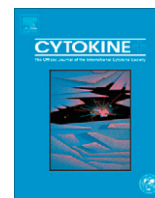
WRAMMERT, J.; SMITH, K.; MILLER, J.; LANGLEY, W. A.; KOKKO, K.; LARSEN, C.; ZHENG, N. Y.; MAYS, I.; GARMAN, L.; HELMS, C.; JAMES, J.; AIR, G. M.; CAPRA, J. D.; AHMED, R.; WILSON, P.C. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. **Nature**, v. 453, n. 7195, p. 667-671, 2008.

ZHANG, X.; LI, L.; JUNG, J.; XIANG, S.; HOLLMANN, C.; CHOI, Y. S. The distinct roles of T cell derived cytokines and a novel follicular dendritic cell-signaling molecule 8D6 in germinal center-B cell differentiation. **J. Immunol.**, v. 167, p. 49, 2001.

ZHENG, Y.; DANILENKO, D. M.; VALDEZ, P.; KASMAN, I.; EASTHAM-ANDERSON, J.; WU, J.; OUYANG, W. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. **Nature**, v. 445, n. 7128, p. 648–651, 2007.

APÊNDICE A - IL-5 e IL-17A são críticas para resposta IgE crônica e diferenciação de células produtoras de anticorpos de longa vida nos tecidos inflamados.

APÊNDICE B - O processo hierárquico de diferenciação de ASC depende de sinais integrados derivados do antígeno e de IL-17A.



IL-5 and IL-17A are critical for the chronic IgE response and differentiation of long-lived antibody-secreting cells in inflamed tissues

Lidiane Zito Grund, Evilin Naname Komegae, Mônica Lopes-Ferreira, Carla Lima *

Immunoregulation Unit, Special Laboratory of Applied Toxinology, Butantan Institute and Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2011
Received in revised form 14 March 2012
Accepted 25 April 2012
Available online 24 May 2012

Keywords:

Fish venom
IL-5/IL-17A
Memory B cell
Long-lived antibody-secreting cells
IgE

ABSTRACT

Prolonged survival of long-lived antibody-secreting cells in the BM has been implicated as a key component of long-term humoral immunity. The current study was designed to uncover the extrinsic signals required for the generation and maintenance of ASC in several niches (peritoneum, spleen and bone-marrow). Our results show that protein mixture of the *Thalassophryne nattereri* venom induced a chronic Th2 humoral response that is characterized by splenic hyperplasia with GC formation and venom retention by follicular DCs. Retention of B1a in the BM were observed. In the late phase (120 d) of chronic venom-response the largest pool of ASC into the peritoneal cavity consisted of B220^{neg}CD43^{high} phenotype; the largest pool of ASC into spleen was constituted by B220^{high} and B220^{low}, whereas the largest pool of ASC into in the BM was constituted by the B220^{high}CD43^{low} phenotype; and finally, terminally differentiated cells (B220^{neg}CD43^{high}) were only maintained in the inflamed peritoneal cavity in late phase. After 120 d a sustained production of cytokines (KC, IL-5, TNF- α , IL-6, IL-17A and IL-23) and leukocytes recruitment (eosinophils, mast cells, and neutrophils) were induced. IL-5- and IL-17A-producing CD4⁺ CD44⁺ CD40L⁺ Ly6C⁺ effector memory T cells were also observed in peritoneal cavity. Finally, treatment of venom-mice with anti-IL-5- and anti-IL17A-neutralizing mAbs abolished the synthesis of specific IgE, without modifying the splenic hyperplasia or GC formation. In addition, IL-5 and IL-17A negatively regulated the expansion of B1a in peritoneal cavity and BM, and promoted the differentiation of these cells in spleen. And more, IL-5 and IL-17A are sufficient for the generation of ASC B220^{neg} in the peritoneal cavity and negatively regulate the number of ASC B220^{pos}, confirming that the hierarchical process of ASC differentiation triggered by venom needs the signal derived from IL-5 and IL-17A.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Immunological memory is a hallmark of acquired immunity. The contribution of B cells for the memory Abs response is based on different population of cells: memory B cells and long-lived antibody-secreting cells – ASC. Memory B cells undergo rapid clonal expansion and differentiation to mount high affinity Ab responses upon exposure to antigens. ASC are terminally differentiated and continue secreting Abs without antigenic stimulation in the bone marrow (BM) that provides a special microenvironment for their longevity [1–5].

Both memory B cells and ASC can be generated during the first immune response from innate-like B cells as B1 and conventional B (B2) which differ in development, surface marker expression, tissue localization, and function. Peritoneal B1 cells are comprised of two different populations, B1a is CD5^{pos}, long-lived and

responsible for the production of low affinity and polyreactive IgM referred to as natural antibodies. Upon Ag encounter, they quickly migrate to lymphoid organs (e.g., the spleen) to become Ab-producing cells [6].

Numerous changes are associated with ASC differentiation which distinguished then from memory conventional B cells, including the loss of surface IgM, B220, CD19, and MHC class II, the production of secretory IgM, and the upregulation of the specific marker as CD43, CD138 (syndecan-1) and CD93 [7–9]. ASC express adhesion molecules like VLA-4, VLA-5, CD9, CD44 [8–10] and chemokines receptors as CXCR3 and CXCR4 [10–12], which could be involved in homing and selective survival in particular tissues or niches, mainly in the BM followed by spleen and sites of inflammation.

The intrinsic genetic program that drives the differentiation of ASC is becoming clear. ASC differentiation is largely controlled by the transcriptional repressor B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) that neutralizes Pax5- and Bcl6-mediated repression, thus enabling the expression of the plasma cell – specific gene program, in collaboration with other essential regulators such as IFN regulatory factor (IRF) 4 and X-box-binding protein-1

* Corresponding author. Address: Special Laboratory of Applied Toxinology, Butantan Institute, Av. Vital Brazil, 1500, Butantan, 05503-009 São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 3726 1024; fax: +55 11 3676 1392.

E-mail address: carlalima@butantan.gov.br (C. Lima).

(XBP-1) [13]. Extrinsic factors such as IL-5, IL-6, SDF-1 α , TNF α , and a proliferation-inducing ligand (APRIL, also known as TNFSF13) have been associated with the survival of ASC [14,15]. Results from Cassese et al. [16] strongly support the concept that ASC survival depends on niches in which a combination of specific signals, including IL-5, IL-6, stromal cell-derived factor-1 α , TNF- α , and ligand for CD44, provides an environment required to mediate plasma cell longevity. Thus, the understanding of the mechanisms by which ASC are generated and maintained is of fundamental interest to reveal the basis of immunological memory.

The help that T cells provide to B cells allows the production of memory B cells and ASC. The Th17 lineage develops in a pathway independent from Th1 and Th2 differentiation [17,18]. A hallmark of Th17 cells is the production of IL-17a-f, the proinflammatory cytokines. These cytokines bind to multimeric IL-17 receptors comprised of two IL-17RA subunits and one IL-17RC subunit [19]. Work has focused attention on the pathogenic function of the IL-17A in several organ-specific autoimmune and chronic inflammatory diseases as SLE [20] and in particular, IL-17 has been reported as the central cytokine involved in the spontaneous development of germinal center (GC) B cell-derived autoantibodies in autoimmune BXD2 mice [21]. However, the involvement of IL-17A in the ASC differentiation and maintenance is still largely unknown.

Thalassophryne nattereri fish envenomation is commonly reported among fishermen and bathers in the Brazilian North and Northeast coast, estimated at hundreds of accidents per year [22]. Using a mouse model, we have reveal the mechanism of actions of venom and its toxin families, and recently we shown that low doses of *T. nattereri* venom mixed to alum for optimal conditions of T cell activation elicited a strong and sustained (for more than 6 months) active memory response with high levels of specific IgG1 and IgG2a, and total IgE, accompanied by a striking IL-5 production and a decreased B220 expression in splenic B cells [23]. Therefore, this model provides an interesting scenario for studying the signals allowing survival and differentiation of the memory B cells.

Thus in this work, we have used venom proteins of *T. nattereri* Brazilian fish to establish a model in which germinal center derived B cells and high affinity specific antibodies were permanently generated and to study the extrinsic signals required for the generation and maintenance of ASC in several niches (peritoneum, spleen and bone-marrow) as well as the signaling pathways that they engage.

2. Material and methods

2.1. Mice

Male BALB/c mice (5–6 weeks old) were obtained from a colony at the Butantan Institute, São Paulo, Brazil. Animals were housed in a laminar flow holding unit (Gelman Sciences, Sydney, Australia) in autoclaved cages on autoclaved bedding, in an air-conditioned room in a 12 h light/dark cycle. Irradiated food and acidified water were provided *ad libitum*. All procedures involving animals were in accordance with the guidelines provided by the Brazilian College of Animal Experimentation (666/09 and 25/84/02).

2.2. Induction of memory immune response and treatment of mice with neutralizing antibody

T. nattereri fish venom was obtained from fresh captured specimens at the Northeastern coast of Brazil (IBAMA 16221-1) in different months of the year according to Lopes-Ferreira et al. [24]. Endotoxin content was evaluated (resulting in a total dose

<0.8 pg/ml LPS) with QCL-1000 chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay (Bio-Whittaker) according to the manufacturer's instructions. Groups of five mice were immunized with intraperitoneal injections of 10 μ g of *T. nattereri* venom adsorbed in Al(OH)₃ on day 0 and boosted on day 14 with the same dose of venom. Animals injected only with Al(OH)₃ were considered as control mice. All groups of animals (venom or control) were bled and killed at days 21, 28, 48, 74 and 120. In some experiments mice were injected i.v with 5 μ g of neutralizing anti-IL-5 and anti-IL-17A mAbs (R&D Systems Europe Ltd.) or control rat IgG mAb (GL113) 30 min before venom injection at days 0 and 14. Mice were killed at 28 and 74 d after the first immunization. For determination of leukocyte recruitment into peritoneal cavity and T cell analysis mice were immunized on day 0 with 10 μ g of venom adsorbed in alum and boosted on days 14, 20, 47 and 119 with 10 μ g of venom and killed at days 15, 21, 48 and 120 to detection of effector and memory CD4+ T cells.

2.3. Cell isolation

At time points indicated (21, 28, 48, 74, and 120 d) after venom immunization, animals were killed by CO₂ asphyxiation, and peritoneal cells were recovered by peritoneal flushing using 5 ml of ice-cold sterile PBS plus 0.1% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). BM cells were isolated from femur bones and after centrifugation; the supernatant from both cell suspensions was collected for cytokine, chemokine, and FACS analysis. Spleens were removed aseptically and single-cell suspensions were prepared for FACS analysis and *in vitro* re-stimulation. Cells were cultured at 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 25 mM HEPES buffer, and 10% heat-inactivated FCS (all from Life Technologies, Paisley, UK). Cells were cultured with 10 μ g/ml of *T. nattereri* venom for 72 h, and the supernatants from parallel triplicate cultures were stored at -70°C until analysis of cytokine concentrations by ELISA.

2.4. Flow cytometry analysis

For surface staining single-cell suspensions (1×10^6) were treated with 3% mouse serum of naive mice to saturate Fc receptors followed by the staining by fluorescence conjugated Abs: Rat IgG2ak PE-anti-mouse CD5, Goat IgG2bk PE-anti-mouse Ig (specific for IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3), Rat IgG2ak PerCP-Cy5-anti-mouse CD45R/B220, Rat IgG2ak FITC-anti-mouse CD43, Rat IgG2ak PE-anti-mouse CD138, Rat IgG2bk FITC-anti-mouse CD4, Rat IgG2ak Biotin anti-mouse, second antibody goat PE anti-rat, Rat IgG2bk FITC-anti-mouse Ly6C, Goat IgG2bk PE-anti-mouse CD154 (CD40L), Rat IgG2bk PE-anti-mouse Ly6G, Rat IgG2ak FITC-anti-mouse CD117, Rabbit IgG2ak anti-mouse CCR3, goat FITC anti-rabbit for 30 min on ice. Cells were washed three times in PBS 1% BSA. For intracellular staining, cells were stimulated with 20 ng/ml acetate phorbol myristate, 1 μ M ionomycin (Sigma) e Golgi-stop solution (BD Biosciences) for 6 h. Cells were washed, fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and stained with Rat PerCP-Cy5 anti-mouse IL-17A, Rat PerCP-Cy5 anti-mouse IFN- γ , Rat PerCP-Cy5 anti-mouse IL-4 and Rat PerCP-Cy5 anti-mouse IL-5. Cells were washed three times in PBS 1% BSA. Negative controls were used to set the flow cytometer photomultiplier tube voltages, and single-color positive controls were used to adjust instrument compensation settings. Cells were examined for viability by flow cytometry using forward/side scatter characteristics or dead cells were excluded by LIVE/DEAD fixable dead cell stain. Data from stained samples were acquired using a FACSCalibur flow cytometer equipped with CellQuest software

(BD Biosciences) and were analyzed using CellQuest Software (Becton–Dickinson, San Jose, CA).

2.5. Determination of cytokine and chemokine by ELISA

Cytokines and chemokines were measured in supernatant of peritoneal and BM flushing and splenic cell culture by a specific two-site ELISA using antibody pairs purchased from Pharmingen (BD, San Diego, CA, USA). Binding of biotinylated monoclonal antibodies was detected using streptavidin-horseradish peroxidase complex and TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate solution containing hydrogen peroxide. Results are expressed as picograms per milliliter in reference to commercially available standards. Detection limits were 7.8 pg/ml for IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-5, IL-17A, IFN- γ and IL-10; for IL-23 was 39 pg/ml and for chemokine KC was 15.6 pg/ml. The results were expressed as the mean values and standard deviations from five animals.

2.6. Titration of total IgE and specific IgG1 and IgG2a by ELISA

Blood samples were obtained by the puncture of the right ventricle of immunized mice. ELISA for detection of Abs was performed as described [25]. Plasma was tested for IgG1 or IgG2a Abs using venom-coated 96-well plates and biotinylated goat anti-mouse IgG1 or IgG2a antiserum. The reactions were developed with streptavidin-horseradish peroxidase complex (Sigma), O-phenylenediamine (OPD) and H₂O₂ and the plates were read at 490 nm on an automated ELISA reader (Spectramax, Molecular Devices). The results were expressed as the mean \pm SEM absorbance. An IgE-specific ELISA was used to quantitate total IgE Ab levels in plasma using matched Ab pairs (553413 Pharmingen and 1130-08 Southern Biotech.), according to the manufacturer's instructions. Samples were quantified by comparison with a standard curve of IgE (03131D, Pharmingen).

2.7. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA)

For determination of the anaphylactic activity of IgE, PCA reactions were performed in rats using non-inactivated plasma, according to Mota and Wong [26]. After 18 h they were challenged i.v. with 100 μ g of venom +0.25% of Evans blue solution. All tests were made in triplicate and PCA titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution that gave a lesion of >5 mm in diameter. The detection threshold of the technique was established at 1:5 dilutions.

2.8. Determination of peritoneal influx of cells

Groups of five mice were immunized i.p. with 10 μ g of *T. nattereri* venom adsorbed in Al(OH)₃ on day 0 and boosted on day 14 with the same dose of venom. Animals injected only with Al(OH)₃ were considered as control group. At 120 d after the first immunization, animals were killed by CO₂ inhalation and peritoneal cells were obtained by peritoneal flushing with 5 ml of sterile PBS/EDTA 10 mM. For the recovery of cellular contents, lavage fluid was centrifuged at 378g for 10 min and the cell pellet was resuspended in cold PBS/BSA 0.1% for leukocyte cell counts. Using a hemocytometer and cytocentrifuge, slides were prepared, air dried, fixed in methanol, and stained (Wright-Giemsa, Scientific Products, Chicago, IL). For differential cell counts, 300 leukocytes were enumerated and identified as macrophages, neutrophils, eosinophils or mast cells based on staining and morphologic characteristics using a light microscope (Nikon Eclipse E200). Representative photomicrographs of each group were acquired digitally using an Axio Imager A1 microscope (Carl Zeiss, Germany) with an AxioCam ICc1 digital camera (Carl Zeiss, Germany).

2.9. Histology and immunohistochemistry analysis of splenic sections

Spleens from control or venom-mice were collected and fixed (10% buffered formalin). The fragments were then dehydrated, cleared and embedded in paraffin. Serial sagittal sections of the whole spleen were made (3–4 μ m thick), stained with hematoxylin/eosin (H&E) to evaluate general morphology. Immunohistochemistry was performed using mAbs against the membrane Ig (Goat IgG2bk PE-anti-mouse Ig specific for IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 – Southern Biotech) or polyclonal antibodies against *T. nattereri* venom obtained from pre-immunized mice. Endogenous peroxidase was inhibited with 3% H₂O₂ in PBS for 10 min at room temperature. Antibody binding in tissue sections for venom determination was visualized with a biotinylated secondary antibody (goat anti-mouse), streptavidin and biotinylated horseradish peroxidase complex (StreptABCComplex/HPE) and diaminobenzidine (DAB) as chromogen. Sections were counterstained with hematoxylin/eosin. Negative control slides were processed in parallel with each batch of staining or normal serum. All slides were examined with light microscopy (Axio Imager A1, Carl Zeiss, Germany) calibrated with a reference micrometer slide. For each group of five mice, four stained spleen sections from each mouse were analyzed and it was performed three separate experiments.

2.10. Statistical analysis

All values were expressed as mean \pm SEM. Parametric data were evaluated using an analysis of variance, followed by the Bonferroni test. Non-parametric data were assessed using the Mann–Whitney test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Experiments were repeated at least three times.

3. Results

3.1. Venom induces a chronic Th2 antibody response

BALB/c mice with high susceptibility to the development of Th2-type immune response were immunized with proteins of *T. nattereri* venom in the presence of adjuvant. After a venom booster without adjuvant, they were left for a period of at least 7 d and up to 106 d in the absence of further antigenic stimulation for the induction of a chronic response in accordance with McHeyzer-Williams et al. [27] (Fig. 1A). First, we focus our investigation on the analysis of antibody memory response as a way to directly measure the activity of memory B cells, *ex vivo* (Fig. 1B) and the results show a high production of venom-specific IgG1 and IgG2a accompanied by high levels of total and specific IgE antibodies compared with control-mice. Until 74 d we observed an increase in the production of IgG2a that decrease at 120 d. In contrast, the levels of IgG1, total as well as specific IgE dramatically increase at 120 d compared with 21–74 d. These results indicate that the chronic interaction of venom proteins with host promotes a shift from Th1 for Th2 in the late phase of antibody responses.

Besides the ability to produce specific antibodies, another aspect that is discussed on the formation of immunological memory is the change in the spleen architecture, a lymphoid organ considered a center of lymphocyte proliferation and high-affinity antibody production. Here we observed that spleens of venom-mice appeared enlarged in size, and splenomegaly was accompanied by an increased number of splenocytes (Fig. 1C). We observed that typical B cells areas in lymphoid follicles of control-mice (Fig. 1D) were modified in spleen of venom-mice with chronic immune response at 120 d, showing an increased expansion of GC, largest and most populous than in control-mice (Fig. 1E). In addition, a significant enhancement of Ig^{pos} B cells was seen in the regions of GC

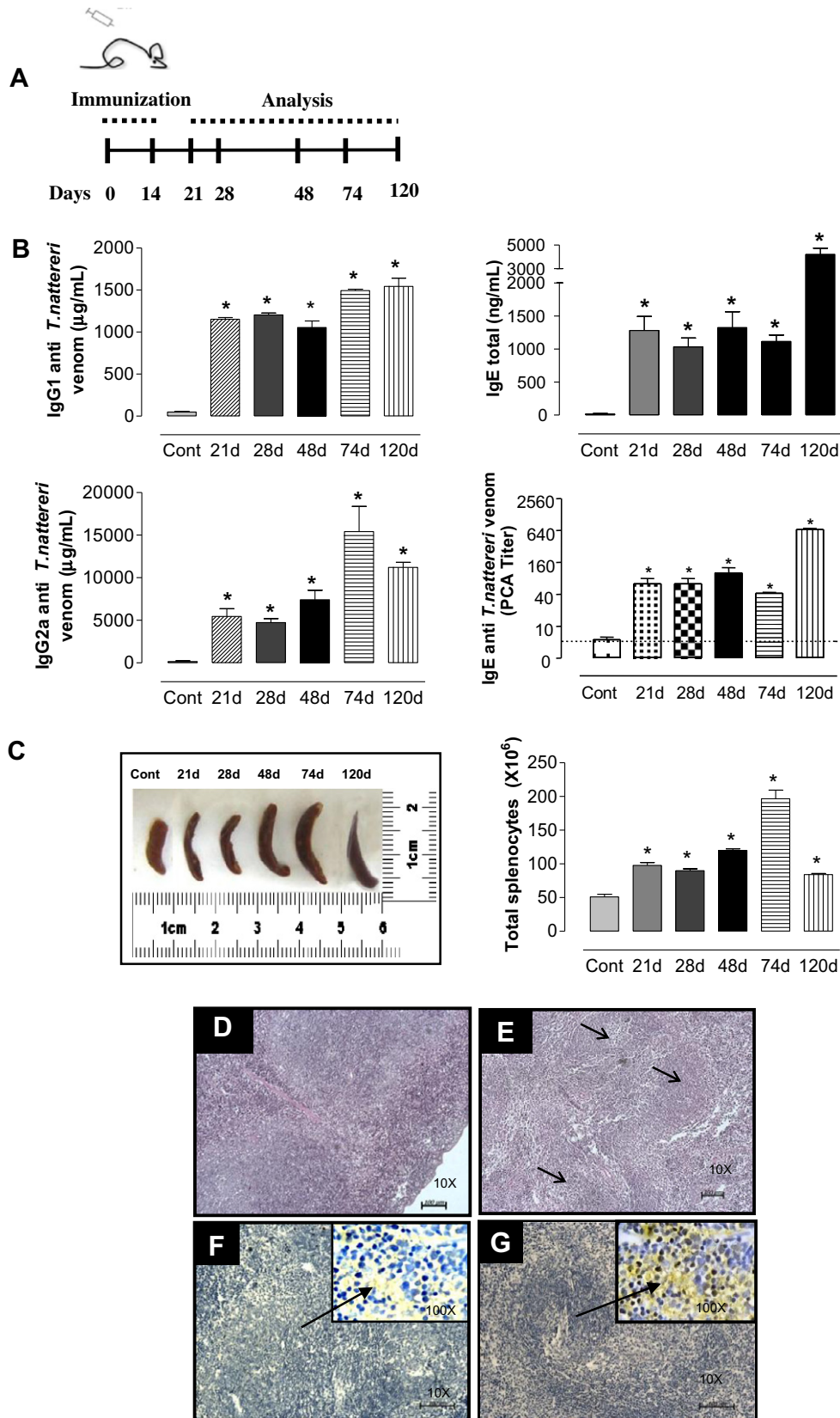


Fig. 1. Venom induces a chronic Th2 antibody response. BALB/c mice ($n = 5$) were immunized i.p. with 10 µg of *T. nattereri* venom adsorbed in $Al(OH)_3$ on day 0 and boosted on day 14 with the same dose of venom alone. Animals injected only with $Al(OH)_3$ were considered as control group. Mice were bled and killed at days 21, 28, 48, 74 and 120 (A). Plasma was tested for IgG1 or IgG2a antibodies using venom-coated 96-well plates and biotinylated goat anti-mouse IgG1 or IgG2a antiserum. Total IgE and venom-specific IgE were determined by sandwich ELISA or PCA, respectively (B). Spleens appeared enlarged in size and the splenomegaly was accompanied by an increased number of splenocytes (C). Typical B cell areas in lymphoid follicles were modified in venom-mice with chronic immune response (E, 120 d), showing an increased expansion of germinal centers, largest and most populous than control-mice (D). A significant enhancement of positive Ig B cells (Ig^{pos}) was seen in the regions of germinal center of venom-mice (G) compared with control-mice (F). Scale bar, 100 µm. Mean \pm SD of three independent experiments is shown. * $p < 0.05$ compared to control-mice.

of these venom-mice until 120 d (Fig. 1G) as compared to regions of the GC of control-mice (Fig. 1F).

