RENATA HARUMI CRUZ

INTERAÇÃO ENTRE ANTICORPOS ESPECÍFICOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS DE PACIENTES ALÉRGICOS

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

São Paulo

2018

RENATA HARUMI CRUZ

INTERAÇÃO ENTRE ANTICORPOS ESPECÍFICOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS DE PACIENTES ALÉRGICOS

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

Área de concentração: Imunologia
Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível na Secretaria de Pós-gradução que aloja o Programa.

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cruz, Renata Harumi
Interação entre anticorpos específicos e células dendríticas de pacientes alérgicos / Renata Harumi Cruz; orientador Antonio Condino Neto. -- São Paulo, 2018.
90 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Alergia. 2. Alérgenos. 3. Células dendríticas. 4. Imunoglobulinas . 5. Linfócitos T CD4+. I. Condino Neto, Antonio , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renata Harumi Cruz

Titulo da Dissertação/Tese: Interação entre anticorpos específicos e células dendríticas de pacientes alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....** , considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 11 de dezembro de 2015.

PARECER 1262/CEPSH
CAAE: 49353615.8.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Avaliação da resposta imune em cocultura de DCs e linfócitos T na presença de Der p 1 e Der p 2 e/ou anticorpos específicos à Dermatophagoides pteronyssinus*" do pesquisador Prof. Dr. **Antonio Condino Neto** e da aluna **Renata Harumi Cruz**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br.

Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **11.12.2016**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO M. A. ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Humana do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a orientação do Professor Dr. Antonio Condino Neto. Este projeto recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – processo número 2015/10532-5.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os *pré-cientistas e cientistas* que lutam pela Ciência. Sabem que este ramo exige muita dedicação, principalmente ao próximo, os nossos pacientes, para trazer-lhes avanços e descobrimentos nesta longa caminhada do conhecimento e aprendizado, e assim ajudar no seu tratamento, melhora e recuperação da saúde.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Valério* e *Vera* que sempre me proporcionaram educação e me apoiaram nas escolhas e decisões com muito amor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2015/10532-5, pela bolsa-Mestrado e auxílio concedido, sem o qual não seria possível a realização deste estudo. Da mesma forma, agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio concedido.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Professor *Antonio Condino Neto*, por proporcionar a realização desse projeto, compartilhar conhecimentos e idéias, paciência, e reuniões construtivas.

Ao Professor *Dirceu Solé* e Dra. *Carolina Aranda*, pela atenção nos encontros realizados na UNIFESP, e aos pacientes do Hospital da Universidade Federal de São Paulo os quais, doaram amostras para o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu amigo, *Thi* (Thiago Pereira Russo), uma pessoa com imenso coração, que tenho um grande carinho. Um amigo o qual considero como meu irmão. Sempre esteve e está presente para longas conversas em cafés, almoços, jantares, nos momentos alegres e tristes. Em ambos os momentos, grandes ensinamentos tanto pessoais quanto acadêmicos me foram passados. São de extrema valia que os guardarei e passarei adiante. Sempre esteve paciente para me ouvir, e depois ajudar com suas palavras e orientações que iluminaram o caminho do meu pensamento e o agir. *I Love you! Let's grab a coffee, Thiiiii?*

Meu sincero agradecimento a *Chris* (Christina Arslanian Kubo), que sempre me socorreu no laboratório desde o início no LIH (Laboratório de Imunologia Humana), quando entrei no laboratório como aluna de Iniciação Científica, e me fez ver que desistir não é a solução.

À *Sil* (Silvana Lucchini), por sempre estar disposta em ajudar com as questões financeiras, burocráticas que vivemos na academia. A sua ajuda é de fundamental importância, Sil!

Aos amigos do LIH tantos os presentes quanto os não mais presentes, mas que um dia, dividimos conversas, experimentos, cafés e dicas. Agradeço pelo apoio e contribuição de alguma forma neste trabalho – *Tábata; Christiane; Lucila; Marina; Núria; Paola; Leandro; Zé; Marília; Josias; Patrícia; Ângela; Paulo; Walmir; Edgar; Alice; Otávio; Lena; Jusley; Edson* e *Gabriela.* Agradecerei com esta frase:

‘Cada um que passa na nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui outra. Cada um que passa na nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa só. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que duas almas não se encontram ao acaso. ’ *Antoine de Saint-Exupéry*

Durante o meu período de Mestrado conheci pessoas queridas que me acolheram calorosamente nas discussões de livros e fomos a muitos encontros: em teatros, e comidinhas. Dividimos e curtimos momentos únicos e aprendi com cada um de vocês um pouco sobre a vida e me fez ver a vida por meio de várias perspectivas. Vocês – *Beth; Alda; Lidia; Maria Eugênia; Cleusa; Alfia; Tia Neide; Fulvio; Cleber* e *Marcio* são amigos eternos. Obrigada por compartilhar momentos maravilhosos!

Aos membros da banca de qualificação, Dra. *Alessandra Pontillo*, Dra. *Eliana Faquin* e Dr. *Flávio Loures* pelas sugestões e críticas para o desenvolvimento e crescimento deste projeto.

Ao Professor *Niels*, antes de iniciar o Mestrado autorizou que eu participasse e assistisse às suas aulas de Imunologia junto com os seus alunos de graduação. Agradeço pela força, incentivo e conselhos para ingressar na carreira acadêmica.

À *Aurea* pelos deliciosos cafés proporcionando as manhãs e tardes convites à realização de experimentos, discussões acadêmicas e um momento para relaxar.

À *Eni,* pela paciência e contribuição nos processos burocráticos.

"A maçã não pode ser colocada de volta na árvore do conhecimento, uma vez que começamos a ver, estamos condenados e desafiados a buscar a força para ver mais, não menos."

Arthur Miller.

RESUMO

CRUZ, Renata Harumi. **Interação entre anticorpos específicos e células dendríticas de pacientes alérgicos**. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia). - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A atopia caracteriza-se pela tendência de um indivíduo a produzir IgE em quantidade elevada, em resposta a um alérgeno específico, levando ao desenvolvimento de asma, rinite ou eczema. Todavia, a manifestação do fenótipo da alergia depende da interação de fatores genéticos e exposição a alérgenos ambientais. Desta forma, o alérgeno é processado e apresentado aos linfócitos T, que desenvolvem uma resposta imune Th2, exacerbada característica da atopia. A principal célula que está envolvida na comunicação entre a imunidade inata e adaptativa é a célula dendrítica (DC) cuja função é capturar, processar e apresentar o antígeno aos linfócitos. As DCs imaturas capturam o antígeno e migram do tecido para o órgão linfóide periférico, onde elas se diferenciam em DCs maduras e apresentam o antígeno aos linfócitos T naive. Assim, os linfócitos T naive podem se diferenciar em subtipos de linfócitos efetores como: linfócitos Th1 e Th2. Esses linfócitos auxiliam na produção de anticorpos pelos linfócitos B na resposta imune humoral contra patógenos específicos. O sistema imune humoral compreende cinco classes de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgD, IgE e IgA e sua produção sofre influência da imunidade celular. Desta forma, alérgenos provenientes de ácaros como, *Dermatophagoides pteronyssinus*, podem levar à inflamação alérgica, alterando a produção de anticorpos. Tendo em vista evidências que demonstram a interação das DCs com anticorpos, propomos investigar sua influência na apresentação dos principais alérgenos da poeira domiciliar e sua modulação sobre a resposta imune em indivíduos alérgicos e não alérgicos.

Palavras-chave: Alergia, Alérgeno, Células dendríticas, Linfócitos TCD4+, Imunoglobulinas.

ABSTRACT

CRUZ, R. H. **Interaction among specific antibodies and dendritic cells from allergic patients.** 2018. 90 s. Dissertation (Master degree in Immunology). Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Atopy is characterized by the trend of an individual to produce high amounts of IgE in response to a specific allergen, leading to the development of asthma, rhinitis or eczema. However, the manifestation of the allergy phenotype depends on the interaction of genetic factors and exposure to environmental allergens. In this way, the allergen is processed and presented to the T lymphocytes, which develop a Th2 immune response, exacerbated characteristic of atopy. The main cell that is involved in the communication between innate and adaptive immunity is the dendritic cell (DC) whose function is to capture, process and present the antigen to lymphocytes. Immature DCs capture the antigen and migrate from the tissue to the peripheral lymphoid organ, where they differentiate into mature DCs and present the antigen to naive T lymphocytes. Thus, naive T lymphocytes can differentiate into subtypes of effector lymphocytes such as Th1 and Th2 lymphocytes. These lymphocytes assist in the production of antibodies by B lymphocytes in the humoral immune response against specific pathogens. The humoral immune system comprises five classes of immunoglobulins: IgG, IgM, IgD, IgE and IgA and their production is influenced by cellular immunity. In this way, allergens from mites such as *Dermatophagoides pteronyssinus*, can lead to allergic inflammation, altering the production of antibodies. In view of evidence demonstrating the interaction of DCs with antibodies, we propose to investigate their influence on the presentation of the main house dust allergens and their modulation on the immune response in allergic and non-allergic individuals.

Keywords: Allergy, Allergen, Dendritic cells, CD4 + T lymphocytes, Immunoglobulins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ácaro da poeira domiciliar 26

Figura 2 – Ativação do sistema imune inato pelos ácaros da poeira domiciliar.... 28

Figura 3 – Mecanismo clássico da inflamação alérgica 30

Figura 4 – O papel das moDCs na resposta imune alérgica a ácaros de poeira domiciliar..... 32

Figura 5 – Sequências dos experimentos realizados com células e soros 40

Figura 6 – Quantificação IgE (A): específicas a Der p 1; (B) específicas a Der p 2 53

Figura 7 – Quantificação da IgG (A): específicas a Der p 1; (B) específicas a Der p 2 54

Figura 8 – Quantificação da IgA (A): específicas a Der p 1; (B) específicas a Der p 2 55

Figura 9 – Correlação entre IgE com IgA específicas à Der p 1..... 56

Figura 10 – Correlação entre IgE com IgG específicas à Der p 1..... 56

Figura 11 – Correlação entre IgA com IgG específicas à Der p 1..... 57

Figura 12 – Correlação entre IgE com IgA específicas à Der p 2..... 57

Figura 13 – Correlação entre IgE com IgG específicas à Der p 2..... 58

Figura 14 – Correlação entre IgG com IgA específicas à Der p 2..... 58

Figura 15 – Detecção de IFN-γ no sobrenadante das moDCs e suas respectivas co-culturas com linfócitos TCD4+ de memória 59

Figura 16 – Detecção de IL-5 no sobrenadante das moDCs e suas respectivas co-culturas com linfócitos TCD4+ de memória 60

Figura 17 – Resposta dose dependente de moDCs de pacientes alérgicos e doadores saudáveis frente à estimulação com Der p 1 – avaliação da liberação de IL-5 61

Figura 18 – Resposta dose dependente de anticorpo IgA e IgG em moDCs de pacientes alérgicos estimulados com Der p 1 – avaliação da liberação de IL-5 62

Figura 19 – Resposta dose dependente de moDCs de pacientes alérgicos e doadores saudáveis frente à estimulação com Der p 1 – avaliação da liberação de IFN-γ..... 64

Figura 20 – Resposta dose dependente de anticorpo IgA e IgG em moDCs de pacientes alérgicos estimulados com Der p 1 – avaliação da liberação de IFN-γ...65

Figura 21 – Imunofenotipagem das moléculas extracelulares das moDCs de paciente alérgico 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos dos indivíduos que participaram do estudo.....52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACs	Anticorpos
APCs	Células apresentadoras de antígenos
Bt	*Blomia tropicalis*
BSA	Soro de albumina bovina
CD	Grupo de diferenciação
CysLTs	Cistenil leucotrienos
DCs	Células dendríticas
Der f	Alérgeno de *Dermatophagoides farinae*
Der p 1, 2	Alérgeno de *Dermatophagoides pteronissynus* do grupo 1, 2
Dp	*Dermatophagoides pteronissynus*
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FcαRI	Receptor para IgA
Fc"RI	Receptor para IgE
FcgRI	Receptor para IgG
GM-CSF	Fator estimulante de colônia para granulócito-macrófago
IFN-g	Interferon-gama
Ig (A, E, G)	Imunoglobulina

IL	Interlucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade principal classe II
MoDCs	Células dendríticas derivadas dos monócitos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	Solução de lavagem PBS mais Tween®
PBS-T-BSA	Solução de bloqueio PBS mais Tween® acrescida soro albumina bovina
pIgR	Receptor de imunoglobulina polimérica
PRRs	Receptor de reconhecimento padrão
RAST	*Radioallergosorbent test*
SIgA	IgA secretória
TCP	Teste cutâneo de puntura
TCR	Receptor de célula T
TfR	Receptor de transferrina
TGF-β	Fator de transformação de crescimento - beta
Th (1, 2)	Linfócitos T auxiliares (1,2)
TLR	Receptor semelhante a Toll
TMB®	Solução cromogênica de Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral

Tregs	Linfócitos T regulatórios
UA	Unidade arbitrária
WAO	Organização Mundial da Alergia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **22**

Alergia 23

1.1.2. *Características gerais* 23

Dermatophagoides pteronissynus 25

Resposta Imune e Alergia 29

Células do Sistema Imune e Alergia 30

Imunoglobulinas e Alergia 34

2. OBJETIVOS **37**

Gerais 38

Específicos 38

3. MATERIAL E MÉTODOS **39**

Fluxograma de experimentação 40

Casuística 41

Amostras 41

Teste cutâneo de puntura 43

Dosagem de IgE total e específica ao extrato de Dp 43

Detecção de IgE, IgA e IgG específicas à Der p 1 e Der p 2 43

Purificação de IgA e IgG totais 44

Coleta da amostra e Isolamento das células mononucleares do sangue periférico 45

Obtenção de linfócitos TCD4+ memória (CD45R0) e monócitos 45

Diferenciação de DCs derivadas dos monócitos (moDCs) e co-cultura com linfócitos TCD4+ de memória 46

Avaliação da produção dos fatores pró-inflamatórios e imunorreguladores 46

Quantificação de citocinas 47

Fenotipagem 48

Análise Estatística 48

4. RESULTADOS **50**

Caracterização da coorte estudada 52

Correlação entre imunoglobulinas 56

Avaliação das citocinas 59

Avaliação da liberação de IL-5 frente aos imunocomplexos 60

Avaliação da liberação de IFN-γ frente aos imunocomplexos 63

4.4. Avaliação da expressão das moléculas extracelulares 66

5. DISCUSSÃO **68**

6. CONCLUSÃO **74**

REFERÊNCIAS **76**

ANEXOS **82**

A- Questionário clínico **82**

B- Medida do teste cutâneo de puntura **85**

C- TCLE menores de 18 anos **86**

D- TCLE maiores de 18 anos. **89**

INTRODUÇÃO

"Você escreve para mudar o mundo... Se você alterar, mesmo que seja por um milímetro, a maneira como as pessoas olham para a realidade, então você pode mudá-lo."

James Baldwin.

IN TR O D U Ç Ã O

1.1. Alergia

1.1.2. Características Gerais

O termo alergia foi apresentado em 1906 por Clemens Von Pirquet, para descrever uma mudança na reação do sistema imune que ocorre devido a uma exposição inicial ao antígeno (sensibilização). A palavra alergia foi derivada do grego *allos* (outro) e *ergon* (trabalho) (THOMAS ET AL, 2010). O intuito de usar o significado da palavra *alergia*, por Clemens Von Pirquet, poderia ser tanto uma reação protetora, que conduzisse para imunidade, ou ser 'prejudicial', levando ao dano tecidual e reações adversas (THOMAS ET AL, 2010, HUBER, 2006).

A reação de hipersensibilidade do sistema imune é caracterizada pelo aumento exacerbado do nível de anticorpos do tipo IgE na circulação sanguínea, após o contato com baixas concentrações de alérgeno (LONDON, THARAKAN, RAMANATHAN, 2016). Este por sua vez, leva à ativação da reação inflamatória alérgica como: asma, rinoconjuntivite e eczema (YAZDANBAKHSH, KREMSNER, REE VAN, 2002).

Esta definição descreve a reação imune, entretanto, não inclui os sintomas clínicos. A atopia é um fator importante para o desenvolvimento das doenças alérgicas, embora o paciente atópico possa apresentar um teste positivo em resposta ao alérgeno sem desenvolvimento dos sintomas (BALDAÇARA ET AL, 2013).

As doenças alérgicas representam um problema de saúde que atinge grande parte da população. De acordo com os estudos epidemiológicos há um aumento na prevalência da *asma*, *rinite alérgica*, *conjuntivite* e *dermatite atópica*. Aproximadamente 1 bilhão de indivíduos no mundo são afetados pelas doenças supracitadas (TAN ET AL, 2016). Em casos mais extremos, as manifestações clínicas podem evoluir para *anafilaxia* e *morte* (HAWRYLOWICZ ET AL, 2005; RUTKOWSKI ET AL, 2014). A prevalência varia, geralmente sendo mais alta em

países desenvolvidos em relação aos países em desenvolvimento (HAWRYLOWICZ ET AL, 2005).

A *Organização Mundial de Alergia* (WAO) estima que atualmente 235 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de asma, a doença mais comum na infância (WORLD ALLERGY ORGANIZATION, 2014). No Brasil, a asma é responsável por 350.000 internações hospitalares por ano, 2.000 óbitos, e incontáveis consultas ambulatoriais e emergências, levando à ausência prolongada em atividades escolares e no trabalho (GALVÃO, CASTRO, 2005). No Brasil é também considerada a 4ª causa de hospitalizações pelo *Sistema Único de Saúde* (SUS), sendo a 3ª entre jovens adultos (GALVÃO, CASTRO, 2005).

O aumento nos casos de alergia coincide com o período de grande modernização e urbanização, com o desenvolvimento econômico do país e com a melhoria das condições sanitárias. Como consequência, houve uma mudança no estilo de vida da população, levando as pessoas (principalmente crianças) a terem menos exposição a agentes microbianos, corroborando a *'hipótese da higiene'* (SHARQUIE ET AL, 2013).

Tal hipótese foi inicialmente apresentada por Strachan em 1989 para explicar o porquê da ocorrência do aumento da asma e doenças alérgicas em países industrializados, associando a redução da carga microbiana na infância com o desenvolvimento de doenças alérgicas (NGOC ET AL, 2005). A *teoria da higiene* afirma que a falta de exposição a componentes microbianos na fase inicial da vida altera a pré-ativação do sistema imune, levando consequentemente ao aumento da suscetibilidade de doenças atópicas (STIEMSMA E TURVEY, 2017).

