Rafael Bonamichi dos Santos

Bloqueio da molécula PD-L1 na hipersensibilidade imediata em modelo murino

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Francisco Giavina-Bianchi Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Mariana Concepcion Castells Guitart

São Paulo - SP 2019

Rafael Bonamichi dos Santos

Bloqueio da molécula PD-L1 na hipersensibilidade imediata em modelo murino

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Francisco Giavina-Bianchi Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Mariana Concepcion Castells Guitart

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP

São Paulo - SP 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

```
Santos, Rafael Bonamichi dos
Bloqueio da molécula PD-L1 na hipersensibilidade
imediata em modelo murino / Rafael Bonamichi dos
Santos. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientador: Pedro Francisco Giavina-Bianchi
Junior.
Coorientadora: Mariana Concepcion Castells
Guitart.
Descritores: 1.Mastócitos 2.Antígeno B7-H1
3.Anafilaxia 4.Muridae 5.Hipersensibilidade
6.Imunoglobulina E 7.Imunoglobulina G
USP/FM/DBD-208/19
```

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese à minha mãe, Dalva, por todo amor, esforço e sacrifício empenhados para que eu conquistasse meus objetivos.

Ao meu pai, Lázaro,

por ser meu exemplo de ética e determinação.

À minha amada esposa, Beatriz, quem sempre me fez acreditar que todos meus sonhos estão ao meu alcance.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Pedro Giavina-Bianchi, exemplo como médico, pesquisador e ser humano. Por todos os ensinamentos e exemplos transmitidos eu serei eternamente grato.

À minha coorientadora, Professora Mariana Castells, por me acolher em seu laboratório fornecendo toda a estrutura para a realização do estudo, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissional.

A Professora Wilma Carvalho Neves Forte, por todo carinho e suporte dedicados à minha formação em Alergia e Imunologia pela Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Às minhas irmãs, Renata e Raquel, meus cunhados e sobrinhos que sempre me apoiaram.

Aos meus sogros, Lurdes e Luiz, pelo suporte ao longo desta jornada.

Aos amigos, Dr. Marcelo Aun, Dra. Rosana Agondi e Dr. Abílio Motta, que muito me ensinaram ao longo desta jornada.

Aos colegas do Serviço de Imunologia, que muito me auxiliaram, permitindo-me uma formação mais completa como pesquisador.

Às amigas do LIM 20, Fernanda Arantes Costa e Fernanda Bruni, sem as quais nada teria se concretizado.

Aos Amigos Eleni Arruda, Serafim Fidalgo, Maurício Freitas, Osvaldo Junior, Rosana Coutinho, Sherwood Alexis e Marlen Garcia, sempre disponíveis para ajudar em qualquer questão.

Ao Gabriel Fagundes e a Suely Goldflus, pelo apoio e incentivo no meu aprimoramento científico.

A todos os professores que passaram pela minha trajetória escolar e acadêmica. Aos animais utilizados no presente estudo, tudo o meu respeito e gratidão.

Às entidades de fomento, Programa de Excelência Acadêmica da CAPES (PROEX) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

Santos RB. *Bloqueio da molécula PD-L1 na hipersensibilidade imediata em modelo murino* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: Os mastócitos atuam no sistema de defesa contra patógenos e no desenvolvimento de distúrbios alérgicos. Embora as respostas dependentes de IgE via FccRI nessas células tenham sido amplamente estudadas, pouco se sabe sobre como as moléculas de superfície celular, como o PD-1 e seus ligantes, que são expressas por mastócitos, células dendríticas e linfócitos T podem modular a reação alérgica. O presente estudo analisou os efeitos do bloqueio da molécula PD-L1 em um modelo murino de anafilaxia cutânea. MÉTODOS: Camundongos C57BL/6 foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina segundo protocolo que teve duração de 28 dias. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 14 e 28 para dosagem de IgE, IgG1 e IgG2a específicos. Os camundongos foram divididos em 9 grupos. Desses grupos, 6 foram desafiados com a técnica de anafilaxia cutânea ativa. Dos seis grupos, um grupo recebeu por via subcutânea 50 µl de tampão fosfato-salino e os outros 5 grupos foram sensibilizados por via subcutânea com 50 µg de ovalbumina, 1 vez por semana, durante quatro semanas. Desses 5 grupos sensibilizados à ovalbumina, o primeiro grupo recebeu anticorpo anti-PD-L1 e o segundo recebeu o isotipo do anticorpo anti-PD-L1 durante a sensibilização, o terceiro recebeu anticorpo anti-PD-L1 e o quarto recebeu o isotipo do anticorpo anti-PD-L1 durante o desafio e o quinto grupo foi o grupo controle. Esses 6 grupos desafiados com a técnica de anafilaxia cutânea ativa foram provocados na orelha com injeção subcutânea de 10 μ l de ovalbumina a 5 μ g/ μ l, além de receberem 200 μ l de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 20 minutos, os animais foram sacrificados e a reação foi avaliada pelo extravasamento de azul de Evans (mensurado por espectrofotometria) e análise histológica dos fragmentos coletados. Os 3 grupos de camundongos restantes foram destinados para o desafio com a técnica de anafilaxia cutânea passiva, sendo sensibilizados com soro de camundongos previamente sensibilizados à ovalbumina em diferentes diluições (1/40, 1/80, 1/160 e 1/320). Desses 3 grupos, o primeiro grupo recebeu anticorpo anti-PD-L1, o segundo recebeu o isotipo do anticorpo anti-PD-L1 e o terceiro foi o grupo controle. Azul de Evans 200 µl 0,25% e 10 µl do alérgeno ovalbumina a 5 µg/µl foram injetados por via intravenosa. Após 20 minutos, os animais foram sacrificados e a reação foi avaliada pelo extravasamento de azul de Evans e análise histológica de fragmentos coletados. RESULTADOS: Os níveis séricos de IgE e IgG1 específicas foram significativamente maiores, nos dias 14 e 28 no grupo controle positivo, não tratado com anticorpos, e isotipo anti-PD-L1 do que no grupo que recebeu anti-PD-L1 durante a sensibilização. Houve redução significativa no extravasamento de azul Evans no grupo que recebeu anti-PD-L1 durante a sensibilização quando comparado ao controle positivo e ao grupo isotipo anti-PD-L1. Não houve variação significativa entre os grupos nos experimentos de anafilaxia cutânea passiva. **CONCLUSÃO:** O bloqueio da molécula PD-L1 durante a sensibilização com alérgeno inibe a síntese de IgE e a IgG1 específicas e diminui a resposta alérgica.

Descritores: Mastócitos; Antígeno B7-H1; Anafilaxia; Muridae; Hipersensibilidade; Imunoglobulina E; Imunoglobulina G.

Summary

Santos RB. *PD-L1 protein inhibition in a murine model of immediate hypersensitivity* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

INTRODUCTION: Mast cells are an important part of the innate immunity system and participate in the defense against pathogens, but are also involved in the development of allergic disorders. Although IgE-dependent immune responses via FccRI have been extensively studied, it is not know if immediate hypersensitivity can be modulated by surface molecules such as PD-1 and its ligand PD-L1, which are expressed on mast cells, dendritic cells and T lymphocytes and have been shown to have an inhibitory role in cancer. The present study assessed the effects of PD-L1 blockage in a murine model of cutaneous anaphylaxis. METHODS: C57BL/6 mice were sensitized and challenged with ovalbumin according to a protocol that lasted 28 days. Blood samples were collected on days 0, 14 and 28 for IgE, IgG1 and IgG2a measurements. Mice were divided into 9 groups, with 5 mice per group. Of these groups, 6 were challenged through an active cutaneous anaphylaxis protocol. Of the six groups, one group received 50 µl phosphatesaline buffer subcutaneously and the other 5 groups were sensitized subcutaneously with 50 µg ovalbumin once weekly for four weeks. Of these 5 groups sensitized to ovalbumin, the first and second groups received anti-PD-L1 antibody or isotype control during sensitization, the third and fourth received anti-PD-L1 antibody or isotope control during challenge, the fifth group was the positive control group sensitized and challenge to ovalbumin and the sixth group was the negative control group that was not sensitized to ovalbumin but it was challenged to ovalbumin. These 6 groups underwent active cutaneous anaphylaxis protocols and were challenged in the ear with subcutaneous injections of 10 µl of 5 µg/µl Ovalbumin and Evans blue, 200 µl, 0.025%, was administered intravenously. After 20 minutes, the animals were sacrificed and the allergic reaction was evaluated by Evans blue extravasation (measured by spectrophotometry) and histological analysis of the fragments collected. The remaining 3 groups were assigned to the passive cutaneous anaphylaxis protocol, where mice were sensitized with serum from previously sensitized animals to ovalbumin at different dilutions (1/40, 1/80, 1/160 and 1/320). Of these 3 groups, the first and second group received anti-PD-L1 antibody and anti-PD-L1 antibody isotype, respectively, during challenge and the third was the positive control group (please explain the positive control). Evans blue 200 µl 0.25% and 10 μ l of ovalbumin allergen at 5 μ g/ μ l were injected intravenously. After 20 minutes, the animals were sacrificed and the reaction was evaluated by Evans blue extravasation and histological analysis of collected fragments. RESULTS: Specific serum IgE and IgG1 levels were significantly higher on days 14 and 28 in the positive control and anti-PD-L1 isotype groups than in the group that received anti-PD-L1 during sensitization. There was a significant reduction in the extravasation of Evans blue in the group that received anti-PD-L1 during sensitization when compared to both the positive control and anti-PD-L1 isotype groups. In contrast subcutaneous challenge with allergen on the animals back in the passive anaphylaxis protocol did not show statistically significant differences between the groups indicating that PD-L1 modulation of the sensitization phase could account for the differences seen during active anaphylaxis. **CONCLUSION:** Blocking of the PD-L1 molecule during allergen sensitization inhibits specific IgE and IgG1 synthesis and decreases the allergic response.

Descriptors: Mast cells; B7-H1 antigen; Anaphylaxis; Muridae; Hypersensitivity; Immunoglobulin E; Immunoglobulin G.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Lista de siglas

| ACA | Anafilaxia cutânea ativa |
|-------|------------------------------------|
| AHR | Hiperresponsividade brônquica |
| CAE | Cloro-acetato-esterase |
| Der p | Dermatophagoides pteronyssinus |
| IV | Intravenoso |
| ILC2 | Células linfóides inatas de tipo 2 |
| μg | Micrograma |
| μl | Microlitro |
| mm | Milímetro |
| OVA | Ovalbumina |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PCA | Anafilaxia cutânea passiva |
| PD-1 | Programmed Cell Death 1 |
| PD-L1 | Programmed Cell Death Ligand 1 |
| S.C | Subcutâneo |
| Th0 | Linfócito T helper 0 |
| Th1 | Linfócito T helper 1 |
| | |

- Th1 Linfócito T helper 2
- Th17 Linfócito T helper 17

Lista de figuras

| Figura 1 Checkpoint pathway: Moléculas expressas na superfície celular que participam |
|--|
| da regulação do sistema imunológico11 |
| Figura 2 - Linha do tempo do grupo controle negativo |
| Figura 3 - Linha do tempo do grupo Dermatophagoides pteronyssinus |
| Figura 4 - Linha do tempo do grupo Ovalbumina |
| Figura 5 - Linha do tempo do grupo controle negativo |
| Figura 6 - Linha do tempo do grupo controle positivo |
| Figura 7 - Linha do tempo do grupo anti-PD-L1 durante sensibilização |
| Figura 8 - Linha do tempo do grupo Isotipo anti-PD-L1 durante sensibilização |
| Figura 9 - Linha do tempo do grupo anti-PD-L1 durante provocação 29 |
| Figura 10 - Linha do tempo do grupo isotipo anti-PD-L1 durante provocação |
| Figura 11 - Linha do tempo do grupo anafilaxia cutânea passiva (Controle Positivo). 30 |
| Figura 12 - Linha do tempo grupo anti-PD-L1 em anafilaxia cutânea passiva |
| Figura 13 - Linha do tempo do grupo isotipo anti-PD-L1 em anafilaxia cutânea passiva |
| |
| Figura 14 - Técnica de anafilaxia cutânea ativa: Injeção intradérmica na orelha com |
| alérgeno diluído em PBS 33 |
| Figura 15 - Leitura da reação foi feita 10 minutos após o desafio com os respectivos |
| alérgenos |
| Figura 16 - Anafilaxia cutânea ativa no grupo de camundongos sensibilizado à |
| Dermatophagoides pteronyssinus (Der p) |
| Figura 17 - Anafilaxia cutânea ativa no grupo de camundongos sensibilizado à |
| ovalbumina (OVA) |