Together these results show that the protein mixture of the venom of *T. nattereri* induced a chronic humoral immune response with a predominant production of IgG2a antibodies that decline after 74 d privileging the production of IgE antibodies. The venom induced the development of splenic hyperplasia with GC formation and proliferation of positive Ig B lymphocytes.

3.2. Bone marrow maintenance of B1a cells induced by venom

Although B1 cells are classified as B cells responding to T cell-independent Ags, adaptive response and T cells can influence many aspects of B1 cell activation and differentiation [28–30]. Next, we analyzed B1a cells (B220/CD45R^{low}CD5^{pos}) using antibodies against B220 (anti-B cell isoform of CD45R) and CD5 in a negative CD4 cells gate. The results present in Fig. 2 show that there was an expansion of peritoneal B1a cells between 28 and 48 d (2.46% and 3.05%, respectively – Fig. 2A) that returned to control levels after 74 d. An elevated number of these cells were seen in spleen at 21, 28 and 74 d (9.72%, 8.48% and 5.45%, respectively – Fig. 2B); we can observe an almost disappearance of B1a cells in spleen at 48 d and 120 d. Although few B1a cells were observed in BM of venom-mice compared with control-mice, this environment sustained the chronic maintenance of B1a cells until 120 d (Fig. 2C).

Thus, these results demonstrate that venom induced the emergence of B1a in the BM and spleen, followed by the mobilization into the peritoneal cavity and retention in the BM.

3.3. Venom antigens promote the final differentiation of ASC in inflamed tissue

The cellular differentiation of B memory cells into ASC has not been completely elucidated, but a hierarchical model of differentiation has been proposed: activated B cells progressively acquire increasing levels of CD138 and decreasing levels of CD45R/B220 to finally arrive at B220^{neg}CD43^{high} ASC phenotype, which are either CD138^{int} or CD138^{high} [9,31]. CD43 (leukosialin or sialophorin) is a cell surface sialoglycoprotein implicated in cell adhesion and proliferation whose tightly regulated expression in B lymphocytes is likely important for their normal development and/or function [10].

In Fig. 3A we observed that the expression of B220 and CD43 divides this population into four subsets that persist at different levels into all compartments. In peritoneal cavity venom induced the formation of B220^{high}CD43^{high}, B220^{high}CD43^{low}, and B220^{neg}CD43^{high}. In spleen: B220^{high}CD43^{high}, B220^{low}CD43^{high}, and B220^{neg}CD43^{high}; and finally in the BM: B220^{high}CD43^{high}, B220^{high}CD43^{low}, and B220^{neg}CD43^{high}.

In Fig. 3B, analyzing the expression of syndecan-1 – CD138 (histogram) in gated cells of the four subsets we show that venom induced into the peritoneal cavity until 120 d the differentiation and maintenance of B220^{high}CD43^{high}CD138^{pos}, B220^{high}CD43^{low}CD138^{pos}, and a bigger percentage of B220^{neg}CD43^{high}CD138^{pos}. Also, B220^{high}CD43^{high}CD138^{pos} positive cells were observed at 21 d; B220^{high}CD43^{low}CD138^{pos} positive cells were detected at 21 d and 48 d; and B220^{neg}CD43^{high}CD138^{pos} were detected at 21 d and 74 d.

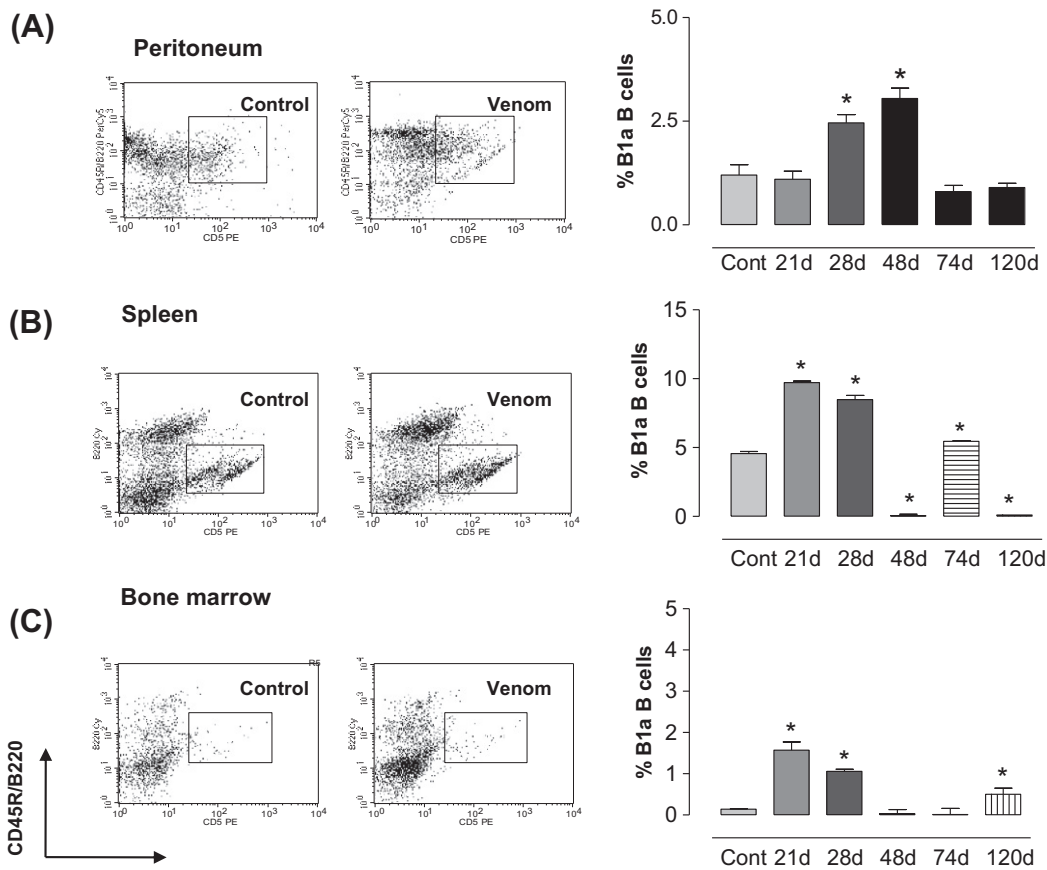


Fig. 2. Accumulation of B1a cells subset. Determination of B1a by flow cytometry using B220 co-staining with CD5 in total cells of peritoneal cavity (A), spleen (B) and BM (C) from immunized or control mice at various time points after immunization. Percentages of cells indicate for each bar represent the mean ± SEM value from determinations from pooled compartments each from five individual mice and three independent experiments. *p < 0.05 compared to control-mice.

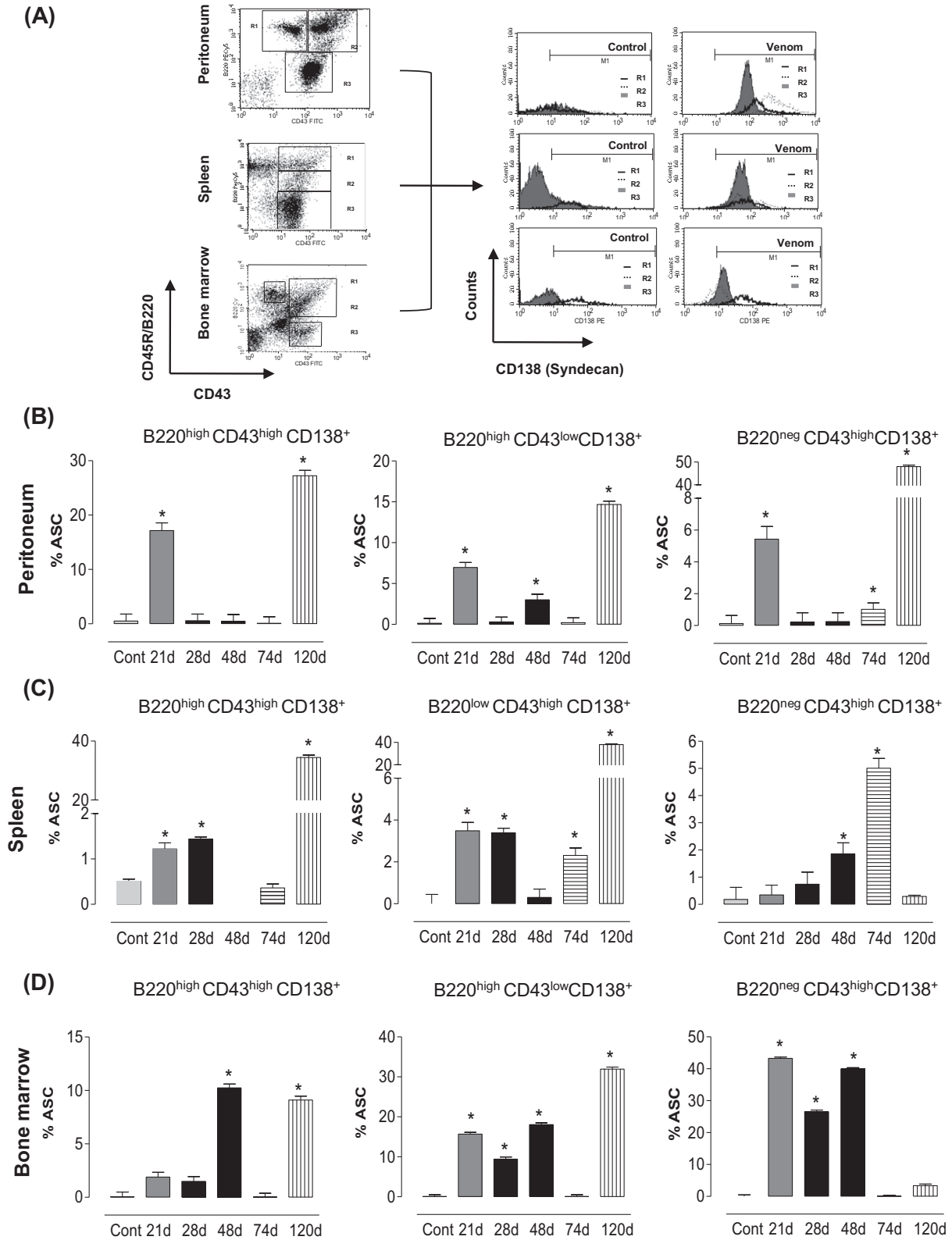


Fig. 3. Venom promotes the differentiation of ASC subtypes. The expression of B220 and CD43 divides the ASC population into 4 subsets that persist at different levels into all compartments. In peritoneal cavity (Fig. 3A) venom induced the formation of B220^{high}CD43^{high}, B220^{high}CD43^{low}, and B220^{neg}CD43^{high}. In spleen (Fig. 3B): B220^{high}CD43^{high}, B220^{low}CD43^{high}, and B220^{neg}CD43^{high}; and finally in the BM (Fig. 3C): B220^{high}CD43^{high}, B220^{high}CD43^{low}, and B220^{neg}CD43^{high}. Representative expression of high levels of CD138 in gated cells from population of peritoneal cavity (D), spleen (E) and BM (F) were determined. Mean ± SEM of three independent experiments is shown. *p < 0.05 compared to control-mice.

In spleen, B220^{high}CD43^{high}CD138^{pos} and B220^{low}CD43^{high}CD138^{pos} appeared at 21 d until 28 d and were maintained in chronic

phase of venom response (120 d), but B220^{neg}CD43^{high}CD138^{pos} were only detected at 48 d and 74 d after immunization (Fig. 3C).

In the BM (Fig. 3D) B220^{high}CD43^{high}CD138^{pos} and B220^{high}CD43^{low}CD138^{pos} were maintained in chronic phase of venom response (120 d), but B220^{neg}CD43^{high}CD138^{pos} were only observed until 48 d.

Together, these results show that: (1) all compartments were constituted by B220^{high}CD43^{high} and B220^{neg}CD43^{high}, but the subpopulations B220^{high}CD43^{low} and B220^{low}CD43^{high} were only observed in peritoneal cavity, and spleen, respectively; (2) in the late phase (120 d) of chronic venom-response the largest pool of ASC into the peritoneal cavity consist of B220^{neg}CD43^{high} phenotype; the largest pool of ASC into spleen was constituted by B220 positive cells (B220^{high} and B220^{low}), whereas the largest pool of ASC into in the BM was constituted by the B220^{high}CD43^{low} phenotype; (3) and finally, terminally differentiated cells (B220^{neg}CD43^{high}) were only maintained in the inflamed peritoneal cavity in late phase of chronic immune response induced by venom (120 d).

3.4. Inflammatory as well T-derived cytokines are responsible for ASC maintenance

A current concept of ASC homeostasis suggests that survival of individual cells depends on specific signals like cytokines produced in a limited number of ecological niches and, most of them present in the BM, but also in inflamed tissues. The active mediators induced by the venom until 120 d in the peritoneal cavity were KC (Fig. 4A) and IL-5 (Fig. 4E), and produced by splenic cells were TNF- α (Fig. 5C), IL-6 (Fig. 5D), IL-5 (Fig. 5E), IL-17A (Fig. 5F), and IFN- γ (Fig. 5H). In the BM, only IL-23 was produced at 120 d (Fig. 6H).

Also, it was observed in peritoneal cavity the production of IL-1 β until 48 d (Fig. 4B), and TNF- α , until 28 d (Fig. 4C); the production of IL-17A was observed only at days 48 and 74 (Fig. 4F); and the production of IFN- γ in this compartment was only observed at 21 d (Fig. 4H). Splenic cells produced KC only at 28 d (Fig. 5A); IL-1 β was produced until 48 d (Fig. 5B); and IL-10 until 74 d (Fig. 5G). Finally, in the BM venom induced the production of KC until 28 d (Fig. 6A); IL-1 β (Fig. 6B) and TNF- α (Fig. 6C) until 48 d; IL-5 was induced until 74 d (Fig. 6E), and IL-17A and IL-10 were detected only at 48 d (Fig. 6G).

Together the results from Figs. 3 and 4–6 suggest that the combination of described positive regulators as KC, IL-5, and TNF- α , and also IL-17A and IL-23 with negative regulators as IFN- γ and IL-10 could regulate the differentiation and the movement of cells into and across the compartments analyzed. Also, the maintenance of terminally differentiated cells (B220^{neg}CD43^{high}) only in the inflamed peritoneal cavity in late phase of chronic immune response induced by venom could be related with the persistent production of time KC, IL-5, TNF- α , IL-6, and IL-17A and IL-23.

Next we hypothesized that the resultant high level of peritoneal KC and IL-5, and possibly systemic IL-6, TNF- α , and IL-17A could contribute to leukocyte production and mobilization in the BM and high peripheral cell numbers in venom-mice. We confirm this hypothesis with the demonstration that chronic humoral immune response induced by *T. nattereri* venom is accompanied by a persistent inflammatory reaction in the peritoneal cavity compared with control animals (Fig. 7A). At 21 d an influx of neutrophils and an exuberant influx of eosinophils to the peritoneal cavity of venom-mice were observed. At 48 d, venom induced an increase in the number of neutrophils and a decrease in the number of eosinophils recruited, but induced the influx of macrophages. The late phase of memory response (120 d) induced by venom was characterized by a persistent Th2-mediated inflammation, with the influx of eosinophils, and mainly mast cells and neutrophils. At 120 d, control animals show no inflammatory cells in the peritoneal cavity.

The most popular and well characterized hypothesis of long-term antibody production is that memory B cells are stimulated by persisting antigen that is retained in the form of antigen–antibody complexes on the surface of follicular dendritic cells – fDC [32]. We next asked whether splenic cells of immunized mice retained venom antigens. For this, we used specific serum produced by previously venom-immunized mice according to Piran-Soares et al. [33]. Immunohistochemistry analysis indicated that venom proteins were detected in the clear zone of GC at days 21–48 (Fig. 7C–E) compared with control-mice (Fig. 7B). At 74 d (Fig. 7F) and 120 d (Fig. 7G) after immunization, few amounts of venom were seen retained by splenic cells, indicative of residual antigen elimination from the cellular environment.

Taken together, these results demonstrate that the persistence of venom antigens retained in fDCs of the spleen and the active inflammation in peritoneal cavity generated the chronic production of extrinsic factors capable to support the differentiation and survival of ASC.

3.5. Peritoneum provides survival signals to sustain ASC differentiation

The idea that CD4 memory T cells (CD44^{hi}CD62L^{neg}) can provide accelerated help for antibody responses is well established. To define the location of antigen-specific memory CD4+ T cells generated in a chronic response induced by venom, we have analyzed memory CD4+ T cells expressing Ly6C and CD40L markers. Our results in Fig. 8A show that the venom induced a formation of memory CD4+ CD44+ T cells expressing high levels of both Ly6C (top panel) and CD40L (bottom panel) in peritoneal cavity until 120 d. In spleen persistent formation of CD4+ CD44+ T cells expressing Ly6C was also observed until 49 d. In this compartment, CD4+ CD44+ T cells expressing CD40L were also seen in an early period after immunization (15 d). Finally, in BM, only CD4+ CD44+ T cells expressing high levels of Ly6C were detected at 49 d and 120 d. Together, these results show that the late phase of chronic response (120 d) induced by the venom is characterized by the presence of memory CD4+ CD44+ T cells expressing high levels of both Ly6C and CD40L in inflamed tissue and memory CD4+ CD44+ T cells expressing Ly6C in the BM.

In Fig. 8B we confirm the activation status of memory CD4 T cells by the demonstration of the intracellular content of cytokines 14 d after immunization. In peritoneal cavity an elevated development of IL-17A-, IL-5-, IL-4-, and IFN- γ -producing CD4+ CD44+ memory T cells were observed compared to control-mice (an increase of 3.3-fold, 3.02-fold, 2.86-fold, and 3.28-fold, respectively). Also, in spleen venom induced the development of IL-5-producing CD4+ CD44+ T cells 1.68-fold compared to control-mice, and IL-4- and IL-5-producing CD4+ CD44+ T cells in BM (1.64-fold and 1.5-fold, respectively). This result identifies memory CD4+ CD44+ T cells clones as a source of critical cytokines involved in Th2 shift during the late phase of venom memory response.

Together, our results suggest that venom induced a Th2-mediated inflammation in inflamed tissue with infiltration of eosinophils, mast cells, neutrophils, and CD4+ CD44+ CD40L+ Ly6C+ effector memory T cells. In addition, these results confirm the participation of memory CD4 T cells in the sustained production of survival factors as IL-5 in all compartments and IL-17A only in inflamed peritoneal cavity.