O mecanismo de manifestação das doenças alérgicas é complexo e influenciado por vários motivos, tais como: rota de exposição e dose do alérgeno, tempo de exposição, suscetibilidade genética e características do alérgeno (TAN ET AL, 2016). Sendo assim, a manifestação do fenótipo da alergia na maioria das vezes depende da interação de *fatores genéticos* e o *envolvimento com o ambiente,* ou seja, a exposição aos alérgenos ambientais: *poeira domiciliar*, *pólen*, *ácaros*, *pêlos de animais*, *fezes de barata, etc* (GREGORY, LLOYD, 2011; ROMAGNANI,

2004). Essa combinação gera uma elevada prevalência e muitas das doenças alérgicas tornam-se crônicas (NUNES, 2003).

Componentes orgânicos de diversas origens, tais como: pólens, fibras vegetais, derivados dos artrópodes (ácaros e baratas) e animais (gatos e cachorros) são agentes potenciais responsáveis pelo desencadeamento das doenças alérgicas (HOLT, THOMAS, 2005). Esses componentes são conhecidos como alérgenos, os quais induzem a reação de hipersensibilidade do tipo I, provocando uma resposta celular Th2 do qual culmina na produção de IgE (GHOULEH ET AL, 2012).

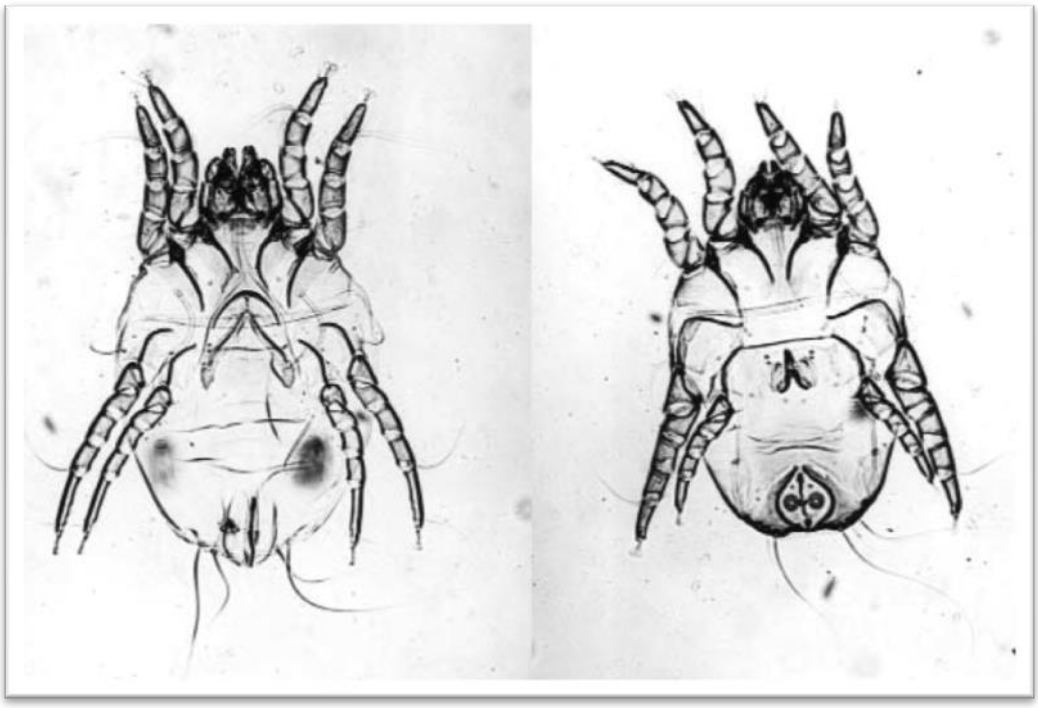
Dermatophagoides pteronissynus

Desde o século XVII, já havia conhecimento de que a inalação de fragmentos de ácaros poderia causar asma e rinite, porém nada muito aprofundado sobre suas consequências (RAULF ET AL, 2015).

Somente em 1964, o grupo de Reindert Voorhort, e o casal Frits T. M. Spieksma e Marise Spieksma-Boezeman, provaram que não somente a presença de ácaros da poeira domiciliar coletados de amostras provenientes das casas são as principais fontes de alérgenos, mas também são encontradas em ambientes internos úmidos e secos (RAULF ET AL, 2015).

A identificação do gênero *Dermatophagoides*, mais conhecido como ácaros da poeira domiciliar (figura 1), foi resultado de muito trabalho e estudo de médicos e biólogos durante o período da pré-Segunda Guerra Mundial (SPIEKSMA, DIEGES, 2004).

Figura 1 - Ácaro da poeira domiciliar



Dermatophagoides pteronyssinus, à esquerda, fêmea; e à direita, macho. Tamanho do corpo ~ 320 µm (Adaptado de: SPIEKSMA, DIEGES, 2004).

Os ácaros são microrganismos chamados de poiquilotérmicos, pois não conseguem regular a sua própria temperatura corporal. Sua proliferação ótima é entre 75% a 80% da umidade relativa e numa temperatura de 25°C a 30°C. São capazes de sobreviver em regiões onde há uma grande variação de temperatura e umidade, assim, utilizam seus mecanismos de escape como 'cavar' em áreas em que a umidade pode ser bem mantida, como sofás e colchões. Portanto, demoram meses para morrer, mesmo com pouca umidade e, assim, possuem o tempo suficiente para amplificar a dispersar suas substâncias alergênicas (BIAGTAN ET AL, 2014).

Na poeira domiciliar estão presentes componentes derivados do ácaro, tais como: grânulos de suas fezes, mas há também epitélios de animais, restos alimentares, esporos de fungos e fragmentos de insetos. Sendo que os alérgenos de ácaros são as principais moléculas na reação da hipersensibilidade. O ácaro da poeira domiciliar é representado principalmente pelo gênero *Dermatophagoides sp.*, e pode ser encontrado em diversos locais, preferencialmente em regiões de

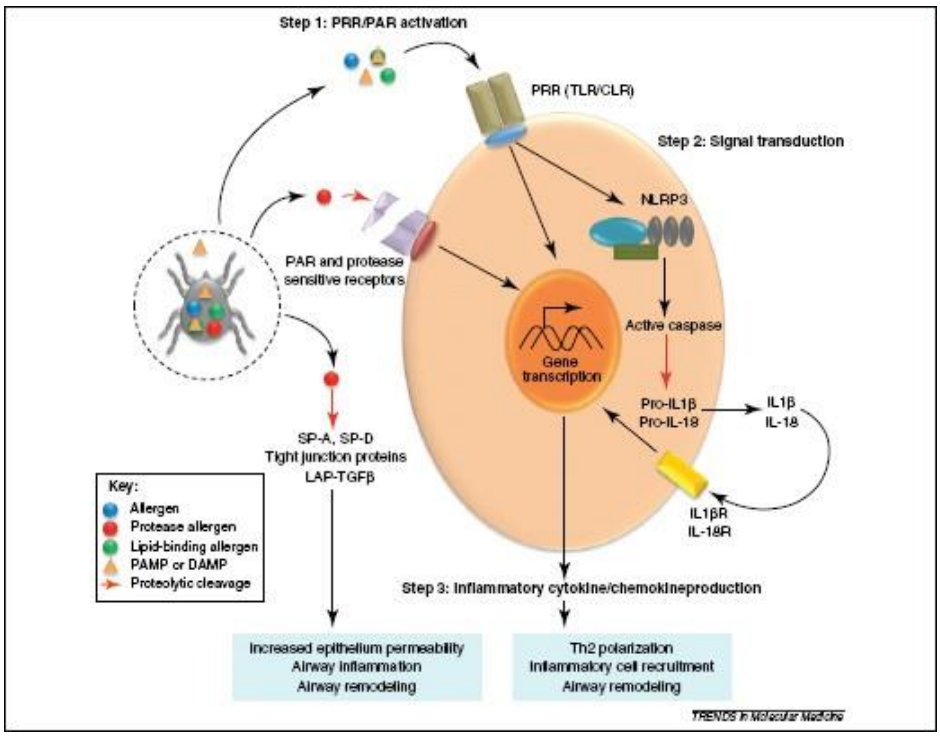
clima tropical como Brasil, Estados Unidos (Flórida), Porto Rico e Venezuela (CRIADO , WANDALSEN, 2001).

Na cidade de São Paulo, por exemplo, observou-se que as espécies *Dermatophagoides pteronissynus* (Dp) e *Blomia tropicalis* (Bt) representam 50% e 26% dos alérgenos presentes na poeira dos interiores domiciliares, respectivamente (SERRAVALLE, MEDEIROS, 1999). Um estudo realizado na cidade de Salvador demonstrou que os ácaros dessas espécies também são os principais indutores da sensibilização alérgica e responsáveis pelas maiores porcentagens de frequência de testes cutâneos positivos (SERRAVALLE, MEDEIROS, 1999).

O ácaro Dp pode induzir diretamente a resposta inflamatória, assim como a resposta imune mediada por IgE. Alguns estudos demonstraram que as enzimas provenientes de Dp são capazes de ativar os eosinófilos e células epiteliais dos brônquios, e induzir a liberação de mediadores inflamatórios provenientes dos mastócitos (LEE ET AL, 2008).

Alérgenos presentes na poeira domiciliar são capazes de ativar o sistema imune inato e iniciar uma resposta inflamatória, demonstrado pela atividade de protease dos alérgenos do grupo 1 de Dp e *Dermatophagoides farinae* (Der p 1 e Der f 1) – enzimas proteolíticas que induzem resposta pró-infamatória pelo rompimento do epitélio pulmonar). Já os alérgenos do grupo 2, Der p 2 e Der f 2 interagem com o sistema imune inato ativando as células dendríticas (DCs, *dendritic cells*) via receptor semelhante a Toll do tipo 2 e 4 (TLR, *Toll like-receptor*) e são também altamente alergênicos (Figura 2) (LISA, LLOYD, 2011; CALDERON ET AL, 2015).

Figura 2 - Ativação do sistema imune inato pelos ácaros da poeira domiciliar.



O sistema imune inato pode reconhecer os alérgenos por várias vias de sinalização. Dentre os quais, pela via de ativação dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), em que mecanismos intracelulares conduzem para transcrições de genes, encaminham para a síntese e liberação de citocinas inflamatórias. E o outro mecanismo é através da enzima proteolítica, dos quais, receptores da membrana, são clivados pela ação das proteases que também ativam a transcrição de genes para produção de citocinas inflamatórias (Adaptado de: JACQUET, 2011).

As doenças alérgicas têm uma resposta inflamatória que é desencadeada pelas citocinas produzidas pelos linfócitos Th2, mastócitos, basófilos e eosinófilos, os quais são: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e TGF-β (Nissen et al, 2013). Estas citocinas são produzidas e secretadas pelas células após estimulação por um alérgeno, como por exemplo, o alérgeno do Dp (BACHARIER, 2011).

Em estudos realizados com Der p 1, um dos principais alérgenos da poeira domiciliar, as DCs dos indivíduos sensíveis ao ácaro produziram mais IL-6 e IL-10, porém menos IL-12 do que as DCs provenientes dos pacientes saudáveis (UPHAN, 2003). Além disso, os linfócitos T dos pacientes sensíveis ao alérgeno do

ácaro Dp cultivados com DCs e Der p 1 produziram preferencialmente IL-4 do que IFN-γ (HAMMAD ET AL, 2003).

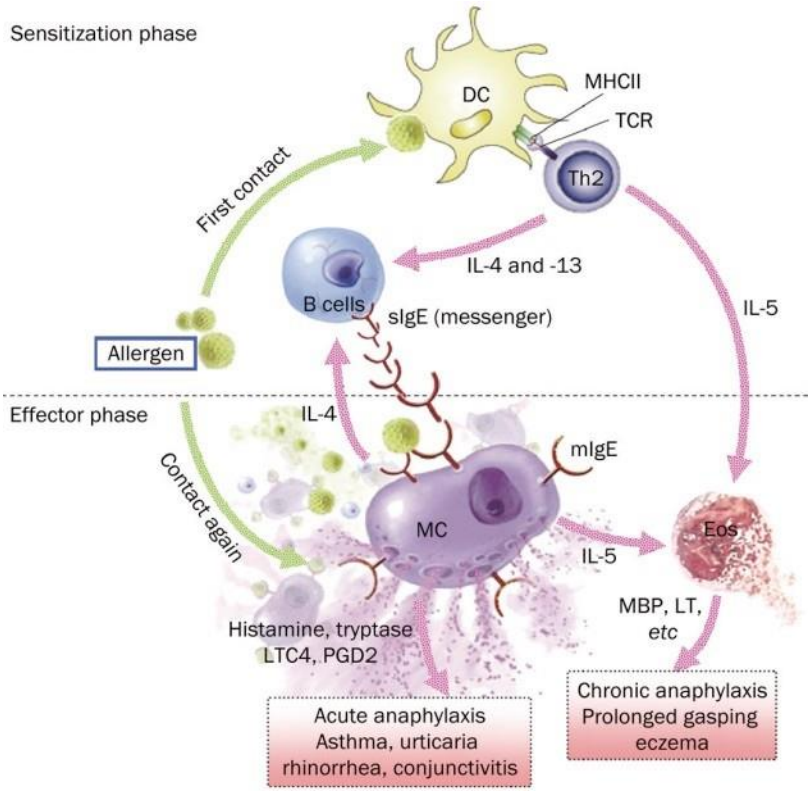
Resposta Imune e Alergia

As reações de hipersensibilidade decorrem de uma reação exacerbada do sistema imune, frente a baixas concentrações de um antígeno, devido a pré-disposição genética. A hipersensibilidade do *tipo I* ocorre na presença da imunoglobulina da classe E (IgE); do *tipo II* é mediada pelos anticorpos IgG e IgM; o *tipo III*, é mediada pela formação de imunocomplexos; e o *tipo IV*, chamada de hipersensibilidade tardia, é uma reação mediada principalmente pelos linfócitos T CD4+ e macrófagos. No entanto, a resposta alérgica é classicamente definida como a reação de hipersensibilidade do *tipo I* (GERSHWIN, 2014; GRUMACH, 2001).

A inflamação alérgica ocorre em duas fases: a *fase da sensibilização* (indução) e a *fase efetora*. A fase de sensibilização envolve as células apresentadoras de antígenos (APCs, *antigen presenting cells*), linfócitos T, citocinas secretadas pelos linfócitos Th2, bem como: IL-4, IL-5 e IL-13, troca de classe dos linfócitos B e a secreção e ligação das IgE no receptor de Fc#RI de alta afinidade na membrana dos mastócitos e basófilos, tornando estas sensibilizadas (HE ET AL, 2013).

A fase efetora ocorre quando o indivíduo passa por subsequentes exposições aos mesmos alérgenos, ativando mecanismos celulares que realizam ligação cruzada com duas IgE adjacentes em mastócitos ou basófilos sensibilizados. Ocorre o recrutamento de células inflamatórias, a ativação e liberação de mediadores inflamatórios, como, histamina, cistenil-leucotrienos (CysLTs) e citocinas que promovem permeabilidade vascular, contração muscular e produção de muco (HE ET AL, 2013; RIZZO, 2008) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo clássico da inflamação alérgica



O processo fisiopatológico da inflamação alérgica envolve duas fases: a *fase de indução*: é o momento onde as DCs recebem o primeiro contato com o alérgeno, consequentemente tornam-se ativas e interagem com linfócitos Th para a mudança do perfil celular, para linfócitos Th2; através da liberação de citocinas específicas induz a mudança de classe dos linfócitos B para a produção de IgE que por sua vez, se liga aos receptores FcεRI de alta afinidade tornando as células (mastócitos, basófilos) sensibilizadas. A fase efetora ocorre após o segundo contato com o mesmo alérgeno, fazendo com que as células sensibilizadas degranulem e liberem mediadores inflamatórios desencadeando manifestações clínicas (Adaptado de: He et al, 2013).

Além dos mastócitos, basófilos e eosinófilos, existem outras células do sistema imune que atuam durante a fase da manifestação alérgica, como por exemplo, as DCs e os linfócitos T.

Células do Sistema Imune e Alergia

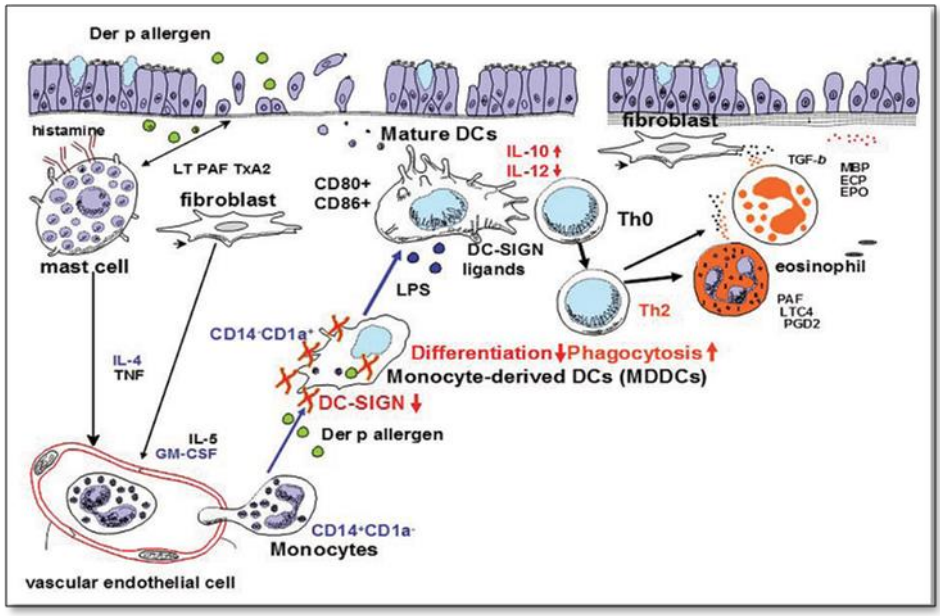
Células dendríticas são derivadas da medula óssea. Morfologicamente, são bem características, apresentando finas projeções nas membranas semelhantes a uma estrela (BANCHEREAU, STEINMAN, 1998). As DCs são células conhecidas APCs, cujo nome que a caracteriza está associado à sua

principal função. Elas desempenham o papel central no início da resposta primária e no aprimoramento da resposta imune secundária (GAETAN ET AL, 2002; GHAEMMAGHAMI ET AL, 2002).