Figura 18 - Anafilaxia cutânea ativa no grupo de camundongos injetado com 50 µl de tampão fosfato-salino (PBS) por via subcutânea uma vez por semana...... 40 Figura 19 - Nível sérico de IgG1 para Dermatophagoides pteronyssinus (Der p) nos dias Figura 20 - Nível sérico de IgG1 para Ovalbumina (OVA) nos dias 0, 14 e 28 41 Figura 21 - Nível sérico de IgG2a para Dermatophagoides pteronyssinus (Der p) nos dias Figura 22 - Nível sérico de IgG2a para Ovalbumina (OVA) nos dias 0, 14 e 28 42 Figura 25- Absorbância do extravasamento de azul de Evans na anafilaxia cutânea ativa dos grupos controle negativo, controle positivo, anti-PD-L1 durante sensibilização, anti-PD-L1 durante provocação, isotipo PD-L1 durante sensibilização e isotipo anti-Figura 26 - Absorbância do extravasamento de azul de Evans na anafilaxia cutânea Figura 27 - Absorbância do extravasamento de azul de Evans na anafilaxia cutânea passiva utilizando soro diluído em PBS 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 nos grupos controle Figura 28 - Valores de IgE específica sérica nos grupos controle negativo, controle positivo, anti-PD-L1 durante sensibilização e isotipo anti-PD-L1 durante sensibilização, nos dias 0, 14 e 28 do protocolo de sensibilização. 49 Figura 29 - Valores de IgG1 sérica nos grupos controle negativo, controle positivo, anti-PD-L1 durante sensibilização, isotipo anti-PD-L1 durante os dias 0, 14 e 28 da

| Figu | ura 30 - Valores de IgG2a sérica nos grupos controle negativo, controle positivo, a | nti- |
|------|--|------|
| | PD-L1 durante sensibilização, isotipo anti-PD-L1 durante os dias 0, 14 e 28 | da |
| | sensibilização | 51 |

| Figura 32 - Análise histológica com a contagem do número de mastócitos nos g | rupos |
|--|-------|
| controle negativo, controle positivo, anti-PD-L1 durante sensibilização e is | otipo |
| anti-PD-L1 durante sensibilização | 53 |
| Figura 33 - Papel dos receptores PD e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 | 57 |

Lista de tabelas

| Tabela 1 - Grupos experimentais conforme substâncias e técnicas utilizadas |
|--|
|--|

| Lista de siglas | 10 |
|--|----|
| Lista de figuras | 11 |
| Lista de tabelas | 14 |
| Sumário | 15 |
| 1. INTRODUÇÃO | |
| 1.1 Mastócitos e IgE | 2 |
| 1.2 Fisiopatologia da doença alérgica mediada pela IgE | 3 |
| 1.3 IgE e mastócitos medeiam a resposta de hipersensibilidade imediata | 5 |
| 1.4 Síndromes clínicas da resposta de hipersensibilidade imediata | 6 |
| 1.5 Modelos murinos de anafilaxia | 7 |
| 1.6 Moléculas PD-1 e PD-L1 | 10 |
| 1.7 Aplicações terapêuticas das moléculas PD-1 e PD-L1 | 13 |
| 2. PERGUNTA DO ESTUDO | |
| 3. OBJETIVO | 16 |
| 3.1 Objetivo geral | 17 |
| 3.2 Objetivos específicos | 17 |
| 4. MÉTODOS | |
| 4.1 Animais | 19 |
| 4.2 Alérgeno | 20 |
| 4.3 Anticorpo monoclonal | 21 |
| 4.4 Protocolo de sensibilização | 21 |
| 4.4.1 Desenvolvimento do Modelo de Anafilaxia Cutânea Ativa | 21 |
| 4.4.1.1 Grupo controle negativo | 22 |
| 4.4.1.2 Grupo Dermatophagoides pteronyssinus | 23 |
| 4.4.1.3 Grupo Ovalbumina | 23 |
| 4.4.2 Bloqueio da Proteína PD-L1 em Modelo de Anafilaxia Cutânea Ativa | 24 |
| 4.4.2.1 Grupo controle negativo | 25 |
| 4.4.2.2 Grupo controle positivo | 26 |
| 4.4.2.3 Grupo anti-PD-L1 durante sensibilização | 27 |
| 4.4.2.4 Grupo Isotipo anti-PD-L1 durante sensibilização | 27 |
| 4.4.2.5 Grupo anti-PD-L1 durante provocação | 28 |
| 4.4.2.6 Grupo isotipo anti-PD-L1 durante provocação | 29 |

Sumário

| 4.4.2.7 Grupo anafilaxia cutânea passiva (controle positivo) |
|---|
| 4.4.2.8 Grupo anti-PD-L1 em anafilaxia cutânea passiva |
| 4.4.2.9 Grupo isotipo anti-PD-L1 em anafilaxia cutânea passiva |
| 4.5 Reação de anafilaxia cutânea ativa32 |
| 4.6 Reação de anafilaxia cutânea passiva33 |
| 4.7 Dosagem de anticorpo33 |
| 4.8 Análise histológica: Coloração e quantificação de mastócitos |
| 4.9 Análise estatística |
| 5. RESULTADOS |
| 5.1 Resultados obtidos durante o desenvolvimento do Modelo de Anafilaxia Cutânea Ativa 37 |
| 5.1.1 Anafilaxia cutânea ativa: Dermatophagoides pteronyssinus e Ovalbumina |
| 5.1.2 Anticorpos IgG1 e IgG2a: Dermatophagoides pteronyssinus e Ovalbumina40 |
| |
| 5.1.3 Histologia: <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> e Ovalbumina43 |
| 5.2 Resultados obtidos durante bloqueio da Proteína PD-L1 em Modelo de Anafilaxia Cutânea |
| Ativa |
| 5.2.1 Anafilaxia cutânea ativa com bloqueio da proteína PD-L144 |
| 5.2.2 Anafilaxia cutânea passiva com bloqueio da proteína PD-L146 |
| 5.2.3 Anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a com bloqueio da Proteína PD-L1 |
| 5.2.4 Histologia com bloqueio da Proteína PD-L151 |
| 6. DISCUSSÃO |
| Neste estudo nós demonstramos que o tratamento com anti-PD-L1 durante a |
| sensibilização, mas não durante a fase efetora, diminuiu a produção de IgE e IgG1 específicas |
| para OVA e diminuiu a desgranulação de mastócito e o extravasamento vascular no local da |
| provocação |
| 7. CONCLUSÃO 60 |
| 8. ANEXOS |
| 9. REFERÊNCIAS |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mastócitos e IgE

Os mastócitos, também conhecidos como células efetoras da reação de hipersensibilidade imediata, são abundantemente encontrados em tecidos que fazem barreira com o ambiente externo, como a pele ou as mucosas dos tratos respiratório e gastrointestinal. Essas células foram descritas pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1878 (1). Ele observou que os grânulos citoplasmáticos dos mastócitos se coravam em roxo com o corante azul de anilina básico e denominou o processo de metachromasia. Posteriormente, descobriu-se que o proteoglicano de heparina altamente sulfatado que está presente nesses grânulos se liga fortemente ao corante básico que, com a polimerização de suas moléculas, muda sua cor do azul para o carmesim (2). No entanto, as propriedades funcionais dos mastócitos permaneceram desconhecidas durante muito tempo. Dados recentes revelam uma grande complexidade de mastócitos com diferentes fenótipos associados a diferentes órgãos e com muitas moléculas de superfície com potencial para interações com células vizinhas no tecido mucoso e conectivo, que podem modular respostas ativadoras e inibitórias(3).

Quase um século após a descoberta do mastócito, seu importante papel na alergia foi confirmado. Esse conhecimento veio gradualmente pelos achados de vários estudos, como a descoberta da IgE pelo casal Ishizaka, em 1966, e dos receptores Fc de alta afinidade (FccRI) em mastócitos (4–6). A identificação da IgE foi gradualmente alcançada nos anos 60. A IgE humana foi visualizada pela primeira vez por precipitação da proteína com o anticorpo de coelho específico para a "reagina" humana (γ E) em gel de agarose e a banda de precipitação foi marcada com um antígeno radioativo da ambrósia americana (o método baseia-se no mesmo princípio do *Western Blot*, o qual é realizado atualmente)(4). Paralelamente, Johansson e Bennich, em 1967, relataram um caso atípico de proteína de mieloma expressa em grande quantidade e que não pertencia a nenhuma das quatro classes de Imunoglobulina conhecidas (IgA, IgD, IgG e IgM). O resultado de um estudo em colaboração identificou a proteína do mieloma como sendo a IgE, um isótipo distinto de imunoglobulina(7). Após tais descobertas, o receptor de IgE humana

(FcɛRI) foi identificado em mastócitos de macaco (4-7).

Outra importante descoberta para a melhor compreensão da reação de hipersensibilidade imediata foi a descoberta da histamina. Em 1953, foi relatado que os mastócitos de ratos liberavam histamina quando estimulados com o composto 48/80, que ficou conhecido como um liberador de histamina (8–10). Desde então, nosso conhecimento sobre o papel dos mastócitos nas doenças alérgicas que envolvem o mecanismo de hipersensibilidade imediata progrediu exponencialmente.

1.2 Fisiopatologia da doença alérgica mediada pela IgE

Por muito tempo considerou-se que o processo alérgico tem início com a célula apresentadora de antígeno que fagocita, processa e apresenta peptídeos antigênicos, através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II acompanhado por moléculas coestimuladoras e coinibitórias, para um linfócito precursor T auxiliar 0 (T *helper* 0 - Th0) (11,12). Dependendo da natureza alergênica e quantidade do antígeno, a porta de entrada e do ambiente de citocinas presente, este linfócito Th0 se diferencia em um linfócito Th2, produzindo principalmente IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 também promove retroalimentação positiva para a via Th2 e suprime a via Th1 (11).

No entanto, recentemente, a nomenclatura do processo inflamatório na alergia evoluiu para além do conceito original de Th2, ao reconhecer que as citocinas associadas à polarização de linfócitos T helper 2 (Th2) são largamente secretadas por outras células

INTRODUÇÃO

além da população de células Th2 originalmente descrita. Estas incluem células T invariantes, células *natural killer* (NK), células progenitoras de eosinófilos/basófilos, células Th1 sob certas condições (13), e células linfóides inatas de tipo 2 (ILC2s) (14). As ILC2s fazem parte do sistema imunológico inato, onde a interação e o reconhecimento do antígeno não são necessários para desencadear a secreção de citocinas tipo 2. Firmemente reguladas, as ILC2s são parte integrante da imunidade da barreira epitelial, envolvida na fisiopatologia da asma (15), na dermatite atópica (16) e na alergia alimentar (17).

Sem alteração, o conceito que a IL-4 e a IL-13 induzem a mudança do isótipo da imunoglobulina de M para E no linfócito B, se mantém (12). A troca de isótipo de Ig exige três sinais (11,12,18). O primeiro sinal é a apresentação do antígeno ao linfócito T pela célula dentrítica(12). O estímulo das interleucinas 4 e 13 compõem o segundo sinal para a indução da troca do isótipo IgM para IgE (12). O terceiro sinal é dado pela ligação das moléculas coestimulatórias CD40 da superfície das células B ao seu ligante, o CD40L, na membrana das células T (12). Estes estímulos ativam a recombinação do DNA, promovendo a troca da IgM pela IgE (12). Evidências mostram que a produção de IgE específica para o antígeno ocorre principalmente em centros germinativos linfáticos, mas as células B produtoras de IgE, que sofrem seleção clonal e maturação da afinidade, também podem ser geradas na mucosa respiratória e trato gastrointestinal (19,20). Portanto, a IgE pode ser produzida localmente por células B no tecido linfoide associado ao intestino ou às vias aéreas, bem como nos linfonodos dos indivíduos com doença atópica respiratória, ou alergia alimentar (19–21).

O anticorpo IgE produzido em respostas ao alérgeno se liga a seus receptores de alta afinidade FccRI na superfície dos mastócitos e basófilos. O FccRI é constituído por uma cadeia α com dois domínios extracelulares que se ligam à IgE; uma cadeia β que

INTRODUÇÃO

atravessa a membrana plasmática por quatro vezes e funciona como um amplificador de sinal; e duas cadeias γ idênticas, de localização predominantemente intracelular, que promovem a ativação celular (22,23). Os "motifs" de sinalização desta forma $\alpha\beta\gamma\gamma$ do receptor FccRI consistem os três "immunoreceptor tyrosine-based activation motifs", um na cadeia β e um em cada uma das cadeias γ (23). Duas moléculas de IgE ligadas a receptores FccRI reconhecem o alérgenos e desencadeiam a ativação do mastócito e basófilo, dando início à fase imediata da reação de hipersensibilidade imediata (12).

1.3 IgE e mastócitos medeiam a resposta de hipersensibilidade imediata

Numa pessoa alérgica, cujos mastócitos de tecidos já possuem IgEs específicas ligadas a seus receptores FcɛRI, a reexposição ao antígeno original ou de reação cruzada, o qual seja bivalente ou multivalente, resulta na ligação cruzada de IgEs adjacentes e, consequentemente, leva a agregação de receptores FcɛRI na superfície celular (23–26). Quando a agregação de FcɛRI tem força e duração suficientes, desencadeia nos mastócitos eventos complexos de sinalização intracelular que, em última análise, resultam na desgranulação celular e secreção de diversos produtos biologicamente ativos (23–29).

Alguns mediadores, como os pré-formados armazenados nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos (histamina; serotonina; proteases como triptase, quimase e carboxipeptidase A3; proteoglicanos como heparina e/ou sulfatos de condroitina; e certas citocinas), bem como mediadores neoformados derivados do metabolismo dos fosfolípides da membrana citoplasmática (prostaglandina D2, leucotrieno B4, leucotrienos C4, leucotrieno D4 e leucotrieno E4), são liberados por mastócitos dentro de minutos após a exposição ao antígeno(24,26,29). Outros, incluindo um espectro

diversificado de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, são produzidos em mastócitos a partir da transcrição genética e, portanto, são secretados durante um período de horas após a ativação inicial do mastócito (24,26,29).