3.6. IL-5 and IL-17A cytokines positively regulate the production of specific-IgE

We show that the resultant high level of peritoneal KC and IL-5, and possibly systemic IL-5, IL-6, TNF- α , and IL-17A and bone-marrow production of IL-23 could contribute to regulation of ASC differentiation and maintenance. ASC survival is largely controlled

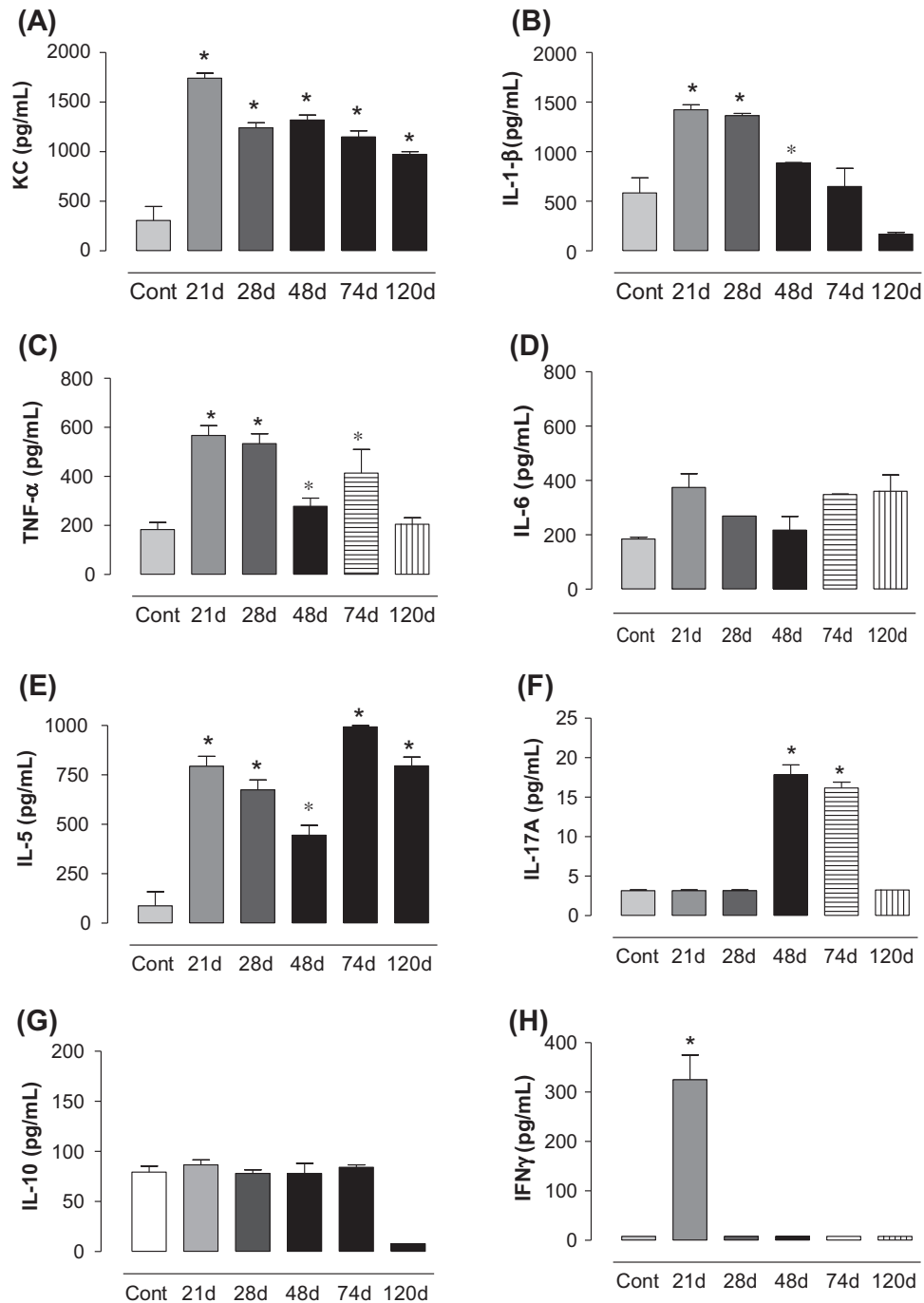


Fig. 4. Inflammatory mediators as well T-derived cytokines produced by peritoneal cavity cells. The levels of KC (A), IL-1 β (B), TNF- α (C), IL-6 (D), and IL-5 (E), IL-17A (F), IL-10 (G) and IFN- γ (H) were determined by ELISA in the supernatant of peritoneal cavity of mice. * $p < 0.05$ compared to control-mice.

by extrinsic factors such as interleukin IL-5, IL-6, SDF-1 α , and TNF α [16], but the direct or indirect influence of IL-5 and IL-17A in the *in vivo* differentiation or maintenance of ASC is not known.

Next, we examined the ability of neutralizing mAbs against both cytokines to modulate specific Ab responses generated by *T. nattereri* venom (Fig. 9A). Mice treated with anti-IL-5 or anti-IL-17A produced at 28 d after immunization diminished levels of specific-IgG1 and undetectable amounts of specific-IgG2a compared with mice injected with venom plus isotype control. However, 74 d after immunization, IgG1 and IgG2a antibody levels were equally high in anti-IL-17A treated-mice, and elevated levels of IgG2a were observed in anti-IL-5 treated-mice, but in contrast a

diminished level of specific-IgG1 was observed in these mice (Fig. 9B). These results show that the production of specific-IgG1 response against venom is controlled only by IL-5. We show that the elevated total IgE levels observed in venom-mice were abolished after anti-IL-5 treatment at 28 d, but not after anti-IL-17A neutralization. Both treatments did not affect total IgE production in later period (74 d) and moreover, the absence of both cytokines virtually abolished the production of specific-IgE antibodies (Fig. 9B), suggesting that IL-5 and IL-17A is crucial for the maintaining of specific-IgE secreting cell functions.

Overall, these results suggest that IL-5 and IL-17A regulate the production of specific-IgE, without modifying the production of

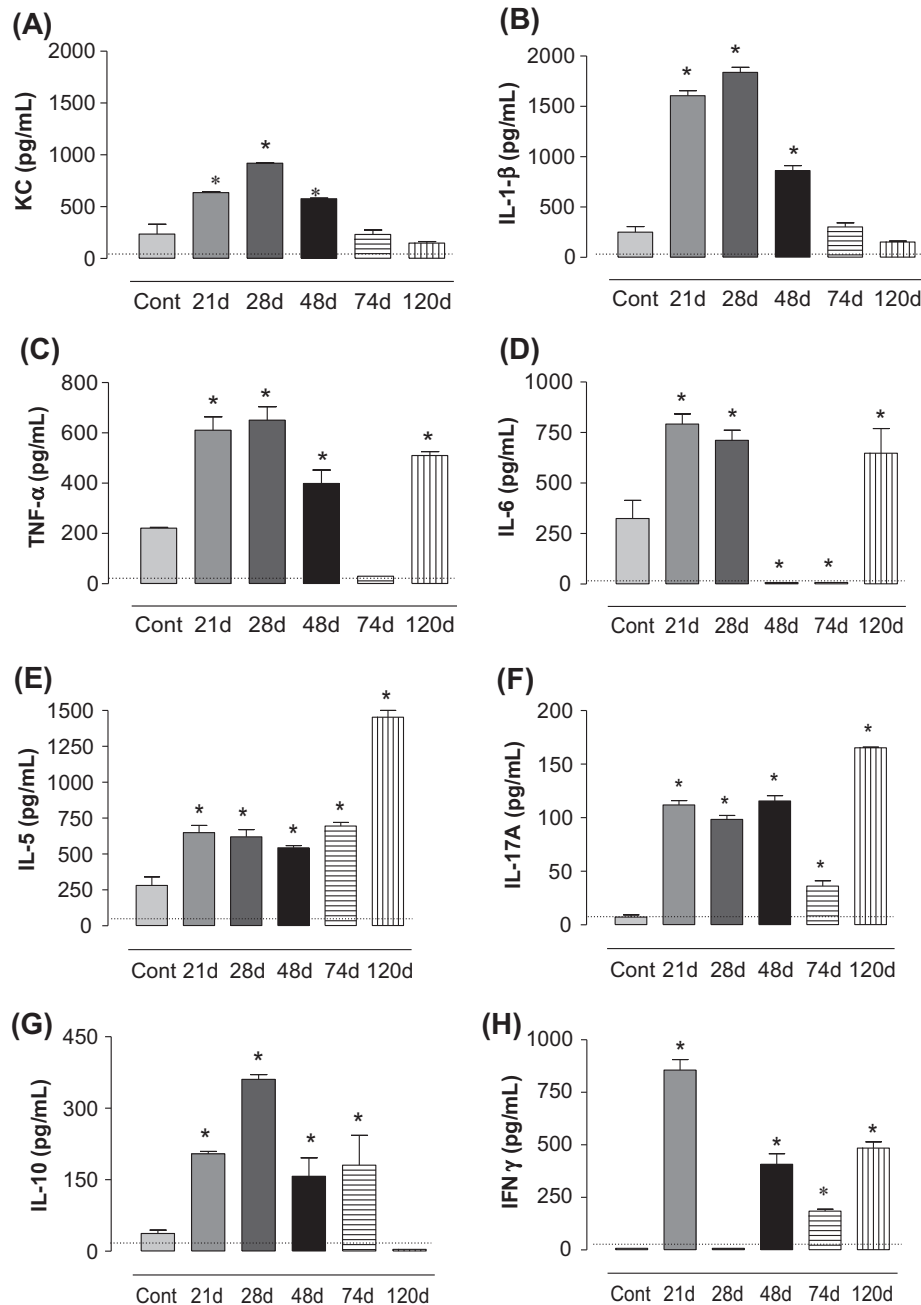


Fig. 5. Mediators produced by splenic cells. The levels of KC (A), IL-1 β (B), TNF- α (C), IL-6 (D), and IL-5 (E), IL-17A (F), IL-10 (G) and IFN- γ (H) were determined by ELISA in the supernatant of *in vitro* re-stimulated splenic cells. * $p < 0.05$ compared to control-mice.

specific-IgG2a or the total production of IgE. Also, IL-5 seems to be important for the chronic production of IgG1.

Nevertheless the treatment with neutralizing antibodies was not able to reverse the splenomegaly (Fig. 9C) or the GC formation (Fig. 9D), the absence of these cytokines during the immunization period of time induced a decrease in total number of splenocytes in 74 d compared with both animals injected only with venom or with venom plus control antibody GL113 (Fig. 9C). In addition, the blockade of IL-17A impairs partially the increase of Ig^{pos} B cells induced by the venom (lower panel, Fig. 9E).

Thus, although IL-5 and IL-17A regulate the synthesis of IgE antibodies, both cytokines do not modify the splenic hyperplasia or the formations of GC provoked by the venom; and also positively regulate the proliferation of splenocytes.

3.7. IL-5 and IL-17A regulate the maintenance of B1a in spleen

In the Fig. 10A, we observed that the treatment of venom-mice with blocking antibodies induced an expansion in the number of B1a in the peritoneal cavity and in the BM at days 28 and 74, suggesting a negative regulation of both cytokines in peripheral compartments as inflamed peritoneal cavity and BM. But in contrast, the splenic B1a population induced by the venom decreased dramatically after both treatments, suggesting a positive regulation of both cytokines in B1a in a secondary lymphoid organ as spleen.

Thus, IL-5 and IL-17A negatively regulate the expansion of B1a in the peritoneal cavity and in BM, and in contrast, they control the differentiation of these cells in spleen.

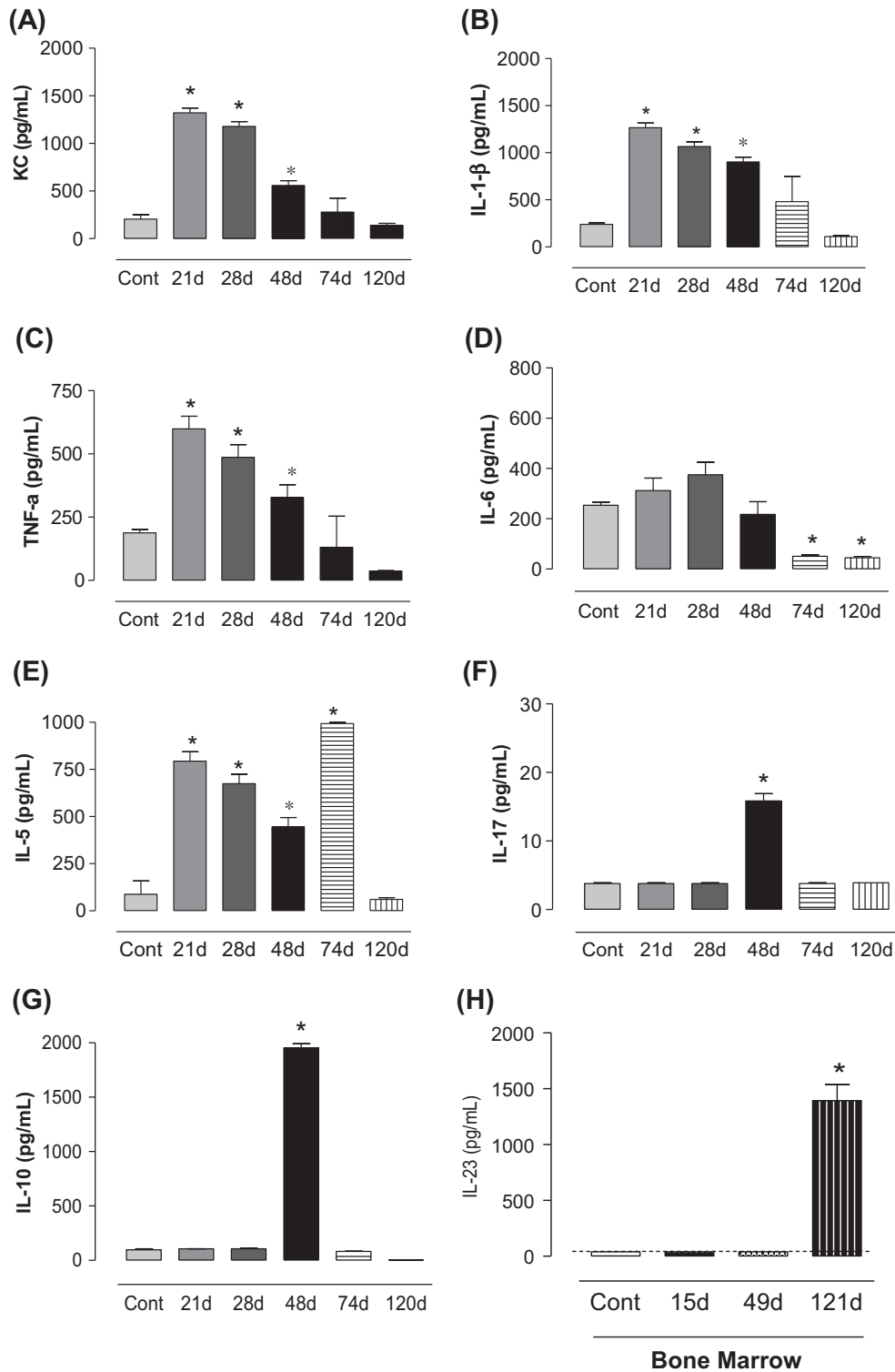


Fig. 6. Mediator produced by bone marrow cells. The levels of KC (A), IL-1 β (B), TNF- α (C), IL-6 (D), and IL-5 (E), IL-17A (F), IL-10 (G) and IL-23 (H) were determined by ELISA in supernatant of BM cells. * $p < 0.05$ compared to control-mice.

3.8. IL-17A positively regulates the generation of terminally differentiated ASC B220^{neg} in inflamed tissue

The selection of allergen-specific B cells into ASC compartment is a critical step in the immune deregulation that leads to the production of IgE in allergic diseases [34]. We show that IL-5 and IL-17A positively control the production of specific IgE in venom-mice.

Next we examined the ability of neutralizing mAbs against both cytokines to modulate the differentiation of ASC (Fig. 10B). We also show that the treatment of venom-immunized mice with both blocking antibodies resulted in almost complete depletion of ASC with the phenotype B220^{neg}CD43^{high} in peritoneal cavity at 74 d. Also, both treatments promoted augmented percentage of ASC with B220^{high}CD43^{high} phenotype. The normal percentage of the

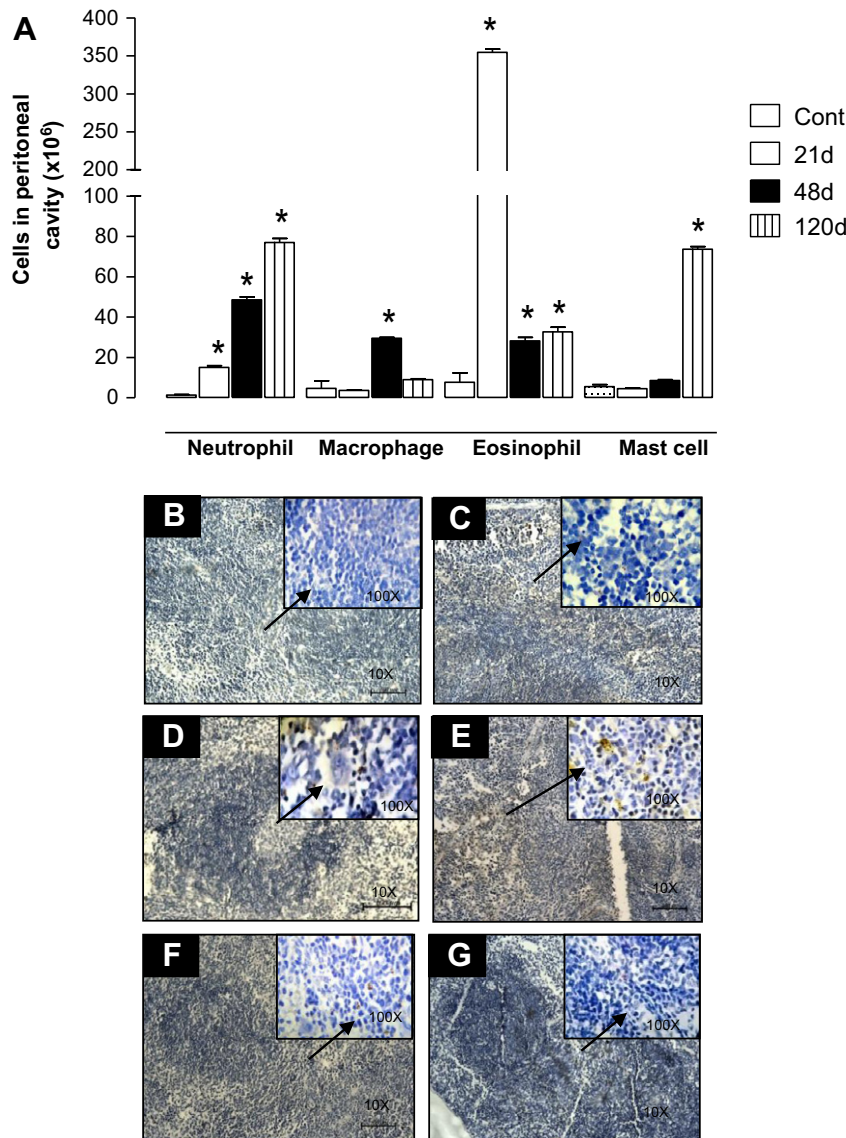


Fig. 7. Chronic humoral immune response induced by *T. nattereri* venom is accompanied by a persistent inflammatory reaction in the peritoneal cavity. The late phase of memory response (120 d) induced by venom was characterized by Th2-mediated inflammation, with the influx of eosinophils, and mainly mast cells and neutrophils. Control animals show no inflammatory cells in the peritoneal cavity (A). Immunohistochemistry analysis indicated that venom could be detectable in the clear zone of germinal center at 21 d until 48 d (C–E) compared with control-mice (B). Few amounts of venom were seen retained by splenic cells at 74 d (F) and 120 d (G) after immunization. * $p < 0.05$ compared to control-mice.

subpopulation B220^{high}CD43^{low} was not modified by neutralizing antibodies.

In the spleen, both blocking neutralizing antibodies promoted a higher percentage of ASC B220^{high}CD43^{high} (28 and 74 d) and B220^{low}CD43^{high} (74 d), however, they reduced the percentage of ASC with B220^{low}CD43^{high} phenotype at 28 d and B220^{neg}CD43^{high} phenotype at 74 d.

Concerning to ASC in the BM, treatment with both anti-IL-5 and anti-IL-17A mAbs promoted an increase in ASC B220^{high}CD43^{high} at 28 d, and in contrast, treatment with both blocking antibodies resulted in almost complete depletion of ASC with the phenotype B220^{neg}CD43^{high} in BM at this time. Furthermore, anti-IL-5 mAbs treatment induced at days 28 and 74 d an increased percentage of ASC B220^{high}CD43^{low}. These experiments indicate that IL-5 and IL-17A signals are sufficient for the generation of ASC with the B220^{neg} phenotype, controlling negatively the rate of survival of ASC with high B220 expression.

Thus, IL-5 and IL-17A are sufficient for the generation of ASC B220^{neg} in the peritoneal cavity and negatively regulates the number of ASC B220^{pos}, confirming that the hierarchical process of ASC differentiation triggered by venom needs the signal derived from IL-5 and IL-17A.

4. Discussion

The aim of this study was to investigate the impact of IL-5 and IL-17A on the development and maintenance of subtype of memory B cells in chronic humoral Th2 immune response. To this end, we used chronic immunized mice with *T. nattereri* venom proteins that were left for a period of 120 d in the absence of further antigenic stimulation. In order to distinguish the differential subtypes of memory B cells, the expression of B220 and CD43 markers was evaluated in these cells in several niches (peritoneum, spleen

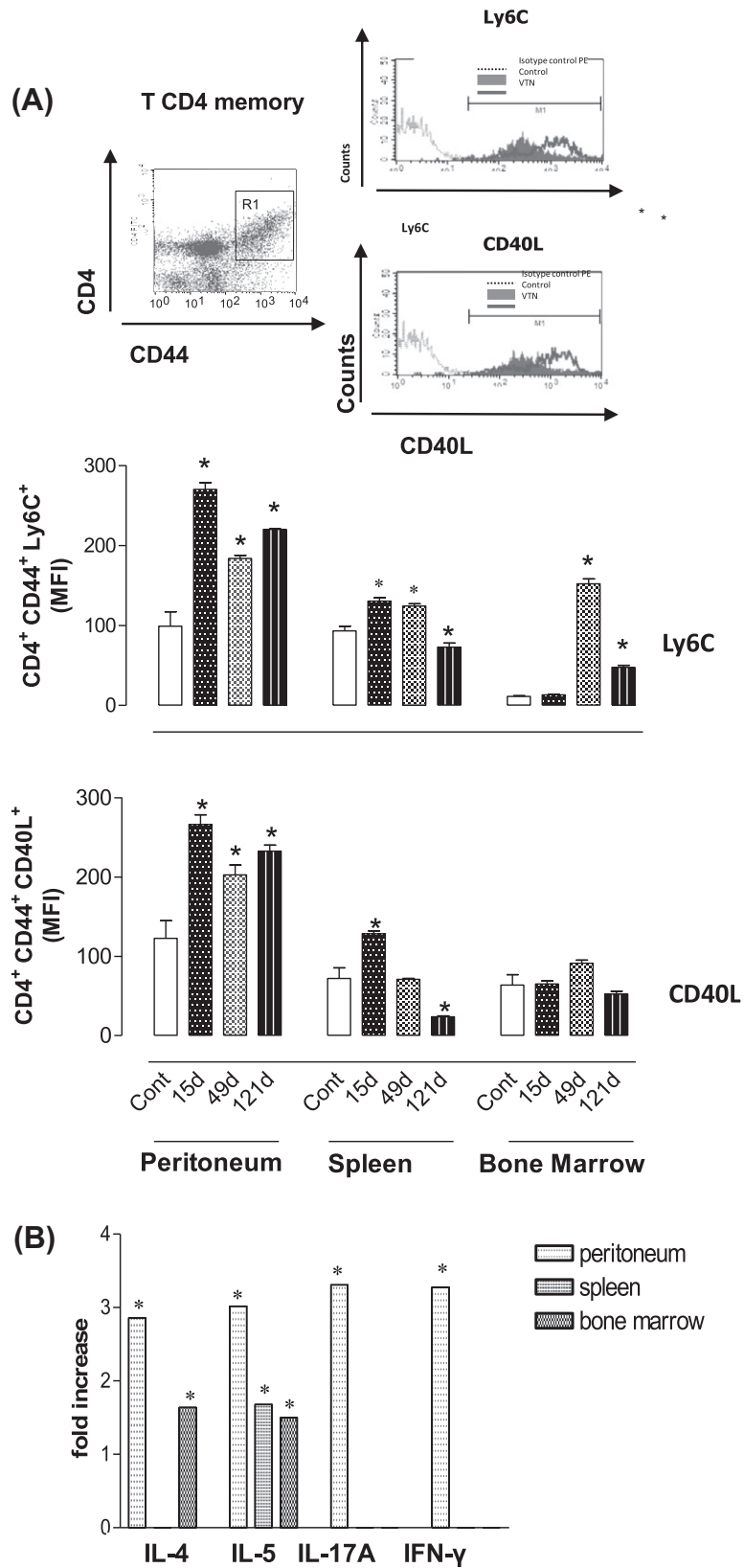


Fig. 8. Memory CD4 T cells were induced in response to *T. nattereri* venom. Representative dot plots showing 3-color staining for memory T cell identification: gated double positive CD4⁺CD44^{high} cells were identified by the co-expression of Ly6C (Fig. 8A, top) or CD40L (Fig. 8A, bottom) in total of peritoneal cavity, spleen and BM from immunized or control-mice at various time point after challenge. MFI were obtained via flow cytometry and each bar represents the mean ± SEM value from determinations from pooled compartments each from five individual mice and three independent experiments. (B) In peritoneal cavity, spleen and BM of immunized or control-mice at 15 d, CD4⁺CD44^{high} T cells were analyzed for intracellular cytokines content using mAbs against IL-4, IL-5, IL-17A, and IFN-γ. The production of memory T cell-derived cytokines was calculated as fold increase induced by venom over the control group. **p* < 0.05 compared to control mice.