Há diversos tipos de DCs identificadas tanto em humanos quanto em camundongos, dentre eles, há as DCs de origem mielóide, que são as células em estudo nesse trabalho. Estas células são encontradas no sangue periférico, representam entre 0.5% a 1.0% dos monócitos circulantes e possuem uma relação comum com monócitos e macrófagos. Para que possam sobreviver, necessitam do fator estimulador de colônia para granulócito e macrófago (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), e também são compostos por marcadores de superfície como: CD11c, CD33 e CD13 e expressam receptores semelhantes a toll 2, 3, 4 e 8 (FRISCHMEYER-GUERRERIO, 2014; UPHAM, STUMBLES, 2003).

Em relação à característica da funcionalidade das DCs há duas formas conhecidas como: DC imatura e DC ativada. Elas possuem diferentes funções fundamentais para a imunidade. DCs imaturas são importantes pela sua alta capacidade de capturar e processar o antígeno embora possua baixa capacidade de estimular linfócitos T. Já as DCs ativadas, possuem alta capacidade de estimular os linfócitos T *naive*, os quais são fundamentais para iniciar as respostas imunes adquiridas aos antígenos proteicos (Figura 4), contudo, possuem baixa habilidade para capturar antígenos. (CELIA ET AL, 1997).

Figura 4 - O papel das moDCs na resposta imune alérgica a ácaros de poeira domiciliar.



O alérgeno de Der p pode modular as células dendríticas derivadas dos monócitos (moDCs), conduzindo para diferenciação a s maturação num processo inflamatório alérgico (Adaptado de: WANG, 2013).

Na alergia, as DCs possuem um papel crucial no processo inicial e no controle da inflamação alérgica. As DCs e as células de Langerhans são particularmente importantes em doenças como a asma e o eczema, respectivamente (KAY, 2001). Sua função consiste no reconhecimento primário da estrutura nativa do alérgeno, processamento em peptídeo, e apresentação ao linfócito T CD4+ via molécula de MHC classe II das DCs, com subsequente polarização para a subpopulação de células T *helper* 2 (Th2) (SHAKIB ET AL, 2008).

O desenvolvimento diferencial dos linfócitos T *naive* em células funcionalmente efetoras, como linfócitos T *helper* 1 (Th1) ou linfócitos Th2, depende dos fatores presentes no microambiente no momento da ativação dos linfócitos T (HILKENS ET AL, 1997).

A diferenciação desses linfócitos necessita de basicamente três sinais estimulatórios, o qual é um processo importante para que haja uma resposta eficiente aos diferentes patógenos. O sinal 1 indica a propriedade molecular do antígeno para o receptor do linfócito T (TCR, *T cell receptor*). A expressão de

moléculas co-estimuladoras na superfície das DCs, juntamente com proteínas produzidas durante a resposta imune inata, representa o sinal 2, ao qual a molécula co-estimuladora se liga a receptores de linfócitos T e o ativam (DELFI ET AL, 2014). A combinação do sinal 1 e o sinal 2 representa a ativação antígeno específica da célula T *naive,* promovendo o seu desenvolvimento em linfócitos T efetores e de memória. As citocinas provenientes das APCs representam o sinal 3, o qual conduz para a determinação dos subtipos de linfócitos T *helper,* por exemplo, altas concentrações de IL-12 polarizam para o tipo Th1 e este linfócito, por sua vez, produz IFN-γ (KALINSKI ET AL., 1999).

Por outro lado, altas concentrações de IL-4 provenientes dos linfócitos T *naives* e baixas concentrações de IL-12, em resposta ao estímulo realizado pela apresentação de peptídeos pelas APCs, conduzem para o perfil do tipo Th2, onde esta célula irá produzir citocinas como: IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-31, IL-33 (Jutel, Akdis, 2011). A combinação do IL-1β, IL-6 com IL-23 independente do fator de crescimento e transformação-beta (TGF-β, transforming growth factor-beta), pode promover o desenvolvimento do tipo Th17, embora o TGF-β, em ambientes onde há inflamação, possa também conduzir para o perfil Th17 (BEDOYA ET AL, 2013).

Os linfócitos T regulatórios (Tregs) estão envolvidos na manutenção da tolerância periférica e no controle dos avanços das doenças inflamatórias crônicas. A presença das citocinas, IL-10 e TGF-β leva ao desenvolvimento dos linfócitos Tregs (VIGNALI ET AL, 2008). Há também uma população de linfócitos T conhecidos como linfócitos T de memória, os quais apresentam características morfofuncionais peculiares comparadas aos linfócitos T *naive.* São células capazes de responder rapidamente frente a um antígeno re-exposto, ou seja, há uma mudança na qualidade de resposta, que permite desenvolver respostas mais eficazes. Os linfócitos de memória apresentam uma maior expressão das moléculas de adesão, permitindo uma adesão mais intensa com as APCs (AHMED, GRAY, 1996).

Além dos linfócitos T, os linfócitos B participam da resposta alérgica. Sua principal função é síntese de anticorpos. Os linfócitos T que foram diferenciados em células efetoras migram para o folículo linfoide onde estão localizados os

linfócitos B (OZDEMIR ET AL, 2010). O reconhecimento do alérgeno pelo linfócito B e a ligação das moléculas co-estimulatórias entre linfócitos B e T, leva à ativação dos linfócitos B, que por sua vez, leva a mudança de classe do anticorpo IgM para IgE (HOLGATE, 2012).

Imunoglobulinas e Alergia

Imunoglobulinas (Igs) ou anticorpos (Acs) são proteínas solúveis produzidas pelos linfócitos B ativados, conhecidos como plasmócitos, em resposta aos antígenos. São proteínas que medeiam a resposta imune humoral, apresentam características estruturais comuns, e funcionalmente são específicas e diversificadas. O sistema imune adaptativo compreende cinco classes de imunoglobulinas: IgE, IgA, IgG, IgM e IgD (JUNIOR ET AL, 2010).

IgE é o anticorpo que possui uma função importante na defesa contra os parasitas. Está presente no sangue em baixas concentrações, possui um curto período de meia-vida devido à sua potente atividade. Está relacionada com a fisiopatologia das doenças alérgicas, assim como asma, alergia alimentar, anafilaxia e dermatite atópica. Em pacientes que apresentam essas doenças, o nível de IgE antígeno-específico é maior em comparação ao indivíduo saudável (WU, SCHEERENS, 2014). A IgE possui uma afinidade extremamente alta com o receptor FcεRI, os quais são expressos em células como: mastócitos, basófilos, eosinófilos e células de Langerhans. Este anticorpo circulante regula positivamente a expressão do receptor FcεRI dessas células. Desta forma, a forte ligação do anticorpo ao receptor gera uma regulação positiva e contribui para a potência desta IgE (SCHROEDER, CAVACINI, 2010).

A IgG é o anticorpo mais predominante e constitui 70% de todas as classes das Igs. É dividido em quatro subclasses de IgG referentes ao seu nível sérico presentes no sangue de um indivíduo saudável que encontramos desta forma: IgG1>IgG2>IgG3>IgG4. As subclasses apresentam distintas funções exercendo uma proteção imune sistêmica, como ligação a bactérias, vírus e fungos com alta afinidade (opsonização). Por exemplo, as IgG1 e IgG3 geralmente

induzem uma resposta contra antígenos proteicos, entretanto, as IgG2 e IgG4 estão relacionadas a antígenos polissacarídicos (SCOTT-TAYLOR ET AL, 2017).

Há ainda uma diferença na afinidade entre os três tipos de receptores FcγR (I, II, III). IgG1 e IgG3 ligam-se aos três tipos do receptor FcγR, IgG4 liga-se somente ao receptor FcγR I e II, embora seja uma ligação mais fraca em relação a IgG1 e a IgG2 que liga-se apenas ao receptor FcγRII (SINGER, JAROLIM, 2014; SCHROEDER, CAVACINI, 2010)

O anticorpo mais abundante do tecido linfóide associado à mucosa é a IgA. A resposta deste anticorpo foi associada com o desenvolvimento da tolerância da mucosa (oral) e contribui como a primeira linha de defesa das regiões mucosas pela neutralização dos antígenos inalados e ingeridos.

A IgA possui baixa capacidade de ativação e inibição do complemento e ativação do macrófago, podendo ser representada como um isótipo não inflamatório, assim como, IgG4 (PILLETE ET AL., 2010). Há duas subclasses da IgA, as quais são: IgA1, predominante no soro na forma monomérica, e IgA2, presente nas secreções mucosas na forma dimérica, sendo chamada de IgA secretória (SIgA, *secretory* IgA). A IgA monomérica liga-se com baixa afinidade ao receptor FcαRI e ativa o ITAM inibitório (ITAMi, motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina, sua ligação pode ativar ou inibir dependendo do ligante) o qual não conduz para a ativação celular ou degranulação/burst oxidativo, no caso dos granulócitos. Em contrapartida, o complexo IgA demonstra uma ativação mais forte e subsequente sinal de ativação, resultando na ativação celular (PASQUIER ET AL., 2004; GLOUDEMANS ET AL., 2013).

Foram descritos quatro receptores em que ocorre uma ligação com a IgA: FcαRI (CD89) expressos nas células mielóides como monócitos, neutrófilos, eosinófilos e células de Kupffer; receptor de Ig polimérica (pIgR, polimeric-Ig receptor) que transporta IgA e IgM polimérica através das células epiteliais da mucosa Fcα/μR expresso em monócitos/macrófagos; receptor asialoglicoproteína

do hapatócito (ASGP-R); e receptor da transferrina (TfR ou CD71) (PASQUIER ET AL, 2004).

Estudos realizados *in vitro* demonstraram que a ligação cruzada do FcαRI com DCs derivados dos monócitos humanos conduz à internalização do complexo IgA e apresentação do antígeno, resultando na manutenção das DCs e produção de IL-10. A ligação da IgA sérica em monócitos induz a expressão de IL-10 e inibe citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF (GLOUDEMANS ET AL., 2013)

Os anticorpos IgE e IgG específicos ao alérgeno da poeira domiciliar, por exemplo para Der p 1, estão envolvidos na alergia, porém cada um com interpretações diferentes. O IgE na fase inicial da alergia induz a degranulação dos mastócitos e contribui para o dano tecidual causado pela liberação dos grânulos provenientes dos mastócitos (HELLMAN ET AL, 2017). Estudos mostraram que este mesmo anticorpo poderia ser considerado um marcador da alergenicidade, uma vez que IgG específico ao alérgeno Der p 1 é quase exclusivamente produzido pelos pacientes alérgicos.

As imunoterapias utilizadas atualmente nas doenças alérgicas reduzem significativamente a inflamação alérgica, no entanto não apresentam melhora significativa na resposta, demonstrando a necessidade do desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. Assim, é importante investigar o tratamento que propicia o equilíbrio da resposta a linfócitos T que foram induzidos pelos alérgenos em pacientes atópicos.

A resposta inflamatória alérgica é caracterizada pela apresentação de antígenos pelas APCs para os linfócitos T *naives*, que direcionam a resposta para um perfil Th2. E em contraste, em indivíduos não alérgicos, há o predomínio de linfócitos Th1 e linfócitos T reguladores (T_{regs}). Nossa hipótese é que o tratamento com IgA e IgG *in vitro* é capaz de imunomodular a resposta das células dendríticas dos pacientes atópicos aos alérgenos Der p 1 e Der p 2.

OBJETIVOS

"Saiba de onde veio. Se você sabe de onde veio, não há absolutamente nenhuma limitação para onde você pode ir."

James Baldwin.

OB J E T I V OS

Geral:

- Avaliar o efeito de IgA e IgG nas respostas de células dendríticas frente aos alérgenos Der p 1 e Der p 2.

Específicos:

- Triar os pacientes por meio do *prick test* e história clínica;
- Quantificar a concentração de IgA, IgE e IgG específicos a Der p 1 e Der p 2 do soro dos pacientes e controles;
- Avaliar a liberação de citocinas por DCs de pacientes triados, como: IL-10 e IL-12;
- Avaliar a liberação de citocinas por linfócitos de pacientes triados em cocultura com as DCs, como: IL-4, IL-5 e IFN-γ.

MATERIAL E MÉTODOS

"Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação."

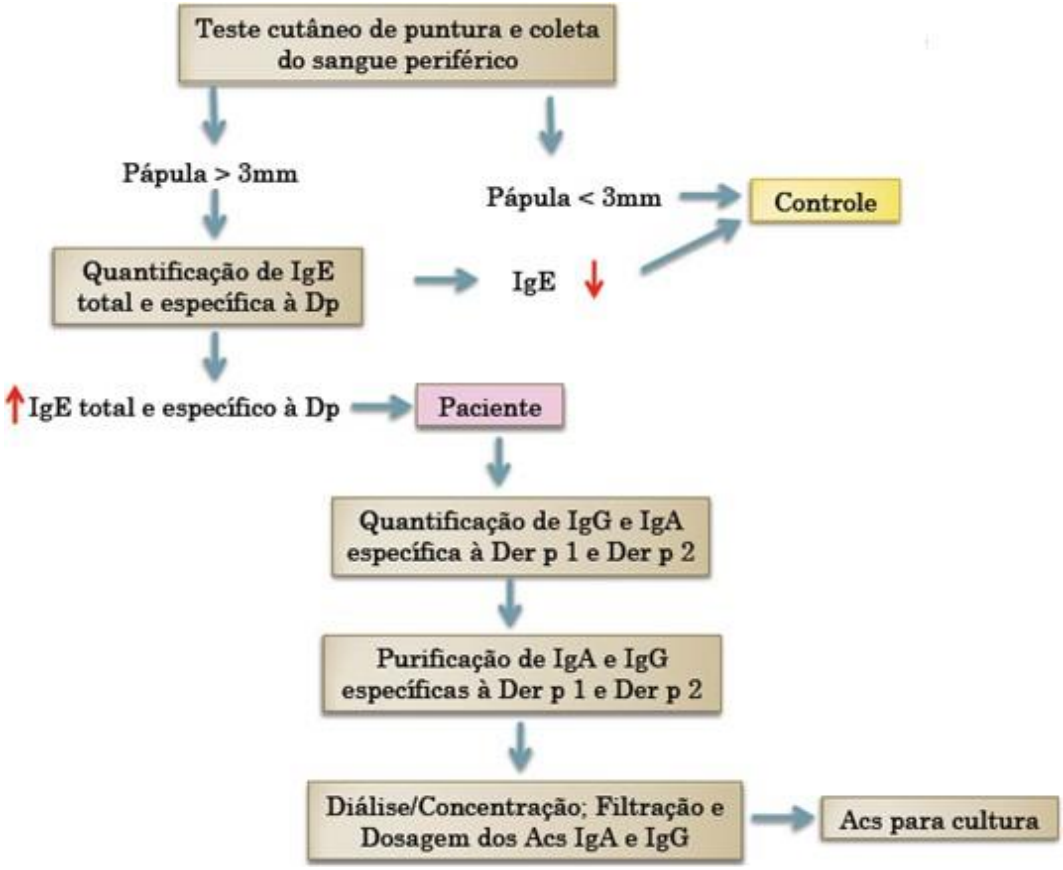
John Dewey.

Fluxograma de experimentação

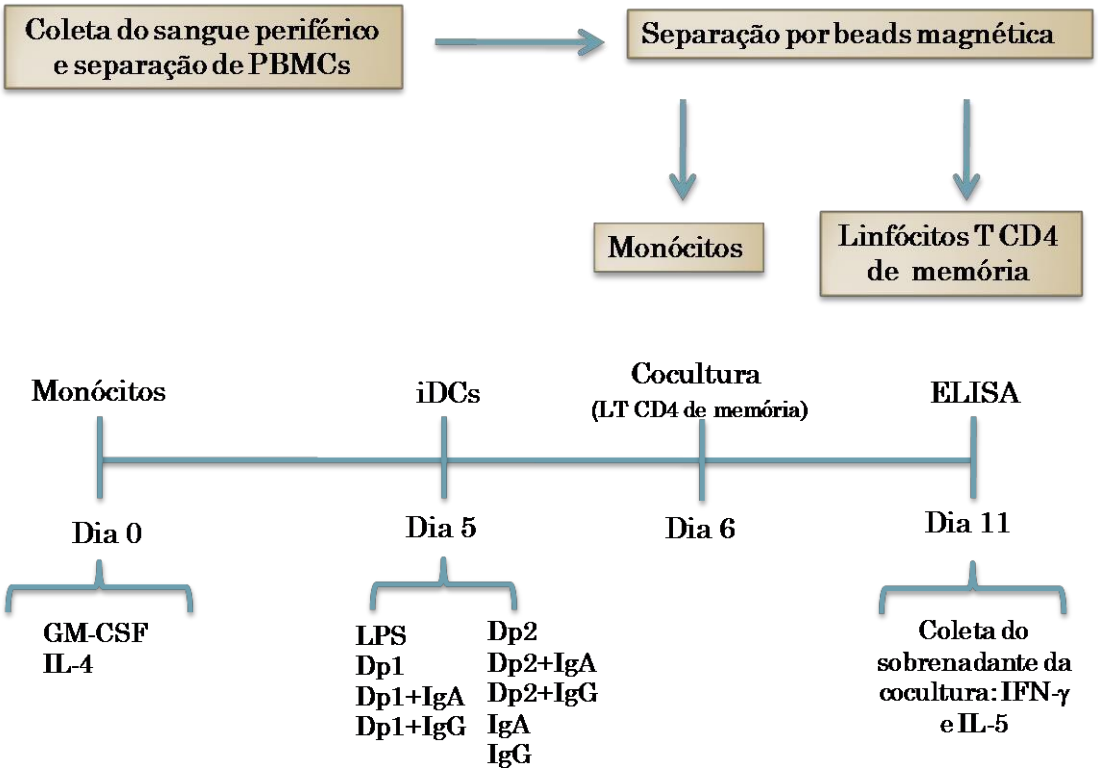
O fluxograma abaixo indica os procedimentos, em sequência, para melhor compreensão.

Figura 5 - Sequências dos experimentos realizados com células e soros humanos

1ª Etapa: Diagnóstico dos pacientes e controles



2ª Etapa: Recrutamento dos pacientes e controles



Fonte: Produção da própria autora

Casuística

Amostras

Participaram deste estudo 142 voluntários selecionados no Ambulatório de Alergia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo (USP).