1.4 Síndromes clínicas da resposta de hipersensibilidade imediata

A reação de hipersensibilidade imediata é uma resposta imune mediada por IgE e mastócitos, envolvida em estados inflamatórios de pele e/ou mucosa (30). Utiliza-se o termo atopia quando coexiste uma predisposição genética a esse tipo de reação. Indivíduos atópicos são aqueles predispostos geneticamente a se sensibilizarem a antígenos comuns do meio ambiente, em geral proteínas, que não oferecem risco ao ser humano. Produzem IgE de modo rápido, contínuo e em grandes quantidades em resposta à exposição a esses alérgenos do meio ambiente, podendo apresentar durante sua vida vários tipos de manifestações clínicas (31). Os pacientes podem apresentar manifestações respiratórias, como asma e rinoconjuntivite, e manifestações cutâneas, como dermatite atópica. Durante a vida, o indivíduo atópico pode apresentar e desenvolver uma ou mais dessas doenças, de modo isolado ou associadas entre si.

A presença de anticorpos IgE é necessária, mas não é suficiente para a expressão da doença alérgica. O anticorpo IgE específico ao alérgeno pode ser detectável na pele ou no sangue, mas o paciente pode não ter tido sintomas alérgicos evidentes após a exposição alergênica. Alguns profissionais de saúde têm teste alérgico epicutâneo ("prick test") e/ou pesquisa de IgE sérica específica para látex positivos, mas não apresentam sintomas alérgicos quando expostos a luvas de látex (32).

Quando a reexposição ao alérgeno desencadeia uma reação alérgica, os efeitos são focalizados no sítio onde ocorre a desgranulação dos mastócitos (33). Na resposta

INTRODUÇÃO

imediata, os mediadores pré-formados liberados têm vida curta e, assim, seus potentes efeitos sobre os vasos sanguíneos e músculos lisos estão confinados às vizinhanças do mastócito ativado (33). Os efeitos continuados da resposta tardia também concentram-se no sítio de ativação inicial desencadeada pelo alérgeno e a anatomia particular desse local pode determinar a rapidez com que a inflamação é resolvida (33). Assim, a síndrome clínica produzida por uma reação alérgica depende crucialmente de três variáveis: a quantidade de anticorpos IgE alérgeno-específicos presente, a via pela qual o alérgeno é introduzido no organismo e a concentração de alérgeno (33).

A reação de hipersensibilidade imediata pode ocorrer com sinais e sintomas localizados, como na rinite e asma alérgicas, conjuntivite alérgica, dermatite atópica, urticária e angioedema, ou de forma sistêmica, como nas anafilaxias, com aumento da morbidade e mortalidade desses pacientes (30). Anafilaxia é uma reação sistêmica grave que pode levar a morte de maneira súbita (34). Nos Estados Unidos, a anafilaxia acomete 30 em cada 100.000 habitantes por ano, com mortalidade reportada de 1-2% (35). A incidência da anafilaxia vem aumentando nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, representando aumentos significativos nos custos do sistema de saúde (36).

1.5 Modelos murinos de anafilaxia

Por muitas razões, estudos de reações alérgicas sistêmicas em seres humanos não preenchem todos os requisitos dos comitês de ética. Portanto, os modelos animais são necessários para entender melhor os mecanismos fisiopatológicos e avaliar a segurança e a eficácia de novas terapias antes de se iniciarem ensaios clínicos em humanos. No entanto, o uso de animais experimentais em laboratórios de pesquisa também exige o cumprimento de preceitos éticos. Estes requisitos foram publicados pelos Institutos Nacionais de Saúde (NIH), os quais foram revisados há mais de 20 anos (Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório - NIH, publicação 85-23, revisada em 1985). Desde então, modelos experimentais que não atendam a esses requisitos não são aceitáveis (37).

A reação anafilática tem sido reproduzida e analisada em modelo murino pela praticidade na criação, procriação, manutenção, manipulação e disponibilidade destes animais, inclusive de modelos *knockouts* e transgênicos (38). Uma variedade de modelos animais foram desenvolvidos para estudar os mecanismos envolvidos na inflamação alérgica, incluindo modelos de asma alérgica, alergia alimentar, anafilaxia sistêmica e anafilaxia local (39–42). Nosso estudo utilizou a técnica de anafilaxia local, mais especificamente a técnica de anafilaxia cutânea ativa (ACA) para avaliar a reação inflamatória alérgica.

Coelhos e porquinhos-da-índia foram os primeiros modelos animais utilizados para testar reações de hipersensibilidade imediata e as respostas mais sensíveis foram geralmente observadas na orelha (43,44). O ensaio foi posteriormente validado para uso em ratos e camundongos (45,46). A administração de corante IV tem sido usada para medir respostas alérgicas localizadas em modelos animais há quase um século, com publicações que descrevem esta técnica que remontam à 1920 (43). Historicamente, uma variedade de métodos experimentais foram utilizados, incluindo injeção de antígeno antes da injeção de corante, injeção de corante antes da injeção de antígeno e injeção simultânea de corante e antígeno (42). A administração de corante intravenoso (IV) como marcador da resposta alérgica é um ensaio versátil, pois pode ser usado para medir reações passivas e ativas de reação anafilática (43,47). Numerosos corantes foram utilizados para avaliar respostas alérgicas, incluindo *Trypan Blue*, *Pontamine Sky Blue*, *Evans Blue*, *Geigy Blue* 536 e India Ink (43,44,47).

A resposta anafilática ao desafio é transitória; a intensidade máxima é alcançada dentro de 10 a 15 min da injeção de corante e nenhuma reação é visível se o corante for administrado mais de 30 minutos após o desafio, independentemente das espécies animais usadas (42). A quantificação do extravasamento de corantes foi originalmente obtida medindo-se o tamanho da pápula formada pela reação inflamatória alérgica (45,47). As técnicas espectrofotométricas para medir o extravasamento de corantes no tecido foram desenvolvidas para os modelos murinos de anafilaxia cutânea passiva (PCA) na década de 1990 (48,49).

A desgranulação de mastócitos também é frequentemente usada como marcador para respostas alérgicas cutâneas. A quantificação dos mastócitos pode ser realizada com técnicas de coloração como com o cloro-acetato-esterase (CAE) ou o azul de toluidina, ou por imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD-117 (45).

Em camundongos, o alérgeno pode desgranular o mastócito e basófilos por duas vias, a denominada via clássica dependente de IgE, de mastócitos e basófilos e principalmente de histamina e a via alternativa mediada por IgG do subtipo IgG1 através da ativação de receptores de baixa afinidade FcγRIII presentes em macrófagos, basófilos e mastócito e tem como mediador principal o fator adivador de plaquetas (PAF) (50,51). Vale ressaltar que diferente da via clássica onde a indução de anafilaxia ocorre através de células sensibilizadas com IgE ligada à receptores específicos presentes na membrana dessas células, a anafilaxia induzida por IgG1 exige a formação de imuno-complexos seguido de posterior ligação ao receptor especifico para a porção Fc presentes (FcγR) na membrana de macrófagos principalmente. A anafilaxia por IgG não é rara e pode se desenvolver tanto quanto a anafilaxia por IgE (52). Em estudos comportamentais

observou-se que camundongos expostos repetidas vezes a alérgenos de alimentos apresentam alterações comportamentais entre elas a aversão ao alérgeno, reação correlacionada com a citocina IL-4 e os anticorpos IgG1 (53). Enquanto em camundongos os isotipo IgE e IgG1 são biomarcadores de resposta inflamatória mediada por TH2, o isotipo IgG2a é um biomarcador de resposta inflamatória mediada por TH1(54).

1.6 Moléculas PD-1 e PD-L1

Pesquisas recentes permitiram uma maior percepção sobre os fatores que reduzem a resposta imune antitumoral, levando à descoberta de várias moléculas que atuam nas vias de controle coestimulantes e inibitórias, denominadas *checkpoint pathways* (Figura 1).No linfócito T essas moléculas são imunorreceptores à base de tirosina (Immunoreceptor tyrosine-based), as moléculas que coestimulam a ativação do linfócito T são denominadas *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) e as moléculas que coinibem a ativação do linfócito T são denominadas *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs) (55,56)..

Um bom exemplo no avanço do conhecimento sobre as moléculas do *checkpoint pathways* que medeiam a supressão imune induzida por tumores é a proteína da "morte-programada 1" (PD-1).

O PD-1 é considerado um membro da família dos receptores CD28 e é conhecido por CD279, enquanto o PD-L1, um de seus ligantes, é membro da família dos receptores B7 ligantes e é conhecido por CD-274 (55,56). O PD-1 está expresso na membrana de linfócitos T e linfócitos B, enviando sinais inibitórios nestas células quando ativado pelos

INTRODUÇÃO

APC / Tumor cell / Dendritic cell T cell PD-L1 (87-H1; CD274) CD80 [87-1] PD-L2 [87-DC; CD273] -PD-1 [CD279] 0 0 **CD28** CD80 [87-1] or CD86 [87-2] CTLA-4 [CD152] ICOSL [87-H2; 87RP1; CD275] ICOS [CD278] **-**87-H3 [CD276] / 87-H4 [VTCN1] • VISTA [87-H5; PD-1H; GI24] 8 2 TMIGD2 [IGPR-1; CD28H] -87-H7 [HHLA2] 0 2 CD160 HVEM [TNFRSF14; CD270] BTLA [CD272] • HVEM [TNFRSF14; CD270] --LIGHT MHC class I or II TCR LAG-3 [CD223] FGL1 CD137L [TNF5F9; 4-18BL] CD137 [TNFRSF9; 4-188] OX40L [TNFSF4; CD252] OX40 [TNFRSF4; CD134] --CD70 [TNFSF7; CD27L] CD27 [TNFRSF7] . CD40 [TNFRSF5] --CD40L [TNFSF5: CD154] Г GITRL [TNFSF18] GITR ITNERSE18: CD3571 . CD96 • a CD155 [PVR; Necl-5] CD226 [DNAM-1] --C CD112 [PVRL2; Nectin-2] • C TIGIT e **CD112R** • • CD200 CD200R --CD48 [BCM-1; BLAST-1] 2B4 [CD244] CEACAM-1 HMG81 Gal-9 TIM-3 [HAVcr-2] Phosphatidylserine (Apoptotic cell) TIM-3 (HAVcr-2) х no Ligand XX A2aR Adenosine IDO1, TDO | 🕁 Tryptophan | Butyrophilin Family Members (e.g. Btnl2, Skint1, MOG, CD277) Regulation and activation of T lymphocytes depend on signaling by the T cell receptor (TCR) Cytokines (TGF)3, IL-1, IL-6, 4 and also by cosignaling receptors that deliver negative $(- \odot \rightarrow)$ or positive $(- \odot \rightarrow)$ signals.

seus ligantes PD-L1 ou PD-L2, que são encontrados na membrana de células dendríticas e monócitos (57,58).

Figura 1 Checkpoint pathway: Moléculas expressas na superfície celular que

participam da regulação do sistema imunológico.

Fisiologicamente, a via PD-1/PD-L1 emergiu como resultado da necessidade de controlar o grau de inflamação em locais que expressam o antígeno estranho, a fim de se evitar uma resposta imune exacerbada com danos ao tecido normal (59). Existe uma expressão notável da proteína PD-1 na superfície de todas as células T ativadas. Quando uma célula T reconhece o antígeno expresso pelo complexo MHC na célula alvo, são produzidas citocinas inflamatórias. Essas citocinas resultam na expressão de PD-L1 no tecido, que se liga e ativa a proteína PD-1 na célula T, induzindo à tolerância imune, fenômeno em que o sistema imunológico diminui sua capacidade de montar uma resposta inflamatória, mesmo na presença de antígenos acionáveis (60). Em certos tumores, mais notavelmente em melanomas, a sobre-expressão de PD-L1 inibe a geração de uma resposta imune ao tumor (60).

Os bloqueadores de PD-1/PD-L1 previnem a interação PD-1/PD-L1, facilitando assim uma resposta imune positiva para combater o tumor (61). Embora os inibidores de PD-1/PD-L1 tenham benefícios claros e demonstrados como agentes anticancerígenos, uma limitação ao seu uso é que sua atividade é dependente da geração de uma população de células T capazes de reconhecer o tumor através de células apresentadoras de antígeno (61). Embora a expressão de PD-L1 pelo tumor possa ser sugestiva de um tumor que esteja suprimindo uma resposta imune e poderia servir como um biomarcador, é fato que nem todos os tumores que expressam PD-L1 respondem aos inibidores de PD-1/PD-L1 (61). Por outro lado, observou-se que tumores PD-L1-negativos podem responder a esses agentes (61). Estudo realizado em cultura de mastócitos extraídos da medula óssea de camundongos mostrou que estas células expressam várias moléculas coestimulatórias e coinibitórias em sua membrana, incluindo membros da família B7, como o PD-L1 (62). Faltam estudos analisando a expressão de PD-L1, suas funções em mastócitos humanos,

seu efeito biológico na sensibilização e seu efeito biológico na fase efetora. Esse *data gap* sustenta nossa pergunta científica.

