

Fernanda Miriane Bruni Soliani

***Anafilaxia induzida em camundongos pelo veneno do peixe
Thalassophryne nattereri***

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

Orientadora: Dra. Mônica Lopes Ferreira

Co-orientadora: Dra. Carla Lima

Versão original.

São Paulo

2012

RESUMO

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

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

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

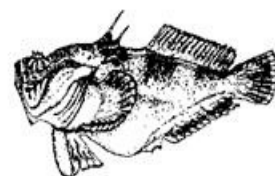
ABSTRACT

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

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

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

Introdução



1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

As doenças alérgicas são caracterizadas por duas fases: a) reação aguda/imediata: que é desencadeada em segundos ou minutos após a re-exposição alérgica, (b) reação de fase tardia: que ocorre dentro de horas após a re-exposição ao alérgeno, quando os sintomas

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

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

O avanço dos estudos de genética em relação à geração e reprodução de animais geneticamente modificados permitiu verificar que animais deficientes de mastócitos (Kit^w/Kit^{w-}

⁵), ausentes de IgE e/ou do receptor FcεR podem desenvolver resposta anafilática ativa e fatal, indicando que outros componentes do sistema imune estão envolvidos nesse processo (Takeishi et al., 1991; Martin et al., 1993; Oettgen et al., 1994).

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

Vale ressaltar que, diferente da via clássica onde a indução de anafilaxia ocorre através da ligação de alérgenos multivalentes à IgE ligada aos receptores específicos presentes na membrana de mastócitos, a anafilaxia induzida por IgG exige a formação de imuno-complexos na circulação seguido da posterior ligação ao receptor específico para a porção Fc presente (FcγR) na membrana de macrófagos. Além disso, tem sido sugerido que grandes quantidades de anticorpos e alérgenos são necessárias para induzir anafilaxia sistêmica mediada por IgG quando comparado à IgE (Miyajima et al., 1997). Porém, recentemente Ishikawa e colaboradores (2010) descreveram que doses pequenas de antígenos podem induzir grave anafilaxia quando os camundongos são sensibilizados passivamente com IgE ou IgG antígeno-

específicos, sugerindo que a anafilaxia induzida por IgG não é rara e pode se desenvolver tanto quanto a anafilaxia por IgE.

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

Reações anafiláticas desencadeadas por venenos não são raras e as pesquisas nessa área têm aumentado muito uma vez que o desenvolvimento urbano tem aproximado os animais potencialmente perigosos dos seres humanos. Acidentes por Himenópteros, como abelhas (família *Apidae*), vespas (família *Vespidae*) e formigas (família *Formicidae*) são conhecidos por desencadear graves reações anafiláticas potencialmente fatais. O primeiro possível registro de óbito por choque anafilático refere-se aos hieróglifos encontrados no túmulo do faraó egípcio *Menes* datados de 2641 a.C. que descreve sua morte como consequência da picada *Kneb*, algo parecido com abelha ou vespa (Ring et al., 2010). O

envenenamento por abelha (*Apis mellifera*) é caracterizado por edema local imediato que irradia pelo membro afetado além de posterior constrição da laringe.

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

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

Diante da gravidade dos acidentes e da dificuldade de se evitar o contato com esses insetos, muito tem sido estudado no intuito de desenvolver uma imunoterapia baseada na dessensibilização dos indivíduos alérgicos levando a uma maior tolerância aos venenos com aumento de IgG específica, particularmente da classe IgG4, capaz de bloquear o antígeno antes que o mesmo se ligue a IgE fixada na membrana dos mastócitos (Schuerwegh et al., 2001; Pereira-Santos et al., 2007). A caracterização dos componentes responsáveis em induzir alergia permite o desenvolvimento de imunoterapia específicas e com menores efeitos colaterais, como já acontece com veneno de abelhas e formigas (Yun et al., 1999; Kim et al., 2001). Além da terapia de dessensibilização, moléculas com função inibitória estão sendo descritas, como o caso de uma pequena molécula (*small molecule*) capaz de inibir a desgranulação de mastócito *in vitro* e *in vivo* (por administração oral em camundongos através do bloqueio da sinalização Syk (*spleen tyrosine kinase*) no receptor FcεRI (Mazuc et al., 2008).