A seleção dos indivíduos foi realizada avaliando o histórico clínico, teste cutâneo de puntura (TCP) e *Immuno CAP*. Para todos os indivíduos foi realizado o teste cutâneo de puntura (TCP) para alguns dos principais alérgenos (respiratórios e alimentares), dentre eles o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp). Após a realização do TCP, foram coletados dois tubos de 10 mL de sangue para coleta de soro, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), separados em alíquotas para

realização das análises de IgE total e específica para Dp e seus alérgenos Der p 1 e Der p 2, bem como IgA e IgG específicas aos alérgenos e posterior purificação das mesmas.

Nas primeiras análises, os participantes foram divididos em dois grupos: DP, que incluíram aqueles com histórico clínico de alergias, TCP positivo à Dp, bem como IgE específica ao ácaro positivo (*Immuno CAP*); - Controle, são aqueles sem histórico clínico de alergias, TCP negativo aos alérgenos testados, e IgE específica ao ácaro negativo.

Todos os procedimentos não ultrapassaram os limites descritos de risco mínimo, de acordo com a regulamentação da convenção de Genebra para pesquisa com seres humanos, e do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de pesquisa, o protocolo experimental e o termo de consentimento contemplam os quesitos éticos e foram analisados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB – USP.

Critérios de inclusão

- Apresentar diagnóstico clínico para alergia (asma, rinite alérgica, conjuntivite alérgica, dermatite atópica; lactente sibilante e alergia alimentar);
- Apresentar resultado positivo para o teste cutâneo de puntura (TCP);
- Apresentar alta titulação para IgE específica à Dp;
- Apresentar alta titulação para IgE, IgA e IgG específico a Der p 1 e Der p 2.

Critérios de exclusão

- Apresentar doenças infectocontagiosas ou congênitas.

Teste cutâneo de puntura

Para determinar os grupos de estudo, foi realizada uma avaliação de hipersensibilidade imediata cutânea (TCP) (BOUSQUET J ET AL, 2012). O procedimento do teste consiste na aplicação de uma gota (20 μL) do extrato alergênico de Dp sobre a superfície da pele do antebraço. Com um puntor estéril descartável (lanceta) faz-se um pequeno furo na pele. A análise foi realizada após 15 minutos e considerada positiva a reação com formação de pápula superior a 3 mm. Como controle negativo utilizou-se solução salina tamponada (PBS, 10 mM, pH = 7,4) e como controle positivo a histamina.

Dosagem de IgE total e específica ao extrato de Dp

A dosagem de IgE total e específica ao extrato de Dp foi realizada pela técnica descrita pelo sistema *Immuno CAP* (JOHANSSON; YMAN, 1988). Foram adquiridos já acoplados ao *Immuno CAP cellulose solid phase* a anti-IgE humana para detecção de IgE total e o extrato de Dp, para dosagem de IgE específica. Foi adicionada a amostra dos pacientes e após a incubação foi lavada para retirar os anticorpos que não se ligaram. A reação foi detectada incubando com anti-IgE humana conjugada com fluoresceína para dosagem de IgE total ou com anti-IgE humana também conjugada com um agente fluorescente. Após parar a reação, a intensidade da fluorescência foi quantificada. Para avaliar os resultados, a fluorescência foi convertida em concentrações pelo *Software* do equipamento, utilizando uma curva de calibração.

Detecção de IgE, IgA e IgG específicas à Der p 1 e Der p 2

Para determinar os níveis de IgE, IgA e IgG específicos aos alérgenos Der p 1 ou Der p 2, foi realizado ensaio de ELISA. Resumidamente, placas de poliestireno (*high-biding* de 96 poços; BD *Biosciences*) foram sensibilizadas com 1 μg/mL do alérgeno Der p 1 ou Der p 2 diluído em tampão carbonato para sensibilização das placas. Após incubação de 15 a 18 horas a 4ºC, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem PBS mais *Tween*® 20 (PBS-T 0,1%; Promega, Madison, WI, EUA). As placas foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente com PBS-T acrescidos de 1% de soro albumina bovina

(PBS-T-BSA 1%). Após bloqueio, as placas foram lavadas novamente seguidas pela adição das amostras séricas (IgE/Der p 1 – 1:6; IgE/Der p 2 – 1:16; IgA/Der p 1 – 1:60; IgA/Der p2 – 1:80; IgG/Der p 1 – 1:150; IgG/Der p 2 – 1:300) e incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi adicionado anticorpo secundário biotinilado anti-IgE (1:1000) ou anti-IgA ou anti-IgG humana conjugados com peroxidase e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas de IgE foram lavadas novamente e incubadas com solução de Avidina peroxidase (1:1000 Avidin Peroxidase; eBioscience) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após mais um ciclo de lavagem depois da última etapa de cada anticorpo, as placas foram reveladas com 50 μL de reagente tetrametilbenzidina (TMB®; BD *Biosciences*). Após 20 minutos a reação foi interrompida com 50 μL ácido sulfúrico (30%) e a absorbância lida em comprimento de onda de 450 nm em leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

A concentração das amostras foi estimada em UA/mL (UA, unidades arbitrárias) através da comparação com uma curva padrão feita com um soro com altos níveis de IgA ou IgG específica à Der p 1 ou Der p 2.

Purificação de IgA e IgG totais

A purificação de IgA e IgG foi realizada pelo método da cromatografia de afinidade (especificidade de ligação). Para purificação dos anticorpos foram utilizadas colunas com resina de agarose contendo Jacalina (para IgA) ou Proteína G (para IgG). As colunas foram equilibradas com PBS seguidas pela incubação do soro diluído 1:1 por 10 minutos à temperatura ambiente. Os componentes do soro que não se ligaram à coluna foram lavados com PBS. Os anticorpos retidos pelas respectivas colunas foram eluídos em tampão 0,1M de α-D-galactose (para IgA) e 0,1M de glicina pH 2,5 (para IgG). As alíquotas contendo IgG purificada tiveram o pH neutralizado com 1M de tris pH 9,0. Ambos os anticorpos purificados foram dializados e concentrados com PBS e em seguida foram esterilizados por filtração utilizando membrana de 0.20 μm.

Após a purificação, as colunas foram regeneradas com PBS e podem ser utilizadas novamente em um novo processo de purificação ou estocadas em solução contendo PBS acrescidos de 0,02% de azida sódica a 4°C.

Coleta da amostra e Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue foi coletado em tubos contendo heparina sódica (BD Vacutainer). Para obtenção das células mononucleares (PBMC), protocolo segundo o fabricante, 8 mL de sangue diluído em 27 mL de PBS foram adicionados em camada sobre a solução de Ficoll-Hypaque (densidade = 1,077 g/mL; GE Healthcare) seguido por centrifugação, durante 30 minutos a 900 x g, a 21°C sem freio. Após a centrifugação, a fase contendo PBMC foi coletada e transferida para um tubo cônico de 50 mL, onde foram adicionados 40 mL de PBS e levou-se para centrifugação durante 10 minutos a 700 x g, a 21°C. Foram realizadas duas lavagens sequenciais de 10 minutos a 300 x g e 200 x g, respectivamente. Na última lavagem, as células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Life Technologies), suplementado com 2 mM L-glutamina, 100 U/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB, inativado pelo calor) para o procedimento da contagem celular. A contagem foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer, numa diluição de 1:10 com corante de azul de Tripan (10 μL de células para 90 μL de corante). O corante auxilia na verificação da viabilidade das células, corando as células mortas. Uma viabilidade acima de 95% foi considerada adequada para a realização dos experimentos.

Obtenção de linfócitos TCD4+ memória (CD45R0) e monócitos

Para isolar a população de linfócitos, foi utilizado o kit de isolamento de linfócitos T CD4+ de memória (memory CD4+ T Cell Isolation kit, human, Miltenyi Biotec). Enquanto que para obter a fração celular enriquecida de monócitos foi utilizado o kit II de isolamento de monócitos (monocyte isolation kit II human, Miltenyi Biotec).

Resumidamente, os linfócitos T CD4+ foram selecionados negativamente, portanto, todas as outras populações celulares foram marcadas usando um

coquetel (CD45RA, CD8, CD14, CD16, CD19, CD56, CD36, CD123, anti-TCRγ/δ, e CD235a) de anticorpos conjugado com biotina incubados por 5 minutos a 4°C, e posteriormente incubados com micro-esferas anti-biotina por 10 minutos a 4°C. Após as incubações os PBMCs foram aplicados na coluna MACS® (Miltenyi Biotec) e as células que foram marcadas ficaram retidas, dessa forma, os linfócitos (fração de células não marcadas) passaram através da coluna magnética, foram coletados e armazenados a -80ºC em solução de soro fetal bovino contendo 10% de DMSO. Da mesma forma, os monócitos foram obtidos utilizando a mesma metodologia, porém com um coquetel de anticorpos diferentes, disponível no seu respectivo kit (CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 e Glycophorin A). No entanto, após a obtenção das células de interesse, os mesmos foram lavados para realizar a contagem celular e o plaqueamento para diferenciação em células dendríticas (DCs).

Diferenciação de DCs derivadas de monócitos (moDCs) e co- cultura com linfócitos T CD4+ de memória

Os monócitos obtidos dos PBMCs após a separação magnética foram plaqueados na concentração de 0,5 x 10^5 monócitos/mL por poço em placa de 12 poços.

Para diferenciação em moDCs, foi adicionado ao meio de cultura RPMI 1640 suplementado e 50 ng/mL de IL-4 humano (PeproTech, Rocky Hill, NJ) e 50 ng/mL de GM-CSF humano (PeproTech, Rocky Hill, NJ) para diferenciação celular. A placa foi incubada por 5 dias a 37ºC, com 5% de CO_2. No quinto dia as moDCs foram transferidas para placas de 96 poços de fundo em "U" e foram ativadas com os estímulos para sua maturação, tais como: 5 µg/mL de LPS, 5 µg/mL de Der p 1 e 5 µg/mL de Der p 2, logo depois foram adicionados os linfócitos nos poços para cocultura. As células foram mantidas em atmosfera úmida, saturada em 5% de CO_2. No décimo o sobrenadante foi coletado para dosagem das citocinas.

Avaliação da produção dos fatores pró-inflamatórios e imunorreguladores

3.10.1. Quantificação de citocinas

A análise das citocinas é outro fator importante na ativação dos linfócitos e monócitos. A produção das mesmas leva ao direcionamento da atividade pró-inflamatória e reguladora da resposta imune. Para seguir com esta análise, utilizamos o sobrenadante das culturas das DCs e das co-culturas com linfócitos. Esse material foi submetido a uma dosagem de citocinas por ELISA para IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 p70, IL-13, conforme protocolo especificado pelo fabricante (BD Pharmigen). As placas para ELISA (high-biding de 96 poços; BD Biosciences) foram revestidas adicionando-se 100 μL de anticorpos monoclonais de captura de antígenos para as citocinas supracitadas e incubadas por 18 horas a 4°C (em duplicata). As placas foram lavadas com PBS com (0,05%) Tween® 20 (Promega, Madison, WI, EUA) e bloqueadas por duas horas com 200 μL de solução de albumina bovina a 1% (BSA, Sigma-Aldrich) e sacarose a 5% (Synth, Diadema, SP, Brasil) em PBS. Após este período, as placas foram lavadas novamente e 50 μL do sobrenadante das amostras foi adicionado e incubado por duas horas em temperatura ambiente. Após nova lavagem, foram adicionados 100 μL de anticorpo policlonal secundário biotinilado (liga-se às citocinas) e incubados durante duas horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e incubadas com solução de peroxidase (Horseradish Peroxidase; Sigma-Aldrich) conjugada à avidina (1,25 ng/mL em PBS + BSA 1 %; Genzyme Diagnostics) por 20 minutos à 37°C. Após 3 lavagens com PBS, foram adicionados 100 μL de reagente tetrametilbenzidina (TMB®; Sigma-Aldrich) para revelar a reação. Após 30 minutos a reação é interrompida com ácido sulfúrico (30%) e a absorbância lida em comprimento de onda de 450 nm em leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão feita com as respectivas citocinas recombinantes humanas, utilizadas numa diluição seriada a partir de 2.000 até 15,62 pg/mL. Os resultados da absorbância são analisados por regressão linear no programa Prism 4.0 (GraphPad Softawer Inc., La Jolla, CA, EUA). As concentrações de citocinas das amostras foram representadas em pg/mL.

Fenofenotipagem

A expressão de marcadores de superfície CD1a, CD83, CD40, CD80, CD86 e DC-SIGN específicos de células dendríticas, foi avaliada de forma a analisar o padrão fenotípico apresentado. Para cada molécula analisada, foi utilizado um anticorpo monoclonal específico marcado com fluorocromos distintos (BD Biosciences, EUA). O isolado celular (5 x 10^5 células) foi incubado com os anticorpos citados por 30 mimutos à 4°C em ambiente escuro (em volume final de 100µL de RPMI) em tubos de poliestireno de 5 mL com fundo arredondado (tubos de citometria). Após tempo de incubação, as células foram lavadas duas vezes com 500µL de PBS (centrifugação a 900 x g por 5 minutos) e fixadas em PBS contendo paraformaldeído (0,5%). A análise foi realizada em citômetro de fluxo Atune NxT (Thermo Fisher Scientific). A região das células a ser analisada foi determinada em escala linear usando os parâmetros de *foward* (FSC) *versus side scatter* (SSC), indicativos de tamanho e complexidade celular, respectivamente. Após a seleção da população celular, fez-se a aquisição de 5000-10.000 eventos em cada amostra para avaliação dos marcadores. Para a análise utilizou-se o software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA). A partir desta análise, foram obtidos dados de densidade por célula de cada marcador, sugerida pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI, do inglês *Median Fluorescence Intensity*).

Análise estatística

Após teste de normalidade, como o D'Agostino-Pearson, verificamos a avaliação estatística a ser utilizada. Caso os dados não apresentem distribuição normal, aplicou-se teste não-paramétrico como Kruskall-Wallis, Mann Whitney e Tukey. No caso dos dados apresentarem distribuição normal, aplicou-se testes paramétricos como o teste "t" de Student e teste de Bartlett para a verificação da existência ou não de homogeneidade entre as variâncias, seguido da análise de variância (ANOVA). O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, a probabilidade de $p<0,05$ capaz de revelar a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os dados dos diferentes grupos (da Silva,

2003). Todas as análises foram realizadas no Software Prism 4.00 (Graph Pad Softawer Inc.).

RESULTADOS

"O amor não começa e termina da forma como parecemos pensar. O amor é uma batalha, o amor é uma guerra, o amor é um crescimento."

James Baldwin.

RESULTADOS

Primeiramente, foram padronizados os ELISAs para detecção de IgE, IgA e IgG específicas à Der p 1 e Der p 2. Os resultados das amostras provenientes desses ensaios foram utilizados juntamente com os resultados do questionário clínico, TCP, IgE total e específica ao ácaro para formação dos grupos DP e Controle. Além disso, foram realizadas também, padronizações dos protocolos experimentais (ELISA, cultura celular) e a preparação das colunas de Der p 1 e Der p 2 para purificação dos anticorpos específicos a esses alérgenos. Foi observada uma maior produção de anticorpos IgE, IgG e IgA nos pacientes atópicos. Após essa etapa, seguimos com a padronização dos ensaios de cultura celular de DCs e linfócitos T CD4+ de memória.

Resumidamente, foi realizada a separação celular por gradiente de densidade para que fossem separadas as células mononucleares. Em seguida, foi purificada para obter os monócitos e linfócitos TCD4+ de memória. Para ambas as células foram utilizados o protocolo de separação negativa por *beads*, após essa separação os monócitos foram estimulados com IL-4 e GM-CSF para diferenciação em moDCs (células dendríticas derivadas de monócitos), e os linfócitos T CD4+ de memória foram congelados como mencionado com mais detalhes em material e métodos (item 3.8).

Após as dosagens das Igs o próximo passo seria avaliar o efeito do tratamento com IgA e IgG nas DCs em co-cultura com linfócitos T CD4+ de memória. Para isso utilizamos a produção de citocinas para avaliar as concentrações celulares e dos estímulos usados. Desta forma, verificamos o efeito das IgAs e IgGs específicas aos alérgenos Der p 1 sobre moDCs na modulação do perfil de resposta para células T *helper* CD4+ de memória em pacientes e indivíduos saudáveis. Avaliamos se as moDCs ao serem estimuladas com anticorpos IgA e IgG de pacientes atópicos são capazes de modular o perfil das citocinas responsáveis pela diferenciação dos linfócitos T.

Caracterização da coorte estudada

No presente trabalho nosso objetivo é avaliar os efeitos do tratamento com IgA e IgG, específicas aos alérgenos Der p 1 e Der p 2, sobre DCs na modulação do perfil da resposta de linfócitos T CD4+ de memória em pacientes e indivíduos saudáveis.

Neste contexto iniciamos com a seleção e coleta das amostras biológicas dos participantes envolvidos no projeto, bem como a triagem dos grupos, alérgico ou controle, e compilamos os dados para uma visão ampla da coorte dos indivíduos e suas características (**Tabela 1**).