1.7 Aplicações terapêuticas das moléculas PD-1 e PD-L1

Estudo recente demonstrou que a resposta imune do hospedeiro pode afetar o crescimento do tumor e a resposta a várias terapias (63). A evolução da imunoterapia com anticorpos contra moléculas coinibitórias no tratamento contra o câncer representa a descoberta terapêutica mais bem sucedida nos últimos anos (64). Dados recentes sobre imunoterapia com anticorpo monoclonal anti-CTLA4, anti PD-1 e anti PD-L1 elevaram o tratamento clínico do melanoma avançado para uma nova era, uma era com aumento da sobrevida dos pacientes e potencial cura (65). O mesmo tem sido observado em pacientes com câncer renal, câncer epidermóide de pulmão, adenocarcinoma de próstata e câncer de mama (66–69). A utilização de biomarcadores de PD-L1 prevê a eficiência do tratamento com imunoterapia e pacientes com tumores com super-expressão de PD-L1 são melhores candidatos ao tratamento (70).

Apesar do grande número de pesquisas sobre os mecanismos das reações anafiláticas, pouco se sabe sobre a via coinibitória do receptor *Programmed Cell Death* 1 (PD-1) e seu ligante *Programmed Cell Death Ligand* 1 (PD-L1) na anafilaxia. Explorar a via coinibitória de imunorregulação em um modelo de anafilaxia pode ampliar a gama de recursos no seu tratamento e prevenção.

2. PERGUNTA DO ESTUDO

Qual efeito biológico da via PD-1/PD-L1 na hipersensibilidade imediata?

<u>3. OBJETIVO</u>

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da molécula PD-L1 em modelo murino de anafilaxia cutânea ativa e passiva.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver o modelo de ACA por Ovalbumina (OVA) e *Dermatophagoides pteronyssinus (Der p)*.
- Avaliar a produção de imunoglobulinas IgE, IgG1 e IgG2a como biomarcadores de sensibilização em modelo murino de ACA.
- Avaliar a histologia da fase efetora da ACA em modelo murino.
- Avaliar o efeito biológico de PD-1/PD-L1 na sensibilização.
- Avaliar o efeito biológico de PD-1/PD-L1 na fase efetora.

4. MÉTODOS

MÉTODOS

O projeto de mestrado inicial intitulado "Avaliação da resposta alérgica cutânea à *Dermatophagoides pteronyssius* e à OVA em modelo murino" visou desenvolver um modelo de ACA, o qual estava vinculado ao Programa de Alergia e Imunopatologia da FMUSP, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa, CEAP, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 27/04/2015, quando foi designado protocolo de pesquisa 073/15 (Anexo I). Em 11 de agosto de 2015, após apresentação do projeto e de seus resultados, assim como devido à ampliação da pesquisa com a análise da molécula PD-L1 no modelo de anafilaxia cutânea ativa (ACA) desenvolvido, a Comissão Examinadora (banca de qualificação) sugeriu à Comissão Coordenadora do Programa a mudança do estudo de mestrado para doutorado no Programa de Alergia e Imunopatologia da FMUSP. O projeto foi vinculado ao Programa de Doutorado, no modelo sanduíche, e parte do projeto foi sendo desenvolvido no *Brigham and Woman's Hospital*, hospital vinculado a *Harvard Medical School*.

Primeiramente, foi desenvolvido um modelo em camundongos de ACA, utilizando-se o ácaro *Der p* e a ovalbumina (OVA) como alérgenos indutores da reação de hipersensibilidade. Posteriormente, avaliamos os efeitos do bloqueio da molécula PD-L1 tanto na fase de sensibilização, como na fase efetora da anafilaxia (ACA).

4.1 Animais

No Brasil, foram utilizados vinte e quatro (24) camundongos Balb/c fêmeas adultas, com 6 a 8 semanas de vida, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e umidade e com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados conforme as normas da Comissão Brasileira de Experimento Animal (COBEA) e o projeto de pesquisa número 073/15 foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (Anexo I).

Em Boston, foram utilizados camundongos C57BL/6 adultos, com 6 a 8 semanas de vida, fornecidos pelo *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine). Mudamos a linhagem de Balb/c para C57BL/6 pela possibilidade de usar C57BL/6 knockout para PD-L1(PD-L1^{-/-}. O que mais tarde se mostrou inviável, uma vez que camundongos PD-L1^{-/-} com 8 a 10 semanas de vida desenvolvem doenças autoimune como diabetes *mellitus* e encefalite.

Os quais foram mantidos de acordo com as diretrizes do biotério do *Brigham and Woman's Hospital/Dana-Farber Cancer Institute-Institutional Care and Use Committee* e do Instituto Norte Americano de Saúde (NIH). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do referido hospital e está inscrito como DFCI IRB 15-046 (Anexo II). O projeto também foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (Anexo III). Os procedimentos aos quais os animais foram submetidos não causaram diminuição de sua mobilidade ou dificuldade na sua alimentação.

4.2 Alérgeno

Os antígenos utilizados foram: o ácaro da poeira doméstica *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*), utilizando-se um extrato em pó liofilizado (Alergia Clínica, Laboratorial e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) e a OVA do laboratório Sigma-Aldrich (ref.: A5503). O hidróxido de alumínio do laboratório Sigma-Aldrich (ref.: 21645-51-2) foi utilizado como adjuvante no projeto de pesquisa em Boston pois camundongos C57BL/6 apresentam maior resistência para sensibilização. No Brasil, não foi utilizado adjuvante.
4.3 Anticorpo monoclonal

A proteína PD-L1 foi bloqueada com o anticorpo anti-PD-L1, Ultra-LEAFTM Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) (BioLegend, ref.:124318), e foi utilizado o anticorpo Ultra-LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype (BioLegend, ref.:400644) como controle negativo.

4.4 Protocolo de sensibilização

O protocolo de sensibilização teve a duração de 28 dias e foi feito por via subcutânea (s.c.) na base da cauda do camundongo.

4.4.1 Desenvolvimento do Modelo de Anafilaxia Cutânea Ativa

Foi realizada extensa revisão bibliográfica dos modelos experimentais de alergia e anafilaxia cutânea descritos na Literatura, o que propiciou inclusive a publicação de uma revisão (37). A anafilaxia cutânea induzida nos modelos pode ser dividida em ativa e passiva. No modelo de ACA os camundongos são sensibilizados recebendo doses fracionadas do alérgeno, enquanto no modelo de anafilaxia cutânea passiva (PCA) os camundongos são sensibilizados ao receber soro de outros camundongos que previamente foram ativamente sensibilizados. A via utilizada para sensibilização também variou nesses modelos entre a via intraperitoneal e a via inalatório e o alérgeno mais utilizado foi a OVA, sempre associada a adjuvante durante o processo de sensibilização. O modelo desenvolvido no presente estudo é inovador, pois utiliza a via s.c. para sensibilizar os camundongos, usa o alérgeno *Der p* e sem a adição de adjuvante durante a sensibilização.

4.4.1.1 Grupo controle negativo

Os animais do "grupo controle negativo" receberam injeções com 50 µl de tampão fosfato-salino (PBS) nos dias 0, 7, 14 e 21. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -1, 14 e 27 pelo plexo oftálmico (300 µl/sangria) para dosagem de IgG1 e IgG2a específicas para os antígenos. Nessa etapa de padronização do modelo de ACA, não dispúnhamos dos reagentes para dosagem de IgE total e específicas. No dia 28, os camundongos foram desafiados na pele do dorso com 10 µl de tampão fosfato-salino, 10 µl de *Der p* a 5 µg/µl e 10 µl de OVA a 5 µg/µl. Também receberam 200 µl de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram sacrificados, câmara de gás de CO₂, e foi medido o diâmetro da pápula formada na pele invertida e fragmentos foram coletados para análise histológica (Figura 2).



♥ Coleta de sangue ↓Injeção de tampão fosfato-salino ♦ Anafilaxia cutânea ativa

♣Eutanásia ♠Biopsia cutânea

Figura 2 - Linha do tempo do grupo controle negativo

4.4.1.2 Grupo Dermatophagoides pteronyssinus

Os animais do "grupo *Der p*" receberam injeções com 50 µl de *Der p* a 1 µg/µl nos dias 0, 7, 14 e 21. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -1, 14 e 27 pelo plexo oftálmico (300 µl/sangria) para dosagem de IgG1 e IgG2a específicas. No dia 28, foi desencadeada a reação inflamatória alérgica por desafio com injeção de 10 µl de *Der p* a 5 µg/µl. Nesta ocasião, os camundongos também receberam 200 µl de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram sacrificados, em câmara de gás de CO₂, foi medido o diâmetro da pápula na pele invertida formada pela reação inflamatória alérgica e fragmentos foram coletados para análise histológica (Figura 3).



◆Eutanásia ◆ Anafilaxia cutânea ativa, desafio com injeção de Dermatophagoides pteronyssinus

Figura 3 - Linha do tempo do grupo Dermatophagoides pteronyssinus

4.4.1.3 Grupo Ovalbumina

Os animais do "grupo OVA" receberam injeções com 50 µl de OVA a 1 µg/µl nos dias 0, 7, 14 e 21. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -1, 14 e 27 pelo plexo oftálmico (300 µl/sangria) para dosagem de IgG1 e IgG2a específicas. No dia 28, foi desencadeado a reação inflamatória alérgica por desafio com injeção de 10 µl de OVA a 5 µg/µl. Os camundongos também receberam nesta ocasião 200 µl de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram sacrificados, câmara de

MÉTODOS

gás de CO_2 , foi medido o diâmetro da pápula formada na pele invertida pela reação inflamatória alérgica e fragmentos foram coletados para análise histológica (Figura 4).

| • ↓ | \downarrow | $\bullet \downarrow$ | \downarrow | * *** |
|--------|--------------|----------------------|--------------|---------|
| D-1 D0 | D7 | D14 | D21 | D27 D28 |

♥ Coleta de sangue ↓Injeção de Ovalbumina ◆ Anafilaxia cutânea ativa, desafio com injeção de Ovalbuminia
 ♣Eutanásia ▲Biopsia cutânea

Figura 4 - Linha do tempo do grupo Ovalbumina

4.4.2 Bloqueio da Proteína PD-L1 em Modelo de Anafilaxia Cutânea Ativa

Com o sucesso obtido no desenvolvimento do modelo de ACA, o projeto de pesquisa foi ampliado para avaliar o efeito do bloqueio da proteína PD-L1 na ACA. Foi trocada a linhagem de camundongos Balb/c para C57BL/6, pois existia a possibilidade de trabalharmos com camundongos C57BL/6 *knockouts* para PD-L1 na colaboração com a Universidade de Harvard. Incluímos a utilização de adjuvantes nos modelos por recomendação de coorientadores. A ACA que era induzida no dorso do animal e medida pelo diâmetro da pápula formada pela reação inflamatória passou a ser realizada na orelha do animal e medida pelo extravasamento de azul de Evans por espectrofotometria. Os camundongos analisados foram divididos em 9 grupos de 5 animais (**Tabela 1**).

| | Técnica | Sensibilização | Provocação | Anticorpo | |
|-----------------------------------|---------|----------------|------------|----------------|------------|
| Grupos: | | | | Anticorpo | |
| | | | | Sensibilização | Provocação |
| 1 – Controle negativo | | PBS | OVA | - | - |
| 2 – Controle positivo | ACA | OVA | | - | - |
| 3 – Anti-PD-L1 durante | | | | | |
| sensibilização | | | | Anti-PD-L1 | - |
| 4 – Isotipo anti-PD-L1 durante | | | | To a time a | |
| sensibilização | | | | isoupo | - |
| 5 - Anti-PD-L1 durante provocação | | | | - | Anti-PD-L1 |
| 6 – Isotipo anti-PD-L1 durante | | | | | Isotino |
| provocação | | | | - | isoupo |
| 7 – Controle positivo (PCA) | | | | - | - |
| 8 – Anti-PD-L1 durante provocação | PCA | Passiva | | | |
| em PCA | | | | - | Allu-PD-L1 |
| 9 – Isotipo anti-PD-L1 durante | | | | | Insting |
| provocação em PCA | | | | - | isoupo |

Tabela 1 - Grupos experimentais conforme substâncias e técnicas utilizadas

Legenda: PBS: Tampão fosfato-salino; OVA: Ovalbumina; ACA: Anafilaxia cutânea ativa; PCA: Anafilaxia cutânea passive; Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1)(BioLegend, ref.:124318); Isotipo: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype (BioLegend, ref.:400644).

4.4.2.1 Grupo controle negativo

Os animais do "grupo controle negativo" receberam injeções com 50 μ l de PBS(PBS) nos dias 0, 7, 14 e 21. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -1, 14 e 27 pelo plexo oftálmico (300 μ l/sangria) para dosagem dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos no plasma por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. No dia 28, os camundongos foram desafiados com 50 μ l de OVA, recebendo também 200 μ l de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de gás de CO₂ e a reação foi avaliada pelo extravasamento de azul de Evans mensurado por espectrofotometria e análise histológica de fragmentos coletados (Figura 5).



♥ Coleta de sangue ↓Injeção de tampão fosfato-salino ♦ Desafio com Ovalbumina

♣Eutanásia ♠Biopsia cutânea

Figura 5 - Linha do tempo do grupo controle negativo

4.4.2.2 Grupo controle positivo

Os animais do "grupo controle positivo" receberam injeções com 50 µl de OVA a 1 µg/µl nos dias 0, 7, 14 e 21. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -1, 14 e 27 pelo plexo oftálmico (300 µl/sangria) para dosagem dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos no plasma por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. No dia 28, foi desencadeado a reação inflamatória alérgica por injeção de 10 µl de OVA a 5 µg/µl. Nesta ocasião os camundongos também receberam 200 µl de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de gás de CO2 e a reação foi avaliada pelo extravasamento de azul de Evans mensurado por espectrofotometria e análise histológica de fragmentos coletados (Figura 6).