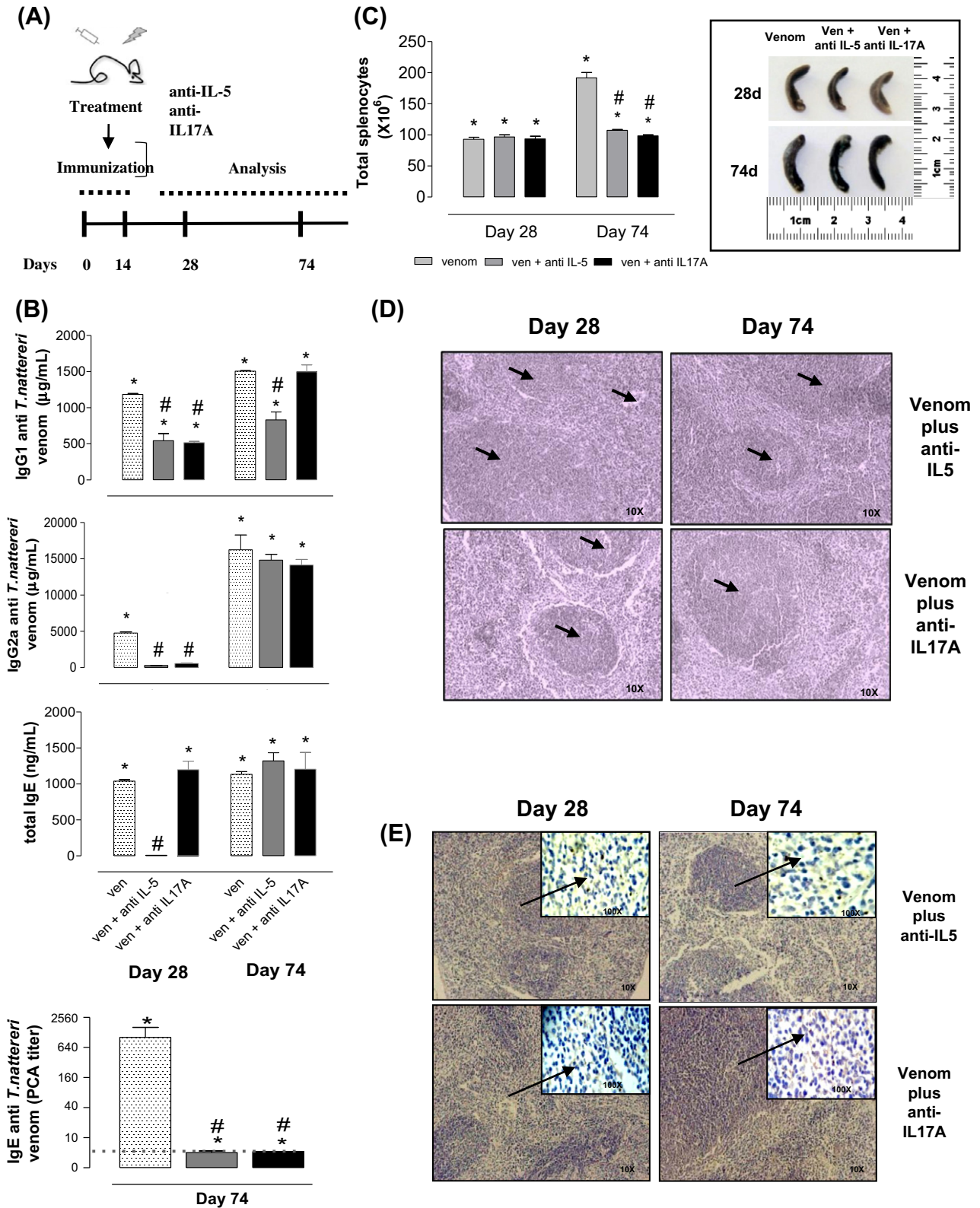


Fig. 9. IL-5 and IL-17A cytokines positively regulate the production of specific-IgE. BALB/c mice were injected with neutralizing anti-IL-5 or anti-IL-17A mAbs or matched isotype control 30 min before venom injection at days 0 and 14 (A). Plasma samples and spleen were isolated at 28 and 74 d after immunization. The isotypes of venom-specific IgG and total or specific IgE present in the plasma of treated animals were determined by ELISA or PCA, respectively (B). The treatment with neutralizing antibodies was not able to reverse the splenomegaly (C) or the germinal centers formation (D), but decreased the total number of splenocytes in 74 d compared with both animals injected only with venom or with venom plus control antibody GL113 (C). The blockade of IL-17A impairs partially the increase of Ig^{pos} B cells induced by the venom (bottom, E). **p* < 0.05 compared to control-mice, # *p* < 0.05 compared to untreated venom-mice.

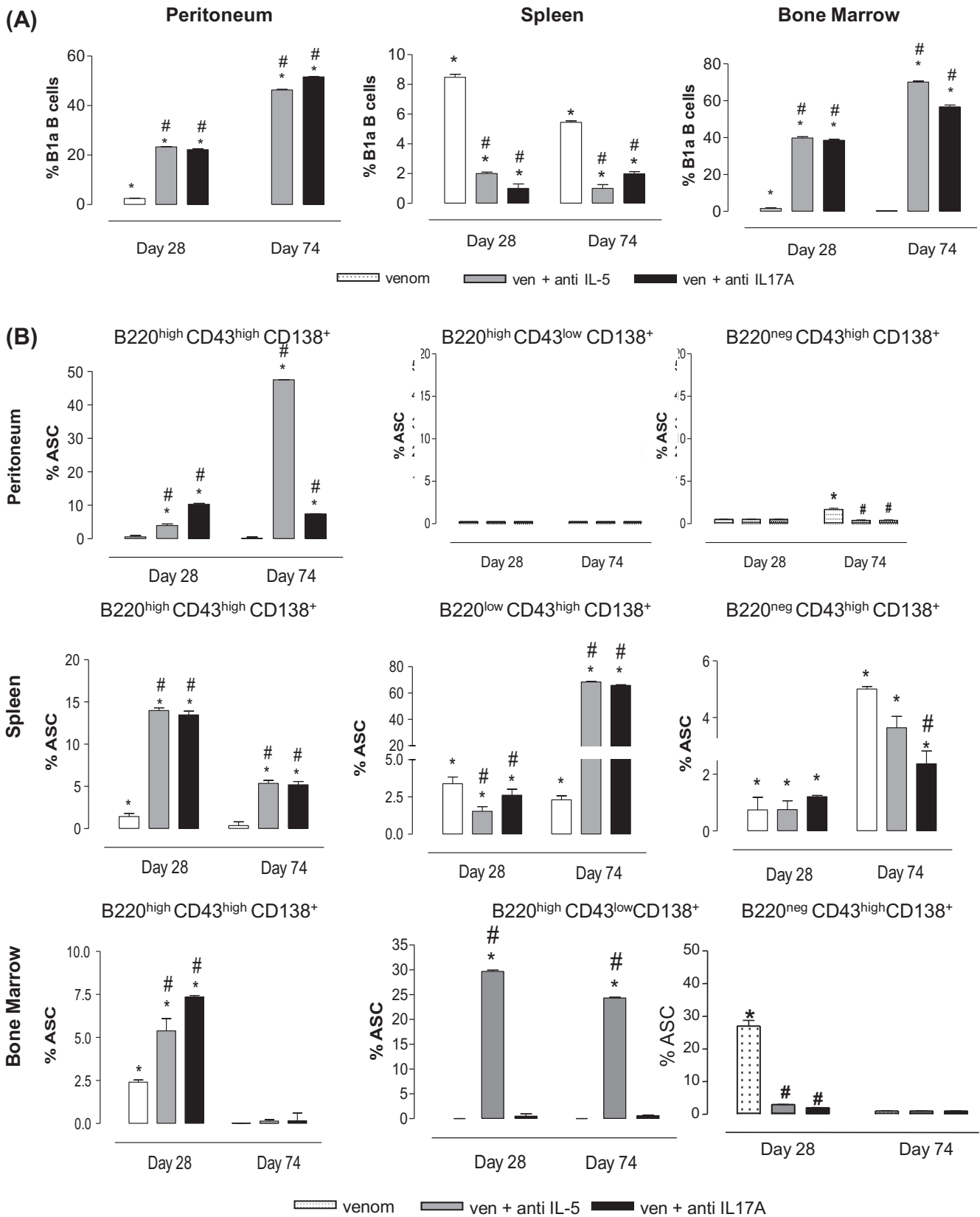


Fig. 10. IL-5 and IL-17A positively regulate the maintenance of terminally differentiated ASC B220^{neg} in inflamed tissue. Mice were injected with neutralizing anti-IL-5, anti-IL-17A or GL113 control mAbs 30 min before venom injection at days 0 and 14. Modulation of B1a cells by neutralizing antibodies treatment (A). Treatment with both blocking mAbs resulted in almost complete depletion of ASC with the phenotype B220^{neg} in peritoneal cavity and negatively regulated the differentiation of ASC with the phenotype B220^{pos} in all compartments (B). * *p* < 0.05 compared to control-mice, # *p* < 0.05 compared to untreated venom-mice.

and BM); and extrinsic survival factors as cytokines produced by CD4 memory T cells and venom depot were also determined. Finally, venom-immunized mice were treated before the immunization processes with anti-IL-5- and anti-IL17A neutralizing antibodies and the Abs production and differentiation of the subtypes of ASC were investigated.

Two key transcriptional regulators, Blimp-1 and XBP-1, have been shown to be necessary for the terminal differentiation of B cells into long-lived antibody-secreting cells [6]. Little is known about signals that induce Blimp-1 and XBP-1 although it has been shown that the expression of Blimp-1 is induced by IL-5 [35]. IL-5 specifically binds to IL-5R α and induces the recruitment of β c to IL-5R, and at least three different signaling pathways including JAK2/STAT5 pathway, Btk pathway, and Ras/ERK pathway are activated. IL-5 critically regulates homeostatic proliferation and survival of B1 cells and the natural antibody production by these cells, and enhances the AID and Blimp-1 expression in activated B2 cells leading to induce μ to γ 1 class switch recombination and terminal differentiation to IgM- and IgG1-secreting plasma cells, respectively [36].

Since the demonstration the role of IL-23 in autoimmunity, it was discovered that Th17 subset has been linked to the pathogenesis of many inflammatory diseases, including arthritis, experimental autoimmune encephalitis, inflammatory bowel disease and airway inflammation [20,37,38]. The differentiation of this subtype of Th cell is dependent on IL-6–STAT3 activation of the transcriptional regulator retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t (ROR γ t); and these cells produce IL-17A, IL-17F, IL-21 and IL-22 and are highly responsive to IL-1 receptor 1 (IL-1R1) and IL-23R signaling [17,39]. IL-17 has been reported as the central cytokine involved in the spontaneous development of germinal center B cell-derived autoantibodies in autoimmune BXD2 mice; and promotes the prolonged retention of murine B cells in the GC [21].

Nevertheless such data established a link between IL-5 and IL-17 and B cells, the direct or indirect influence of IL-17 as well as IL-5 in the *in vivo* differentiation or maintenance of subtype of ASC is not known.

Several models have been proposed to account for the heterogeneity in memory B cell populations [3,10,27]. In contrast to models of memory induced by acute infection with live pathogens that have impaired long-term memory development, in this study, we have used venom proteins of *T. nattereri* Brazilian fish to establish a model in which germinal center derived B cells and high affinity specific antibodies were permanently generated. In particular, memory response to venom induced a chronic expansion of B1a cells in BM, while retains venom proteins by splenic cells and maintains in the peritoneal cavity a Th2-mediated inflammation with infiltration of eosinophils, mast cells, neutrophils and IL-17A-producing CD4+ CD44+ CD40L+ Ly6C+ effector memory T cells (TeM).

Furthermore, we have provided evidence that IL-17A as well as IL-5 produced in a context of chronic inflammatory response against venom proteins directly influence the production of specific IgE antibodies and the maintenance of B1a cells in the BM from the spleen. Both cytokines negatively regulate the maintenance of ASC B220^{pos} in different sites of response. A striking finding in the current study was that IL-5 and IL-17A are critical for the differentiation and maintenance of ASC with B220^{neg} phenotype in inflamed peritoneal cavity.

Some authors believe that the persistence of antigen, for months or even years, in the form of immune complexes on the surface fDC is an essential factor for the maintenance of memory B cells and production of specific antibodies [32,40,41]. However, even though antigen occupancy is apparently not required for the maintenance of memory B cells as reported by Maruyama

et al. [42], our data here do not exclude the possibility that a BCR signal is required for the maintenance of memory B cells and ASC induced by the venom. Presumably these signals are similar to that needed for the survival of naive B cells [43].

It is also conceivable that the B1a cells are required to initiate T-independent B cell differentiation and Ig production. These cells emigrate from the peritoneal cavity into spleen where they complete their differentiation program and switch from IgM to IgA/IgG-secreting B cells [44]. Furthermore, Zhong et al. [45] described that B1 cells induced T cells to express IL-17 and IFN- γ to a much greater extent than observed with either B2 cells. Our data showed here support the view that B1a cells emigrate from the peritoneal cavity into spleen, where they are regulated by IL-5 and IL-17A to become ASC.

Mitsdoerffer et al. [46] have shown that Th17 cells are able to promote class switching to IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3. Finally B1a cells encounter a survival niche into BM, where they may contribute to activate IL-17A-producing CD4+ CD44+ Ly6C+ central memory T cells (TcM) present in this compartment.

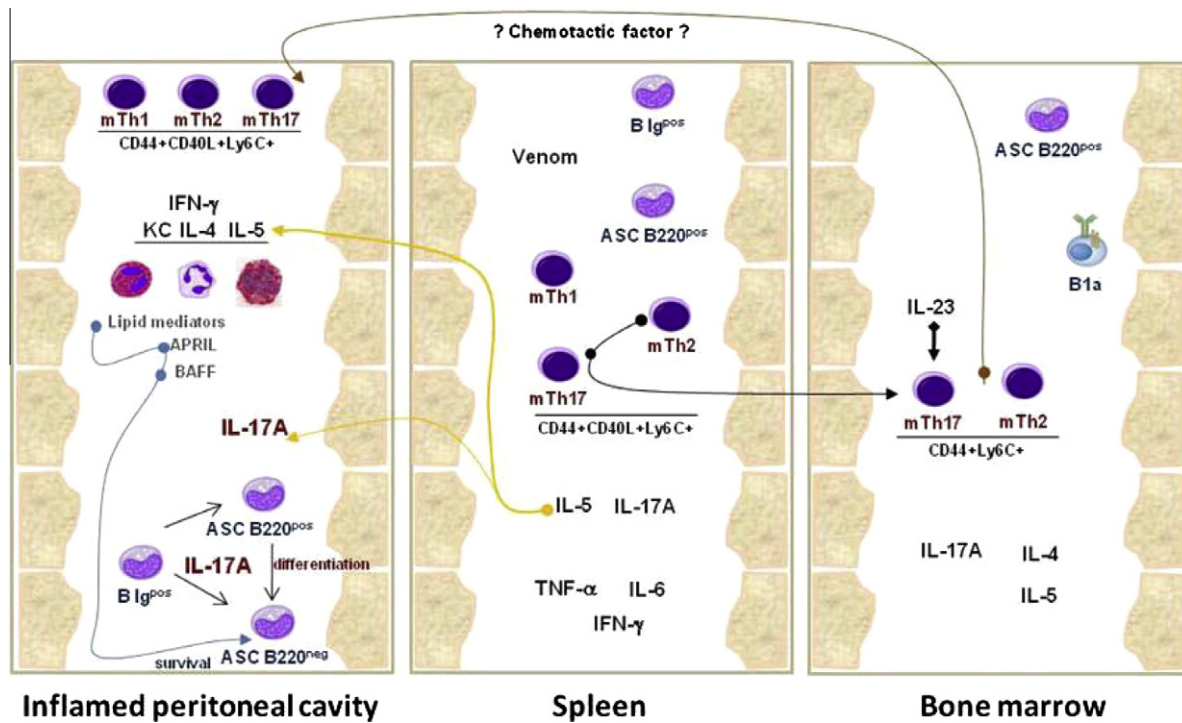
Class switched IgG1+ GC memory B cells were present in equivalent percentage during all time in anti-IL-5- and anti-IL-17A-treated venom-mice compared with non-treated venom-mice (data not shown) as well the treatments did not reverse the splenomegaly or the GC formation (Fig. 9), further highlighting that signals delivered via IL-5R and IL-17R are not required for GC maintenance. Consistent with this we observed an elevated relative number of ASC with both phenotypes (B220^{high/low} and in lesser extent B220^{neg}) in 74 d postimmunization in spleens obtained from anti-IL-5- and anti-IL-17A-treated mice, indicating that in the splenic niche, IL-5R and IL-17R signaling is not required for final differentiation into terminally-differentiated end stage cells with negative expression of B220.

In addition, our studies define that signals delivered via the IL-5R/IL-17R may directly support the differentiation of ASC B220^{neg} outside the GC, into a rich microenvironment necessary for long-lasting survival as chronic inflamed tissues. This is supported by data demonstrating that the treatment of venom-immunized mice with anti-IL-5 and anti-IL-17A mAbs promotes the complete depletion of ASC B220^{neg} in peritoneal cavity. Also in untreated venom-immunized mice we found that the presence of Th2 inflammation with neutrophil, eosinophil and mast cells migrated to KC, IL-4 and IL-5 chemokine gradient may be responsible for the attraction and maintenance of IL-17A-producing effector memory CD4+ Th17 cells, which control the direct differentiation of ASC B220^{neg}. Future studies will need to characterize the direct action of IL-17A and IL-5 in differentiation of ASC from memory B cells, and if the different subsets of ASC induced by *T. nattereri* venom possess differential functional subspecialties.

In addition, our results depicted here support a view [47] that the physical co-localization in the inflamed peritoneal cavity of leukocytes which induce the generation of BAFF/APRIL and possible COX₂-derived lipidic mediators regulate the activation and differentiation of ASC B220^{neg}. Corroborating this view, it is also demonstrated that non-haematopoietic cells as epithelial or endothelial cells in inflamed peritoneal cavity contribute to ASC survival by the production of BAFF and APRIL [15,48].

The population expansion and survival of Th17 cells depend on IL-23 [49]. Interestingly, our data show a positive correlation of the BM production of IL-23 and memory Th17 differentiation process. Presumably, IL-23 in BM participates in the activating of CD4+ CD44+ Ly6C+ central memory T cells into effector memory cells expressing CD40L (CD154) that may be mobilized from BM into the inflamed tissue, an ideal niche for interaction with B cells [50–53], amplifying the processes of differentiation and survival of ASC.

Antigen-specific IgE is the central event in the pathogenesis of chronic atopic disorders (in atopic dermatitis, followed by atopic



Scheme 1. Possible scenario for the effect of IL-17A on differentiation and survival of ASC in inflamed tissue. We postulate that during chronic response to *T. nattereri* venom a persistent peritoneal Th2-mediated inflammation consisting of the innate cells and inflammatory mediators as well T-derived cytokines produced by memory Th2 and Th17 cells promote a rich microenvironment that differentiates and maintains terminally differentiated cells (B220^{neg}CD43^{high}CD138^{pos}). The reservoir of splenic ASC was constituted by B220 positive cells; in the BM IL-23 support TcM cells; and ASC B220^{pos} were the major phenotype found in this compartment.

asthma, perennial allergic rhinitis, and seasonal allergic rhinitis) and is dependent on Th2 cytokines. It is also important to discuss that our study showed that specific IgE responses to venom were ablated in anti-IL-5- and anti-IL-17-treated-mice, suggesting that (i) IL-17A as well as IL-4 and IL-13 are key regulators of switching to IgE, and (ii) combined therapies with anti-IL-5- and anti-IL-17-monoantibodies could be implemented. Moreover, our findings demonstrate that (iii) IL-17A is not involving in the IgG1 switch, in contrast to partial dependence of IgG1 on IL-5. Our study produced results which corroborate the provocative findings of Milovanovic et al. [54], showing that IL-17A has an important functional implication in IgE production. Furthermore, they demonstrated that blocking IL-17A affected only IgE and not IgG, IgM, or IgA production in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from an atopic donor. Finally, our results enable us to propose a mechanism in which IL-5 and IL-17A produced by CD4⁺ CD44⁺ CD40L⁺ Ly6C⁺ effector memory T cells induce memory B-cell IgE class switching and differentiation into ASC.