Tabela 1. Dados demográficos dos indivíduos que participaram do estudo

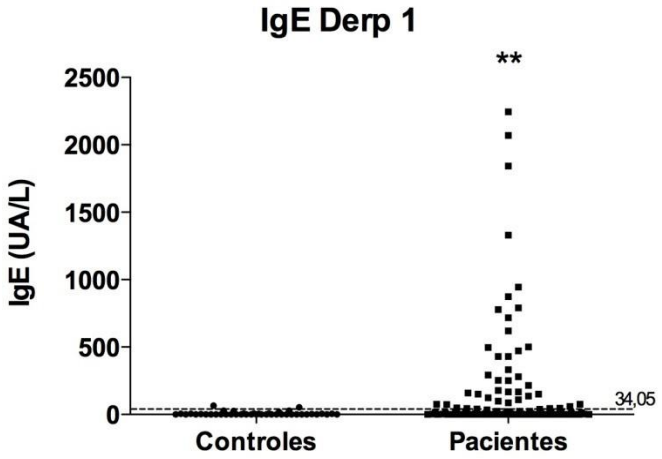
		Paciente		Controle	
Gênero		51F	47M	27F	17M
Idade, anos*		26,2 ± 11,7		21,2 ± 9,3	
Clínica	Asma/Rinite alérgica	23	19	0	0
	Dermatite atópica	8	6	0	0
	Alergia alimentar	2	6	0	0
	Lactente Sibilante	1	2	0	0
	Conjuntivite alérgica	17	14	0	0

*Valores expressos em média e desvio padrão

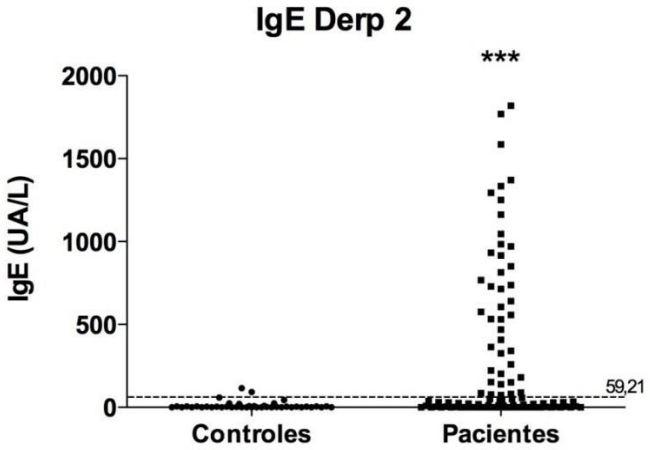
A determinação dos níveis de anticorpos séricos específicos foi mensurada por ELISA. Este método fornece informações quantitativas referentes ao perfil de sensibilidade do paciente para auxiliar no diagnóstico do mesmo (Daher et al, 2009). Dessa forma, realizamos a dosagem dos anticorpos específicos no qual os valores foram determinados utilizando *cut-off* fazendo, média mais duas vezes o desvio padrão (média+2xSD) para determinar o nível de corte dos anticorpos IgE, IgG e IgA específicos Der p 1 e Der p 2, e comparamos os seus níveis entre o grupo Controle e grupo DP (**Figuras 6** (**A/B**)**, 7** (**A/B**)**, 8** (**A/B**)). Dito isso, os resultados demonstraram, que os pacientes possuem níveis elevados de anticorpos específicos à Der p 1 e à Der p 2 em comparação ao controle. Conforme observamos nas **figuras 6 (A/B)**, **7 (A/B)** e **8 (A/B)**. Sendo os valores de P: $P< 0,05$, $P< 0,005$ e $P< 0,0001$.

Figura 6 - Quantificação IgE

(A)



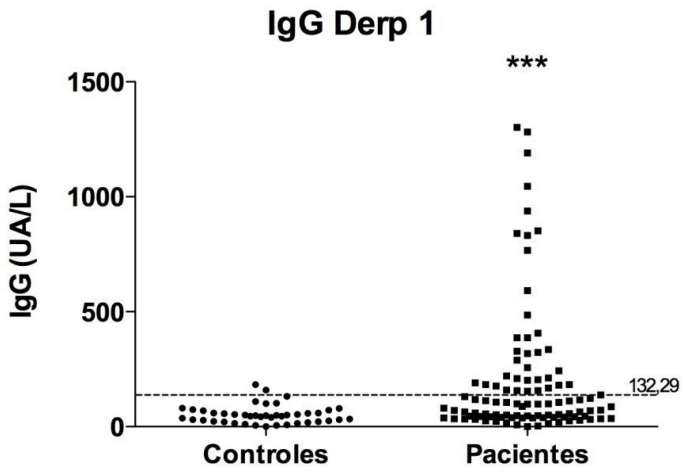
(B)



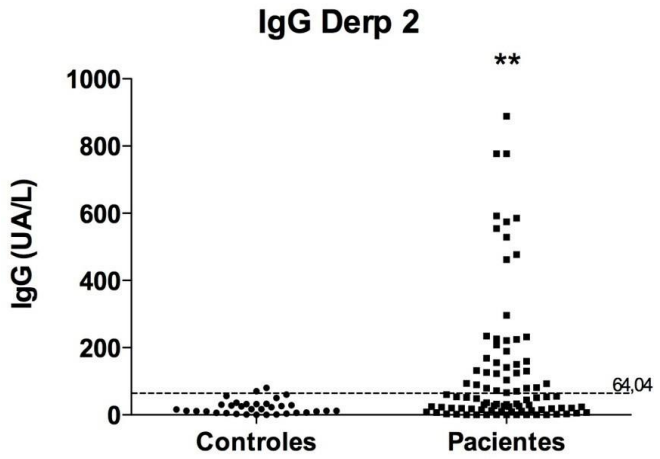
((A): específico à Der p 1; (B): específico à Der p 2) em pacientes com: asma e rinite alérgica; dermatite atópica; alergia alimentar; lactente sibilante; conjuntivite alérgica (N=98) e controles saudáveis (N=44). Os resultados são expressos em unidades arbitrárias por mL (UA/mL). O valor do Cut-off (média+2xSD) está indicado na linha pontilhada. Os níveis de anticorpos dos pacientes são comparados com o controle saudável pelo teste *t*-test (*** = $P < 0{,}0001$, ** = $P < 0{,}005$).

Figura 7 - Quantificação IgG

(A)



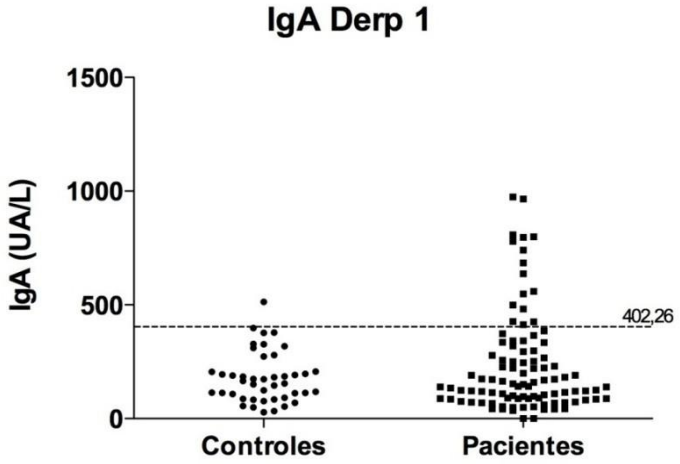
(B)



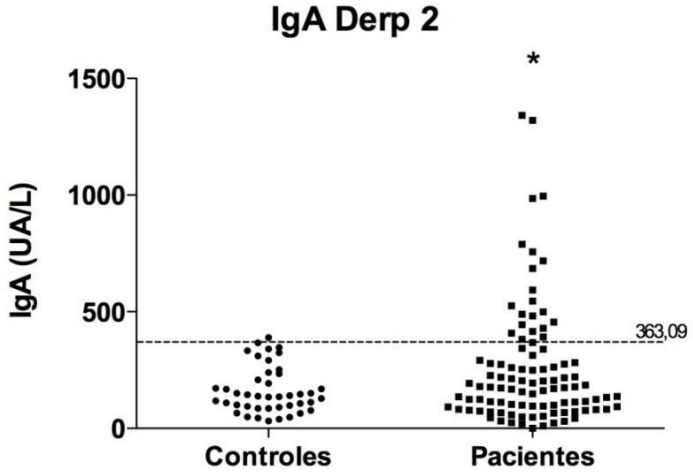
((A): específico à Der p 1; (B): específico à Der p 2) em pacientes com: asma e rinite alérgica; dermatite atópica; alergia alimentar; lactente sibilante; conjuntivite alérgica (N=98) e controles saudáveis (N=44). Os resultados são expressos em unidades arbitrárias por mL (UA/mL). O valor do Cut-off (média+2xSD) está indicado na linha pontilhada. Os níveis de anticorpos dos pacientes são comparados com o controle saudável pelo teste *t*-test (*** = $P < 0,0001$, **= $P < 0,005$).

Figura 8 - Quantificação IgA

(A)



(B)

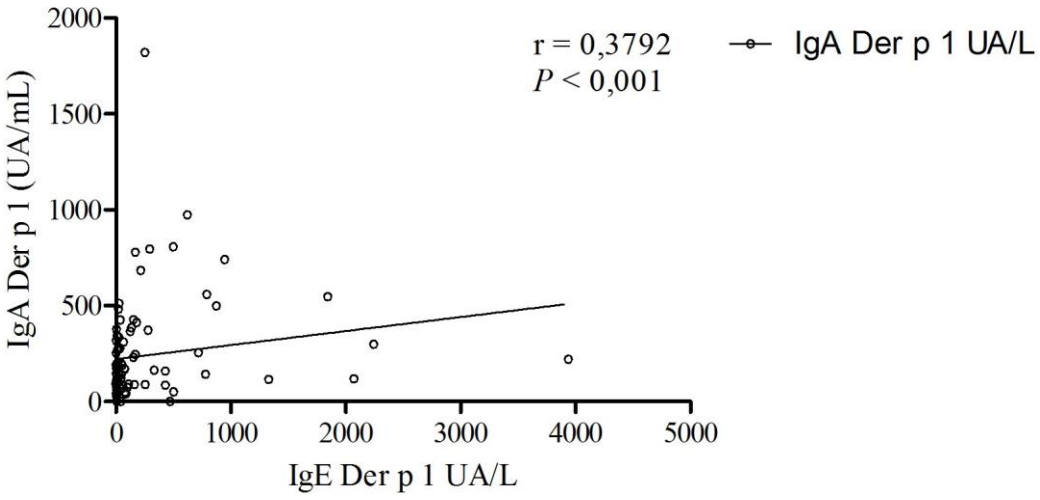


((A): específico à Der p 1; (B): específico à Der p 2) em pacientes com: asma e rinite alérgica; dermatite atópica; alergia alimentar; lactente sibilante; conjuntivite alérgica (N=98) e controles saudáveis (N=44). Os resultados são expressos em unidades arbitrárias por mL (UA/mL). O valor do Cut-off (média+2xSD) está indicado na linha pontilhada. Os níveis de anticorpos dos pacientes são comparados com o controle saudável pelo teste *t*-test (* = $P < 0,05$).

Correlação das Imunoglobulinas

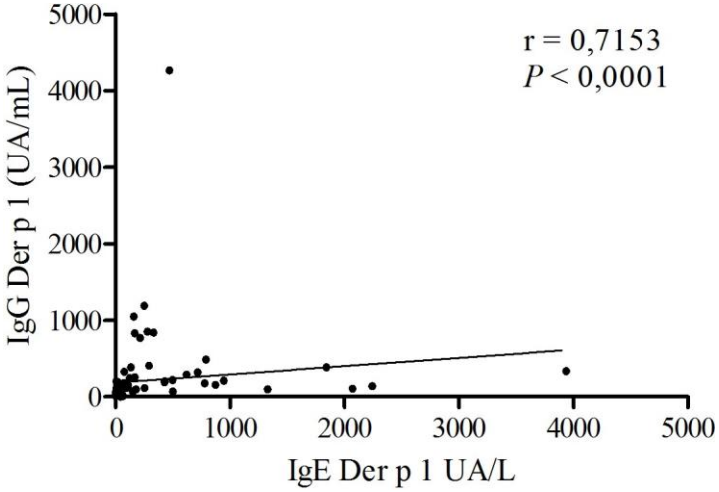
Foi realizada também a correlação da IgE com IgG e IgA específicos à Der p 1 e Der p 2 (**Figura 9, 10, 11, 12, 13 e 14**).

Figura 9 - Correlação entre IgE com IgA específicos à Der p 1



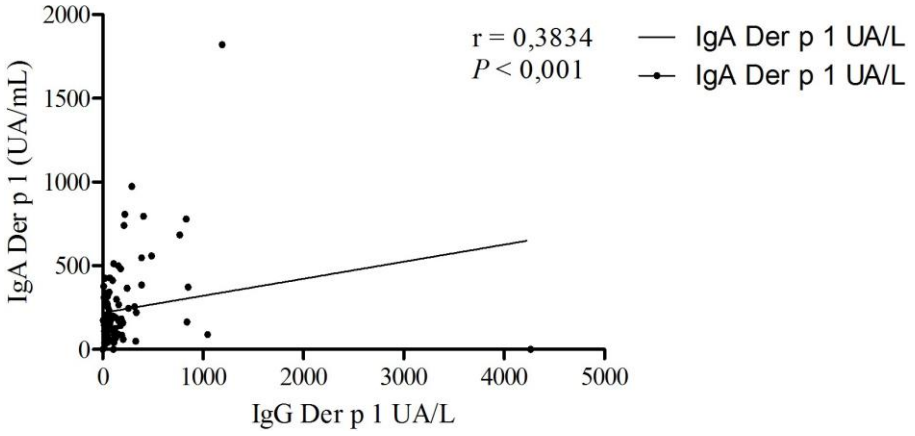
As análises foram feitas utilizando o coeficiente de correlação de Spearman (*r*), (n=98).

Figura 10 - Correlação entre IgE com IgG específicos à Der p 1



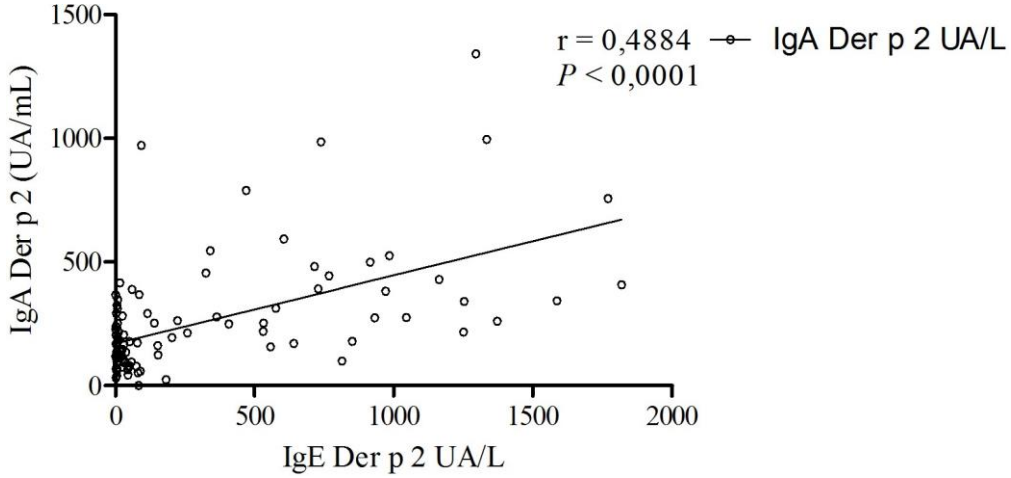
As análises foram feitas utilizando o coeficiente de correlação de Spearman (*r*), (n=98).

Figura 11 - Correlação entre IgA com IgG específicos à Der p 1



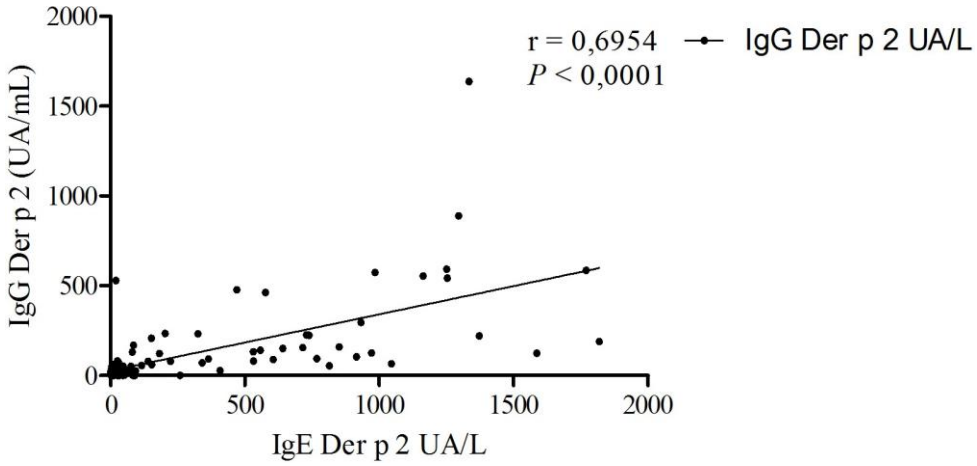
As análises foram feitas utilizando o coeficiente de correlação de Spearman (*r*), (n=98).

Figura 12 - Correlação entre IgE com IgA específicos à Der p 2



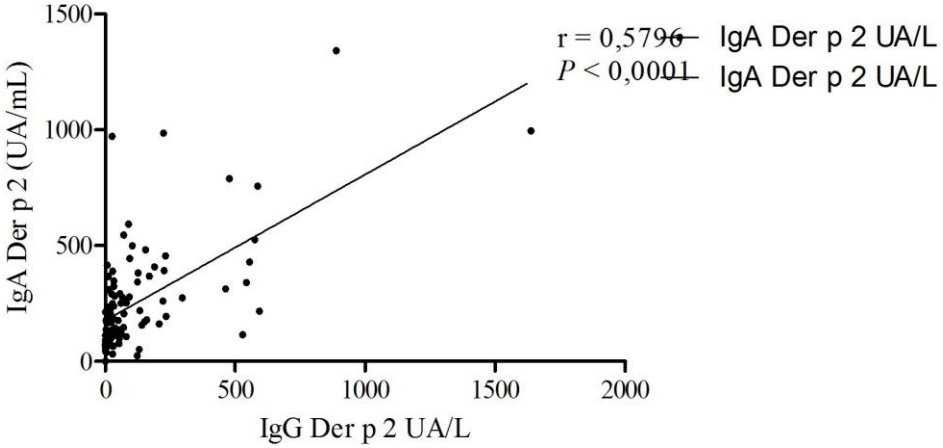
As análises foram feitas utilizando o coeficiente de correlação de Spearman (*r*), (n=98).

Figura 13 - Correlação entre IgE com IgG específicos à Der p 2



As análises foram feitas utilizando o coeficiente de correlação de Spearman (*r*), (n=98).

Figura 14 - Correlação entre IgG com IgA específicos à Der p 2



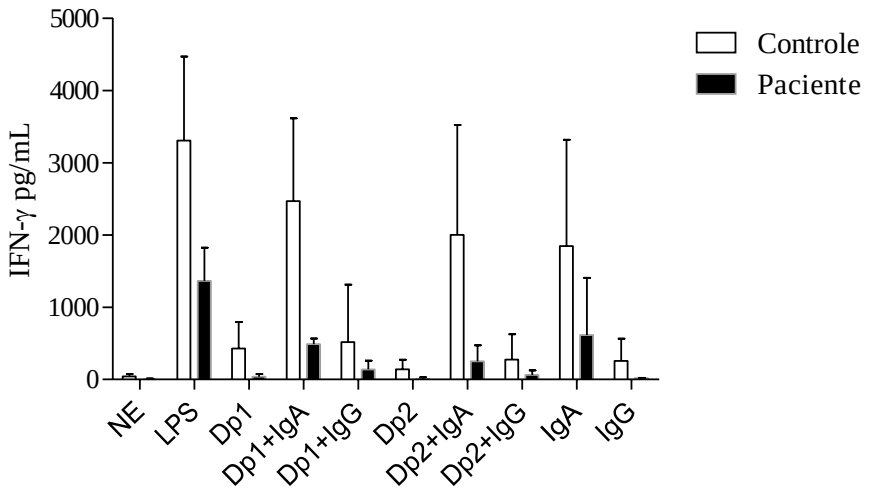
As análises foram feitas utilizando o coeficiente de correlação de Spearman (*r*), (n=98).