♥ Coleta de sangue ↓Injeção de Ovalbumina
 ◆ Anafilaxia cutânea ativa, desafio com Injeção de Ovalbumina
 ◆Eutanásia ◆Biopsia cutânea

Figura 6 - Linha do tempo do grupo controle positivo

4.4.2.3 Grupo anti-PD-L1 durante sensibilização

Os animais do "grupo anti-PD-L1 durante sensibilização" receberam injeções com 50 μ l de OVA a 1 μ g/ μ l nos dias 0, 7, 14 e 21. Nos dias -1, 6, 13 e 20, 200 μ l do anticorpo anti-PD-L1 foi aplicado por via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -1, 14 e 27 pelo plexo oftálmico (300 μ l/sangria) para dosagem dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos no plasma por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. No dia 28, os animais foram desafiados com injeção de 10 μ l de OVA a 5 μ g/ μ l, recebendo também 200 μ l de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de gás de CO2 e a reação foi avaliada pelo extravasamento de azul de Evans mensurado por espectrofotometria e análise histológica de fragmentos coletados (Figura 7).

| $\mathbf{v} \nabla \downarrow$ | $\nabla \downarrow$ | $ abla ullet \downarrow$ | $\nabla \downarrow$ | * *** |
|--------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|---------|
| D-1 D0 | D6 D7 | D13 D14 | D20 D21 | D27 D28 |

Figura 7 - Linha do tempo do grupo anti-PD-L1 durante sensibilização

4.4.2.4 Grupo Isotipo anti-PD-L1 durante sensibilização

Os animais do "grupo isotipo anti-PD-L1 durante sensibilização" receberam injeções com 50 μ l de OVA a 1 μ g/ μ l nos dias 0, 7, 14 e 21. Nos dias -1, 6, 13 e 20, 200 μ l do isotipo anti-PD-L1 foi aplicado via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -1, 14 e 27 pelo plexo oftálmico (300 μ l/sangria) para dosagem dos

anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos no plasma por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. No dia 28, os animais foram desafiados com injeção de 10 μ l de OVA a 5 μ g/ μ l, recebendo também 200 μ l de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de gás de CO2 e a reação foi avaliada pelo extravasamento de azul de Evans mensurado por espectrofotometria e análise histológica de fragmentos coletados (Figura 8).

| $\bullet \Lambda \downarrow$ | $\Lambda \downarrow$ | $\Lambda \checkmark \downarrow$ | $\Lambda \downarrow$ | * *** |
|------------------------------|------------------------|----------------------------------|--------------------------|---------|
| D-1 D0 | D6 D7 | D13 D14 | D20 D21 | D27 D28 |
| Coloto do conque | Inizača da Orralhumina | A Apofilorio antôneo ativo | desefie com iniceão de C |) |

 ◆ Coleta de sangue ↓Injeção de Ovalbumina ◆ Anafilaxia cutânea ativa, desafio com injeção de Ovalbumina Λ Isotipo Anticorpo Ultra-LEAF™ Purified Rat IgG2b, κ Isotype (ref.:400644) (BioLegend, ref.:400644).
 ◆Eutanásia ◆Biopsia cutânea

Figura 8 - Linha do tempo do grupo Isotipo anti-PD-L1 durante sensibilização

4.4.2.5 Grupo anti-PD-L1 durante provocação

Os animais do "grupo anti-PD-L1 durante provocação" receberam injeções com 50 μ l de OVA a 1 μ g/ μ l nos dias 0, 7, 14 e 21. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -1, 14 e 27 pelo plexo oftálmico (300 μ l/sangria) para dosagem dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos no plasma por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. No dia 27, 200 μ l do anticorpo anti-PD-L1 foi aplicado por via intraperitoneal. No dia 28, os animais foram desafiados com injeção de 10 μ l de OVA a 5 μ g/ μ l, recebendo também 200 μ l de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de gás de CO2 e a reação foi avaliada pelo extravasamento de azul de Evans mensurado por espectrofotometria e análise histológica de fragmentos coletados (Figura 9).



♥ Coleta de sangue ↓Injeção de Ovalbumina ◆ Anafilaxia cutânea ativa, desafio com injeção de Ovalbumina

∇ Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1)) (BioLegend, ref.:124318)
 ◆Biopsia cutânea

Figura 9 - Linha do tempo do grupo anti-PD-L1 durante provocação

4.4.2.6 Grupo isotipo anti-PD-L1 durante provocação

Os animais do "grupo isotipo anti-PD-L1 durante provocação" receberam injeções com 50 µl de OVA 1 µg/µl nos dias -1, 7, 14 e 21. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 14 e 27 pelo plexo oftálmico (300 µl/sangria) para dosagem dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos no plasma por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. No dia 27, 200 µl do isotipo anti-PD-L1 foi aplicado por via intraperitoneal. No dia 28, os animais foram desafiados com injeção de 10 µl de OVA a 5 µg/µl, recebendo também 200 µl de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de gás de CO2 e a reação foi avaliada pelo extravasamento de azul de Evans mensurado por espectrofotometria e análise histológica de fragmentos coletados (Figura 10).



 ◆ Coleta de sangue ↓Injeção de Ovalbumina ◆ Anafilaxia cutânea ativa, desafio com injeção de Ovalbumina ∧ Isotipo Anticorpo Ultra-LEAF™ Purified Rat IgG2b, κ Isotype (ref.:400644) (BioLegend, ref.:400644)
 ◆Eutanásia ◆Biopsia cutânea



4.4.2.7 Grupo anafilaxia cutânea passiva (controle positivo)

No "grupo PCA", o soro de animal sensibilizado a OVA foi diluído (1/40, 1/80, 1/160 e 1/320) e injetado por via s.c. no dorso do camundongo na hora 0. Na hora 2, os animais foram desafiados com injeção de 10 µl de OVA a 5 µg/µl, recebendo também 200 µl de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de gás de CO2, a reação foi avaliada pelo extravasamento de azul de Evans mensurado por espectrofotometria e fragmentos foram coletados para analise histológica (Figura 11).



℘Injeção de soro de animal sensibilizado a Ovalbumina ↓Injeção de Ovalbumina ◆ Anafilaxia cutânea passiva
 ◆Eutanásia ◆Biopsia cutânea

Figura 11 - Linha do tempo do grupo anafilaxia cutânea passiva (Controle

Positivo)

4.4.2.8 Grupo anti-PD-L1 em anafilaxia cutânea passiva

No "grupo anti-PD-L1 em PCA", o anticorpo anti-PD-L1 foi injetado por via intraperitoneal na hora -24. Soro de animal sensibilizado à OVA foi diluído (1/40, 1/80, 1/160 e 1/320) e injetado por via s.c. no dorso do camundongo na hora 0. Na hora 2, os animais foram desafiados com injeção de 10 μ l de OVA a 5 μ g/ μ l, recebendo também 200 μ l de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de gás de CO2, a reação foi avaliada pelo

extravasamento de azul de Evans mensurado por espectrofotometria e fragmentos foram coletados para analise histológica (Figura 12).

| ∇ | Ş | ↓♦♠♠ |
|----------|--------|--------|
| Hora -24 | Hora 0 | Hora 2 |

℘ Injeção de soro de animal sensibilizado a Ovalbumina ↓Injeção de Ovalbumina ◆ Anafilaxia cutânea passiva
 ∇ Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) (BioLegend, ref.:124318)
 ◆Eutanásia ◆Biopsia cutânea

Figura 12 - Linha do tempo grupo anti-PD-L1 em anafilaxia cutânea passiva

4.4.2.9 Grupo isotipo anti-PD-L1 em anafilaxia cutânea passiva

No "grupo isotipo anti-PD-L1 em PCA", o isotipo anti-PD-L1 foi injetado via intraperitoneal na Hora -24, na hora 0 recebeu soro de animal sensibilizado a OVA foi diluído (1/40, 1/80, 1/160 e 1/320) e injetado por via s.c. no dorso do camundongo. Na hora2, os animais foram desafiados com injeção de 10 μ l de OVA a 5 μ g/ μ l, recebendo também 200 μ l de azul de Evans a 0,025% por via intravenosa. Após 10 minutos, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de gás de CO2, a reação foi avaliada pelo extravasamento de azul de Evans mensurado por espectrofotometria e fragmentos foram coletados para analise histológica (Figura 13).



℘Injeção de soro de animal sensibilizado a Ovalbumina ↓Injeção de Ovalbumina ◆ Anafilaxia cutânea passiva
 ◆Eutanásia ◆Biopsia cutânea

A Isotipo Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype) (BioLegend, ref.:400644)

Figura 13 - Linha do tempo do grupo isotipo anti-PD-L1 em anafilaxia cutânea

passiva

4.5 Reação de anafilaxia cutânea ativa

O ensaio de ACA foi realizado para avaliar a presença de anticorpos específicos com atividade anafilática na pele dos camundongos sensibilizados (71,72). Os animais sensibilizados a OVA receberam por via s.c. na orelha direita 10 µl de PBS com alérgeno na concentração 5 µg/µl de OVA. Na orelha esquerda foi aplicado 10 µl de PBS (controle negativo). Em seguida, foi administrado por via intravenosa o azul de Evans a 0,25%. Após 10 minutos da reação, os animais são sacrificados câmara de gás de CO₂. O azul de Evans que extravasou para o tecido é extraído após 12 horas em 700 µl de formamida a 63°C. Então a absorbância da solução composta por formamida e azul de Evans é mensurada por espectrofotômetro à 620 nm. A ACA é considerada positiva quando a absorbância é maior que 0.150 nm (Figura 14).



Figura 14 - Técnica de anafilaxia cutânea ativa: Injeção intradérmica na orelha com

alérgeno diluído em PBS

Legenda: (A). Após 10 minutos da exposição ao alérgeno, o camundongo é sacrificado e a orelha é seccionada (B). O fragmento de orelha é mantido em formamide à 63 °C por 18 horas para extrair do tecido o corante de azul de Evans (C).

4.6 Reação de anafilaxia cutânea passiva

Neste método o soro de animal sensibilizado a OVA foi diluído (1/40, 1/80, 1/160 e 1/320) e 10 mcl injetado por via s.c. no dorso do camundongo. Após 2 horas, 200 µl de azul de Evans 0,25% e 10 µl do alérgeno OVA a 5 µg/µl é injetado por via intravenosa. Após 10 minutos da reação, os animais são sacrificados em câmara de gás de CO₂ . O azul de Evans que extravasou para o tecido é extraído após 12 horas em 700 µl formamida a 63°C. Então a absorbância da solução composta por formamida e azul de Evans é mensurada por espectrofotômetro à 620 nm.

4.7 Dosagem de anticorpo

Foram dosados os anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos no plasma por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Os kits utilizados são da Affymetrix eBioscience,

MÉTODOS

IgE (ref.:88-50460-22), IgG1 (ref.:88-50410-22) e IgG2a (ref.:88-50420-22). Amostras de sangue foram obtidas por punção da veia facial. O sangue coletado foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, sendo o plasma separado e congelado a - 20°C.

Para determinação de IgE, IgG1 e IgG2a, a microplaca foi recoberta com anticorpo de captura. Após incubação e lavagem, os soros foram adicionados em uma diluição previamente determinada. Para revelar a reação, foram adicionados anticorpos de detecção biotinilados específicos para IgE, IgG1 ou IgG2a, seguido de incubação e lavagem. Por fim, a solução reveladora, contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno, foi adicionada.

A reação de cor foi lida em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos como a média das absorbâncias e comparado com o padrão fornecido pelo kit em diluições seriadas.

4.8 Análise histológica: Coloração e quantificação de mastócitos

O corante cloro-acetato-esterase (CAE) foi utilizado para corar os tecidos. A técnica de CAE cora os grânulos dos mastócitos; por isso, o número de células coradas é menor nos tecidos que sofreram desgranulação de mastócitos do que nos tecidos onde o processo não ocorreu(45).

Os camundongos foram submetidos a eutanásia e amostras de tecido das costas e da orelha foram fixados em 10% de formalina tamponada, incorporados na parafina, garantindo uma orientação transversal de todos os tecidos, e cortados com a espessura de 4 mm. As lâminas foram digitalizadas no microscópio Pannoramic 250 Flash II 3D Histech Ltda. Os mastócitos foram quantificados de acordo com a área (mm²), usando análise de imagem gerada por computador (software NIH Image J, versão 1.49v).

34

4.9 Análise estatística

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

5. RESULTADOS

5.1 Resultados obtidos durante o desenvolvimento do Modelo de Anafilaxia Cutânea Ativa

5.1.1 Anafilaxia cutânea ativa: *Dermatophagoides pteronyssinus* e Ovalbumina

Após a fase de sensibilização, 3 camundongos de cada grupo (alérgenos e controle negativo) foram submetidos ao procedimento de ACA. A reação foi positiva nos grupos *Der p* e Ova, sendo que no grupo *Der p* a reação só foi positiva a partir da provocação com 10 μ g, enquanto no grupo Ova a reação já era positiva a partir de 5 μ g (Figura 15, Figura 16 e Figura 17). O grupo controle negativo que não havia sido sensibilizado apresentou reação negativa em ambas provocações, com *Der p* e Ova (Figura 18).