Collectively, the observation described here that the production of survival factors for the innate cells as neutrophils, eosinophils and mast cells, and cytokines as IL-5 and IL-17A for activated effector memory T cells (CD40L^{pos}) guarantees the survival of the ASC B220^{neg} in the inflamed peritoneal cavity. IL-23 promotes in the BM an ideal niche for retention of TcM in rest state (CD40L^{neg}) that demonstrate fast capacity of mobilization for the inflamed tissue where they are activated and will help ASC in survival. Thus, we proposed that in our model, IL-5 and IL-17A is required for the differentiation and maintenance of ASC with B220^{neg} phenotype in inflamed tissue as peritoneal cavity, regulating the down-expression of B220 molecules in these cells (see Scheme 1).

5. Conclusion

In conclusion, by using venom proteins of *T. nattereri* Brazilian fish we have highlighted the importance of extrinsic mediators

as cytokines in Th2 chronic response development, demonstrating that IL-5 and IL-17A are crucial for the maintaining of specific-IgE secreting cell functions. We demonstrated that IL-5 and IL-17A exert positive regulation in B1a cells in a secondary lymphoid organ as spleen and are crucial for the maintenance of specific-IgE production. We found that IL-5 and IL-17A are required for the differentiation and maintenance of ASC with B220^{neg} phenotype in inflamed peritoneal cavity, whereas neutralizing anti-IL-5- and anti-IL-17A antibodies abolish this subpopulation. Thus, IL-5 and IL-17A are sufficient for the generation of ASC B220^{neg} in the peritoneal cavity and negatively regulate the number of ASC B220^{pos}, confirming that the hierarchical process of ASC differentiation triggered by venom needs the signal derived from IL-5/IL-5R and IL-17A/IL-17R.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (CEPID/FAPESP), and CNPq.

References

- [1] Slifka MK, Ahmed R. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol* 1998;10:252–8.
- [2] Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997;388:133–4.
- [3] Manz RA, Arce S, Cassese G, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 2002;14:517–21.
- [4] Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 2005;23:367–86.
- [5] McHeyzer-Williams MG, McLean MJ, Lalor PA, Nossal GL. Antigen-driven B cell differentiation *in vivo*. *J Exp Med* 1993;178:295–307.
- [6] Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005;5:230–42.
- [7] Chevrier S, Genton C, Kallies A, Karnowski A, Otten LA, Malissen B, et al. CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3895–900.

- [8] Arce S, Luger E, Muehlinghaus G, Cassese G, Hauser A, Horst A, et al. CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. *J Leuk Biol* 2004;75:1022–8.
- [9] Sanderson RD, Lator P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1989;1:27–35.
- [10] Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA. 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* 2002;99:2154–61.
- [11] Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hamann A, Radbruch A, et al. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol* 2002;169:1277–82.
- [12] Wehrli N, Legler DF, Finke D, Toellner KM, Loetscher P, Baggiolini M, et al. Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes. *Eur J Immunol* 2001;31:609–16.
- [13] Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002;17:51–62.
- [14] Sze DM, Toellner KM, Garcia DV, Taylor DR, MacLennan IC. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* 2002;192:813–21.
- [15] Huard B, McKee T, Bosshard C, Durual S, Matthes T, Myit S, et al. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest* 2008;118:2887–95.
- [16] Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, et al. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 2003;171:1684–90.
- [17] Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677–88.
- [18] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121–33.
- [19] Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009;9:556–67.
- [20] Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 2009;10:778–85.
- [21] Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 2008;9:166–75.
- [22] Haddad Jr V, Pardal PO, 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). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003;45:221–3.
- [23] Grund LZ, Souza VMO, Faquim-Mauro EL, Lima C, Lopes-Ferreira M. Experimental immunization with *Thalassophryne nattereri* fish venom: striking IL-5 production and impaired of B220+ cells. *Toxicol* 2006;48:499–508.
- [24] Lopes-Ferreira M, Emim JA, Oliveira V, Puzer L, Cezari MH, Araujo MS, et al. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem Pharmacol* 2004;68:2151–7.
- [25] Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 2008;9:310–8.
- [26] Mota I, Wong D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci* 1969;8:813–20.
- [27] McHeyzer-Williams LJ, Cool M, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel b220(–) memory b cell compartment. *J Exp Med* 2000;191:1149–66.
- [28] Erickson LD, Foy TM, Waldschmidt TJ. Murine B1 B cells require IL-5 for optimal T cell-dependent activation. *J Immunol* 2001;166:1531–9.
- [29] Taki S, Schmitt M, Tarlinton D, Forster I, Rajewsky K. T cell-dependent antibody production by Ly-1 B cells. *Ann NY Acad Sci* 1992;4:328–35.
- [30] Moon BG, Takaki S, Miyake K, Takatsu K. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J Immunol* 2004;172:6020–9.
- [31] O'Connor BP, Cascalho M, Noelle RJ. Short-lived and long-lived bone marrow plasma cells are derived from a novel precursor population. *J Exp Med* 2002;195:737–45.
- [32] Wu J, Qin D, Burton GF, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cell-derived antigen and accessory activity in initiation of memory IgG responses *in vitro*. *J Immunol* 1996;157:3404–11.
- [33] Piran-Soares AA, Komegae EN, Souza VMO, Fonseca LA, Lima L, Lopes-Ferreira M. Neutralizing antibodies obtained in a persistent immune response are effective against deleterious effects induced by the *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Toxicol* 2007;49:920–30.
- [34] Rogosch T, Kerzel S, Sikula L, Gentil K, Liebertruh M, Schlingmann KP, et al. Plasma cells and nonplasma B cells express differing IgE repertoires in allergic sensitization. *J Immunol* 2010;184:4947–54.
- [35] Horikawa K, Takatsu K. Interleukin-5 regulates genes involved in B-cell terminal maturation. *Immunology* 2006;118:497–508.
- [36] Takatsu K, Kouro T, Y. Nagai, Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv Immunol* 2009;101:191–236.
- [37] Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8:345–50.
- [38] Schnyder B, Lima C, Schnyder-Candrian S. Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response. *Cytokine* 2010;50:220–7.
- [39] Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008;14:282–9.
- [40] Gray D. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. *Nat Rev Immunol* 2002;2:60–5.
- [41] Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GF, Szakal AK. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev* 1997;156:39–52.
- [42] Maruyama M, Lam KP, Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 2000;407:636–42.
- [43] Lam KP, Kuhn R, Rajewsky K. *In vivo* ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 1997;90:1073–83.
- [44] Kroese FG, Bos NA. Peritoneal B-1 cells switch *in vivo* to IgA and these IgA antibodies can bind to bacteria of the normal intestinal microflora. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;246:343–9.
- [45] Zhong X, Gao W, Degauque N, Bai C, Lu Y, Kenny J, et al. Reciprocal generation of th1/th17 and t(reg) cells by B1 and B2 cells. *Eur J Immunol* 2007;37:2400–4.
- [46] Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim HJ, Korn T, Kolls JK, et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14292e7.
- [47] Fedyk ER, Phipps RP. Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10978–83.
- [48] Chu VT, Fröhlich PA, Steinhäuser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol* 2011;12:151–9.
- [49] Stritesky GL, Yeh N, Kaplan MH. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol* 2008;181:5948–55.
- [50] Cassese G, Lindenau S, de Boer B, Arce S, Hauser A, Riemekasten G, et al. Inflamed kidneys of NZB/W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2726–32.
- [51] Hutloff A, Büchner K, Reiter K, Baelde HJ, Odendahl M, Jacobi A, et al. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50:3211–20.
- [52] Tsubaki T, Takegawa S, Hanamoto H, Arita N, Kamogawa J, Yamamoto H, et al. Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2005;141:363–71.
- [53] Schroder AE, Greiner A, Seyfert C, Berek C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:221–5.
- [54] Milovanovic M, Drozdenko G, Weise C, Babina M, Worm M. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *J Invest Dermatol* 2010;130:2621–8.

The Hierarchical Process of Differentiation of Long-Lived Antibody-Secreting Cells Is Dependent on Integrated Signals Derived from Antigen and IL-17A

Lidiane Zito Grund, Monica Lopes-Ferreira, Carla Lima*

Immunoregulation Unit, Special Laboratory of Applied Toxinology (CEPID/FAPESP), Butantan Institute and Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Switched CD19-positive memory B cells purified from mice with chronic immune response against *Thalassophryne nattereri* venom proteins were cultured with venom or cytokines. Our results confirm the existence of a hierarchic process of differentiation: activated memory B cells progressively acquire increasing levels of CD138 and decreasing levels of CD45R/B220 to finally arrive at ASC with B220^{neg} phenotype, which are IgG1-secreting cells. Only Bmem from peritoneal cavity or bone marrow of *VTn* immunized mice presented the capacity to generate ASC functionally active. IL-17A or IL-21/IL-23/IL-33 improves the ability of venom to induce intracellular IgG of peritoneal derived-ASC. Cognate stimulation with venom and IL-17A is sufficient to down-regulate the expression of CD45R/B220. BAFF-R is up-regulated in splenic or medullar derived-ASC stimulated by venom, CpG or cytokines. Only splenic derived-ASC up-regulate Bcl-2 expression after CpG or the combination of IL-21/IL-23/IL-33 stimulation. Finally, the activation of ASC for IgG1 secretion is triggered by venom proteins in peritoneal cavity and by IL-17A in medullar niche. These results show the importance of the integration of signals downstream of BCR and IL17-A receptors in modulating ASC differentiation, focusing in the microenvironment niche of their generation.

Citation: Grund LZ, Lopes-Ferreira M, Lima C (2013) The Hierarchical Process of Differentiation of Long-Lived Antibody-Secreting Cells Is Dependent on Integrated Signals Derived from Antigen and IL-17A. PLoS ONE 8(9): e74566. doi:10.1371/journal.pone.0074566

Editor: Geetha P. Bansal, Tulane University, United States of America

Received: January 2, 2013; **Accepted:** August 6, 2013; **Published:** September 18, 2013

Copyright: © 2013 Grund et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by FAPESP 2012/50001-0 and 2009/53078-1 CNPQ. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: carlalima@butantan.gov.br

Introduction

Immunological memory is typically established following immunization or infections, and is central to the survival of the host. This immunity is engendered by cellular (CD4 and CD8 T cells) and humoral (B cells) immune compartments. Two B cell populations are responsible for sustaining the humoral immune memory: memory B cells (Bmem) and the long-lived antibody-secreting cells (ASC) [1,2,3].

The non-proliferating ASC secrete high affinity antigen-specific antibodies (Abs) for protracted periods of time [1,4], are capable of homing to bone marrow (BM) via CXCR4/CXCL12-mediated chemokine signaling or inflamed tissue and differ from Bmem in many respects. ASC up-regulate Blimp-1, XBP-1, IRF4 that cause i) cessation of cell cycle; ii) decrease signaling from the B cell-receptor (BCR) and communication with T cells; iii) inhibition of isotype switching and somatic hypermutation; iv) down-regulation of CXCR5; v) induction of copious immunoglobulin (Ig) synthesis and secretion; vi) down-regulation of typical B cell markers, including major

histocompatibility (MHC) class II, B220/CD45, CD19, CD21, CD22, and surface Ig; vii) and increase of syndecan-1 (CD138) [5,6].

Conventional models suggest that long-term Ab responses are maintained by the continuous proliferation and differentiation of Bmem into ASC. Despite some studies carefully mapping out the mechanisms mediating the survival of Bmem, Hikida et al. [7] report that phospholipase C (PLC)- γ 2 is required for efficient formation of germinal center (GC) and Bmem. However, it was described that BAFF and APRIL are not required for the survival [8]. Also it is not clear whether antigen reencounter results in the activation of antigen-responding Bmem or if intrinsic changes modulate their differentiation into ASC following appropriate stimulation [9]. It has been proposed that long-lasting B cell-mediated immunity is sustained by recurrent antigen exposure and in the absence of cognate antigen, inflammatory stimuli associated with adaptive immune responses like cytokines, Toll-like receptor (TLR) agonists or T cell help drive the activation of Bmem in a non-specific manner *in vivo* [10,11]. Signals influencing the

decision between memory maintenance and plasmacytic differentiation are not fully understood at present.

Recently, using venom proteins of *Thalassophryne nattereri* (VTn) Brazilian fish we establish a model in which GC derived-B cells and high-affinity specific Abs were permanently generated [12]. Therefore, this model provides an interesting scenario for studying the signals allowing survival and differentiation of the memory B cell compartment. In particular, humoral memory response to venom was characterized by a predominant production of IgG2a Abs that decline after 74 d privileging the production of IgE Abs later (120 d). A chronic expansion of B1a cells in BM induced by the venom was also observed, splenic cells retained venom proteins and in the peritoneal cavity a Th2-mediated inflammation with infiltration of eosinophils, mast cells, neutrophils and IL-17A-producing CD4⁺ CD44⁺ CD40L⁺ Ly6C⁺ effector memory T cells (TeM) were maintained. The venom promoted the differentiation of Bmem and subtypes of ASC that were characterized by the expression of B220 and CD43 molecules (B220^{high}CD43^{high}, B220^{high}CD43^{low}, B220^{low}CD43^{high} or B220^{neg}CD43^{high}), indicating a hierarchical process of differentiation [13].

Furthermore, we have provided *in vivo* evidence that IL-17A as well as IL-5 produced in a context of chronic inflammatory response against venom proteins directly influence the production of specific IgE Abs and the maintenance of B1a cells in the BM from the spleen. Both cytokines negatively regulate the maintenance of ASC B220^{pos} in different sites of response. A striking finding in this study was that IL-5 and IL-17A are critical for the differentiation and maintenance of ASC B220^{neg} phenotype in inflamed peritoneal cavity [13].

Here in this study, we proposed to confirm the capacity of memory B cells generated by venom proteins to undergo terminal differentiation in response to different immunological signals as re-exposition of antigen or non-specific and bystander mediators as cytokines.

Material and Methods

Venom

Thalassophryne nattereri fish venom was obtained from fresh captured specimens in different months of the year according to Lopes-Ferreira et al. [14] at the Mundau Lake in Alagoas, state of Brazil with a trawl net from the muddy bottom of lake. No protected specimens were captured and fish were transported to Immunoregulation Unit of Butantan Institute. All necessary permits (capture, conservation and venom c) were obtained for the described field Studies (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA Permit Number: 16221-1). Venom was immediately extracted from the openings at the tip of the spines by applying pressure at their bases. After that fish were anesthetized with 2-phenoxylethanol prior to sacrifice by decapitation.

After centrifugation, venom was pooled and stored at -80 °C before use. The venom protein concentration was determined by the Bradford [15] colorimetric method using bovine serum albumin as the standard (Sigma Chemical Company; ST. Louis, MO, USA). Endotoxin content was evaluated (resulting in a total dose < 0.8 pg/mL LPS) with QCL-1000 chromogenic

Limulus amoebocyte lysate assay (Bio-Whittaker) according to the manufacturer's instructions.

Mice

Male BALB/c mice (5–6 weeks old) were obtained from a colony at the Butantan Institute, São Paulo, Brazil. Mice were housed in a laminar flow holding unit (Gelman Sciences, Sydney, Australia) in autoclaved cages on autoclaved bedding, in an air-conditioned room in a 12 h light/dark cycle. Irradiated food and acidified water were provided *ad libitum*. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian College of Animal Experimentation. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Butantan Institute (Permit Number: 666/09) and of University of São Paulo (Permit Number: 25/84/02). All surgery was performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Induction of memory immune response by venom

Groups of 5 mice were immunized with intraperitoneal (i.p.) injections of 10 µg of *Thalassophryne nattereri* fish venom on days 0 and 14. The first immunization was give in 1.6 mg of aluminium hydroxide (Al(OH)₃) as adjuvant and the booster in the absence of adjuvant. Mice injected only with Al(OH)₃ were considered as control-group. After 48 d, mice were killed by injection of lethal dose of sodium pentobarbital anesthesia for obtaining peritoneal, spleen and BM cell suspensions.

Peritoneum, splenic and bone marrow cell isolation

Cell suspensions from control or immunized mice were obtained at 48 d after the first immunization. Peritoneal cells were recovered by peritoneal lavage using 5 mL of ice-cold sterile phosphate-buffered saline (PBS) plus 0.1% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Spleens were dissociated into single cell suspensions by mechanical disruption in Cell Strainer (BD Falcon). Bone marrow cells were obtained by flushing femurs of mice. Erythrocytes in spleens and BM were lysed with 0.14 M NH₄Cl and 17 mM Tris-HCl (pH 7.4). After lyses, cell concentration was adjusted to 10 × 10⁶ cell/mL in RPMI containing 10% heat-inactivated FCS.

CD19-positive memory B cell purification

B cells were purified from either control- or VTn-immunized BALB/c (48 d) mice using Magnetic Activated Cell Sorting (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). A single-cell leukocyte suspensions from freshly isolated spleen, bone marrow, and the peritoneal cavity were prepared using RPMI containing 10% heat-inactivated FCS. Erythrocytes were removed from the single cell suspensions by lysis. Briefly, total cells (1 × 10⁷) were incubated with 10 µL of anti-CD19 (Ly-1) MicroBeads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions for positive selection. After immobilization of all these cells with a magnet, untouched cells were discharged and CD19-positive B cells were collected and identified. Purity of Bmem cells identified as CD19⁺ was 95% and confirmed by flow cytometry.

CD19-positive memory B cell culture

All cultures were performed in Iscove modified Dulbecco medium (Invitrogen) and 10% fetal calf serum. Purified CD19-positive B cells from peritoneum, spleen and BM were plated at 1.5×10^5 /mL and cultured in basic conditions that favors B differentiation according to Jourdan et al. [16]. In the first step of activation (0–4 d) B cells were cultured in the presence of soluble anti-CD40 mAb (50 ng/mL) and recombinant cytokines as IL-2, IL-4 and IL-10 (all at 50 ng/mL). In respective cultures group, 2.5 μ g/mL of CpG-ODN (*oligodeoxynucleotide* 24, Sigma-Aldrich) or *T. nattereri* venom (20 μ g/mL) were added. After 4 d of culture, plasmablasts were harvested, washed, and cultured with IL-2, IL-10 and IL-6 (all at 50 ng/mL) or with various combinations of recombinant cytokines as IL-17A, IL-21, IL-23 and IL-33 (all at 1 ng/mL). At 7 d of culture, cells were washed and cultured with recombinant IL-6 (50 ng/mL) for 2 d for plasma cell generation.

Detection of apoptosis or necrosis

Apoptotic and necrotic cells were analyzed with an FITC-Annexin V (*fluorescein isothiocyanate* FITC)-conjugated or PI using flow cytometry. Cells were harvested and resuspended in 100 μ L binding buffer. Subsequently, cells were incubated with 5 μ L of FITC-Annexin V and 10 μ L of PI for 15 min in the dark. The intensity of fluorescence of stained cells was acquired using a BD FACSCalibur flow cytometer and data were analyzed with CellQuest software (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada).

Labeling with CFSE

For monitoring cell division, B cells in the first day and in the last day of culture (1×10^6 cell/mL) were incubated for 10 min at 37 °C with 5 mM CFSE (*5- and 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*; Molecular Probes). After being washed extensively, cells were resuspended in culture medium and cell proliferation was measured on day 4 by flow cytometry on a FACSCalibur and data were analyzed with CellQuest software (BD Biosciences). A combination of CFSE and PerCP-Cy5-anti-mouse CD45R/B220 or PE-anti-mouse CD138 was used to determine B cell differentiation status before and after culture.

Hematoxylin/eosin staining

The CD19-positive B cell pellets before and after culture were resuspended in PBS containing 0.1% newborn calf serum (Sigma) and slides were performed using a hemocytometer and cytocentrifuge. Slides were air dried, fixed in methanol, and stained (Wright-Giemsa, Scientific Products, Chicago, IL). After wash in H₂O they were mounted for observation with light microscopy at a magnification of $\times 40$ (Axio Imager A1; Carl Zeiss).

Flow Cytometry Analysis

For surface staining single-cell suspensions (1×10^6) were treated with 3% mouse serum of naive mice to saturate Fc receptors followed by the staining by fluorescence conjugated Abs: Rat IgG2ak PE-anti-mouse CD138, Rat IgG2ak PerCP-

Cy5-anti-mouse CD45R/B220, Rat IgG2ak FITC-anti-mouse CD19 and Rat IgG2bk FITC-anti-mouse BAFF-R for 30 min in ice. Cells were washed three times in PBS 1% BSA. For intracellular staining, cells were washed, fixed and permeabilized with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and stained with Rat IgG2ak PerCP-Cy5-anti-mouse Bcl-2 and Rat IgG2bk FITC-anti-mouse IgG. Cells were washed three times in PBS 1% BSA. Negative-controls were used to set the flow cytometer photomultiplier tube voltages, and single-color positive controls were used to adjust instrument compensation settings. Cells were examined for viability by flow cytometry using side/forward scatter characteristics or 7-AAD exclusion. Data from stained samples were acquired using a four-color FACSCalibur flow cytometer equipped with CellQuest software (BD Biosciences) and were analyzed using CellQuest Software (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Data were recorded as geometric mean fluorescence intensity (MFI) and percent of fluorescent positive cells.

Determination of IgG production

The concentration of venom-specific IgG in cell culture supernatants was measured on day 9 with quantitative ELISA. Supernatants were tested for IgG1 or IgG2a Abs using venom-coated 96-well plates (venom at 3 μ g/mL) and biotinylated goat anti-mouse IgG1 or IgG2a antiserum. The reactions were developed with streptavidin-horseradish peroxidase complex (Sigma), OPD (O-phenylenediamine) and H₂O₂ and plates were read at 490 nm on an automated ELISA reader (Spectramax, Molecular Devices). Results were expressed as the mean \pm SEM absorbance. Antibody concentrations were calculated from the IgG standard curves and represented as μ g/mL.

Statistical analysis

All values were expressed as mean \pm SEM. Parametric data were evaluated using an analysis of variance, followed by the Bonferroni test. Non-parametric data were assessed using the Mann–Whitney test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The SPSS statistical package (Release 13.0, Evaluation version, 2004) was employed.

Results

Memory response induced by *T. nattereri* venom is characterized by high frequency of CD19-positive Bmem

In our previously study [13] we identified that proteins of *VTn* induce in BALB/c mice a chronic humoral response characterized by the presence of Bmem and ASC in peritoneum, spleen and BM at several time-points after immunization. Also we demonstrated that 48 d post-immunization was a time for high frequency of switched Bmem (CD45R/B220^{pos}IgG^{pos}CD19^{pos}) and low frequency of ASC (CD45R/B220^{neg}CD138^{pos}) in all three compartments: 2.9% control vs 87.5% *VTn* in peritoneal cavity, 10% control vs 71% *VTn* in spleen, and 10% control x 79% *VTn* in bone marrow (Figure S1), thus becoming an ideal period for purifying cells

committed with terminal B cell differentiation. Second, B cell-restricted cell surface protein CD19 has been used as a good murine marker of naive, activated and memory B cell that appears at the earliest stages of development [17] but is down-regulated during plasma cell differentiation [18].