Apesar da diferença encontrada entre os níveis de IgE e IgG específicos tanto para Der p 1 quanto para Der p 2, houve correlação entre a IgE com IgG e IgA específicos à ambos alérgenos. Apesar de se correlacionarem, a força da correlação foi maior entre IgE e IgG (r = 0,7153 para Der p 1 e r = 0,6954 para Der p 2) do que entre IgE e IgA (r = 0,3792 para Der p 1 e r = 0,4884 para Der p 2).

Avaliação das citocinas

Após as dosagens das Igs o próximo passo seria avaliar o efeito do tratamento com IgA e IgG nas DCs em cocultura com linfócitos T CD4+ de memória. Para isso, após a diferenciação dos monócitos em DCs, estas células foram estimuladas com os LPS (5µg/mL); Der p 1 (5 µg/mL); Der p 2 (5 µg/mL); IgA e IgG (100 µg/mL). As DCs foram mantidas em estufa durante 24 horas. Após esse período de incubação, foi realizada a cocultura com linfócitos T CD4+ de memória autóloga. A cocultura foi mantida na estufa durante 5 dias para posterior dosagem das citocinas (**Figuras 15** e **16**). Em relação à produção de IFN-γ, o controle demonstrou níveis elevados da citocina em comparação ao paciente (**Figura 15**).

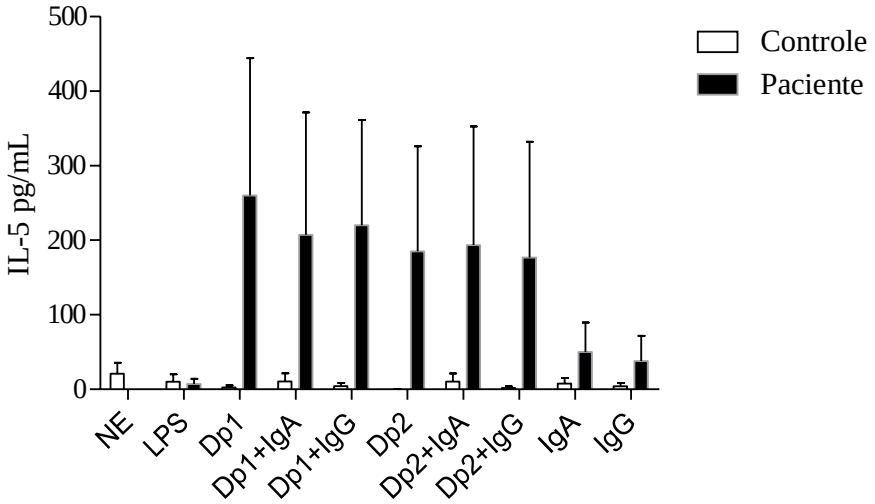
Figura 15 - Detecção de IFN-γ no sobrenadante das moDCs e suas respectivas coculturas com linfócitos T CD4+ de memória.



As moDCs ($1x10^4$) foram estimuladas por 5 dias com LPS, Der p 1, Der p 2 à 5 µg/mL com e sem tratamento com anticorpos (IgA e IgG a 100 µg/mL), na presença de linfócitos T CD4+ de memória autólogo ($1x10^5$), N=3.

A resposta mediada pelos linfócitos Th2 contribui para o desenvolvimento das doenças alérgicas em que está envolvida a fase tardia da alergia. Após a diferenciação dos linfócitos Th2, estas por sua vez liberam citocinas, como IL-5.

Figura 16 - Detecção de IL-5 no sobrenadante das moDCs e suas respectivas coculturas com linfócitos T CD4+ de memória.



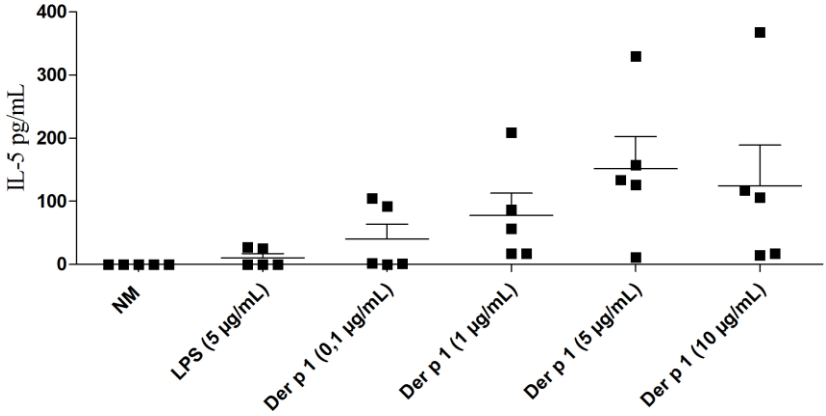
As moDCs ($1x10^4$) foram estimuladas por 5 dias com LPS, Der p 1, Der p 2 à 5 µg/mL com e sem tratamento com anticorpos (IgA e IgG a 100 µg/mL), na presença de linfócitos T CD4+ de memória autólogo ($1x10^5$), N=3

Avaliação da liberação de IL-5 frente aos imunocomplexos

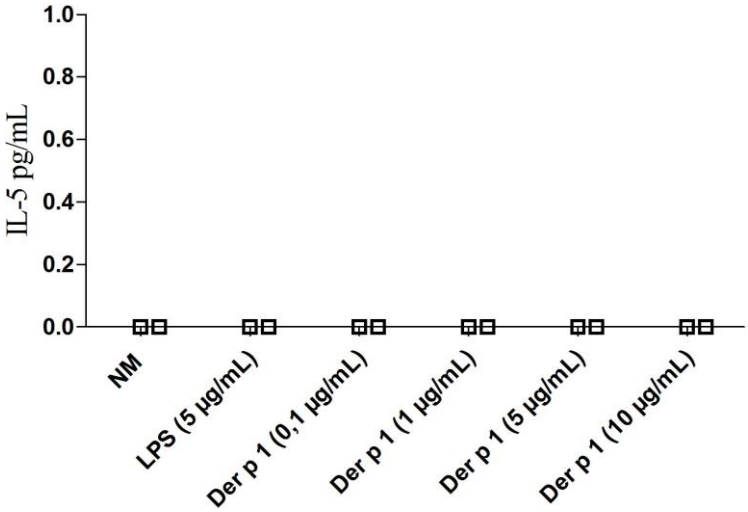
Embora na literatura existam estudos utilizando o Der p 1 na concentração de 5 µg/mL (DE WIT ET AL, 1999; ROYER ET AL, 2010), nós realizamos um ensaio dose resposta com as seguintes concentrações de Der p 1: 100 ng/mL; 1 µg/mL; 5 µg/mL e 10 µg/mL, para saber a concentração ideal do Der p 1 na ativação das DCs seguida da cocultura. Após a realização do experimento, quantificamos pelo método de ELISA a liberação de IL-5 e IFN-γ pelas DCs em cocultura com linfócitos TC4+ de memória autóloga. O nosso resultado nos demonstrou que a concentração de 5 µg/mL do Der p 1 teve o maior pico de produção da IL-5 como pode ser observado (**Figura 17 A**). Em relação aos doadores saudáveis, não se demonstraram níveis de detecção consideráveis para IL-5 (**Figura 17 B**).

Figura 17 - Resposta dose-dependente de moDCs de pacientes alérgicos e doadores saudáveis frente a estimulação com Der p 1 – avaliação da liberação de IL-5.

(A)



(B)

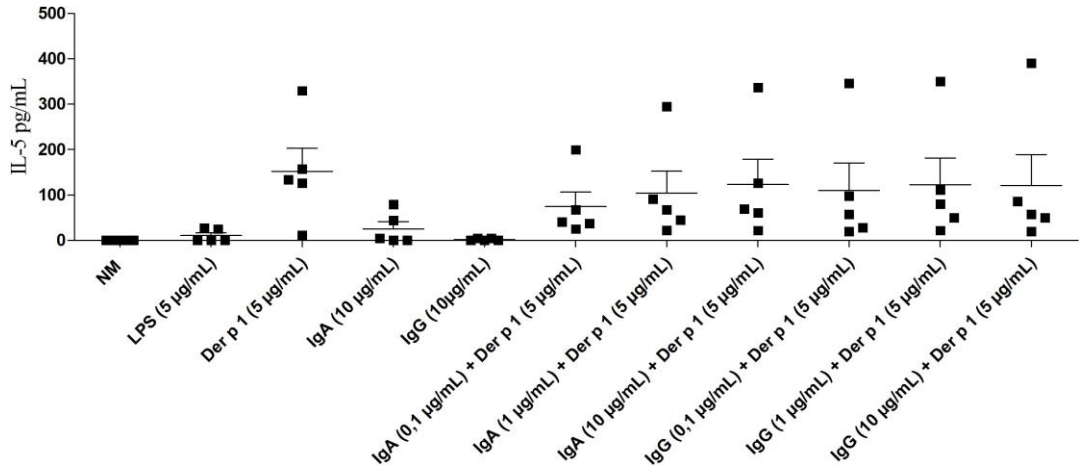


As DCs de pacientes alérgicos e doador saudável foram estimulados com LPS (5 ug/mL); ou Der p 1 nas concentrações de 100 ng/mL; 1 ug/mL; 5 ug/mL e 10 ug/mL. Após 24 horas de estimulação, as DCs foram colocadas em cocultura na proporção de 1:10. No quinto dia foi coletado o sobrenadante e dosado IL-5 por ELISA. Pacientes alérgicos (**A**) e doadores saudáveis (**B**).

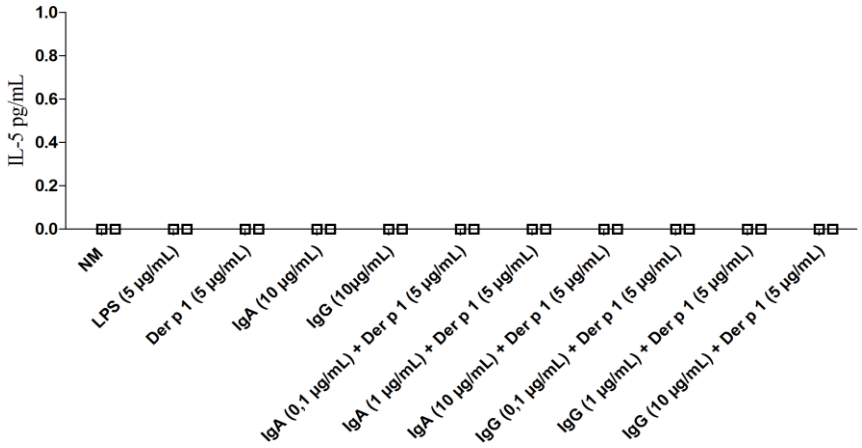
Após avaliar a resposta dose-dependente das DCs de pacientes alérgicos e doadores saudáveis frente à estimulação com Der p 1, seguimos o nosso experimento aplicando o tratamento com os anticorpos IgA e IgG, assim fazendo um ensaio de dose-resposta dependente de anticorpo nas DCs de pacientes alérgicos e não alérgicos.

Figura 18 - Resposta dose dependente de anticorpo IgA e IgG em moDCs de pacientes alérgicos estimulados com Der p 1 – avaliação da liberação da IL-5

(A)



(B)



As DCs de pacientes alérgicos e doadores saudáveis foram estimuladas com LPS (5 ug/mL); somente Der p 1 (5 ug/mL); IgA (10µg/mL); IgG (10µg/mL) e os imunocomplexos de anticorpo nas concentrações de 100 ng/mL; 1 ug/mL; e 10 ug/mL e Der p 1 (5 ug/mL). Após 24 h de estimulação, as DCs foram colocadas em cocultura na proporção de 1:10. No quinto dia foi coletado o sobrenadante e dosado IL-5 por ELISA. Pacientes alérgicos, N=5 (**A**) e doadores saudáveis, N=2 (**B**)

.

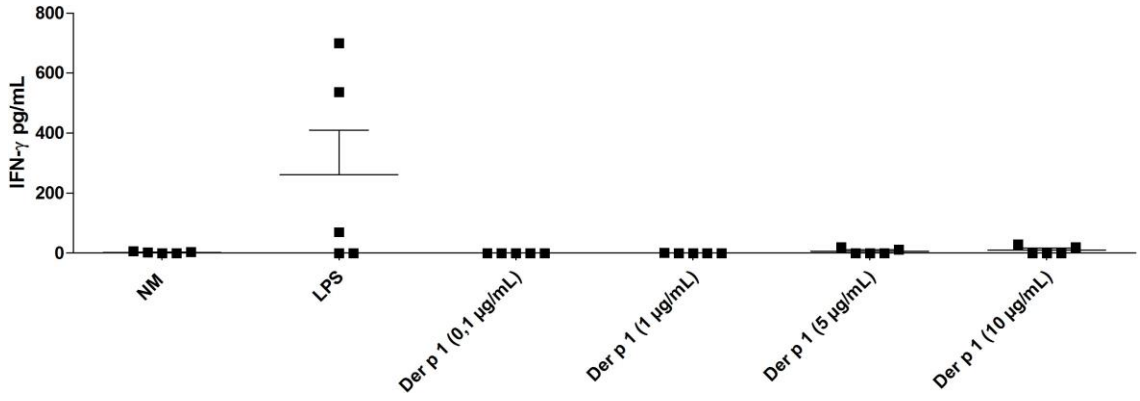
Ao utilizarmos os anticorpos como tratamento, conseguimos observar que a IgA à 100 ng/mL associada ao Der p 1 à 5 µg/mL, causou uma diminuição da liberação da IL-5 pelas células dos pacientes alérgicos (**Figura 18 A**). Isso ocorre também quando avaliamos o resultado da IgG à 100 ng/mL associada ao Der p 1 à 5 µg/mL em comparação ao grupo somente Der p 1.

Avaliação da liberação de IFN-γ frente aos imunocomplexos

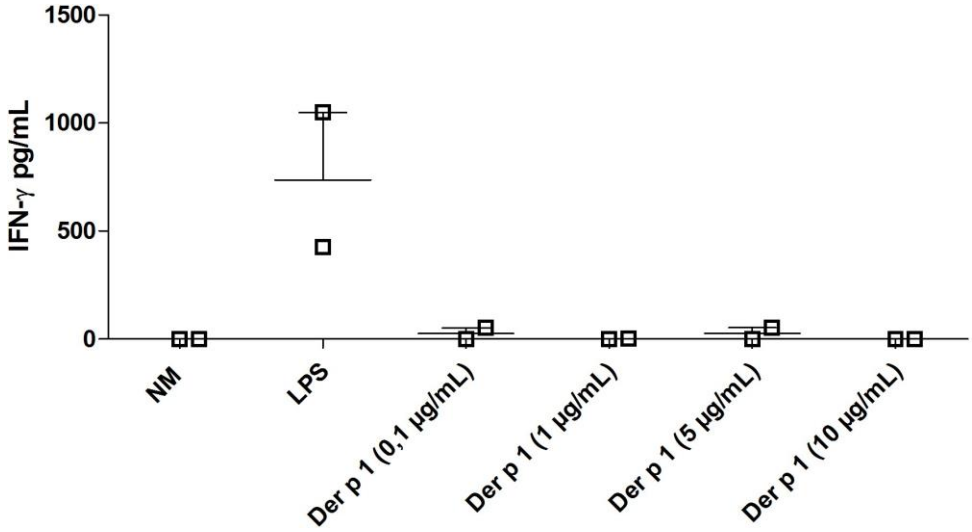
Quantificamos também a citocina, IFN-γ, nas células de pacientes alérgicos e controle saudável. Nesta etapa, avaliamos se haveria alguma modulação para a via Th1. Conforme os dados da literatura, as células dos pacientes quando são expostos ao Der p 1 são sensíveis, gerando uma resposta Th2, consequentemente liberando IL-5 (MORRIS ET AL, 2016), como observado anteriormente (**Figura 17 A**). Logo, os pacientes não produzem IFN-γ, como demonstrado (**Figura 19 A**). Já nos controles saudáveis (**Figura 19 B**) há uma pequena produção de IFN-γ, confirmando os dados encontrados com o grupo Morris, 2016.

Figura 19 - Resposta dose-dependente de moDCs de pacientes alérgicos e doadores saudáveis frente à estimulação com Der p 1 – avaliação da liberação de IFN-γ.