Figura 15 - Leitura da reação foi feita 10 minutos após o desafio com os respectivos

alérgenos

Legenda: O diâmetro da pápula azul na pele invertida do animal é considerado positivo quando maior do que 5 mm. A: No grupo *Dermatophagoides pteronyssinus* a reação foi considerada positiva a partir da provocação com 10µg. B: No grupo Ovalbumina a partir de 5µg. C: No grupo controle negativo a reação foi negativa para ambos alérgenos utilizados nas provocações.



Figura 16 - Anafilaxia cutânea ativa no grupo de camundongos sensibilizado à

Dermatophagoides pteronyssinus (Der p)

Legenda: A reação foi avaliada pelo diâmetro da pápula formada após desafio. Os desafios com tampão fosfato-salino (PBS), 50 μ g de ovalbumina (OVA) e 5 μ g de Der p foram considerados negativos pois não ultrapassaram 5 milímetros de diâmetro. Os desafios com 10 e 50 μ g de Der p foram considerados positivos pois ultrapassaram milímetros de diâmetro



Figura 17 - Anafilaxia cutânea ativa no grupo de camundongos sensibilizado à

ovalbumina (OVA)

Legenda: A reação foi avaliada pelo diâmetro da pápula formada após desafio. Os desafios com 10 μ l de tampão fosfato-salino (PBS) e 50 μ g de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) foram considerados negativos pois não ultrapassaram 5 milímetros de diâmetro. Os desafios com 5, 10 e 50 μ g de OVA foram considerados positivos pois ultrapassaram 5 milímetro.



Figura 18 - Anafilaxia cutânea ativa no grupo de camundongos injetado com 50 μ l de

tampão fosfato-salino (PBS) por via subcutânea uma vez por semana

Legenda: A reação foi avaliada pelo diâmetro da pápula formada após desafio. Os desafios com 10 µl de tampão fosfato-salino (PBS), 50 µg de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) e 50 µg de Ovalbumina (OVA) foram considerados negativos pois não ultrapassaram 5 milímetros de diâmetro.

5.1.2 Anticorpos IgG1 e IgG2a: *Dermatophagoides pteronyssinus* e Ovalbumina

Todos os 8 camundongos de cada grupo tiveram os anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para os alérgenos dosados. Foi observado níveis significativamente maiores de IgG1 e IgG2a nos grupos *Der p* e Ova quando comparados ao grupo salina (Figura 19, Figura 20, Figura 21 e Figura 22) A dosagem de IgE específica foi realizada, porém os resultados não foram considerados pois o anticorpo anti-IgE estava deteriorado.



Figura 19 - Nível sérico de IgG1 para Dermatophagoides pteronyssinus (Der p) nos

dias 0, 14 e 28

Legenda: Houve elevação do anticorpo com significância estatística no grupo Der p entre os dias 0, 14 e 28. O mesmo não ocorreu no grupo PBS (tampão fosfato-salina).



Figura 20 - Nível sérico de IgG1 para Ovalbumina (OVA) nos dias 0, 14 e 28

Legenda: Houve elevação do anticorpo com significância estatística no grupo OVA entre os dias 0, 14 e 28. O mesmo não ocorreu no grupo PBS (tampão fosfato-salina).



Figura 21 - Nível sérico de IgG2a para Dermatophagoides pteronyssinus (Der p) nos

dias 0, 14 e 28

O mesmo não ocorreu com o grupo PBS (tampão fosfato-salina).



Figura 22 - Nível sérico de IgG2a para Ovalbumina (OVA) nos dias 0, 14 e 28

Legenda: Houve elevação do anticorpo com significância estatística no grupo OVA entre os dias 0, 14 e 28. O mesmo não ocorreu no grupo PBS (tampão fosfato-salina).

5.1.3 Histologia: Dermatophagoides pteronyssinus e Ovalbumina

Foi realizada a avaliação histológica de 5 camundongos de cada grupo. O Grupo PBS apresentou infiltrado inflamatório inespecífico mínimo, com predomínio de linfócitos e com leve edema do tecido s.c. (Figura 23). As células foram contabilizada em 10 campos de grande aumento.

Os grupos que foram sensibilizados com OVA e *Der p* apresentaram processo inflamatório predominantemente polimorfonuclear difuso, com recrutamento intenso de células, constituídas em sua maioria por neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (Figura 23 e Figura 24). Houve acometimento principal do tecido conjuntivo frouxo do s.c. e da derme profunda. Ocasionalmente a derme reticular também estava inflamada. Não foram observados granulomas ou vasculites.



Figura 23 - Número de linfócitos, mastócito e eosinófilos após desafio

Legenda: Os grupos sensibilizados a Dermatophagoides pteronyssinus (Der p) e Ovalbumina (OVA) apresentaram um número significativamente maior de mastócitos e eosinófilos que o grupo tampão fosfato-salina (PBS) após o desafio. O número de linfócitos foi significativamente maior no grupo PBS quando comparado aos grupos Der p e Ova.



Figura 24 - Número de neutrófilos após desafio

Legenda: Os grupos sensibilizados Dermatophagoides pteronyssinus (Der p) e Ovalbumina (OVA) após o desafio apresentaram um número significativamente maior de neutrófilos que o grupo tampão fosfato-salina (PBS).

5.2 Resultados obtidos durante bloqueio da Proteína PD-L1 em Modelo de Anafilaxia Cutânea Ativa

5.2.1 Anafilaxia cutânea ativa com bloqueio da proteína PD-L1

Nos grupos controle positivo, anti-PD-L1 durante a provocação, isotipo PD-L1 durante sensibilização e isotipo PD-L1 durante provocação a reação foi considerada positiva, pois a medida por espectrofotometria do Azul de Evans extravasado ultrapassou a absorbância de 0.15 nm. A reação foi negativa no grupo controle negativo (não sensibilizado) e no grupo que recebeu anti-PD-L1 durante a sensibilização em 5 camundongos de cada grupo (Figura 25).





ativa dos grupos controle negativo, controle positivo, anti-PD-L1 durante

sensibilização, anti-PD-L1 durante provocação, isotipo PD-L1 durante sensibilização e

isotipo anti-PD-L1 durante provocação.

Legenda: A reação provocada pelo alérgeno foi considerada positiva no grupo controle positivo, anti-PD-L1 durante provocação, isotipo PD-L1 durante sensibilização e isotipo anti-PD-L1 durante provocação e considerada negativa no grupo negativo e no grupo anti-PD-L1 durante sensibilização. Houve redução estatisticamente significante no extravasamento de azul Evans no local da injeção do alérgeno entre o grupo anti-PD-L1 sensibilização e os grupos controle positivo, anti-PD-L1 durante provocação, isotipo PD-L1 durante sensibilização e isotipo anti-PD-L1 durante provocação. PBS: Tampão fosfato-salino. Alérgeno utilizado: Ovalbumina. Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) (BioLegend, ref.: 124318). Isotipo anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype (BioLegend, ref.:400644).

RESULTADOS

Houve diferença estatisticamente significante no extravasamento de azul Evans no local da injeção do alérgenos, no grupo anti-PD-L1 durante sensibilização em relação aos grupos controle positivo, anti-PD-L1 durante provocação, isotipo PD-L1 durante sensibilização e isotipo PD-L1 durante provocação (Figura 25). Ou seja, o bloqueio de PD-L1 na fase de sensibilização levou a redução significativa do extravasamento de azul de Evans.

5.2.2 Anafilaxia cutânea passiva com bloqueio da proteína PD-L1

Assim como na ACA, na PCA, a reação é considerada positiva quando a medida por espectrofotometria do Azul de Evans extravasado ultrapassa a absorbância de 0.15 nm. A reação foi positiva nos grupos controle positivo, anti-PD-L1 e isotipo PD-L1 em cinco camundongos de cada grupo (Figura 26).

Houve diferença estatisticamente significante no extravasamento de Azul Evans entre os grupos: controle negativo com injeção de alérgeno e controle positivo com injeção de alérgeno; controle positivo com injeção de PBS e controle positivo com injeção de alérgeno; controle negativo com injeção do alérgeno e anti-PD-L1 com injeção de alérgeno; anti-PD-L1 com injeção de PBS e anti-PD-L1 com injeção de alérgenos; controle negativo com injeção do alérgeno e isotipo anti-PD-L1 com injeção de alérgeno; isotipo anti-PD-L1 com injeção de PBS e isotipo anti-PD-L1 com injeção de alérgeno. Quando utilizada a técnica de PCA, não foi possível observar redução no extravasamento de azul de Evans na presença do anti-PD-L1 ou do isotipo anti-PD-L1 (Figura 26).





passiva dos grupos controle negativo, controle positivo e anti-PD-L1.

Legenda: Não houve variação estatística entre controle positivo e anti-PD-L1. PBS: Tampão fosfato-salino. Alérgeno utilizado foi Ovalbumina. PCA: Anafilaxia cutânea passiva. Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1)(BioLegend, ref.:124318). Isotipo anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype (BioLegend, ref.:400644).

Utilizando a técnica de PCA também foi comparado diferentes diluições do soro de camundongo previamente sensibilizado à OVA. O soro foi diluído em PBS à 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 e aplicado nos grupos controle positivo, anti-PD-L1 e isotipo anti-PD-L1. A reação foi positiva nas diluições 1/80 e 1/40 em todos os grupos e não houve variação significativa entre os grupos, considerando-se a mesma diluição (Figura 27). Novamente, não foi observado diferença no extravasamento quando utilizado anti-PD-L1 ou isotipo anti-PD-L1.



Figura 27 - Absorbância do extravasamento de azul de Evans na anafilaxia cutânea

passiva utilizando soro diluído em PBS 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 nos grupos controle

positivo, anti-PD-L1 e isotipo anti-PD-L1.

Legenda: A reação foi positiva nas diluições 1/80 e 1/40 em todos os grupos e não houve variação significativa entre os grupos na mesma diluição. PCA: Anafilaxia cutânea passiva. Alérgeno utilizado: Ovalbumina. Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) (BioLegend, ref.:124318). Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype (BioLegend, ref.:400644).

5.2.3 Anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a com bloqueio da Proteína PD-L1

Todos os cinco camundongos de cada grupo tiveram os anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos para OVA séricos dosados no dia 0, 14 e 28. O nível sérico de IgE específicos para OVA foi significativamente maior, nos dias 14 e 28, no grupo controle positivo e isotipo anti-PD-L1 do que no grupo anti-PD-L1 durante sensibilização (Figura 28). Isto sugere que o bloqueio de PD-L1 pode interferir na modulação da resposta Th2.



Figura 28 - Valores de IgE específica sérica nos grupos controle negativo, controle

positivo, anti-PD-L1 durante sensibilização e isotipo anti-PD-L1 durante sensibilização,

nos dias 0, 14 e 28 do protocolo de sensibilização.

Legenda: O nível sérico de IgE específica apresentou maior elevação, nos dias 14 e 28, no grupo controle positivo e isotipo anti-PD-L1 do que no grupo anti-PD-L1 durante sensibilização. Alérgeno utilizado: Ovalbumina. Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) (BioLegend, ref.:124318). Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype (BioLegend, ref.:400644).

No dia 28, o grupo anti-PD-L1 apresentou menor elevação do nível sérico e IgG1

específicos para OVA do que ambos os grupos controle positivo e isotipo anti-PD-L1

(Figura 29).





anti-PD-L1 durante sensibilização, isotipo anti-PD-L1 durante os dias 0, 14 e 28 da

sensibilização.

Legenda: No dia 28, o grupo anti-PD-L1 apresentou menor elevação do nível sérico de IgG1 específica do que ambos os grupos controle positivo e isotipo anti-PD-L1. Alérgeno utilizado: Ovalbumina. Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1)(BioLegend, ref.:124318). Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype (BioLegend, ref.:400644).

Quanto ao nível sérico de IgG2a, não foi observado variação estatística significante entre os grupos nos dias 0, 14 e 28 (Figura 30).





Legenda: Não foi observado variação significativa entre os grupos. Não foi observado variação estatística significante entre os grupos nos dias 0, 14 e 28. Alérgeno utilizado: Ovalbumina. Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1)(BioLegend, ref.:124318). Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype (BioLegend, ref.:400644).

5.2.4 Histologia com bloqueio da Proteína PD-L1

A avaliação histológica foi realizada em 2 camundongos de cada grupo. Utilizando a técnica Cloro-acetato-esterase para corar o tecido é possível visualizar em vermelho os grânulos dos mastócitos que não desgranularam (Figura 31). Com isso foi avaliado em qual fragmento de tecido houve maior ou menor desgranulação de mastócitos.

Os camundongos foram provocados em dois locais: com injeção intradérmica na orelha e com injeção s.c. no dorso. Houve diferença significativa entre o número de mastócitos por milímetro quadrado quando o local de provocação foi a orelha com injeção intradérmica do alérgeno. O grupo controle positivo apresentou 20,03 mastócitos/mm² e o grupo anti-PD-L1 administrado durante a sensibilização apresentou 24,20

RESULTADOS

mastócitos/mm². O maior número de mastócitos no grupo anti-PD-L1 durante sensibilização sugere que a desgranulação foi menor neste grupo do que no grupo controle positivo, uma vez que o mastócito após desgranulação não é corado pelo CAE (Figura 32).





acetato-esterase.

Legenda: (A) Tecido da orelha do grupo controle positivo corado com cloro-acetatoesterase com 19.3 mastócitos/mm². (B) Tecido da orelha do grupo anti-PD-L1 corado com cloro-acetato-esterase com 24.7 mastócitos/mm². Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) (BioLegend, ref.:124318).