Hitomi e colaboradores (2010) identificaram um inibidor tipo imunoglobulina, denominado Allergin-1, o qual contém a seqüência ITIM em sua porção citoplasmática e inibe a desgranulação mediada por IgE em mastócitos derivados da medula óssea (BMMCs).

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

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

Diferentemente dos terrestres, acidentes causados por organismos aquáticos apresentam baixa incidência devido ao seu habitat, e ainda muitos existentes não sofrem notificação ou são sub-notificados. Entretanto por viverem em um ecossistema altamente competitivo produzem um enorme número de metabólitos que constituem seus venenos e por

isso são intensamente estudados e descrições médicas de reações alérgicas desenvolvidas em resposta a eles são freqüentes.

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

Dentre os animais aquáticos de importância toxicológica estão os Cnidários (água viva, urtiga do mar), Equinodermos (ouriço), Poríferos (espojas), Moluscos (caramujos) e os peixes que podem ser agrupados em venenosos ou peçonhentos. Os peixes venenosos obtêm suas toxinas incorporando veneno de plantas, algas ou outros organismos através da cadeia trófica, ou possuem vias metabólicas para a produção de seus venenos. São representados principalmente por baiacu, garoupa, barracuda e bicuda. Já os peixes peçonhentos apresentam glândulas especializadas na secreção de substâncias tóxicas e um aparato especializado constituído por espinhos ou acúleos canaliculados ou não para a inoculação, como é o caso das arraias, bagres, peixe-escorpião e niquim.

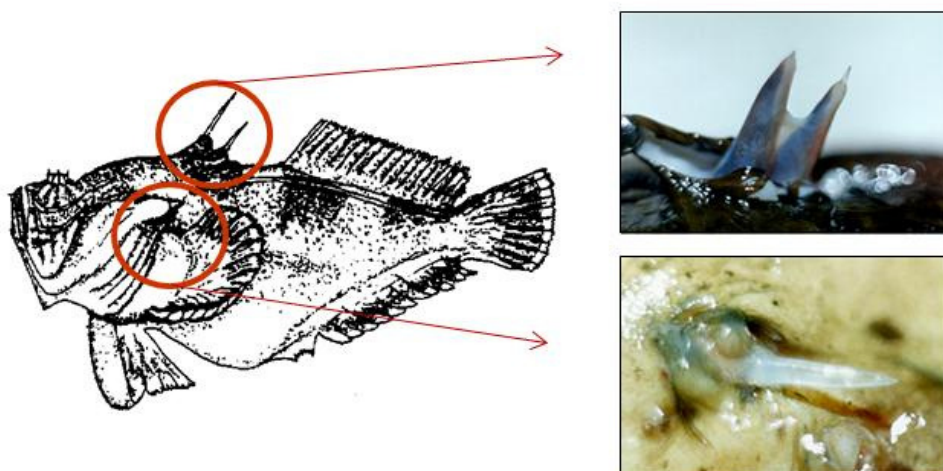
Os niquins pertencem à família *Batrachoididae* e estão agrupados em 15 espécies, das quais quatro são encontradas no Brasil; *Thalassophryne nattereri*, *Thalassophryne punctata*, *Thalassophryne reticulata* e *Thalassophryne amazonica*, entretanto os únicos relatos de acidentes referem-se à espécie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

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

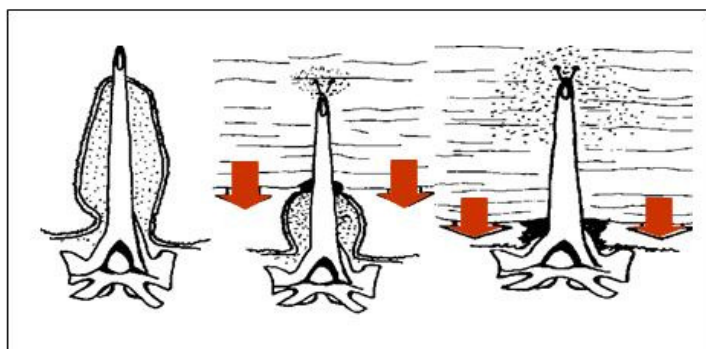
(A)



(B)



(C)