(A)



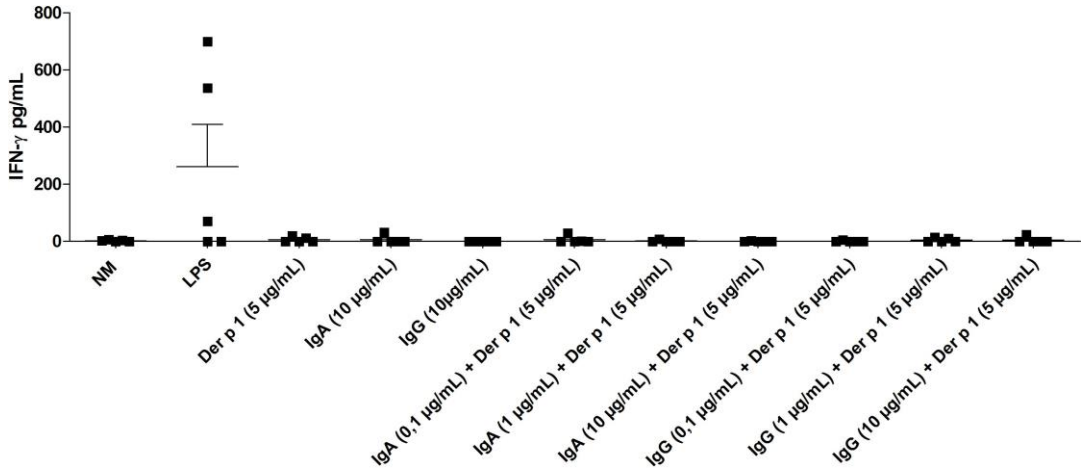
(B)



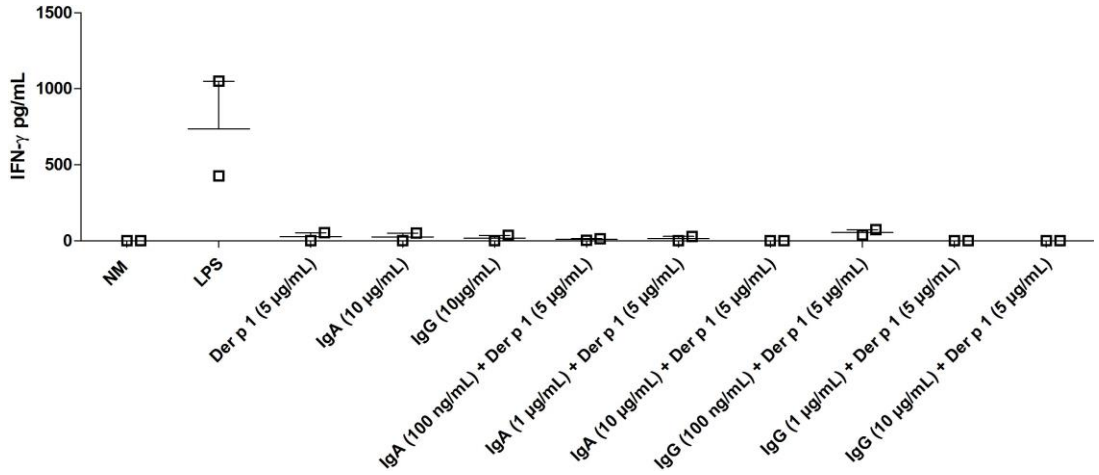
As DCs de pacientes alérgicos e doador saudável foram estimulados com LPS (5 ug/mL); ou Der p 1 nas concentrações de 100 ng/mL; 1 ug/mL; 5 ug/mL e 10 ug/mL. Após 24 h de estimulação, as DCs foram colocadas em cocultura na proporção de 1:10. No quinto dia foi coletado o sobrenadante e dosado IFN-γ por ELISA. Pacientes alérgicos (**A**) e doadores saudáveis (**B**).

Figura 20 - Dose resposta dependente de anticorpo IgA e IgG em moDCs de pacientes alérgicos estimulados com Der p 1 – avaliação da liberação de IFN-γ

(A) Liberação de IFN-γ dos pacientes alérgicos frente a IgA e IgG



(B) Liberação de IFN-γ dos controles saudávies frente a IgA e IgG



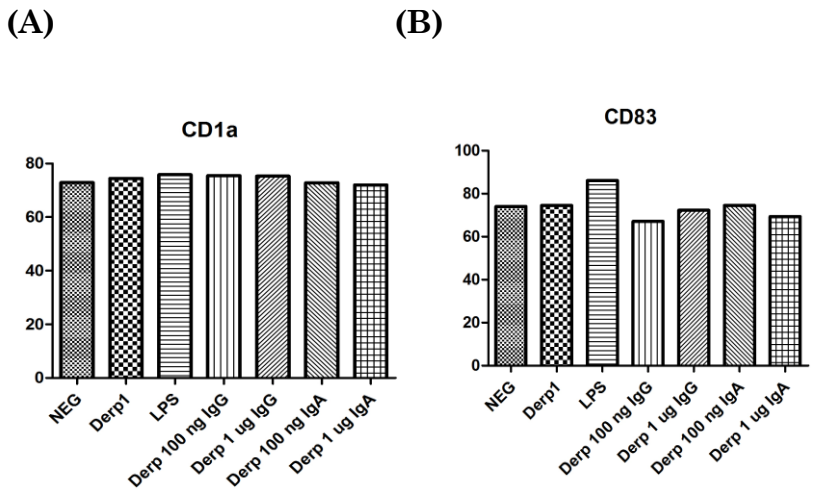
As DCs de pacientes alérgicos e doador saudável foram estimulados com LPS (5 ug/mL); somente Der p 1 (5 ug/mL); IgA (10µg/mL); IgG (10µg/mL) e os imunocomplexos de anticorpo nas concentrações de 100 ng/mL; 1 ug/mL; e 10 ug/mL e Der p 1 (5 ug/mL). Após 24 h de estimulação, as DCs foram colocadas em cocultura na proporção de 1:10. No quinto dia foi coletado o sobrenadante e dosado IFN-γ por ELISA. Pacientes alérgicos, N=5 (**A**) e doadores saudáveis, N=2 (**B**).

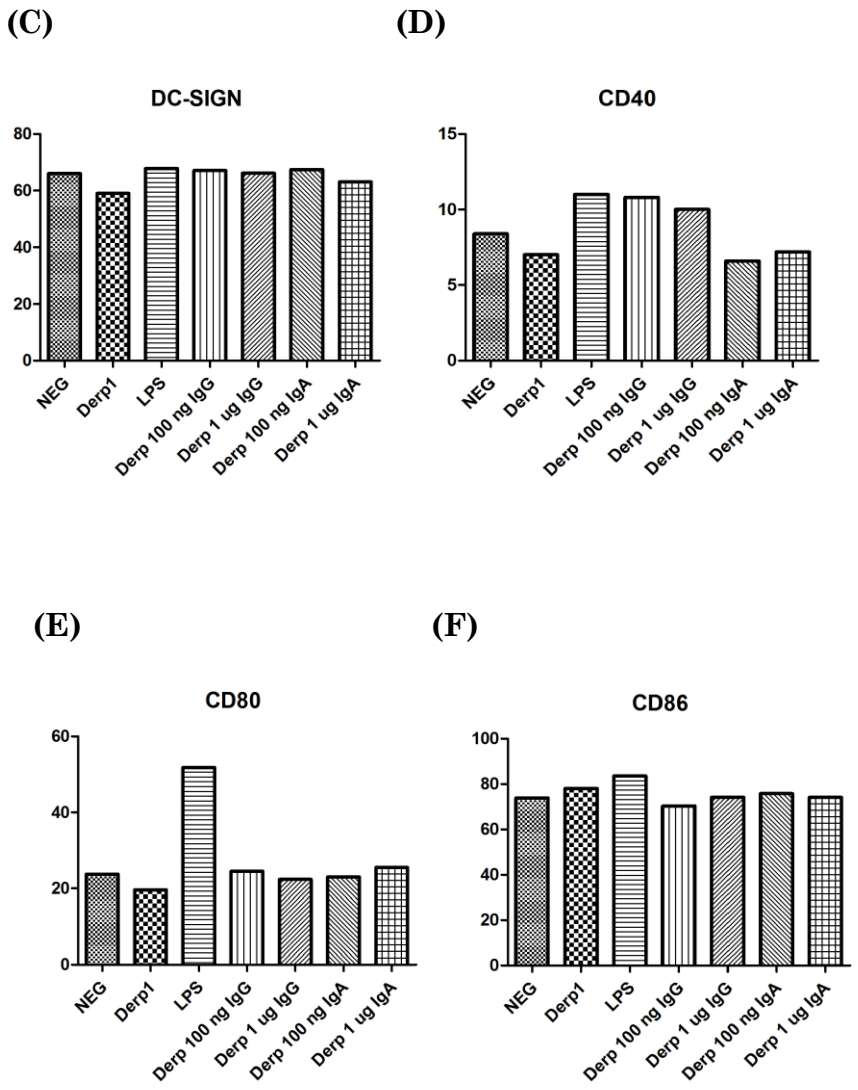
Além dessas citocinas foram realizadas as dosagens de IL-12 p70 e IL-10 provenientes das DCs de pacientes alérgicos e controles saudáveis, as quais não foram detectadas pelo ensaio utilizado. Nos ensaios de cocultura, também não detectamos a liberação de IL-10 e IL-4. Assim, mais ensaios são necessários para obter uma melhor visualização do perfil de citocinas.

Avaliação da expressão das moléculas extracelulares

Avaliamos também se receptores da membrana extracelular das DCs estavam envolvidos no desencadeamento da resposta alérgica ou relacionados a um efeito protetor. Desta forma realizamos um experimento de marcação de receptores extracelular, e padronizamos o nosso painel das DCs, como: CD1a; CD83; CD40; DC SIGN; CD80 e CD86. Foi realizada outra imunofenotipagem, porém obtiveram-se resultados inconclusivos. Foi possível observar que tanto a IgA e IgG parecem ter uma ação protetora nas DCs dos pacientes por meio da avaliação das moléculas de superfície celular.

Figura 21 - Imunofenotipagem das moléculas extracelulares das moDCs de paciente atópico





As DCs ($1x10^4$ células) foram estimuladas com: Der p 1 (5 ug/mL); LPS (5 ug/mL); e os imunocomplexos Ag-Ac em duas concentrações: Der p 1 (5 ug/mL)-IgG (100 ng/mL); Der p 1(5 ug/mL)-IgG (1 ug/mL); Der p 1 (5 ug/mL)-IgA (100 ng/mL); Der p 1 (5 ug/mL)-IgA (1 ug/mL) por 24 horas em estufa de CO_2 a 37 °C. n=1, paciente atópico.

DISCUSSÃO

"A mente que se abre a uma nova idéia

jamais voltará ao seu tamanho original".

Albert Einstein.

DISCUSSÃO

A progressão da atopia constitui uma sequência de desenvolvimento de doenças alérgicas. Na maioria das vezes inicia-se na infância com eczema e progride para asma e rinite durante sua vida. Mais de 90% dos casos de asma está associado com um estado de atopia e há um aumento de 5% a 25% (ROCHE ET AL, 1997). Esse aumento pode ser devido ao melhor reconhecimento da doença, aumento de indivíduos geneticamente predispostos e fatores ambientais como poluição, dieta ou exposição à alérgenos (RÖNMARK ET AL, 2016).

Os médicos iniciam o processo de diagnóstico nos pacientes por meio da história clínica e da avaliação física dos mesmos. Sintomas que indicam asma, rinite alérgica, alergia alimentar, alergia a medicamentos ou dermatite atópica, sugerem uma exposição constante ao alérgeno. Dentro do grupo dos asmáticos há uma correlação quantitativa entre a exposição cumulativa ao alérgeno e a sensibilização (HAMILTON, 2008).

Entre os ácaros da poeira domiciliar, principalmente o Dp, são conhecidos como os principais agentes indutores da inflamação alérgica, devido às proteínas alergênicas (alérgenos) presentes no mesmo. Dentre essas proteínas, as principais são os alérgenos grupo 1 e do grupo 2, chamados de Der p 1 e Der p 2, respectivamente. Geralmente esses alérgenos são reconhecidos por mais de 90% dos pacientes alérgicos ao Dp. O Der p 1 é uma cisteína protease, que induz a produção de citocinas e quimiocinas para promover a polarização para linfócitos Th2, possui uma atividade proteolítica nas células epiteliais, aumentando a sua permeabilidade através da célula. Por outro lado, o Der p 2, é uma proteína que imita a molécula MD-2, que por sua vez ativa TLR2 e TLR4, assim desencadeando a ativação intracelular (CALDERÓN ET AL, 2015; YU ET AL, 2014).

Para formar uma resposta imune, as DCs, são as células que possuem a capacidade de apresentar antígenos para o sistema imune (DESLÉE ET AL, 2002). Na alergia, as DCs, possuem um papel crucial no processo inicial e no controle da inflamação alérgica (KAY, 2001). Sua função consiste no reconhecimento dos antígenos, processamento em peptídeos, migração para os

linfonodos, e apresentação aos linfócitos T CD4+ por meio da molécula de MHC classe II das DCs, com subsequente polarização para a subpopulação de células Th2 (SHAKIB ET AL, 2002; 2008).

Além dos linfócitos T, os linfócitos B também participam da resposta alérgica. Sua principal função é a síntese de anticorpos. Os linfócitos T que foram diferenciados em células efetoras migram para o folículo linfóide onde estão localizados os linfócitos B (OZDEMIR ET AL, 2010). O reconhecimento do alérgeno pelo linfócito B e a ligação das moléculas co-estimulatórias entre linfócitos B e T, leva à ativação dos linfócitos B que, por sua vez, leva à mudança de classe (HOLGATE, 2012). O presente estudo avaliou os efeitos dos anticorpos IgA e IgG específicos à Der p 1 e Der p 2 sobre as DCs dos pacientes alérgicos.

Inicialmente foi realizada uma divisão dos pacientes conforme a sua apresentação clínica das doenças alérgicas junto com o teste de puntura, que está demonstrada na **tabela 1,** para uma visão ampla da coorte dos indivíduos e suas características. Seguida desta classificação nós avaliamos os níveis séricos desses pacientes e controles. A diferença observada entre os níveis de IgE (**Figura 6 – A** e **B**) já era esperada, uma vez que o nível de IgE específico ao ácaro foi critério para a formação dos grupos. Essa quantificação demonstra que os integrantes do grupo DP também são sensíveis aos principais alérgenos do ácaro Dp, diferentemente do grupo Controle. Estes resultados corroboram com os dados da literatura, uma vez que outros grupos avaliaram os níveis de anticorpos IgE específicos a Der p 1 e Der p 2 entre pacientes atópicos e não atópicos, e observaram um resultado semelhante (MINAMI ET AL, 2015).

O anticorpo IgG é um componente da resposta mediada por linfócitos Th1, o qual é produzido na presença do IFN-γ. Dependendo do tipo celular, e também do tipo do receptor, as funções efetoras do IgG, incluem: fagocitoses, ativação do *burst* oxidativo, degranulação celular, citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), e ativação de genes para produção de citocinas e quimiocinas (ROSALES, 2017). Embora esteja presente na inflamação alérgica, podemos constatar em nossos resultados que os pacientes alérgicos demonstraram altos níveis de IgG específicos a Der p 1 e Der p 2 em relação ao controle (**Figura 7 – A** e **B**). Esse resultado é congruente com o estudo realizado pelo grupo Hales e

colaboradores, onde foram analisadas a quantidade de IgG em pacientes alérgicos. O anticorpo IgG é conhecido principalmente na função de opsonização de patógeno, porém, pode atuar no bloqueio da degranulação do mastócito, enquanto que o IgE medeia a ativação das células sensibilizadas pelo mesmo. Estudos demonstraram, através de ensaio de competição com os anticorpos IgG e IgE, que o anticorpo IgG possui uma ligação semelhante ao IgE, gerando uma competição de sítio (HALES ET AL, 2006). Em comparação com os nossos resultados, o grupo DP demonstrou também maiores níveis de IgG específica aos alérgenos (Der p 1 e Der p 2) em relação ao grupo Controle, indicando que há alguma influência no mecanismo da resposta alérgica, levando à produção do IgG em pacientes alérgicos (HALES ET AL, 2006; SMART; KEMP, 2002). Dados provenientes de vários estudos com imunoterapia, indicaram que o aumento do IgG, mais especificamente, IgG_4, estava diretamente relacionada com a melhora clínica dos pacientes alérgicos (AKDIS ET AL, 2014).

A IgA é o anticorpo mais abundante da secreção nas mucosas e que por sua vez é o maior responsável pela imunidade nesses locais (BEREK, 2015). A forma dimérica desse anticorpo, conhecida como IgA secretória, é encontrada nas secreções da mucosa oral e nasal e está associada a doenças alérgicas e tolerância. Embora poucos estudos relataram sobre IgA específico ao alérgeno, há estudos realizados com extrato de ácaro no qual avaliou-se os IgA específicos (KIM ET AL, 2016; SUZUKI; FAGARASAN, 2009). Em nossos estudos observamos altos níveis de IgA no grupo alérgico em relação ao grupo controle (**Figura 8 – A** e **B**). Em todas as quantificações séricas das imunoglobulinas, os pacientes demonstraram níveis elevados de IgE, IgG e IgA específicas a Der p 1 e Der p 2, em relação ao controle. Isso nos indica que provavelmente há outro mecanismo de resposta que os pacientes alérgicos desenvolvem para tolerar ou regular a inflamação alérgica.

Realizamos também um teste de correlação com os anticorpos IgE, IgG e IgA. Apesar da diferença encontrada entre os níveis de IgE e IgG específicos tanto para Der p 1 (**Figura 10**) quanto para Der p 2 (**Figura 13**), houve correlação entre a IgE com IgG (**Figura 10, 13**), IgE com IgA (**Figura 9, 12**) e IgA com IgG (**Figura 11, 14**) específicos a ambos os alérgenos. Apesar de se

correlacionarem, a força da correlação foi maior entre IgE e IgG (r = 0,7153 para Der p 1 e r = 0,6954 para Der p 2) do que entre IgE e IgA (r = 0,3792 para Der p 1 e r = 0,4884 para Der p 2). Essas correlações, junto com a avaliação dos resultados dos anticorpos demonstrados anteriormente, corroboram a queda do paradigma Th1 *versus* Th2.

Há vários estudos que indicam que os linfócitos Th1 e Th2 e seus produtos liberados (citocinas) possuem um importante papel crítico na asma alérgica, como por exemplo, quando o grupo de Morris e Luster, estuda sobre as influências dos tipos de linfócitos Th na asma (MORRIS; LUSTER, 2016). Quando conduzimos o estudo para uma análise *in vitro*, avaliamos a produção de citocinas, tais como: IL-5, IFN-γ, IL-10 e IL-12 (p70). Os resultados demonstraram que os nossos pacientes produzem mais IL-5 em comparação ao controle independentemente do tratamento com os anticorpos usados. Como esperado, no grupo controle não houve a produção de IL-5, corroborando os dados encontrados na literatura (**Figura 17 A**). Continuando uma análise na produção da IL-5, podemos observar que quando realizamos o ensaio de cultura celular estimulando as DCs com imunocomplexos Der p 1-IgG ou Der p 1-IgA, e cocultura com linfócitos TCD4+ (**Figura 18 A**). Observamos que há um perfil de proteção em pacientes atópicos, demonstrando uma diminuição da liberação de IL-5, quando comparadas às células estimuladas somente com Der p 1. Já os pacientes não atópicos não foram capazes de produzir IL-5 estimulado com Der p 1 dentro de todas as condições (**Figura 17 B e 18 B**). Em relação à liberação de IFN-γ, nossos resultados demonstraram que tanto nos pacientes quanto nos controles não houve liberação de IFN-γ (**Figura 19 A-B e 20 A-B**). Estes resultados reforçam que a função efetora celular que envolve os linfócitos T *helper* e citocinas não é o único e o principal mecanismo de controle da alergia. São necessários mais estudos para poder compreender a alergia. Há pesquisas que estudaram a relevância da função supressiva dos linfócitos T reguladores em células de pacientes alérgicos. Nós mensuramos os níveis de IL-10 da cocultura, porém não se verificaram resultados significativos. (Foi quantificada também a citocina IL-4, porém esta não nos demonstrou os níveis mínimos de detecção).