A provocação s.c. com alérgeno no dorso dos animais não apresentou diferenças estatisticamente significantes, mas também foi encontrado um número menor de mastócitos no grupo controle positivo do que no grupo anti-PD-L1 durante sensibilização (Figura 32).

RESULTADOS





controle negativo, controle positivo, anti-PD-L1 durante sensibilização e isotipo anti-

PD-L1 durante sensibilização.

Legenda: O número de mastócitos que desgranulou no grupo controle positivo foi significativamente maior que no grupo anti-PD-L1 durante sensibilização. Anti-PD-L1: Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) (BioLegend, ref.:124318). Anticorpo Ultra-LEAFTM Purified Rat IgG2b, κ Isotype (BioLegend, ref.:400644).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo nós demonstramos que o tratamento com anti-PD-L1 durante a sensibilização, mas não durante a fase efetora, diminuiu a produção de IgE e IgG1 específicas para OVA e diminuiu a desgranulação de mastócito e o extravasamento vascular no local da provocação.

Na literatura é possível encontrar diferentes modelos experimentais que buscam interpretar o papel dos receptores PD-1 e PD-L1 na inflamação, sobretudo na oncologia. Pesquisas decifrando o papel destas moléculas, que são intensamente expressas em mastócitos, nos processos alérgicos são raras. Assim como em nosso estudo, Akbari et al. sensibilizaram e provocaram animais com OVA, mas utilizando um modelo de hiperresponsividade brônquica (AHR) (73). Eles demonstraram em camundongos PD-L1^{-/-} redução, estatisticamente significativa, na AHR e inflamação mínima das vias aéreas, com pouca infiltração de eosinófilos quando comparados a camundongos BALB/c tipo selvagem. No nosso estudo bloqueamos o ligante PD-L1 com anticorpos anti-PD-L1 durante a sensibilização e o desfecho foi redução do extravasamento vascular. Eles também estudaram camundongos PD-L2^{-/-} e demostraram que os animais desenvolviam AHR mais grave que os camundongos BALB/c do tipo selvagem(73). Estes dados indicam que PD-L1 e PD-L2 podem ter papéis opostos na patogênese de doenças alérgicas, induzindo respostas imunes de padrão Th2 e Th1, respectivamente.

Foi avaliado *in vitro*, como determinadas citocinas do microambiente inflamatório determinam a expressão de PD-L1 e PD-L2 em células dendríticas. A célula dendrítica virgem expressa PD-L1 em moderada abundância e PD-L2 em baixa quantidade. Na presença de IL-4 a expressão de PD-L1 e PD-L2 em células dendríticas é de moderada abundância. Na presença de IFN- γ a expressão de PD-L1 aumenta muito e PD-L2 elevasse pouco; e na presença de IFN- γ e lipopolissacarídeo a expressão de PD-L1 se eleva e PD-L2 diminui (73).

DISCUSSÃO

Por outro lado, a expressão aumentada de PD-L1 observada em células dendríticas pulmonares, macrófagos e células B após o desafio com OVA inibe a produção de IFN- γ , o que poderia polarizar a resposta imune para o perfil Th2 e aumentar a AHR. Da mesma forma, a perda de PD-L1 resulta em aumento de IFN- γ e redução de AHR (73).

Singh et al. observaram que após reconhecimento antigênico e ativação, as células dendríticas pulmonares expressam PD-L1 e PD-L2. A interação PD-1/PD-L1 produz uma resposta Th2 com mais produção de IL-4, o que leva ao aumento da AHR. No entanto, a interação PD-1/PD-L2 inicia uma resposta do tipo Th1 com expressão aumentada de IFN-□ e subsequentemente redução da AHR. A expressão simultânea de PD-L1 e PD-L2 neutraliza os efeitos únicos e não leva à polarização imediata das células T (74) (Figura 33).

Em nosso estudo, bloqueamos a interação de PD-1/PD-L1 com o anti-PD-L1. Baseado nos achado de Singh et al., podemos presumir que houve uma menor polarização para Th2, consequentemente uma menor produção de IL-4, IL-5 e IL-13, que levou a uma menor ativação de linfócito B em plasmócito, que por sua vez levou a menor mudança da classe de anticorpos de IgM para IgE e IgG1, com redução do nível sérico de IgE e IgG1. No vigésimo oitavo dia, a inibição foi parcial para IgE(Figura 28) enquanto a inibição para IgG1 (Figura 29) se manteve. É possível que a PD-L1 contribua para o controle da recombinação precoce de troca de isotipos para IgE, mas possa escapar do controle de PD-L1 em momentos posteriores, possivelmente devido à produção local de IgE tecidual.

O nível sérico de IgE específica impacta na sensibilização de mastócitos, explicando a observação do grupo tratado com anti-PD-L1 apresentar menor número de mastócitos desgranulados. Estas descobertas mostram o papel da interação PD-1/PD-L1 em células dendríticas e linfócitos T nas doenças alérgicas.


Figura 33 - Papel dos receptores PD e seus ligantes PD-L1 e PD-L2.

Legenda: Após reconhecimento e ativação, as células dendríticas expressam PD-L1 e PD-L2. A interação PD-1 / PD-L1 produz uma resposta Th2 com mais produção de IL-4 e IL-13 o que leva ao aumento da resposta inflamatória alérgica (direita). No entanto, a interação PD-1 / PD-L2 inicia uma resposta do tipo Th1 com expressão aumentada de IFN-y e subsequentemente reduz a resposta inflamatória alérgica (esquerda). A expressão simultânea de PD-L1 e PD-L2 neutraliza os efeitos únicos e não leva à polarização imediata das células T (meio). Fonte: Modificado de Singh et al. 2011.

O PD-L1 também foi considerada diretamente responsável pela geração de células T reguladoras (75). McGee e Agarwal relataram que o PD-1 está ativado quando linfócitos T reguladores (Treg) suprimem a AHR e a inflamação das vias aéreas. Em um modelo em camundongos, esses autores observaram que os Tregs do baço e pulmões induzíveis expressando PD-1 reverteram completamente a inflamação pulmonar e a AHR frente à metacolina. Desta forma foi sugerido que a PD-1 está criticamente envolvida no mecanismo de ação dos linfócitos Treg (76).

DISCUSSÃO

Recentemente, observou-se que a PD-L1 associada a queratinócitos desempenha um papel importante na regulação negativa da função efetora de células T CD8 em sítios inflamatórios e desempenha um papel crucial na tolerância de células T periféricas contra antígenos exógenos (77). O PD-L1 interage não apenas com a PD-1, mas também com um segundo receptor, B7-1, nas células T ativadas, e essa interação regula negativamente a expansão das células T (78).

O bloqueio da interação PD-L1 com PD-1 e B7-1 com um anticorpo monoclonal, como o utilizado em nosso estudo, resulta em níveis aumentados de IFN- γ , mas não afetam a produção de IL-4 (73). O mesmo foi observado por Matsumoto et al. que em seu estudo evidenciaram elevação de citocinas IL-5, IL-13 e IFN- γ em animais que foram tratados com anti-PD-L1 durante a sensibilização à OVA. Entretanto, neste estudo não houve redução da AHR com o bloqueio de PD-L1 (79).

Sabe-se que a PD-1 desempenha funções críticas na regulação da autoimunidade, imunidade a tumores, imunidade infecciosa, imunidade ao transplante e na definição de privilégio imunológico. Recentemente, uma nova função da PD-1 e de seus ligantes na patogênese da doença alérgica foi estudada e revelou uma função coestimulatória crucial dos ligantes PD-1 e PD-L1 na patogênese da asma. Há fortes evidências de que a molécula PD-1 está envolvida na manutenção da tolerância periférica e que a PD-L1 contribui para sensibilização a alérgenos e na indução da asma. Os modelos de alergia e asma geraram evidências científicas de que PD-L1 e PD-L2 têm papéis opostos na modulação e polarização das funções das células T em AHR e inflamação das vias aéreas(74).

Camundongos PD-L1 knockout foram desenvolvidos e amplamente estudados pela Dr Arlene Sharpe. Em um modelo de doenças autoimune, Diabetes Mellitus, foi demonstrado que a PD-L1 nas células T, APCs e tecido do hospedeiro inibe as respostas de células T virgens e efetoras e desempenha um papel crítico na tolerância das células T(80). Inicialmente pretendíamos utilizar camundongos knockouts para PD-L1, mas a deficiência do PD-L1 os deixa mais propensos a desenvolver doenças autoimunes entre a 8-12 semana de vida.

Os achados de McAlees et al. destacam a complexidade da regulação imunológica via PD-1 e sugerem que a variabilidade observada em estudos examinando o papel dos membros da família PD-1 no controle da asma alérgica pode se dever à capacidade diferencial de regulação de subpopulações de células TCD4+ efetoras específicas. Foram estudados linfócitos T *naive* cultivados em condições polarizantes para Th1, Th2 e Th17 na presença de anti-PD-L1(81). O anticorpo diminuiu a produção de IFN-γ no perfil Th1, diminuiu a produção de IL-17A e IL-17F no Th17, mas, em contraste, o perfil Th2 não sofreu alteração significativa na produção IL-5 e IL-13, inclusive com aumento de 40% na produção de IL-4 (81). As células Th17 parecem ser fortemente inibidas pelo eixo PD-1/PD-L1, e as respostas Th17 excessivas estão associadas ao desenvolvimento de asma alérgica mais grave (81). De uma perspectiva clínica, esses dados sugerem que o eixo PD-1/PD-L1 exerce uma influência inibitória na asma, mas está envolvido apenas na regulação da gravidade da doença e não no início da doença.

O estímulo do eixo regulador PD-1/PD-L1 apresenta funções paradoxais de regulação da resposta imune e de indução de resposta imune de perfil Th2. No presente estudo, o bloqueio de PD-L1, diminuiu a resposta alérgica, sugerido que o estímulo de indução de resposta imune Th2 por PD-L1 sobrepõe a ação inibitória da molécula. A imunomodulação desse eixo pode representar nova opção de prevenção e terapêutica na abordagem do tratamento das doenças alérgicas, como a asma.

7. CONCLUSÃO

É provável que a molécula PD-L1 tenha um papel importante durante a fase de sensibilização alérgica, uma vez que o bloqueio da interação de PD-L1 com PD-1 e B7-1 inibe a síntese de IgE e IgG1 específicas, a inflamação celular e a permeabilidade vascular.

No entanto, o bloqueio da interação de PD-L1 com PD-1 e B7-1 apenas durante a fase efetora não alterou a inflamação celular e a permeabilidade vascular.

8. ANEXOS

Anexo I - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de

Medicina da Universidade de São Paulo

MEDICINA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 27/04/2015, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 073/15 intitulado: "Avaliação da resposta alérgica cutânea à *Dermatophagoides pteronyssius* e à Ovalbumina em modelo murino" que utilizará 72 animais da espécie camundongo e 9 animais da espécie rato, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Pedro Francisco Giavina-Bianchi Júnior Pesquisador (a) Executante: Rafael Bonamichi dos Santos

CEUA-FMUSP, 27 de Abril de 2015

Dr. Eduardo Pompeu Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP e-mail: ceua fm@usp.br

Anexo II - Carta de aprovação do Brigham and Woman's Hospital/ Dana-Farber Cancer

Institute-Institutional Care and Use Committee



Dana-Farber Cancer Institute 450 Brookline Avenue Boston, Massachusetts 02215

DECHACUC Longwood Center 9055 360 Longwood Ave. Boston, MA 02215 dfci_jacuc@dfci.harvard.edu

James Folicrum, CPIA Manager Longwood Center 9058 360 Longwood Ave. Boston, MA 02215 617.582.8207

Timothy Korbut, CPIA Coordinator Longwood Center 9059 360 Longwood Ave. Boston, MA 02215 617.582.9560

Linda Callahan, CPIA, LATG Sr. Manager for Compliance Longwood Center 9060 360 Longwood Ave. Boston, MA 02215 617.632.6222

March 29, 2019

To Whom It May Concern:

This letter is in regard to Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) animal protocol 15-046, "Active Cutaneous Anaphylaxis in Mouse Model." The Principal Investigator (PI) of this animal protocol was Mariana Castells, MD, PhD. Animal protocol 15-046 was approved by DFCI's IACUC on 2/9/2016 and was active through 1/30/2017, when it was closed at the request of the PI.

Rafael Bonamichi dos Santos, MD, was approved to work with live animals under protocol 15-046.

Sincerely, oloun time

James Folcrum, CPIA IACUC Manager

NCI DANA-FARMER/HARVARD CANCER CENTER

\

A Teaching Affiliate of Harvard Medical School Anexo III - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada "Bloqueio da molécula PD-L1 na hipersensibilidade imediata em modelo murino", registrada com o nº 1286/2019, sob a responsabilidade de Pedro Francisco Giavina Bianchi Junior e Rafael Bonamichi dos Santos, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 24.04.19

| Finalidade | () Ensino (x) Pesquisa Científica |
|-------------------------|--|
| Vigência da autorização | Início: 01-06-2015 Término: 03-06-2019 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo C57Bl/6 |
| Nº de animais | 45 |
| Peso/Idade | 8 semanas |
| Sexo | machos |
| Origem | Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) |

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 24 de Abril de 2019

Dr. Eduardo Pompeu Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP e-mail: ceua@fm.usp.br

9. REFERÊNCIAS

1. Crivellato E, Beltrami C alberto, Mallardi F, Ribatti D. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. Br J Haematol. 2003 Oct;123(1):19–21.