Then we choose this period of time (48 d) to purified CD19-positive B cells using magnetic microbeads (Figure 1A). Several protocols sorting human memory B cells that are committed to plasmacytic differentiation use CD27 as well as CD19 molecule. Here we purified CD19-positive switched memory B lymphocytes from *VTn*-immunized mice and CD19-positive naive B cells from control-mice.

We confirmed the enrichment process of CD19-positive B cell by positive selection (Figure 1B) in association with a high percentage of viable cells (control- 76.98% vs *VTn*-immunized mice 80.70%) (Figure 1C). We also showed that only CD19-positive B cells derived from *VTn*-immunized mice proliferate *in vitro*, compared with the low capacity of proliferation of CD19-positive B cells from control mice, indicative of the existence of naive B cells in control-mice and effector/memory B cells in venom-mice. The high proliferative response (16-fold) was achieved using splenic CD19-positive B cells from *VTn*-immunized mice, followed by high frequency of BM and peritoneal cells (Figure 1D).

Together, these results show that 48 d after *in vivo VTn*-immunization, the venom proteins are able to induce viable effector/memory CD19-positive B cells, particularly in spleen, with a proliferative capacity in medium without any specific stimulation. In humans, approximately one third of the CD19-positive B cells is Bmem on a average basis [19]. Traditionally, the induction of Bmem is considered as a crucial factor for long-term vaccine-induced protection [10,11]. The high frequency achieved in our model upon venom immunization is similar with frequencies observed in humans by components of bacterial vaccines (*Bordetella pertussis* and tetanus) or viral vaccines (measles and influenza) [20].

CD19-positive Bmem generated by VTn differentiate *in vitro* into non-proliferating CD138-positive ASC

Next we investigated the commitment of Bmem to plasmacytic differentiation (ASC) and if there is a linear process using an *in vitro* system. For that, purified CD19-positive B cells (1.5×10^5 cell/mL) from control- immunized mice (naive B cells) or *VTn*-immunized mice (memory B cells) were cultured in a three-step *in vitro* model with medium under basic conditions to B cell maintenance and differentiation for 9 days according to procedure schematized in detailed on Figure 2A. ASC differentiation was confirmed by the CD138 membrane expression acquisition and loss of their proliferative capacity. CD138 was reported to be expressed in ASC in BM and peripheral blood, but not on pre-germinal centre B cells [21]. CD138 is a heparan sulphate proteoglycan, which mediates cellular adhesion to collagen type I [22] and might play a role in adhesion to BM stromal cells [23].

In Figure 2B we see that before culture (upper) only CD19-positive B cells purified from peritoneum of *VTn*-immunized mice express high levels of CD138 compared with CD19-positive B cells from control group. After culture (bottom) in

medium under basic conditions, cells obtained from all compartments mainly peritoneal and splenic CD19-positive B cells from *VTn*-immunized mice up-regulated the expression of CD138 after differentiation.

Next we confirm the status of terminal differentiated CD138-positive ASC from *VTn*-immunized mice. In Figure 2C we show that ASC from *VTn*-immunized mice (lower picture) presented an activated lymphocyte-like morphology reminiscent of plasma cell with a small, dense, ovoid nucleus and a voluminous cytoplasm containing prominent amounts of rough endoplasmic reticulum (RER) and enlarged Golgi compared with naive B cells from control mice that exhibit a high nucleus to cytoplasm ratio, little RER, and an uncondensed nucleus (upper picture). According to CFSE staining (Figure 2D), after culture in basic conditions, only few cells of *VTn*-immunized mice are dividing, confirming the loss of the capacity of proliferation after stimulation (black bars - Figure 2D). On the other hand, CD19-positive B cells purified of all cell suspensions obtained from control mice show a great proliferative capacity under basic condition of culture (white bars - Figure 2D).

Here, these findings confirm the existence of a hierarchic process of differentiation in which CD19-positive Bmem from mice with chronic response to the venom differentiate *in vitro* into CD138-positive ASC. Terminal differentiated ASC express high levels of CD138 and possess low proliferative capacity.

IL-17A and a combination of IL-21/IL-23/IL-33 potentiate the effect of IgG production induced by venom

Early studies demonstrated that IL-17A participates on antigen-specific Ig production since the efficient levels of Ig were reduced in mice deficient in IL-17 [24]. Some mediators as IL-21 cytokine not only trigger B-cell proliferation [25], isotype switching and somatic hypermutation [26], but also induce ASC differentiation, exceeding 5 to 20 times the capacity of IL-4, IL-2 or IL-10 in this function [27]. IL-33 has been described by increase IgG1 and IgG2a production in inflammatory diseases such as collagen-induced arthritis [28] and recently, IL-23R was detected in plasmacytes and plasmablasts and the signals derived modulate IgM and IgG secretion [29].

To gain insight into extrinsic cues required for ASC differentiation and reinforce the hierarchical process of differentiation of Bmem into ASC, we evaluated the role of the venom antigens and the co-participation of recombinant cytokines or CpG in this culture system (Figure 3A). Because ASC lose their ability to cell division, reduce the expression of genes involved in BCR signaling and over-express genes involved with Ig production, we analyze after 9 d of culture the percentage of double positive cells: CD138-positive IgG producing-ASC (Figure 3B). These results show that *VTn* re-stimulation *in vitro* enhances the percentage of CD138-positive IgG producing-ASC from cells of the all compartments of immunized mice; in contrast with the incapacity of unrelated antigen as CPG (Figure 3C-3E).

These findings suggest an antigen-specific process and corroborate the idea that the differentiation of Bmem into ASC during T-dependent responses is at least in some cases strictly dependent on their expression of MHC-II [30].

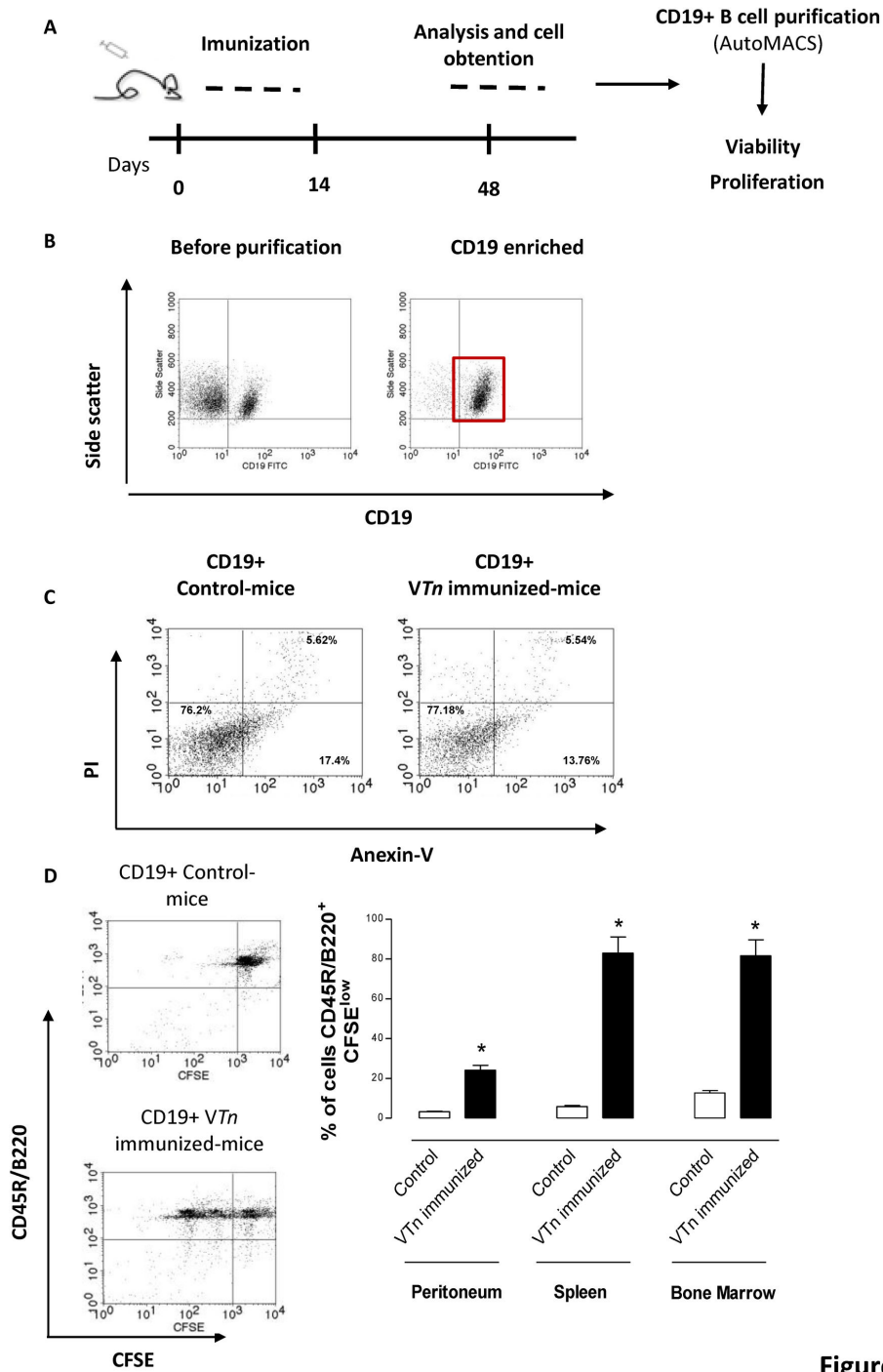


Figure 1

Figure 1. Memory response induced by *T. nattereri* venom is characterized by high frequency of CD19-positive B cells. Cartoon show the course of the experimental protocol in BALB/c mice immunized i.p. with 10 µg of *T. nattereri* venom (VTn) adsorbed in Al(OH)₃ on days 0 and 14. Mice injected only with Al(OH)₃ were considered as control group. After 48 d, mice were killed for peritoneal, spleen and BM cell suspensions collection. CD19-positive cells were enriched using magnetic anti-CD19 microbeads and positive selection (A). Purity (B) and viability (C) were assessed by flow cytometry using CD19 staining and FITC-annexin V co-staining with propidium iodide (PI) respectively. The percentage of cells in proliferation was determined through CFSE incorporation. The percentage of CD45R/B220^{pos} CFSE^{low}-labeled CD19-positive B cells from control- or VTn-immunized mice was assessed by flow cytometry after 4 d of culture (D). Data are mean ± SEM values from three independent experiments. **p* < 0.05 compared to CD19-positive B cells from control. Dot plots are representative of 3 experiments.

doi: 10.1371/journal.pone.0074566.g001

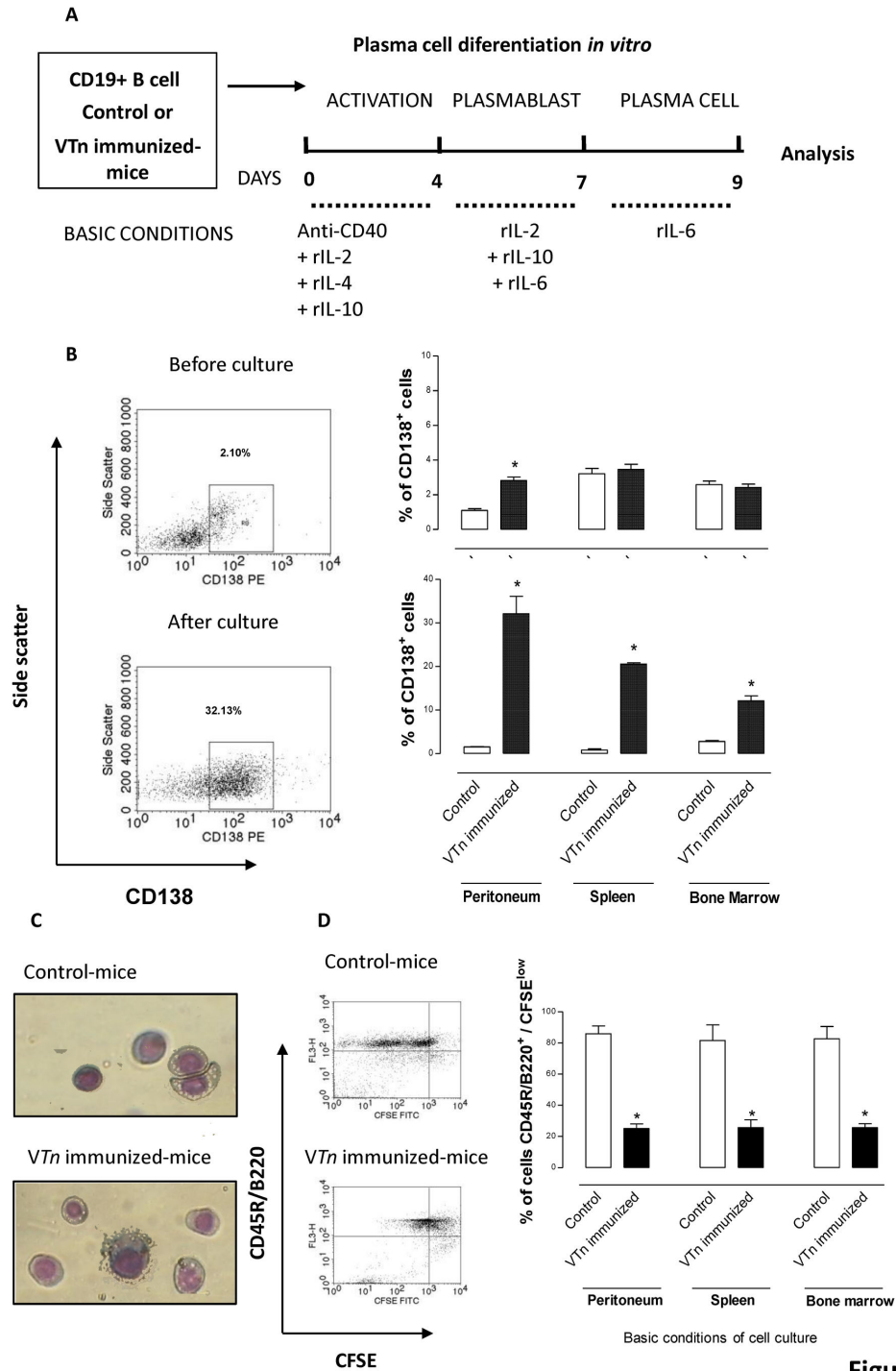


Figure 2

Figure 2. Venom is able to induce the *in vitro* differentiation of CD19-positive Bmem into non-proliferating CD138-positive ASC. Representation of the B cell differentiation in an *in vitro* model (A). Purified CD19-positive Bmem (1.5×10^5 cell/mL) obtained 48 d after venom immunization were cultured under basic conditions to plasma cell generation for 9 d. ASC differentiation was phenotypically monitored by flow cytometry based on CD138 membrane expression (B) and morphologically by Hematoxylin/eosin staining (C). The percentage of proliferating-cells was determined through CFSE incorporation. CD138^{pos} CFSE^{low}-labeled CD19-positive B cells from control- or VTn-immunized mice were assessed by flow cytometry after 4 d of culture (D). Data are mean \pm SEM values from three independent experiments. * $p < 0.05$ compared to CD19-positive B cells from control. Dot plots are representative of 3 experiments.

doi: 10.1371/journal.pone.0074566.g002

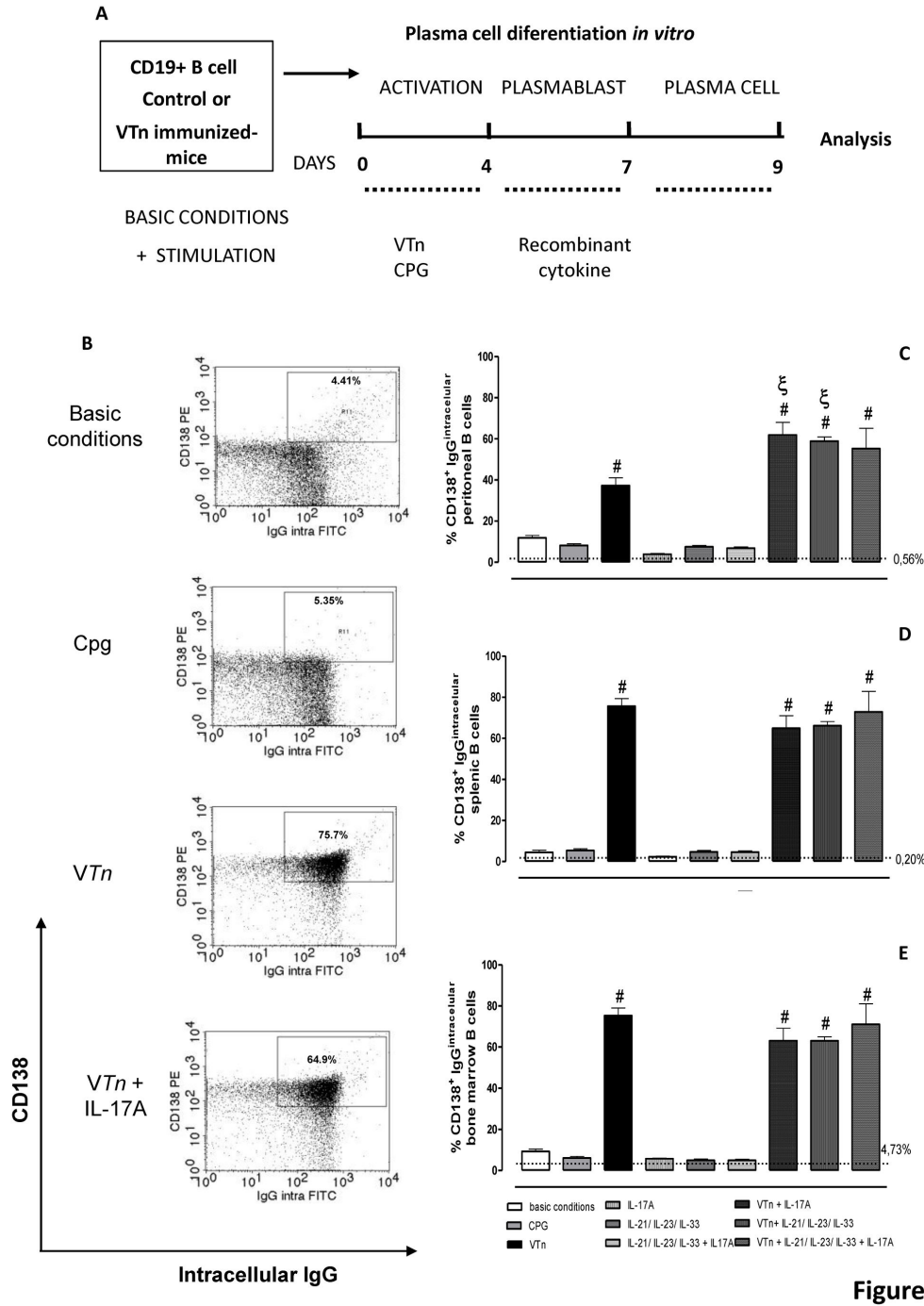


Figure 3. IL-17A and a combination of IL-21/IL-23/IL-33 potentiate the ability of venom to induce the differentiation of IgG producing-ASC. Representation of the B cell differentiation in an *in vitro* model. Purified CD19-positive Bmem (1.5×10^5 cell/mL) obtained 48 d after venom immunization were cultured in a three-step *in vitro* model under basic conditions or in medium supplemented with VTn, CpG or cytokines alone or in combination with venom for 9 d (A). Evaluation of intracellular content of IgG in CD138-positive ASC was determined by flow cytometry (B). The percentage of double-positive cells was analyzed in peritoneal (C), splenic (D) or medullar cells (E). The dashed line represents the percentage of IgG^{pos} CD138^{pos} ASC differentiated from CD19-positive B cells from control group of mice cultured in medium under basic conditions. #*p* < 0.05 compared to CD19-positive B cells from VTn-immunized mice in medium under basic conditions; and ξ*p* < 0.05 compared to CD19-positive B cells from VTn-immunized mice in medium supplemented with VTn. Data are mean ± SEM values from three independent experiments. Dot plots are representative of 3 experiments.

doi: 10.1371/journal.pone.0074566.g003

The recombinant cytokine IL-17A as well as the combination of IL-21/IL-23/IL-33 cytokines have additive effect on peritoneal ASC differentiation induced by *VTn*. However, the addition of IL-17A or the combination of cytokines IL-21/IL-23/IL-33 did not play a synergic effect on splenic or BM ASC differentiation induced by *VTn*. Such event may be explained by the *in vivo* microenvironment in which splenic and BM cells developed. After 48 d of immunization with *VTn* we detect the production of large amounts of IL-17A in all compartments including peritoneal cavity, but IL-10 was produced only by splenic and BM cells [13]. The presence of IL-17A could up-regulate the expression of IL-17R in the CD19-positive Bmem while IL-10 could counter-regulate this expression. So, we can speculate that peritoneal Bmem expressing high levels of IL-17R could be more susceptible to *in vitro* action of IL-17A, in contrast to BM and splenic cells that are more refractory to this signal.

Also, TLR9 agonist, the mixture of IL-21/IL-23/IL-33 alone, IL-17A alone or added to IL-21/IL-23/IL-33 mixture did not directly induce ASC differentiation from cells of any compartment (Figure 3C-3E).

Our results together confirm the existence of a hierarchical process in which CD19-positive Bmem become CD138-positive IgG producing-ASC by a mechanism directly dependent on BCR stimulation by venom, that could be potentiated by IL-17A and IL-21/IL-23/IL-33 if the cells are from peritoneal cavity.

Loss of CD45R/B220 surface expression in ASC is controlled by cognate antigen

CD45R/B220 glycoprotein is a member of the family of protein tyrosine phosphatases expressed in B lymphocytes throughout their development from early pro-B stages and is down-regulated upon terminal differentiation into ASC [31]. Decreased expression of CD45R/B220 is particularly significant for ASC longevity since its lack increases cell survival [32]. Our next step was the evaluation of the expression of the CD45R/B220 in ASC differentiated from Bmem collected of *VTn*-immunized mice (Figure 4).