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

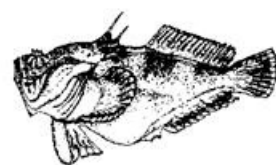
Mais recentemente, o trabalho de Grund e colaboradores (2012) demonstrou que o veneno de *T. nattereri* é capaz de desencadear e manter uma resposta inflamatória Th2 crônica com persistentes níveis de IgG1 e principalmente IgE produzidos por células ASC terminalmente diferenciadas (B220^{neg}). Os autores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

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

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

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

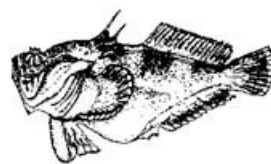
Conclusão



7 CONCLUSÃO

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

Referências



8 REFERÊNCIAS*

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

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

Castells M, Austen KF. Mastocytosis: mediator-related signs and symptoms. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127:147–52.

Chen JC, Chuang JG, Su YY, Chiang BL, Lin YS, Chow LP. The protease allergen Pen c 13 induces allergic airway inflammation and changes in epithelial barrier integrity and function in a murine model. *J Biol Chem*. 2011;286(30):26667-79.

Chen I, Martinez O, Overbergh I, Mathieu C, Prabhakar BS, Chan IS. Early up-regulation of th2 cytokines and late surge of th1 cytokines in an atopic dermatitis model. *Clin Exp Immunol*. 2004;138 (3):375-87.

Chruszcz M, Pomés A, Glesner J, Vailes LD, Osinski T, Porebski PJ, Majorek KA, Heymann PW, Platts-Mills TA, Minor W, Chapman MD. Molecular determinants for antibody binding on the group 1 house dust mite allergens. *J Biol Chem*. 2011 Dec 30. [Epub ahead of print].

Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol*. 1923; 8:163- 82.

Cohen SG, Zelaya-Quesada M. Portier, richet, and the discovery of anaphylaxis: a centennial. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 110(2):331-6.

De Medeiros CR, Barbaro KC, De Siqueira França FO, Zanotti AP, Castro FF. Anaphylactic reaction secondary to Bothrops snakebite. *Allergy*. 2008; 63(2):242-3.

De Medeiros CR, Barbaro KC, Lira MS, França FO, Zaher VL, Kokron CM, Kalil J, Castro FF. Predictors of Bothrops jararaca venom allergy in snake handlers and snake venom handlers. *Toxicon*. 2008;51(4):672-80.

Demain JG, Goetz DW. Immediate, late, and delayed skin test responses to *Centruroides vittatus* scorpion venom. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;30:135-7.

Demain JG, Minaei AA, Tracy JM. Anaphylaxis and insect allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(4):318-22.

Dotimas EM, Hider RC. Koneybee venom. *Bee Word*. 1987; 2:51:71.

Dy M., Schneider E. Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004; 15:393–410.

Dyer KD, Percopo CM, Xie Z, Yang Z, Kim JD, Davoine F, Lacy P, Druey KM, Moqbel R, Rosenberg HF. Mouse and human eosinophils degranulate in response to platelet-activating factor (PAF) and lysoPAF via a PAF-receptor-independent mechanism: evidence for a novel receptor. *J Immunol*. 2010;184(11):6327-34.

Edwards Jr E.K. And E.K. Edwards Sr, Immediate, anaphylactic and delayed reactions to jellyfish, Contact Dermatitis. 2000;43:244–245.

Erb KJ, Holloway JW, Sobek A, Moll H, Le Gros G. Infection of mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med.* 1998; 187(4):561-9.

Facó PE, Havt A, Barbosa OS, Nobre AC, Bezerra GP, Menezes DB, Fonteles MC, Lopes-Ferreira M, Monteiro HS. Effects of Thalassophryne nattereri fish venom in isolated perfused rat kidney. *Toxicon.* 2003; 42(5): 509-14.

Finkelman FD, Rothenberg ME, Brandt EB, Morris SC, Strait RT. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(3):449-57.

Finkelman FD. Anaphylaxis: lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 3: 506-15.

Fitzgerald KT, Flood A A. Hymenoptera stings. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2006; 4:194-204.

Fonseca LA, Lopes-Ferreira M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *T. nattereri* (niquim). *An Bras Dermatol.* 2000; 75: 435-43.

Ford JW, Kilmon MA, Haas KM, Shelburne AE, Chan-Li Y, Conrad DH. In vivo murine CD23 destabilization enhances CD23 shedding and IgE synthesis. *Cell Immunol.* 2006;243(2):107-17.