2. Oliver J, Bloom F, Mangieri C. ON THE ORIGIN OF HEPARIN : AN EXAMINATION OF THE HEPARIN CONTENT AND THE SPECIFIC CYTOPLASMIC PARTICLES OF NEOPLASTIC MAST CELLS. J Exp Med. 1947 Jul 31;86(2):107–16.

3. Dwyer DF, Barrett NA, Austen KF, Immunological Genome Project Consortium. Expression profiling of constitutive mast cells reveals a unique identity within the immune system. Nat Immunol. 2016 Jul;17(7):878–87.

4. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity wth gamma-E-globulin antibody. J Immunol Baltim Md 1950. 1966 Dec;97(6):840–53.

5. Johansson SG, Bennich H. Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. Immunology. 1967 Oct;13(4):381–94.

6. Tomioka H, Ishizaka K. Mechanisms of passive sensitization. II. Presence of receptors for IgE on monkey mast cells. J Immunol Baltim Md 1950. 1971 Oct;107(4):971–8.

7. Bennich H, Ishizaka K, Ishizaka T, Johansson SG. A comparative antigenic study of gamma E-globulin and myeloma-IgND. J Immunol Baltim Md 1950. 1969 Apr;102(4):826–31.

Riley JF, West GB. The presence of histamine in tissue mast cells. J Physiol. 1953
 Jun 29;120(4):528–37.

9. Fawcett DW. Cytological and pharmacological observations on the release of histamine by mast cells. J Exp Med. 1954 Aug 1;100(2):217–24.

10. Paton WDM. Compound 48/80: a potent histamine liberator. Br J Pharmacol

Chemother. 1951 Sep;6(3):499-508.

Bradley LM. Migration and T-lymphocyte effector function. Curr Opin Immunol.
 2003 Jun;15(3):343–8.

Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. J
 Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S73-80.

13. Motomura Y, Kitamura H, Hijikata A, Matsunaga Y, Matsumoto K, Inoue H, et al. The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4+ T cells. Nat Immunol. 2011 May;12(5):450–9.

14. Barlow JL, McKenzie ANJ. Type-2 innate lymphoid cells in human allergic disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2014 Oct;14(5):397–403.

15. Christianson CA, Goplen NP, Zafar I, Irvin C, Good JT, Rollins DR, et al. Persistence of asthma requires multiple feedback circuits involving type 2 innate lymphoid cells and IL-33. J Allergy Clin Immunol. 2015 Jul;136(1):59–68.e14.

16. Kim BS, Siracusa MC, Saenz SA, Noti M, Monticelli LA, Sonnenberg GF, et al. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. Sci Transl Med. 2013 Jan 30;5(170):170ra16.

17. Lee J-B, Chen C-Y, Liu B, Mugge L, Angkasekwinai P, Facchinetti V, et al. IL-25 and CD4(+) TH2 cells enhance type 2 innate lymphoid cell-derived IL-13 production, which promotes IgE-mediated experimental food allergy. J Allergy Clin Immunol. 2016 Apr;137(4):1216–1225.e5.

18. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E classswitch recombination. Nat Rev Immunol. 2003 Sep;3(9):721–32.

19. Takhar P, Corrigan CJ, Smurthwaite L, O'Connor BJ, Durham SR, Lee TH, et al. Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma. J Allergy Clin Immunol. 2007 Jan;119(1):213–8.

20. Coëffier M, Lorentz A, Manns MP, Bischoff SC. Epsilon germ-line and IL-4 transcripts are expressed in human intestinal mucosa and enhanced in patients with food allergy. Allergy. 2005 Jun;60(6):822–7.

21. KleinJan A, Vinke JG, Severijnen LW, Fokkens WJ. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. Eur Respir J. 2000 Mar;15(3):491–7.

22. Kraft S, Rana S, Jouvin M-H, Kinet J-P. The role of the FcepsilonRI beta-chain in allergic diseases. Int Arch Allergy Immunol. 2004 Sep;135(1):62–72.

23. Kraft S, Kinet J-P. New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. Nat Rev Immunol. 2007;7(5):365–78.

24. Burton OT, Oettgen HC. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. Immunol Rev. 2011 Jul;242(1):128–43.

25. Platzer B, Ruiter F, van der Mee J, Fiebiger E. Soluble IgE receptors--elements of the IgE network. Immunol Lett. 2011 Dec 30;141(1):36–44.

26. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. Mucosal Immunol. 2010 Mar;3(2):111–28.

27. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation.Nat Rev Immunol. 2006 Mar;6(3):218–30.

 Rivera J, Gilfillan AM. Molecular regulation of mast cell activation. J Allergy Clin Immunol. 2006 Jun;117(6):1214–1225; quiz 1226.

29. Boyce JA. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. Immunol Rev. 2007 Jun;217:168–85.

30. Forte, W.C.N. Imunologia do básico ao aplicado. 2nd ed. 179-237 p.

31. Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. J Allergy Clin Immunol. 2004 May;113(5):832–6.

32. Brown RH, Schauble JF, Hamilton RG. Prevalence of latex allergy among anesthesiologists: identification of sensitized but asymptomatic individuals. Anesthesiology. 1998 Aug;89(2):292–9.

Schwartz LB. Effector cells of anaphylaxis: mast cells and basophils. Novartis
 Found Symp. 2004;257:65-74-79, 98–100, 276–85.

34. Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Bock SA, Branum A, et al. 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. J Allergy Clin Immunol. 2006 Feb;117(2):391–7.

35. Golden DBK. Patterns of anaphylaxis: acute and late phase features of allergic reactions. Novartis Found Symp. 2004;257:101-110-115, 157–60, 276–85.

36. Simons FER, Ardusso LRF, Bilò MB, Dimov V, Ebisawa M, El-Gamal YM, et al. 2012 Update: World Allergy Organization Guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2012 Aug;12(4):389–99.

37. Aun MV, Bonamichi-Santos R, Arantes-Costa FM, Kalil J, Giavina-Bianchi P. Animal models of asthma: utility and limitations. J Asthma Allergy. 2017;10:293–301.

38. Bonamichi-Santos R, Aun MV, Agondi RC, Kalil J, Giavina-Bianchi P, Bonamichi-Santos R, et al. Microbiome and Asthma: What Have Experimental Models Already Taught Us?, Microbiome and Asthma: What Have Experimental Models Already Taught Us? J Immunol Res J Immunol Res. 2015 Jul 22;2015, 2015:e614758.

39. Bates JHT, Rincon M, Irvin CG. Animal models of asthma. Am J Physiol Lung

Cell Mol Physiol. 2009 Sep;297(3):L401-410.

40. Oyoshi MK, Oettgen HC, Chatila TA, Geha RS, Bryce PJ. Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. J Allergy Clin Immunol. 2014 Feb;133(2):309–17.

41. Doyle E, Trosien J, Metz M. Protocols for the induction and evaluation of systemic anaphylaxis in mice. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2013;1032:133–8.

42. Evans H, Killoran KE, Mitre E. Measuring local anaphylaxis in mice. J Vis Exp JoVE. 2014 Oct 14;(92):e52005.

43. Ramsdell, S.G. The use of Trypan Blue to demonstrate the immediate skin reaction in rabbits and guinea pigs. 15 (4). 1928;305–11.

44. Chase MW. STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS : X. ANTIBODIES INDUCING IMMEDIATE-TYPE SKIN REACTIONS. J Exp Med. 1947 Nov 30;86(6):489–514.

45. Goose J, Blair AM. Passive cutaneous anaphylaxis in the rat, induced with two homologous reagin-like antibodies and its specific inhibition with disodium cromoglycate. Immunology. 1969 Jun;16(6):749–60.

46. Ovary, Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. The Journal of Immunology. 81 (4), 355-357 (1958).

47. Ovary Z. Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. Prog Allergy. 1958;5:459–508.

48. Teshima R, Akiyama H, Akasaka R, Goda Y, Toyoda M, Sawada J. Simple spectrophotometric analysis of passive and active ear cutaneous anaphylaxis in the mouse. Toxicol Lett. 1998 Mar 31;95(2):109–15.

49. Akiyama H, Teshima R, Akasaka R, Fujimori K, Goda Y, Sawada J, et al. Quantitative evaluation of passive cutaneous anaphylaxis (PCA) using a hand-held spectrophotometer. Biol Pharm Bull. 1996 Aug;19(8):1112-4.

50. Finkelman FD. Anaphylaxis: lessons from mouse models. J Allergy Clin Immunol. 2007 Sep;120(3):506-515-517.

51. 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 Mar;115(3):449–457; quiz 458.

52. Ishikawa R, Tsujimura Y, Obata K, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. IgGmediated systemic anaphylaxis to protein antigen can be induced even under conditions of limited amounts of antibody and antigen. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Nov 26;402(4):742–6.

53. Dourado LPA, Saldanha JC da S, Gargiulo DL, Noviello M de LM, Brant CC,
Reis MLC, et al. Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. Cell Immunol.
2010;262(1):62–8.

54. Mountford AP, Fisher A, Wilson RA. The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to Schistosoma mansoni. Parasite Immunol. 1994 Oct;16(10):521–7.

55. Murakami N, Riella LV. Co-inhibitory pathways and their importance in immune regulation. Transplantation. 2014 Jul 15;98(1):3–14.

56. Brown GR, Hem V, Katz KS, Ovetsky M, Wallin C, Ermolaeva O, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D36-42.

57. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. Immunol Rev. 2010 Jul;236:219–42.

58. Mozaffarian N, Wiedeman AE, Stevens AM. Active systemic lupus erythematosus is associated with failure of antigen-presenting cells to express

programmed death ligand-1. Rheumatol Oxf Engl. 2008 Sep;47(9):1335-41.

59. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and
PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism,
Combinations, and Clinical Outcome. Front Pharmacol [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan
3];8. Available from: http://www.frontiersin.org.https.scihub.name/articles/10.3389/fphar.2017.00561/full

60. Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. Nat Rev Drug Discov. 2015 Aug;14(8):561–84.

61. Aguiar PN, Santoro IL, Tadokoro H, de Lima Lopes G, Filardi BA, Oliveira P, et al. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. Immunotherapy. 2016;8(4):479–88.

62. Nakae S, Suto H, Iikura M, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, et al. Mast Cells Enhance T Cell Activation: Importance of Mast Cell Costimulatory Molecules and Secreted TNF. J Immunol. 2006 Feb 15;176(4):2238–48.

63. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2012 Mar 22;12(4):252–64.

64. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. Science. 2013 Dec 20;342(6165):1432–3.

65. Tarhini AA. Immunotherapy of Melanoma. Curr Mol Pharmacol. 2015 Jul 16;

66. Aoun F, Kourie HR, Sideris S, Roumeguère T, Velthoven R van, Gil T. Checkpoint inhibitors in bladder and renal cancers: results and perspectives. Immunotherapy. 2015 Nov 23;

67. Scarpace SL. Metastatic squamous cell non-small-cell lung cancer (NSCLC): disrupting the drug treatment paradigm with immunotherapies. Drugs Context. 2015;4:212289.

68. Massari F, Ciccarese C, Caliò A, Munari E, Cima L, Porcaro AB, et al. Magnitude of PD-1, PD-L1 and T Lymphocyte Expression on Tissue from Castration-Resistant Prostate Adenocarcinoma: An Exploratory Analysis. Target Oncol. 2015 Nov 6;

69. Faget J, Bendriss-Vermare N, Gobert M, Durand I, Olive D, Biota C, et al. ICOSligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells. Cancer Res. 2012 Dec 1;72(23):6130–41.

70. Meng X, Huang Z, Teng F, Xing L, Yu J. Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. Cancer Treat Rev. 2015 Dec;41(10):868–76.

71. Ovary Z. [Cutaneous anaphylaxis in the albino rat]. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1952;3(4):293–301.

72. Mota I, Wong D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. Life Sci. 1969 Aug 15;8(16):813–20.

73. Akbari O, Stock P, Singh AK, Lombardi V, Lee W-L, Freeman GJ, et al. PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. Mucosal Immunol. 2010 Jan;3(1):81–91.

74. Singh AK, Stock P, Akbari O. Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma. Allergy. 2011 Feb;66(2):155–62.

75. Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, Guleria I, Sayegh MH, Noelle RJ. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 8;105(27):9331–6.

76. McGee HS, Yagita H, Shao Z, Agrawal DK. Programmed Death-1 antibody blocks therapeutic effects of T-regulatory cells in cockroach antigen-induced allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010 Oct;43(4):432–42.

77. Ritprajak P, Hashiguchi M, Tsushima F, Chalermsarp N, Azuma M. Keratinocyteassociated B7-H1 directly regulates cutaneous effector CD8+ T cell responses. J Immunol Baltim Md 1950. 2010 May 1;184(9):4918–25.

78. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. Immunity. 2007 Jul;27(1):111–22.

79. Matsumoto K, Inoue H, Nakano T, Tsuda M, Yoshiura Y, Fukuyama S, et al. B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism. J Immunol Baltim Md 1950. 2004 Feb 15;172(4):2530–41.

80. Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, et al. PD-L1deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 20;101(29):10691–6.

81. McAlees JW, Lajoie S, Dienger K, Sproles AA, Richgels PK, Yang Y, et al. Differential control of CD4(+) T-cell subsets by the PD-1/PD-L1 axis in a mouse model of allergic asthma. Eur J Immunol. 2015 Apr;45(4):1019–29.