First, we noted that before culture, the peritoneal (Figure 4B) and BM (Figure 4D) CD19-positive B cells from *VTn* (gray) or control mice (white) express similar levels of CD45R/B220, in contrast to splenic (Figure 4C) CD19-positive B cells from *VTn*-immunized mice that presented lower expression compared with cells from control mice. This result suggests that the *in vivo* splenic microenvironment selectively controls the low levels of CD45R/B220 expression.

Second, after 9 d of basic conditions, peritoneal (Figure 4B) and splenic (Figure 4C) differentiated ASC from Bmem of *VTn*-immunized mice showed decreased CD45R/B220 levels, while BM cells (Figure 4D) maintain similar levels compared with before culture of this molecule. When Bmem of *VTn*-immunized mice were re-stimulated *in vitro* with GpG we observed that this TLR9 agonist up-regulated the expression of CD45R/B220 only in peritoneal ASC, but did not change the expression in splenic or medullar ASC.

The re-stimulation with *VTn* dramatically decreased the CD45R/B220 expression in ASC from Bmem of all compartments, whereas IL-17A alone only induced decrease in CD45R/B220 levels in ASC from splenic and medullar niche.

The addition of the mixture of 3 or 4 cytokines to peritoneal, splenic or medullar Bmem was not able to induce decrease in the CD45R/B220 expression levels in differentiated ASC. Also, the addition of cytokines (mixed of 3 or 4 cytokines) to culture re-stimulated with *VTn* did not enhance the venom capability of decrease the CD45R/B220 expression in ASC. These results show that although IL-17A plays co-participating with *VTn* in the differentiation of peritoneal Bmem into IgG producing CD138-positive ASC, probably due to its ability to induce increased expression of IL-17R, this cytokine alone is not sufficient to decrease CD45R/B220 expression in peritoneal cells, suggesting a direct requirement of *VTn* and others signaling pathways on peritoneal Bmem for down-regulation of CD45R/B220. For example, the classical XBP-1/Blimp-1 dependent pathway [6]. IRF-4, Blimp-1 and XBP-1/UPR transcriptional regulators are important in the control of the terminal differentiation of memory B lymphocytes into ASC [33].

ASC from splenic and medullar CD19-positive B cell express high levels of BAFF-R

BAFF (*B cell activating factor*), a member of the TNF family (also named TALL-1, THANK, BlyS or zTNF4) plays a fundamental role in the long-term survival and homeostasis of mature B2 and marginal zone B cells [34]. The binding of BAFF to their receptors (BAFF-R/BR3, TACI, BCMA) leads to the activation of the NF- κ B pathway and ultimately to the transcription of the anti-apoptotic factor Bcl-xL and Bcl-2 [35]. We reported in Figure 5A and 5B that CD138-positive ASC differentiated from peritoneal cavity of *VTn*-immunized mice (white bar) present low levels of BAFF-R similar to the levels of control mice (dashed line). After different types of *in vitro* re-stimulation we observed no changes in the low levels of BAFF-R in ASC, suggesting that another receptors as TACI or BCMA could be required for peritoneal ASC differentiation.

In contrast, our data show that CD138-positive ASC differentiated from spleen of *VTn*-immunized mice super-express the BAFF-R levels after stimulated with CPG, *VTn* or the combination of IL-21/IL-23/IL-33 (Figure 5C). Moreover, added to the capacity of CPG, *VTn* or the combination of IL-21/IL-23/IL-33 to the up-regulation of the BAFF-R expression, IL-17A is also important for ASC derived from BM cells (Figure 5D). These findings demonstrated the essential role of BAFF-BAFF-R signaling during ASC differentiation induced by venom in the splenic and BM microenvironment. Other studies clearly demonstrated that splenic follicles are greatly reduced in size, and IgG immune response to T-dependent antigen was impaired as a consequence of anti-BAFF-R blocking Abs [34].

CpG is currently being used as an adjuvant in vaccination protocols [36]. In human B cells, the effects of CpG-ODN-mediated TLR9 activation include cellular proliferation, differentiation into ASC, up-regulation of molecules involved in immune cellular interactions and increase of cytokine secretion. It was recently demonstrated that CpG-ODN induce the expression of TACI and BCMA, but did not up-regulate BAFF-R expression in isolated resting B cells from healthy donors [37]. Here, we demonstrated that TLR9 agonist induced an up-regulation of BAFF-R in ASC from splenic and medullar Bmem of *VTn*-immunized mice. These results indicate a potential

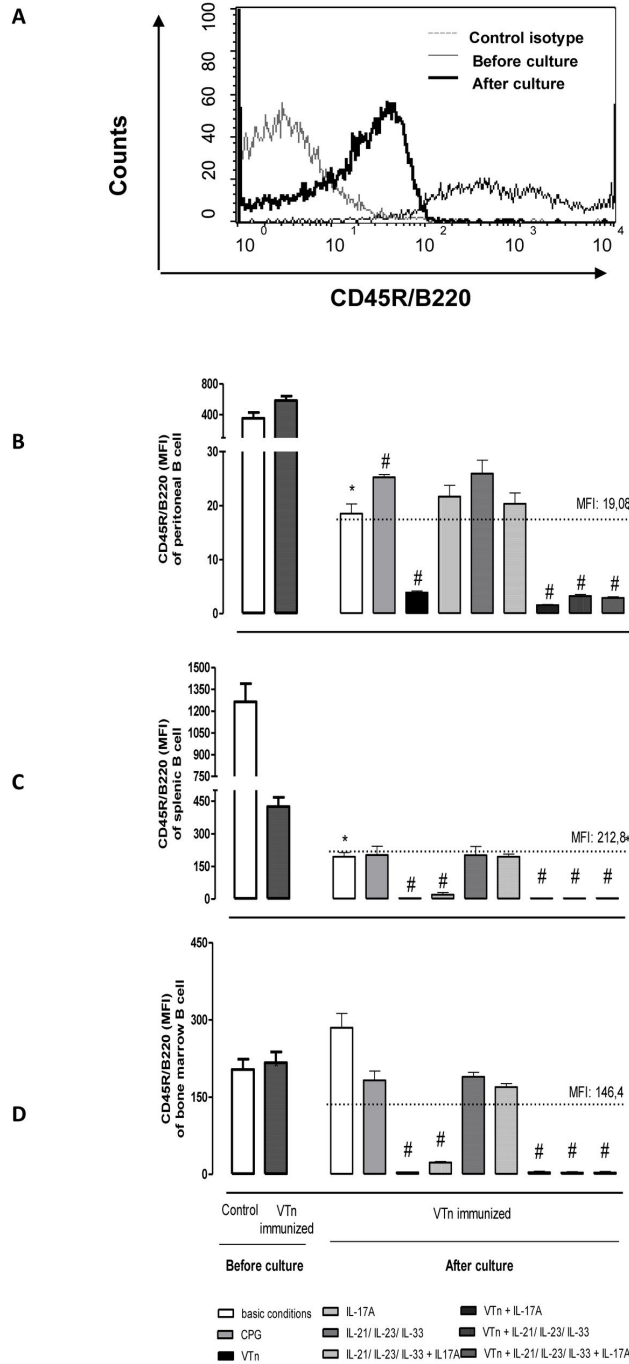


Figure 4

Figure 4. Loss of CD45R/B220 surface expression in ASC is controlled by cognate antigen. The surface expression of CD45R/B220 was analyzed in terms of mean fluorescence intensity (MFI) ± SD by flow cytometry in CD138-positive ASC derived from CD19-positive B cells of control- or *VTn*-immunized mice. Histogram is representative of 3 experiments (A). The dashed line represents the MFI of CD45R/B220 in purified CD19-positive B cells from control mice cultured in medium under basic conditions. The percentage of positive cells was analyzed in peritoneal (B), splenic (C) or medullar cells (D). **p* < 0.05 compared to CD19-positive B cells from control, and #*p* < 0.05 compared to CD19-positive B cells from *VTn*-immunized mice in medium under basic conditions.

doi: 10.1371/journal.pone.0074566.g004

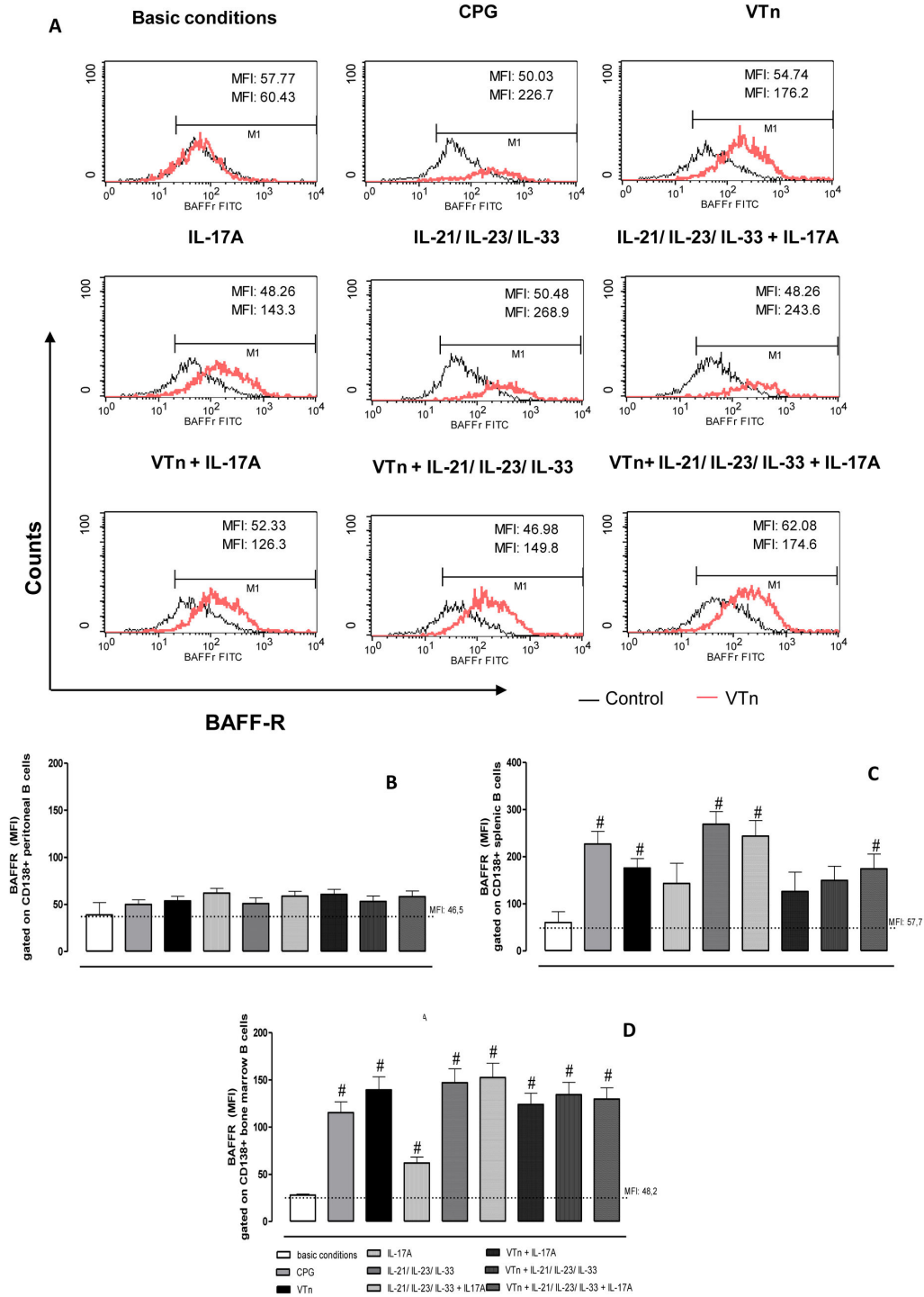


Figure 5

Figure 5. ASC from splenic and bone marrow CD19-positive B cells express high levels of BAFF-R. The surface expression of BAFF-R was analyzed in terms of mean fluorescence intensity (MFI) \pm SD by flow cytometry in CD138-positive ASC derived from CD19-positive B cells of control- or *VTn*-immunized mice. Histogram is representative of 3 experiments (A). The dashed line represents the MFI of BAFF-R in purified CD19-positive B cells from control mice cultured in medium under basic conditions. The percentage of positive cells was analyzed in peritoneal (B), splenic (C) or medullar cells (D). #*p* < 0.05 compared to CD19-positive B cells from *VTn*-immunized mice in medium under basic conditions.

doi: 10.1371/journal.pone.0074566.g005

difference in the response of human and murine B cells to CpG-ODN, and show that CpG-ODN synergize with antigen for the induction of increase in BAFF-R expression on murine ASC.

IL-6 and IL-10 [38] are known to be required for proliferation and differentiation of human B cells. Previously we demonstrated that in the memory response induced by *VTn*, IL-10 was produced only by splenic and BM cells, but not by peritoneal cells [13]. Together we can propose that the up-regulation of BAFF-R in CD138-positive ASC differentiated from spleen and BM of *VTn*-immunized mice induced by *VTn*, CPG, or the combination of IL-21/IL-23/IL-33 and IL-17A could require IL-10 co-participation.

TLR9 agonist and the combination of IL-21/IL-23/IL-33 promote increase in pro-survival Bcl-2 protein in ASC from splenic niche

Terminally differentiated ASC are non-cycling and thus phenotypically different from their predecessors. Expression of Blimp-1 protein results in concomitant repression of the B cell-specific transcription and apoptotic factors as Bcl-6 and Pax5, and up-regulation of pro-survival members of the Bcl-2 family, especially Bcl-2, Bcl-XL and myeloid cell leukaemia 1 (Mcl1) [39]. Over-expression of Bcl-2 also causes a prominent expansion of memory compartment contributing to the maintenance of T and B cell memory [40].

Our results of intracellular content of Bcl-2 (Figure 6A) show that ASC differentiated from peritoneal (Figure 6B) or medullar (Figure 6D) CD19-positive Bmem did not demonstrate up-regulation of Bcl-2 expression after any type of stimulation. But in contrast, only TLR9 agonist (CpG) and the combination of cytokines IL-21/IL-23/IL-33 promote an increase of Bcl-2 expression levels in CD138-positive ASC differentiated from splenic Bmem from *VTn*-immunized mice (Figure 6C).

These results corroborate the study of Klein et al. [41] that showed that after leaving the GC, ASC modulate the expression of various genes (267) including Bcl-2 similar to those found in quiescent naive cells. These findings suggest that ASC survival induced by *VTn* and IL-17A could be mediated by other survival molecules as members of the Rho family GTPases such as Rho, Rac or Cdc42 that regulate the actin cytoskeleton and survival [42].

Moreover our results pointed to an important role for TLR signaling in memory B cell compartment. The key role of TLR receptors in cellular activation and modulation of quality of function of B effector cells was first described by Leadbetter et al. [43]. Our data show that activation of the TLR9 by CpG agonist promotes increased expression of CD45R/B220 in ASC derived from peritoneal B cells (Figure 4B), of BAFF-R expression in splenic and BM (Figure 5C and 5D) and of Bcl-2 levels by splenic B cells (Figure 6B). However, the super-regulation of CD5R/B220, BAFF-R and Bcl-2 expression in ASC induced by CpG did not transduce sufficient signals to induce the production or the secretion of specific IgG by ASC. These results suggest that signaling via TLR9 present in endosomal compartments of B cells could be related with ASC survival, but not with Abs production.

Venom and IL-17A control specific IgG1 secretion by ASC

Abs secretion is the hallmark of terminal differentiated B cell [44]. To investigate whether differentiated CD138-positive ASC were functionally active we measured venom specific Ab secretion in the last day of culture. IgG1 was the predominant subclass secreted in supernatant from peritoneal or BM ASC, but specific IgG2a Abs were not detected (Figure 7). These results show that *VTn* acts increasing IgG1 secretion by CD138-positive ASC from peritoneal cavity of *VTn*-immunized mice (Figure 7A), while IL-17A is fundamental for stimulate the secretion of IgG1 by BM differentiated CD138-positive ASC (Figure 7B). Our results show that the addition of IL-17A in venom-restimulated cells promoted a decrease in IgG1 production by peritoneal or medullar ASC.

Early studies demonstrated that IL-17A participates on antigen-specific Ig production since the efficient levels of Ig were reduced in mice deficient in IL-17 [25], and IL-17 together with BAFF, but not IL-17 alone increase cell survival, proliferation and Ig class switching via transcription factor Twist1 activation *in vitro* [45]. Milovanovic et al. [46] also demonstrated that IL-17A participates together with anti-CD40 and IL-4 in the IgE secretion by human ASC. Taken together, we demonstrate that activation of ASC for IgG1 secretion is triggered by venom proteins in peritoneal cavity and by the inflammatory cytokines as IL-17A maintained in medullar niche. Thus, the special retention of high-affinity Bmem in inflamed tissues and in central compartment as BM ensures that high-affinity Abs will be produced upon each Ag exposure.

Discussion

The generation of vaccine-mediated protection is a complex challenge. The long-term protection requires the persistence of vaccine Abs and/or the generation of immune memory cells capable of rapid and effective re-activation upon subsequent microbial exposure. The determinants of immune memory induction, as well as the relative contribution of persisting Abs and of immune memory B cells to protection against specific diseases, are thus essential parameters of long-term vaccine efficacy. The successes in vaccines against polio, measles, smallpox, diphtheria and tetanus have mostly come against invariant pathogens that cause acute infections followed by long-term protective immunity. However, there are urgent needs to develop vaccines against persistent and chronic infections such as HIV, human papillomavirus, dengue, influenza, *Mycobacterium tuberculosis* and hepatitis C virus. Thus, a better understanding of how different antigens activate the immune system and sustain the immune memory is important for new vaccines and adjuvants or for the optimization of immunization strategies.

Here in this study, we confirm the contribution of Bmem to ASC differentiation. Using cellular suspensions of peritoneal cavity, spleen and BM from mice with chronic humoral response against venom (48 d), we purified switched CD19-positive Bmem that were cultured in an *in vitro* system in the presence of venom, cytokines or CpG. Together, our results confirm the existence of a hierarchic process of differentiation:

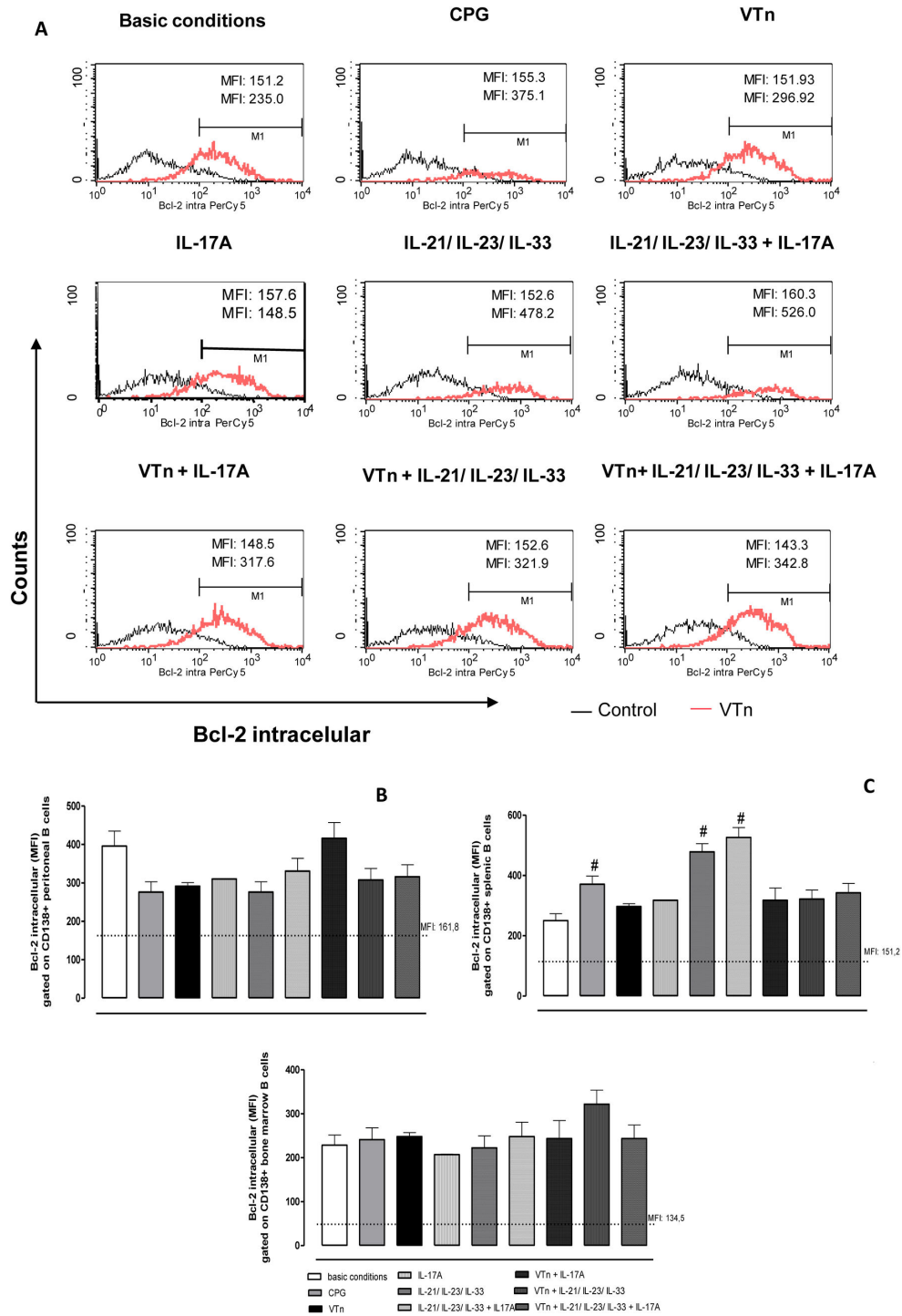


Figure 6

Figure 6. TLR9 agonist and recombinant cytokines promote increase in anti-apoptotic Bcl-2 protein in ASC. The intracellular content of Bcl-2 was analyzed in terms of mean fluorescence intensity (MFI) ± SD by flow cytometry in CD138-positive ASC derived from CD19-positive B cells of control- or *VTn*-immunized mice. Histogram is representative of 3 experiments (A). The dashed line represents the MFI of Bcl-2 in purified CD19-positive B cells from control mice cultured in medium under basic conditions. The percentage of positive cells was analyzed in peritoneal (B), splenic (C) or medullar cells (D). #*p* < 0.05 compared to CD19-positive B cells from *VTn*-immunized mice in medium under basic conditions.