Fróes HP. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (Thalassophrynidae). *Bahia Med.* 1933c; 4: 225-7.

Fróes HP. Peixes toxíforos do Brasil. *Bahia Med.* 1933; 4: 69-75.

Fróes HP. Studies on venomous fishes of tropical countries. *J. Trop. Med. Hyg.* 1933b; 36: 134-5.

Fróes HP. Sur un poisson toxiphore brésilien: le "niquim" Thalassophryne maculosa. *Rev. Sud. Am Me Chl.* 1932; 3:871-8.

Gough L, Schulz O, Sewell HF., and Shakib F. 1999. The Cysteine Protease Activity of the Major Dust Mite Allergen Der P 1 Selectively Enhances the Immunoglobulin E Antibody Response. *J. Exp. Med.* 1999; 20:1897–901.

Green RHCE, Brightling G, Woltmann D, Parker AJ, Wardlaw ID, Pavord. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax.* 2000; 57: 875–9.

Grund L Z, Souza VMO, Mauro-Faquim EL, Lima C, Lopes-Ferreira M. Experimental immunization with Thalassophryne nattereri fish venom: Striking IL-5 production and impaired of B220+ cells. *Toxicon.* 2006; 48(5): 499-508.

Grund LZ, Komegae EN, Lopes-Ferreira M, Lima C. IL-17A is critical for the Th2 chronic response and differentiation of long-lived plasma cells in inflamed tissues. *Cytokine* 2012. *Submitted.*

Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, Tournoy K, Louis R, Foidart JM, Noël A, Cataldo DD. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res*. 2009;58(12):845-54.

Haddad Jr V, Pardal PPO, Cardoso JL, Martins IA. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): Report of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Serjipe State). *Ver. Inst. Med. Trop*. 2003; 4: 221-3.

Harada M, Nagata M, Takeuchi M, Ohara T, Makino S, Watanabe A. Age-dependent difference in susceptibility to IgE antibody- and IgG1 antibody-mediated passive anaphylactic shock in the mouse. *Immunol Invest*. 1991; 5-6: 515-23.

Hewitt CR, Brown AP, Hart BJ, Pritchard DI. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J Exp Med*. 1995; 182(5):1537-44.

Hitomi K, Tahara-Hanaoka S, Someya S, Fujiki A, Tada H, Sugiyama T, Shibayama S, Shibuya K, Shibuya A. An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits immunoglobulin E-mediated immediate hypersensitivity reactions. *Nat Immunol*. 2010; 11(7):601-7.

Hsieh KY, Tsai CC, Wu CH, Lin RH. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33:1067-75.

Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 1968; 69:599-609.

Ishikawa R, Tsujimura Y, Obata K, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. IgG-mediated systemic anaphylaxis to protein antigen can be induced even under conditions of limited amounts of antibody and antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 402(4):742-6.

Ishizaka K, Ishizaka T. Human reaginic antibodies and immunoglobulin E. *J Allergy*. 1968; 42(6):330-63.

Jeebhay MF, Robins TG, Lehrer SB, Lopata AL: Occupational seafood allergy: a review. *Occup Environ Med*. 2001; 58: 553-62.

Kawakami K. Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases. *J. Infect. Chemother*. 2003; 9: 201-9.

Kim SS, Park HS, Kim HY, Lee SK, Nahm DH. Anaphylaxis caused by the new ant, *Pachycondyla chinensis*: demonstration of specific IgE and IgE-binding components. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107(6):1095-9.

Klotz JH, Klotz SA, Pinnas JL. Animal bites and stings with anaphylactic potential. *J Emerg Med*. 2009; 36(2):148-56.

Koch M, Witzernath M, Reuter C, Herma M, Schütte H, Suttorp N, Collins H, Kaufmann SH. Role of local pulmonary IFN-gamma expression in murine allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 35(2):211-9.

Komegae EN, Grund LZ, Lopes-Ferreira M, Lima C. Crucial commitment of proteolytic activity of a major toxin from *Thalassophryne nattereri* fish venom to the generation of specific survival niches for long-lived antibody-secreting cells. *Immunobiol*, 2012. *Submitted*.

Kuipers H, Heirman C, Hijdra D, Muskens F, Willart M, van Meirvenne S, Thielemans K, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Dendritic cells retrovirally overexpressing IL-12 induce strong Th1 responses to inhaled antigen in the lung but fail to revert established Th2 sensitization. *J Leuk Biol.* 2004; 5: 1028-38.

Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Jones H, Umland SP, Kreutner W, Egan RW, Chapman RW. Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995; 12:404-9.

Kweon MN, Yamamoto M, Kajiki M, Takahashi I, Kiyono H. Systemically derived large intestinal CD4(+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. *J Clin Invest.* 2000; 106: 199–206.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-5.

Lagranderie M, Abolhassani M, Vanoirbeek J, Lima C, Balazuc AM, Huerre M, Vargaftig BB, Marchal G. Mycobacterium bovis BCG killed by extended freeze-drying targeted plasmacytoid dendritic cells to regulate lung inflammation. *J Immunol.* 2010;15; 184(2):1062-70.

Leung PS, Lee YS, Tang CY, Kung WY, Chuang YH, Chiang BL, Fung MC, Chu KH. Induction of shrimp tropomyosin-specific hypersensitivity in mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008; 147(4):305-14.

Lewkowich IP, Day SB, Ledford JR, Zhou P, Dienger K, Wills-Karp M, Page K. Protease-activated receptor 2 activation of myeloid dendritic cells regulates allergic airway inflammation. *Respir Res.* 2011;21:12-22.

Li X M, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103:206–14.

Li, X. M.; Serebrisky, D.; Lee, S.Y.; Huang, C.K.; Bardina, L.; Schofield, B.H.; Stanley, J.S.; Burks, A.W.; Bannon, G.A.; Sampson, H.A. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106:150–8.

Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'shea JJ. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 15137-42.

Lima C, Clissa PB, Piran-Soares AA, Tanjoni I, Moura-Da-Silva AM, Lopes-Ferreira M. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon*. 2003; 42: 499-507.

Liu L, Jarjour NN, Busse WW, Kelly EA: Enhanced generation of helper T type 1 and 2 chemokines in allergen-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 169:1118-24.

Liu LY, Mathur SK, Sedgwick JB, Jarjour NN, Busse WW, Kelly EA: Human airway and peripheral blood eosinophils enhance Th1 and Th2 cytokine secretion. *Allergy*. 2006; 61:589-97.

Lopes-Ferreira M, Bárbaro KC, Cardoso DF, Moura-Da-Silva AM, Mota I. *T. nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*, 1998 a; 36:405-10.

Lopes-Ferreira M, Emim JAS, Oliveira V, Puzer L, Cezari MH, Araújo MS, Juliano L, Lapa AJ, Souccar C, Moura-Da-Silva AA. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Bioch Pharmacol*. 2004. 68: 2151-57.

Lopes-Ferreira M, Emim JAS, Souccar C, Lapa AJ, Cezari MHS, Juliano L, Moura-Da-Silva AM, Mota I. Characterization of the nociceptive and edematogenic activities of the *T. nattereri* fish venom. *Toxicon*. 1998 b; 36:1304-08.

Lopes-Ferreira M, Moura-Da-Silva AM, Mota I, Takehara HA. Neutralization of *T. nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. *Toxicon*. 2000; 38:1149-56.

Lopes-Ferreira M, Moura-Da-Silva AM, Piran-Soares AA, Ângulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Farsky SHP. Hemostatic effects induced by *T. nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. *Toxicon*. 2002;40: 1141-47.

Lopes-Ferreira M, Núñez N, Rucavado A, Farsky SH, Lomonte B, Angulo Y, Moura-Da-Silva A M, Gutiérrez JM. Necrosis induced by *thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in murine skeletal muscle: a novel tool to study muscle degeneration and regeneration. *International J. Exp. Pathol*. 2001; 82: 55-64.

Macdowell AL, Peters SP. Neutrophils in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007; 7(6):464-8.

Magalhães GS, Lopes-Ferreira M, Junqueira De Azevedo IMJ, Spencer PJ, Araujo MS, Portaro FCV, Ma L, Valente RH, Juliano L, Fox JW, Ho PL, Moura-Da-Silva AM. Natterins, a new class of protein with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochimie*. 2005; 87: 687-99.

Magalhães KW, Lima C, Piran-Soares AA, Marques EE, Hiruma-Lima CA, Lopes-Ferreira M. Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. orbignyi*. *Toxicon*. 2006; 47: 575-83.