doi: 10.1371/journal.pone.0074566.g006

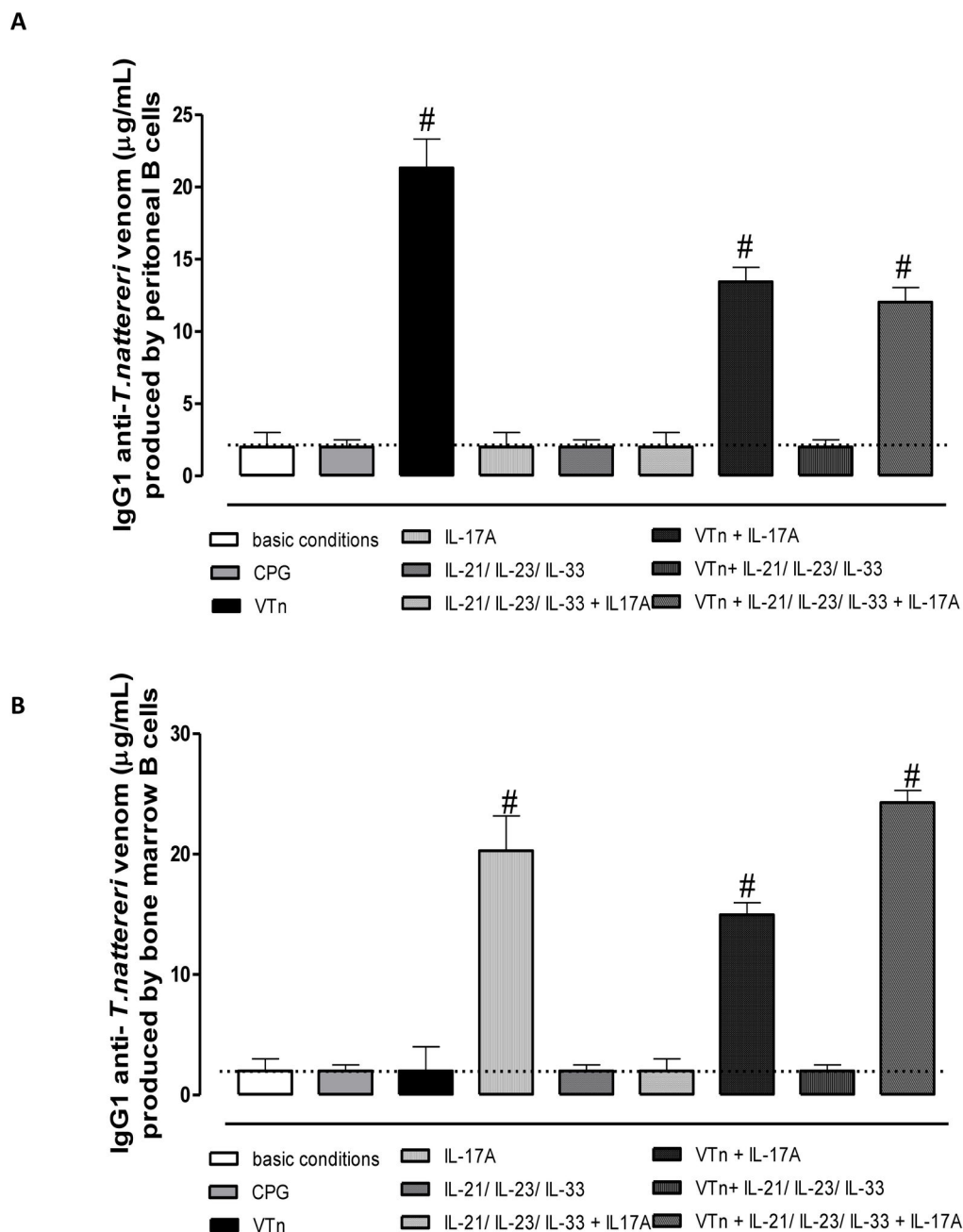


Figure 7

Figure 7. Venom and IL-17A control venom-specific IgG1 secretion by ASC. Purified CD19-positive B cells were cultured as described above. At the end of culture, ELISA harvested supernatants for quantifying Ab concentrations. Venom-specific IgG1 Abs were detected in supernatant of peritoneal (A) and BM (B) cell cultures. The dashed line represents the specific-IgG1 in supernatant of purified CD19-positive B cells from control group of mice cultured in medium under basic conditions. #*p* < 0.05 compared to CD19-positive B cells from *VTn*-immunized mice in medium under basic conditions. Data are mean ± SEM values.

doi: 10.1371/journal.pone.0074566.g007

activated memory B cells progressively acquire increasing levels of CD138 and decreasing levels of CD45R/B220 to

finally arrive at ASC with B220^{neg} phenotype, which are IgG1-secreting cells. Only antigen-experienced Bmem from

peritoneal cavity or bone marrow of *Vtn*-immunized mice presented the capacity to generate ASC functionally active, probably influenced by specific-niche stromal contact. This process is dependent on antigen and IL-17A itself. The reduction in the levels of CD45R/B220 and the increased expression of BAFF-R induced in ASC by IL-17A are both related to the direct action of this cytokine on Bmem in splenic and medullar niche. The differentiation of ASC induced by the venom is dependent on the BAFF-R signals and is independent on the Bcl-2 protein expression.

This work contributes for the expansion of the understanding of the factors involved in the differentiation and the survival of ASC, therefore it demonstrates that dependent on the microenvironment niche of their formation (mainly inflamed tissue as peritoneal cavity) these cells require the integration of signals derived from antigen and IL-17A for the survival for extending period of time and for the secretion of memory Abs. The trafficking and localization of Bmem and ASC in the body/tissue mediated by homing receptors and chemokine receptors triggered by venom antigens are determinant for activation dependent on BCR- or cytokine receptors.

Vaccines that induce neutralizing Abs have led to the eradication of important pathogens and have severely reduced the prevalence of many other infections. However, even the most successful vaccines do not induce protective Abs in all individuals, and can fail to induce lifelong immunity. In this view, our data permit some important points to be discussed. First, we demonstrated the capacity of proteins of the *T. nattereri* venom as B-cell helpers, leading committed Bmem to differentiation into IgG producing-ASC. The ability of venom antigens to promote the preferentially differentiation of Bmem from inflamed peritoneal cavity into IgG1-producing B220^{neg} ASC could be recognized as an adjuvant function for vaccines improvement, and highlight the important role of constant recruitment of new memory B cells for the continuously diversifying high-affinity Abs response produced upon each Ag exposure.

Second, our data show that IL-17A as an important mediator for memory immune responses, enhancing IgG Abs production and inducing IgG1 secretion lead us to suggest the use of IL-17A administration in combination with adjuvants as an immune-stimulator or the use of new adjuvants able to induce the local production of IL-17A. Our data corroborate the established concept that the generation of vaccine-induced Th17 cells as well IL-17 production is crucial for protection against intracellular organisms.

IL-17 has been increasingly implicated in host responses against intracellular pathogens, promoting the neutrophil infiltration and granulomatous inflammation at the site of infection. In addition, it has been attributed to IL-17 a role in antigen-specific Ig production with normal or impaired formation of GC [25,47-49]. Moreover, Th17 cells can induce B cell proliferation and promote antibody isotype switching to IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3. Interestingly, IL-17 on its own drove class switch recombination to IgG2a [50].

Considerable recent attention has been given to IL-17 secreting CD4+ (Th17) cells and their potential role in vaccine-induced immunity to a diverse array of bacteria and viruses in

preclinical models and several groups have recently reported that IL-17 confers protection against vaccine of *B. pertussis* [51], *C. albicans* or *Staphylococcus aureus* [52,53], systemic mycoses of North America, *B. dermatitidis*, *C. posadasii*, and *H. capsulatum* [54,55] and *S. Typhi* [56].

Finally, the potent activity of venom proteins to modulate innate immune cells. Emerging concepts suggest that information sensed about the antigen is integrated by dendritic cells (DC) and translated to antigen-specific T and B cells to modulate the strength, quality, and persistence of the memory immune response [57,58]. Moreover, conventional adjuvants, such as aluminum hydroxide, induce good Th2-type immune responses, but are not considered effective to promoting Th1-type immune responses. This is a major limitation in vaccines against pathogens for which potent cellular responses are required for protection, such as, respiratory syncytial virus (RSV), *Mycobacterium tuberculosis* and hepatitis C virus.

In this concept, venom proteins elicit both Th1- and Th2-memory immune responses with IL-17A production by T memory cells, and have even more potent activity in induce protective immunity, shaping the quantity and quality of T and B cell memory. Our group demonstrated recently that venom or isolated proteins modulate important checkpoints of an ideal vaccine antigen like co-stimulatory molecules on surface of antigen presenting cells, cytokine environment and memory cells. Nattectin, a C-type lectin isolated from the venom is able of overcoming the immaturity of the immune system driving Th1-type responses in an *in vivo* model and licenses macrophages to differentiate into cells exhibiting typical DC function *in vitro* [59]. Sustained production of cytokines (KC, IL-5, TNF- α , IL-6, IL-17A and IL-23) and leukocytes recruitment (neutrophils, eosinophils, and mast cells) were induced by venom which can enhance quality and quantity of effector and central memory T cell and ASC generation [13]. Moreover, proteases Natterins isolated from *T. nattereri* venom are also able to induce a pronounced Th2-type response and a rich splenic microenvironment important to generation and maintenance of terminal differentiated ASC with B220 negative phenotype [60].

In conclusion, the modulation of the capacity of specific-Bmem to differentiate into ASC could be achieved by a particular antigen and cytokines-based mechanisms; and is critical to fully explore the potential for design of novel vaccines or adjuvants in the future.

Supporting Information

Figure S1. Memory response induced by *T. nattereri* venom is characterized by high percentage of Bmem. Dot plots (A) and percentage of Bmem (CD19^{pos} in B220^{pos} IgG^{pos} gated cells) in peritoneum (B), spleen (C) and bone marrow (D) from control- or *Vtn*-immunized mice were determined at 21, 28, 48, 74 and 120 d after immunization by multiparametric flow cytometry using Armenian hamster IgG1y2 FITC-anti-mouse CD19, goat IgG2bk PE-anti-mouse IgG (specific for IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3), Rat IgG2aak PerCP-Cy5-anti-mouse CD45R/B220. Data are mean \pm SEM values from three

independent experiments. * $p < 0.05$ compared to control-mice. Dot plots are representative of 3 experiments. (TIFF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LZG MLF CL. Performed the experiments: LZG. Analyzed the data: LZG MLF

CL. Contributed reagents/materials/analysis tools: MLF CL. Wrote the manuscript: MLF CL.

References

- Slifka MK, Ahmed R (1998) Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol* 10: 252-258. doi:10.1016/S0952-7915(98)80162-3. PubMed: 9638360.
- Aiba Y, Kometani K, Hamadate M, Moriyama S, Sakaue-Sawano A et al. (2010) Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(27): 12192-12197. doi:10.1073/pnas.1005443107. PubMed: 20547847.
- Yoshida T, Mei H, Dörner T, Hiepe F, Radbruch A et al. (2010) Memory B and memory plasma cells. *Immunol Rev* 237: 117-139. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00938.x. PubMed: 20727033.
- Manz RA, Arce S, Cassese G, Hauser AE, Hiepe FA et al. (2002) Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 14: 517-521. doi:10.1016/S0952-7915(02)00356-4. PubMed: 12088688.
- Ehrhardt GR, Hijikata A, Kitamura H, Ohara O, Wang JY et al. (2008) Discriminating gene expression profiles of memory B cell subpopulations. *J Exp Med* 205(8): 1807-1817. doi:10.1084/jem.20072682. PubMed: 18625746.
- Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB et al. (2004) XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21: 81-93. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.010. PubMed: 15345222.
- Hikida M, Casola S, Takahashi N, Kaji T, Takemori T et al. (2009) PLC-gamma2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *J Exp Med* 206: 681-689. doi:10.1084/jem.20082100. PubMed: 19273623.
- Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha RS, Xu S et al. (2008) Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol* 180: 3655-3659. PubMed: 18322170.
- McHeyzer-Williams LJ, Cool M, McHeyzer-Williams MG (2000) Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel b220(-) memory b cell compartment. *J Exp Med* 191: 1149-1166. doi:10.1084/jem.191.7.1149. PubMed: 10748233.
- Traggiai E, Puzone R, Lanzavecchia A (2003) Antigen dependent and independent mechanisms that sustain serum antibody levels. *Vaccine* 21: S35-S37. doi:10.1016/S0264-410X(03)00198-1. PubMed: 12763680.
- Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A (2003) A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101: 4500-4504. doi:10.1182/blood-2002-11-3569. PubMed: 12560217.
- Grund LZ, Souza VM, Faquim-Mauro L, Lima C, Lopes-Ferreira M (2006) Experimental immunization with *Thalassophryne nattereri* fish venom: striking IL-5 production and impaired of B220+ cells. *Toxicon* 48: 499-508. doi:10.1016/j.toxicon.2006.06.014. PubMed: 16930659.
- Grund LZ, Komegae EN, Lopes-Ferreira M, Lima C (2012) IL-5 and IL-17A are critical for the chronic IgE response and differentiation of long-lived antibody-secreting cells in inflamed tissues. *Cytokine* 59: 335-351. doi:10.1016/j.cyto.2012.04.045. PubMed: 22633287.
- Lopes-Ferreira M, Emim JA, Oliveira V, Puzer L, Cezari MH et al. (2004) Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem Pharmacol* 68: 2151-2157. doi:10.1016/j.bcp.2004.07.037. PubMed: 15498505.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3. PubMed: 942051.
- Jourdan M, Caraux A, de Vos J, Fiol G, Larroque M et al. (2009) An *in vitro* model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* 114(25): 5173-5181. doi:10.1182/blood-2009-07-235960. PubMed: 19846886.
- Matsumoto AK, Kopicky-Burd J, Carter RH, Tuveson DA, Tedder TF et al. (1991) Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J Exp Med* 173: 55-64. doi:10.1084/jem.173.1.55. PubMed: 1702139.
- Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K et al. (1993) Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 81: 2658-2663. PubMed: 8490175.
- Fecteau JF, Roy A, Néron S (2009) Peripheral blood CD27+ IgG+ B cells rapidly proliferate and differentiate into immunoglobulin-secreting cells after exposure to low CD154 interaction. *Immunology* 128: 353-365. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02976.x. PubMed: 19016905.
- Buisman AM, Rond CG, Oztürk K, Hulscher T, Binnendijk RS (2009) Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. *Vaccine* 28: 179-186. doi:10.1016/j.vaccine.2009.09.102. PubMed: 19799844.
- Wijdenes J, Vooijs WC, Clément C, Post J, Morard F et al. (1996) A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 94: 318-323. doi:10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1811.x. PubMed: 8759892.
- Elenius K, Jalkanen M (1994) Function of the syndecans—a family of cell surface proteoglycans. *J Cell Sci* 107: 2975-2982. PubMed: 7698997.
- Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C (2003) Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol* 21: 205-230. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141138. PubMed: 12524387.
- Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M et al. (2002) Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17: 375-387. doi:10.1016/S1074-7613(02)00391-6. PubMed: 12354389.
- Etinger R, Kuchen S, Lipsky PE (2008) Interleukin 21 as a target of intervention in autoimmune disease. *Ann Rheum Dis* 67: Suppl 3: iii83-iii86. doi:10.1136/ard.2008.098400. PubMed: 19022821.
- Saito T, Kitayama D, Sakamoto A, Tsuruoka N, Arima M et al. (2008) Effective collaboration between IL-4 and IL-21 on B cell activation. *Immunobiology* 213: 545-555. doi:10.1016/j.imbio.2008.01.006. PubMed: 18656702.
- Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL et al. (2007) Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol* 179: 8180-8190. PubMed: 18056361.
- Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y et al. (2008) IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* 205: 339-346. doi:10.1084/jem.20071868. PubMed: 18268038.
- Cocco C, Morandi F, Airoidi I (2011) Interleukin-27 and interleukin-23 modulate human plasmacell functions. *J Leukoc Biol* 89: 729-734. doi:10.1189/jlb.1210660. PubMed: 21330353.
- Shimoda M, Mmanywa F, Joshi SK, Li T, Miyake K et al. (2006) Conditional ablation of MHC-II suggests an indirect role for MHC-II in regulatory CD4 T cell maintenance. *J Immunol* 176: 6503-6511. PubMed: 16709807.
- Hardy RR, Hayakawa K (2001) B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19: 595-621. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.595. PubMed: 11244048.
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M et al. (2001) CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409: 349-354. doi:10.1038/35053086. PubMed: 11201744.
- Calame KL (2001) Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol* 2: 1103-1108. doi:10.1038/ni1201-1103. PubMed: 11725300.

34. Rauch M, Tussiwand R, Bosco N, Rolink AG (2009) Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells. *PLOS ONE* 4: e5456. doi:10.1371/journal.pone.0005456. PubMed: 19421318.
35. Sasaki Y, Derudder E, Hobeika E, Pelanda R, Reth M et al. (2006) Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation. *Immunity* 24: 729-739. doi:10.1016/j.immuni.2006.04.005. PubMed: 16782029.
36. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM (2011) CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 10: 499-511. doi:10.1586/erv.10.174. PubMed: 21506647.
37. Abu-Rish EY, Amrani Y, Browning MJ (2013) Toll-like receptor 9 activation induces expression of membrane-bound B-cell activating factor (BAFF) on human B cells and leads to increased proliferation in response to both soluble and membrane-bound BAFF. *Rheumatology* 52(7): 1190-1201. doi:10.1093/rheumatology/ket006. PubMed: 23436580.
38. Burdin N, van Kooten C, Galibert L, Abrams JS, Wijdenes J et al. (1995) Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol* 154: 2533-2544. PubMed: 7533177.
39. Yasuda T, Kometani K, Takahashi N, Imai Y, Aiba Y et al. (2011) ERKs induce expression of the transcriptional repressor Blimp-1 and subsequent plasma cell differentiation. *Sci Signal* 19: 4(169): ra25 PubMed: 21505187.
40. Korsmeyer SJ, McDonnell TJ, Nunez G, Hockenbery D, Young R (1990) Bcl-2: B cell life, death and neoplasia. *Curr Top Microbiol Immunol* 166: 203-207. doi:10.1007/978-3-642-75889-8_26. PubMed: 2073800.
41. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Keller JL, Haddad J Jr et al. (2003) Gene expression dynamics during germinal center transit in B cells. *Ann N Y Acad Sci* 987: 166-172. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb06045.x. PubMed: 12727636.
42. Yasuda T, Kurosaki T (2008) Regulation of lymphocyte fate by Ras/ERK signals. *Cell Cycle* 7(23): 3634-3640. doi:10.4161/cc.7.23.7103. PubMed: 19029810.
43. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ et al. (2002) Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416: 603-607. doi:10.1038/416603a. PubMed: 11948342.
44. Tarte K, Zhan F, Vos DJ, Klein B, Shaughnessy J Jr (2003) Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood* 102: 592-600. doi:10.1182/blood-2002-10-3161. PubMed: 12663452.
45. Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC et al. (2009) Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 10: 778-785. doi:10.1038/nrm2786. PubMed: 19483719.
46. Milovanovic M, Drozdenko G, Weise C, Babina M, Worm M (2010) Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *J Invest Dermatol* 130: 2621-2628. doi:10.1038/jid.2010.175. PubMed: 20596087.
47. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171: 6173-6177. PubMed: 14634133.
48. Hsu H-C, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R et al. (2007) Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 9: 166-175. PubMed: 18157131.
49. Wu H-J, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T et al. (2010) Gut-Residing Segmented Filamentous Bacteria Drive Autoimmune Arthritis via T Helper 17 Cells. *Immunity* 32: 815-827. doi:10.1016/j.immuni.2010.06.001. PubMed: 20620945.
50. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim HJ, Korn T et al. (2010) Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14292-14297. doi:10.1073/pnas.1009234107. PubMed: 20660725.
51. Warfel JM, Merkel TJ (2013) Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol* 6(4): 787-796. doi:10.1038/mi.2012.117. PubMed: 23187316.
52. Lin L, Ibrahim AS, Xu X, Farber JM, Avanesian V et al. (2009) Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLOS Pathog* 5(12):e1000703. PubMed: 20041174.
53. Schmidt CS, White CJ, Ibrahim AS, Filler SG, Fu Y et al. (2012) NDV-3, a recombinant alum-adjuvanted vaccine for *Candida* and *Staphylococcus aureus*, is safe and immunogenic in healthy adults. *Vaccine* 30(52): 7594-7600. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.038. PubMed: 23099329.
54. Wüthrich M, Gern B, Hung CY, Ersland K, Rocco N et al. (2011) Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. *J Clin Invest* 121(2): 554-568. doi:10.1172/JCI43984. PubMed: 21206087.
55. Hung CY, Gonzalez A, Wüthrich M, Klein BS, Cole GT (2011) Vaccine immunity to coccidioidomycosis occurs by early activation of three signal pathways of T helper cell response (Th1, Th2, and Th17). *Infect Immun* 79(11): 4511-4522. doi:10.1128/IAI.05726-11. PubMed: 21859851.
56. McArthur MA, Szein MB (2012) Heterogeneity of multifunctional IL-17A producing S. Typhi-specific CD8+ T cells in volunteers following Ty21a typhoid immunization. *PLOS ONE* 7(6): e38408. doi:10.1371/journal.pone.0038408. PubMed: 22679502.
57. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S et al. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767. PubMed: 10837075.
58. Shortman K, Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2: 151-161. doi:10.1038/nri746. PubMed: 11913066.
59. Saraiva TC, Grund LZ, Komegae EN, Ramos AD, Conceição K et al. (2011) Nattectin a fish C-type lectin drives Th1 responses *in vivo*: licenses macrophages to differentiate into cells exhibiting typical DC function. *Int Immunopharmacol* 11: 1546-1556. doi:10.1016/j.intimp.2011.05.012. PubMed: 21621644.
60. Komegae EN, Grund LZ, Lopes-Ferreira M, Lima C (2013) The Longevity of Th2 Humoral Response Induced by Proteases Natterins Requires the Participation of Long-Lasting Innate-Like B Cells and Plasma Cells in Spleen. *PLOS ONE* 8(6): e67135. doi:10.1371/journal.pone.0067135. PubMed: 23840604.