Mancardi DA, Iannascoli B, Hoos S, England P, Daëron M, Bruhns P: FcγRIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcεRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J Clin Invest* 2008, 118:3738-50.

Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2:323–35.

Martin TR, Ando A, Takeishi T, Katona IM, Drazen JM, Galli SJ. Mast cells contribute to the changes in heart rate, but not hypotension or death, associated with active anaphylaxis in mice. *J Immunol.* 1993;151(1):367-76.

Mazuc E, Villoutreix BO, Malbec O, Roumier T, Fleury S, Leonetti JP, Dombrowicz D, Daëron M, Martineau P, Dariavach P. A novel druglike spleen tyrosine kinase binder prevents anaphylactic shock when administered orally. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 1:188-94.

McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, Freeman GJ, Umetsu DT, Dekruyff RH. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat. Immunol.* 2001; 2:1109-16.

McKee A S, Munks M W, MacLeod MKL, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, Marrack P. Alum Induces Innate Immune Responses through Macrophage and Mast Cell Sensors, But These Sensors Are Not Required for Alum to Act As an Adjuvant for Specific Immunity. *J Immunol.* 2009; 183(7): 4403-14.

Meyts I, Hellings PW, Hens G, Vanaudenaerde BM, Verbinnen B, Heremans H, Matthys P, Bullens DM, Overbergh L, Mathieu C, De Boeck K, Ceuppens JL. IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma. *J Immunol.* 2006; 177(9):6460-70.

Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and FcγRIII. *J Clin Invest.* 1997;99:901-14.

Monteiro HSA, Bezerra GP, Facó PEG, Havt A, Siva-Jr GB. Epidemiologia dos acidentes pelo peixe Niquim (*T. nattereri*) no estado do Ceará no período de 1992 a 2002, - XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p.11, 2003.

Morgan RK, McAllister B, Cross L, Green DS, Kornfeld H, Center DM. Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3+ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model. *J Immunol.* 2007; 178: 8081–9.

Mota I, Wong D. "Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization." *Life Sci.* 1969; 8(16): 813-20.

Mould AW, Matthaehi KI, Young IG, Foster PS. Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice. *J Clin Invest.* 1997;99:1064-71.

Mustafa FB, Ng FS, Nguyen TH, Lim LH. Honeybee venom secretory phospholipase A2 induces leukotriene production but not histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol.* 2008; 151(1):94-100.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(10):679-91.

Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med.* 2002; 8:567-73.

Nieuwenhuizen N, Lopata AL, Jeebhay MF, Herbert DR, Robins TG, Brombacher F. Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117(5):1098-105.

Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen J M, Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature.* 1994; 370:367-70.

Ovary Z. "Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse." *J Immunol.* 1958;81(4):355-7.

Palframan RT, Collins PD, Willhians TJ, Rankin SM. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood.* 1998; 91:2240-48.

Pareja-Santos A, Saraiva TC, Costa EP, Santos MF, Zorn TT, Souza VM, Lopes-Ferreira M, Lima C. Delayed local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. *Int J Exp Pathol.* 2009; 90(1):34-43.

Parsons M.E., Ganellin C.R. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* 2006; 147:127–35.

Pereira-Santos MC, Baptista AP, Melo A, Alves RR, Soares RS, Pedro E, Pereira-Barbosa M, Victorino RM, Sousa AE. Expansion of circulating Foxp3+D25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2008; 2:291-7.

Phillips C, Coward WR, Pritchard DI, Hewitt CR. Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites. *J Leukoc Biol.* 2003;73(1):165-71.

Piancatelli D, Bellotta L, Del Beato T, Duse M, Della Penna MR. Total IL-12 levels are increased in paediatric atopic dermatitis: correlations with age and disease severity. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008. 21(2):359-65.

Pinckard N, Farr RS, Hanahan DJ. Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) Released In Vivo during IgE anaphylaxis with PAF released In Vitro from IgE sensitized basophils. *J Immunol.* 1979; 123(4):1847-57.

Piran-Soares AA, Komegae EN, Oliveira Souza VM, Fonseca LA, Lima C, Lopes-Ferreira M. Neutralizing antibodies obtained in a persistent immune response are effective against deleterious effects induced by the *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Toxicon.* 2007; 49:920–30.

Portier, Richet C. Action anaphylachque dès quelques venins. *CR Soc Biol.* 1902; 54:170-2.

Prescott RA, Potter PC. Hypersensitivity to airborne spitting cobra snake venom. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005; 94(5):600-3.

Reimers AR, Weber M, Müller UR. Are anaphylactic reactions to snake bites immunoglobulin E-mediated? *Clin Exp Allergy.* 2000; 30(2):276-82.

Ring J, Behrendt H, de Weck A. History and classification of anaphylaxis. *Chem Immunol Allergy.* 2010; 95:1-11.

Rodriguez N, F Fend, L Jennen, M Schiemann, N Wantia, CU Prazeres da Costa, S Dürr, U Heinzmann, H Wagner, T Miethke. Polymorphonuclear neutrophils improve replication of *Chlamydia pneumoniae* in vivo upon MyD88-dependent attraction. *J. Immunol.* 2005; 174: 4836–44.

Russell FE. *Poisonous Marine Animals.* New York: TFH Publications, 1971.

Sampson H A, Muñoz-Furlong A, Campbell R L, Adkinson NF Jr, Bock SA, Branum A, Brown SG, Camargo CA Jr, Cydulka R, Galli SJ, Gidudu J, Gruchalla RS, Harlor AD Jr., Hepner DL, Lewis LM, Lieberman PL, Metcalfe DD, O'Connor R, Muraro A, Rudman A, Schmitt C, Scherrer D, Simons FE, Thomas S, Wood JP, Decker W W. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report-second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *Ann Emerg Med.* 2006; 47(4):373-80.

Schleimer RP, Mac Glashan DW, Peters SP, Pinckard RN, Adkinson NF, Lichtenstein LM. Characterization of inflammatory mediator release from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133:614-7.

Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Bridts CH, Stevens WJ. Wasp venom immunotherapy induces a shift from IL-4-producing towards interferon-gamma-producing CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Clin Exp Allergy.* 2001; 31(5):740-6.

Schulz O, Laing P, Sewell HF, Shakib F. Der p I, a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23). *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 3191-94.

Sergejeva S, Ivanov S, Lotvall J, Linden A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(3):248-53.

Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2010. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 127(2):326-35.

Simons FE; World Allergy Organization. World Allergy Organization survey on global availability of essentials for the assessment and management of anaphylaxis by allergy-immunology specialists in health care settings. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010 May;104(5):405-12.

Stone KD, C Prussin, DD Metcalfe. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125:73–80.

Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(4):658-68.

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000; 100: 655-69.

Tada T, K Okumura, B Platteau, A Beckers, H Bazin. Half-lives of two types of rat homocytotropic antibodies in circulation and in the skin. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1975; 48:116–31.

Tai HY, Tam MF, Chou H, Peng HJ, Su SN, Perng DW, Shen HD. Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occluding protein of human lung epithelial cells. *Allergy.* 2006; 61(3):382-8.

Takeishi T, Martin TR, Katona IM, Finkelman FD, Galli SJ. Differences in the expression of the cardiopulmonary alterations associated with anti-immunoglobulin E-induced or active anaphylaxis in mast cell-deficient and normal mice. Mast cells are not required for the cardiopulmonary changes associated with certain fatal anaphylactic responses. *J Clin Invest.* 1991; 88(2):598-608.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4.

Von Hertzen L, Klaukka T, Mattila H, Haahtela T. Mycobacterium tuberculosis infection and the subsequent development of asthma and allergic conditions. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 6: 1211-4.

Wan H, Winton HL, Soeller C, Gruenert DC, Thompson PJ, Cannell MB, Stewart GA, Garrod DR, Robinson C. Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics following exposure of epithelial cells to house dust mite allergen Der p 1. *Clin Exp Allergy.* 2000;30(5):685-98.

Wang M, Takeda K, Shiraishi Y, Okamoto M, Dakhama A, Joetham A, Gelfand EW. Peanut-induced intestinal allergy is mediated through a mast cell–IgE–FcεRI–IL-13 pathway. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(2):306-16.

Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 267–285.

Weytjens K, Cartier A, Malo JL, Chretien P, Essiembre F, Lehrer S, Swanson M: Aerosolized snow-crab allergens in a processing facility. *Allergy* 1999; 54: 892–3.

Winbery SL, Lieberman PL. Histamine and antihistamines in anaphylaxis. *Clin. Allergy Immunol.* 2002; 17:287–317.

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

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

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

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