Alguns estudos demonstraram que as DCs derivadas dos monócitos atuam criticamente na resposta alérgica. Um estudo realizado pelo grupo Deslée et al, avaliou a expressão da molécula de CD86 das DCs, quando estimuladas com Der p 1, de pacientes alérgicos e não alérgicos. O seu resultado demonstrou que os pacientes possuem elevado nível da expressão da molécula CD86. Observamos a mesma resposta quando utilizamos somente o alérgeno Der p 1 (**Figura 21 F**). Para testarmos a nossa hipótese, de que os anticorpos possuem um efeito protetor, estimulamos as DCs com Der p 1-IgA ou Derp 1-IgG, e novamente realizamos o ensaio para avaliação das moléculas de expressão extracelular. Logo, em nosso estudo encontramos que quando comparamos o tratamento do alérgeno com anticorpo (imunocomplexo formado por Der p 1- IgA e IgG) diminui a expressão da molécula co-estimulatória CD86 (**Figura 21 F**). Esse mesmo efeito ocorreu também com a molécula CD40 quando utilizamos Der p 1-IgA (**Figura 21 D**), o que corrobora o estudo realizado com o grupo Ghaemmaghami et al. Sabe-se que a molécula CD40 é importante para a ativação da regulação positiva da citocina IL-12. Há evidências que indicam que a regulação diminuída da IL-12 (p70), observada nas DCs que foram ativadas na presença de Der p 1, foi devido à baixa produção de IL-12 (GHAEMMAGHAMI ET AL, 2002; JACQUET, 2011). Desta forma pode-se contribuir para a reação alérgica, favorecendo a via Th2. Observamos também que a molécula DC SIGN na presença de Der p 1 diminui a sua expressão (**Figura 21 C**). Isso ocorre devido ao fato da Der p 1 ser uma enzima com capacidade de clivar ativamente a porção extracelular da molécula DC SIGN (FURMONAVICIENE, 2007; JACQUET, 2011). Com isso, favorece-se a supressão da diferenciação dos linfócitos Th1.

O mecanismo imunológico pelo qual a tolerância ao alérgeno pode estar 'quebrado' em humanos, conduzindo a doenças alérgicas, é ainda uma questão aberta, e que permanece não entendida totalmente. Mas, recentes estudos e resultados encontrados nesse projeto têm contribuído para clarear esta curiosa questão. Visto que os anticorpos IgG e IgA parecem desempenhar um papel protetor, diminuindo a resposta Th2, eles podem ser usados associando-se a drogas para atenuar a resposta Th1 e Th2 e para melhorar o tratamento da doença atópica.

CONCLUSÃO

(...) Nós não somos o que deveríamos ser.

Nós não somos o que queremos ser.

Nós não somos o que seremos.

Mas, graças a Deus, não somos o que éramos.

Martin Luther King Jr.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos no estudo nos permitem concluir que:

- Pacientes apresentam altas titulações de IgE, IgG e IgA específicas de ambos os alérgenos (Der p 1 e Der p 2) em relação ao controle;

- Há correlação entre IgE e IgG específicas para Der p 1 e Der p 2;

- Houve uma tendência à diminuição da liberação de IL-5 após tratamento com os imunocomplexos (Der p 1-IgG ou Der p 1-IgA), indicando uma possível utilização destes imunocomplexos no tratamento da alergia,

- O tratamento das DCs com os imunocomplexos Der p 1-IgG ou Der p 1-IgA, houve uma tendência a diminuição da expressão das moléculas de superfície CD40 e CD86, uma vez que estas, em condições de resposta alérgica, apresentaram níveis elevados. A molécula DC SIGN na presença de Der p 1 diminui a sua expressão.

A elevada titulação dos anticorpos específicos a Der p 1 e Der p 2 detectados nos pacientes e conjunto com os resultados obtidos dos ensaios *in vitro*, onde foram utilizados os imunocomplexos Der p 1-IgA ou Der p 1-IgG, sugerem que os anticorpos parecem atuar como uma função protetora, diminuindo a resposta Th2. Desta forma, os anticorpos IgG e IgA poderiam ser usados para atenuar a resposta alérgica, se associados a drogas, e possibilitariam a melhoria do tratamento de doenças atópicas. Uma vez que a fisiopatologia das doenças alérgicas é complexa e influenciada por vários fatores, são necessários mais estudos para a sua compreensão e esclarecimento.

REFERÊNCIAS

Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. **Science**, v. 272, p. 54-60, 1996.

Ah-Ghouleh A, Johal R, Sharquie IR, Emara M, Harrington H, Shakib Farouk, Ghaemmaghami AM. The glicosylation pattern of common allergens: the recognition and uptake of Der p 1 by epithelialand dendritic cells is carbohydrate dependent. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. 1-11, 2012.

Akdis CA and Akdis M. Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 11, p. 4678-4680, 2014.

Bacharier LB. Evaluation of the child with recurrent wheezing. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 128, n. 3, p. 1-5, 2011.

Baldaçara RPC, Fernandes MFM, Baldaçara L, Aun WT, Mello JF, Pires MC. Prevalence of allergen sensitization, most important allergens and factors associated with atopy in children. **Med J**, v. 131, n. 5, p. 301-308, 2013.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cell and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245-252, 1998.

Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin III J. Th17 cells in immunity and autoimmunity. **Clinical and Developmental Immunology**, p. 1-16, 2013.

Berek C. Eosinophils: important players in humoral immunity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 183, p. 57-64, 2015.

Biagtan M, Viswanathan R, Bush RK. Immunotherapy for house dust mite sensitivity: where are the knowledge gaps? **Curr Allergy Asthma Resp**, v. 14, p. 482-488, 2014.

Calderon MA, Linneberg A, Tebbe JK, Blay FD, Rojas DHF, Virchow JC, Demoly P. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 136, p. 38-48, 2015;.

Celia M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origen, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, p. 10-16, 1997.

Conferência Científica Internacional da WAO (WISC 2014): 2014; Rio de Janeiro. Disponível em: <www.worldallergy.org/wisc2014>: Acesso em: 03 Mar. 2017.

Criado RFJ, Wandalsen NF. **Fatores ambientais em alergia**. Alergia e imunologia na infância e na adolescência.2001:13-22.

Delf S, Kitzmuller C, Steinberger P, Himly M, Jahn-Schmid B, Fischer GF, Zlabinger GJ, Bohle B. Differential activation of dendritic cells by toll-like receptors causes diverse differentiation of naive CD4+ T cells from allergic patients. **Allergy**, v. 69, p. 1602-1609, 2014.

Deslée G, Charbonnier A-S, Hammad H, Angyalosi G, Leblond I-T, Mantovani A, Tonnel A-B, Pestel J. Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells. Basic and clinical immunology. **J Allergy Clin Immunol**, v. 110, p. 763-770, 2002.

Frischmeyer-Guerrerio PA, Keet CA, Guerrerio AL, Chichester KL, Bieneman AP, Hamilton RG, Wood RA, Schroeder JT. Modulation of dendritic cell innate and adaptative immune functions by oral and sublingual immunotherapy. **Clinical Immunology**, v. 155, p. 47-59, 2014.

Furmonaviciene R, Ghaemmaghami AM, Boyd SE, Jones NS, Bailey K, Willis AC, Sewell HF, Mitchell DA, Shakib F. The protease allergen Der p 1 cleaves cell surface DC-SIGN and DC-SIGNR: experimental analysis of *in silico* substrate identification and implications in allergic responses. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, p. 231-42, 2007.

Ghaemmaghami AM, Gough L, Sewell HF, Shakib F. The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level. **Clin Exp Allergy**, v. 32, p. 1468-1475, 2002.

Galvão CES, Castro FFM. As alergias respiratórias. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 84, n. 1, p. 18-24, 2005.

Gershwin LJ. Comparative immunology of allergic responses. **Annu Rev Anim Bioscience**, v. 3, n. 17, p. 1-17, 2014.

Gloudemans AK, Lambrecht BN, Smits HH. Potential of Immunoglobulin A to Prevent Allergic Asthma. **Clinical and Developmental Immunology**, p. 1-12, 2013.

Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. **Trends Immunology**, v. 32, n. 9, p. 402-411, 2011.

Grumach AS. Alergia e imunologia na infância e na adolescência. São Paulo: **Atheneu**, 2001.

Hales BJ, Martin AC, Pearce LJ, Laing IA, Hayden CM, Goldblatt J, Soue¨f PNL, Thomas WR. IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease. **Journal Allergy Clinical Immunololgy,** v. 118, p. 361-367, 2006.

Hamilton RG. Diagnostic tests for human allergic disease. **Expert opinion med diagn**, v. 2, n. 10, p. 1123-1135, 2008.

Hammad H, Smits HH, Ratajczak C, Nithiananthan A, Wierenga EA, Stewart GA, Jacquet A, Tonnel AB, Pestel J. Monocyte-derived dendritic cells exposed to Der p 1 allergen enhance the recruitment of Th2 cells: major involvement of the chemokines TARC/CCL17 and MDC/CCL22. **Eur Cytokine Network,** v. 14, n. 4, p. 219-228, 2003.

Hawrylowicz CM, Garra AO. Potencial role of interleukin-10 - secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nature review. 2005;5:271-283. Holt PG, Thomas WR. Sensitization to airborne environmental allergens: inresolved issues. **Nature Immunology**, v. 6, n. 10, p. 957-960, 2005.

He SH, Zhang HY, Zeng XN, Chen D, Yang PC. Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. **Acta Pharmacologica Sinica***,* v. 34, p. 1270-83, 2013.

Hellman LT, Akula S, Thorpe M, FU Z. Tracibg the origins of IgE, mast cells, and allergies by studies of wild animals. **Frontiers in Immunology,** v. 8, n. 1749, p. 1-22, 2017

Hilkens CMU, Kalinski P, Boer M, Kapsenberg ML. Human dendritic ceels exogenous interleukin-12 – Inducing factors to direct the development of naïve T-helper cells toward the th1 phenotype. **Bood**, v. 90, n. 5, p. 1920-1926, 1997.

Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 673-683, 2012.

Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature reviews immunology**, v. 8, p. 218-230, 2008.

Holt PG and Thomas WR. Sensitization to airborne environmental allergens: unresolved issues. **Nature Immunology**, v. 6, n. 10, p. 957-960, 2005.

Huber B. 100 years of allergy: Clemens von Pirquet – his idea of allergy and its immanent concept of disease, v. 118, n. (19-20), p. 573-579, 2006.

Jacquet A. The role of the house dust mite-induced innate immunity in development of allergic response. **Int Arch Allergy Immunol**. 2011; 555:95-105.

Junior MD, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Cruvinel WM, Andrade LEC, Silva NP. Sistema imunitário – parte II. Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

Jutel M, Akdis CA. T-cell subset regulation in atopy. **Curr. Allergy Asthma Rep**, v. 11, p. 139-145, 2011.

Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. ViewPoint **Immunology today**, v. 20, n. 12, p. 561-567, 1999.

Kay AB. Allergy and allergic diseases. **N Engl J Med**, v. 344, n. 1, p. 30-37, 2001.

Kim JH, Yoon MG, Seo DH, Kim BS, Ban GY, Ye YM, Shin YS, Park HS. Detection of Allergen Specific Antibodies From Nasal Secretion of Allergic Rhinitis Patients. **Allergy Asthma Immunol Res**, v. 8, n. 4, p. 329-337, 2016.

Lee JS, Kim IS, Ryu JS, Yun CY. House dust mite, *Dermatophagoides pteronissinus* increases expression of MCP-1, IL-6 and IL-8 in human monocytic THP-1 cells. **Cytokine**, v. 42, p. 365-371, 2008.

Lisa GG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 9, p. 402-411, 2011.

London JrR, Tharakan A, Ramanathan JrM. The role of innate immunity and aeroallergens in chronic rhinosinusites. **Adv Otorhinolaryngol Basel, Karger**, v. 79, p. 66-77, 2016.

Minami T, Fukutomi Y, Lidholm J, Yasueda H, Saito A, Sekiya K, Tsuburai T, Maeda Y, Mori A, Taniguchi M, Hasegawa M, Akiyama K. IgE Abs to Der p 1 and Der p 2 as diagnostic markers of house dust mite allergy as defined by a bronchoprovocation test. **Allergology International**, v. 64, p. 90-95, 2015.

Morris FL, Luster AD. Allergen-Specific $CD4^+$ T Cells in Human Asthma. **State of the art**, v. 13, n. 1, p. 25-30, 2016.

Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC. Cytokines, allergy, and asthma. **Curr Opin Allergy Clin immunol**, v. 5, p. 161-166, 2005.

Nissen SP, Kjaer HF, Host A, Nielsen J, Halken S. The natural course of sensitization and allergic diseases from childhood to adulthood. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 24, n. 6, p. 549-555, 2013.

Nunes C. A epidemiologia das doenças alérgicas. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 11, p. 169-199, 2003.

Ozdemir C, Akdis M, Akdis CA. T-cell response to allergens. **Anaphilaxis Chem Immunol allergy**, v. 95, p. 22-44, 2010.

Pasquier B, Lepelletier Y, Baude C, Hermine O, Monteiro RC. Differential expression and function of IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation of dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 1134-1141, 2004.

Pilette C, Detry B, Guisset A, Gabriels J, Sibille Y. Induction of interleukin-10 expression through Fcalpha receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, p. 486-493, 2010.

Raulf M, Bergmann KC, Kull S, Sander I, Hilger CH, Brüning T, Jappe U, Müsken H, Sperl A, Vrtala S, Zahradnik E, KlimekL. Mites and other indoor allergens – from exposure to sensitization and treatment. **Allergo J Inter**, v. 24, p. 68-80, 2015.

Rizzo MC. Asma: da infância à adolescência. **Gaz méd**, v. 78, n. 2, p. 93-102, 2008.

Roche N, Chinet TC, Huchon GJ. Allergic and nonallergic interactions between house dust mite allergens and airway mucosa. **Eur Respir J**, v. 10, p. 719-726, 1997.

Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? **Immunology**, v. 112, p. 352-363, 2004.

Rönmark EP, Ekerljung L, Mincheva R, Sjölander S, Hagstad S, Wennergren G, Rönmark E, Lötvall J and Lundbäck B. Different risk factor patterns for adult asthma, rhinitis and eczema: results from West Sweden Asthma Study. **Clinical and translational allergy**, v. 6, n. 28, p. 1-10, 2016.

Rosales C. Fcγ receptor heterogeneity in leukocyte functional responses. **Frontiers in immunology**, v. 280, n. 8, p. 1-13, 2017.

Royer P-J, Emara M, Yang C, Al-Ghouleh A, Tighe P; Jones N; Sewell HF; Farouk Shakib; Martinez-Pomares L and Ghaemmaghami AM. The mannose receptor mediates the uptake of diverse native allergens by dendritic cells and determines allergen-induced T cell polarization through modulation of IDO activity. **The journal of immunology**, v. 185, p. 1522-1531, 2010.

Rutkowski K, Sowa P, Talipska JR, Sulkowski S,Rutkowski R. Allergic diseases: the price of civilisational progress. **Derm Alergol**, v. 2, p. 77-83, 2014.

Scott-Taylor TT, Stefan-Claudiu A, Sumeya A, Pettengell R. Immunoglobulin G; structure and functional implications of different subclass modifications in initiation and resolution of allergy. **Immunitity, Inflammation and Disease**, p. 1-21, 2017.

Schroeder HWJr, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 202, p. 41-52, 2010.

Serravalle K, Medeiros MJr. Ácaros da poeira domiciliar na cidade de Salvador-BA. **Rev Bras Alerg Imunopatol**, v. 22, p. 19-24, 1999.

Shakib F, Ghaemmaghami AM, Sewell HF. The molecular basis of allergenicity. **Trends in immunology. Cell press**, v. 29, n. 12, p. 633-642, 2008.

Sharquie IK, Ghouleh AA, Fitton P, Clark MR, Armour KL, Sewell HF, Shakib F, Ghaemmaghami. An investigation into IgE-facilitated allergen recognition and

presentation by human dendritic cells. **BMC Immunology**, v. 14, n. 54, p. 1471-2172, 2013.

Singer J, Jarolim EJ. IgE-based Immunotherapy of Cancer -A Comparative Oncology Approach. **J Carcinog Mutagen**, v. 5, n. 3, p. 1-20, 2014.

Smart JM, Kemp AS. Increased Th1 and Th2 allergen-indudec cytokine responses in children with atopic disease. **Clin Exp Allery**, v. 32, p. 796-802, 2002.

Spieksma FTM, Dieges PH. The allergy archives. **Journal Allergy Clin Immunol**, p. 573-576, 2004.

Suzuki K, Fagarasan S. Diverse regulatory pathways for IgA synthesis in the gut. **Mucosal Immunology Nature**, v. 6, n. 2, p. 468-471, 2009.

Stiemsma T, Turvey ST. Asthma and the microbe: defining the critical window in early life. **Allergy Asthma Clin Immunol**, v. 13, n. 3, p. 1-9, 2017.

Tan H-TT, Sugita K, Akdis CA. Novel biologicals fot the treatment of allergic diseases and asthma. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 16, n. 70, p. 1-14, 2016.

Thomas WR, Hales BJ, Smith W-A. House dust mite allergens in asthma and allergy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, p. 321-328, 2010.

Uphan JW. The role of dendritic cells in immune regulation and allergic airway inflammation. **Respirology**, v. 8, p. 140-148, 2003.

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 7, p. 523-5322008.

Wang J-Y. The innate immune response in house dust mite-induced allergic inflammation. **Allergic asthma immunological research**, v. 5, n. 2, p. 68-74, 2013.

Wu LC, Scheerens H. Targeting IgE production in mice and humans. **Current Opinion in Immunology**, v. 31, p. 8-15, 2014.

Yazdanbakhsh M; Kremsner PG; Ree van R. Allergy, parasites and the hygiene hypothesis. **Science**, v. 296, p. 490-494, 2002.

Yu S-J, Liao E-C, Tsai J-J. House dust mite allergy: environment evaluation and disease prevention. **Asia pacific allergy**, v. 4, p. 241-252, 2014.

ANEXOS

A- Questionário clínico

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

Questionário clínico

Nome: _____

Data:___/____/ _____ **Idade**: _____ **Datadenascimento**: ___ / ___ / _____

Gênero: ( ) **masculino** ( ) **feminino**

Endereço: _____

Telefone:_____ **Celular:**_____

I) Histórico do problema:

1) Qual o principal problema que o trouxe ao alergologista?

_____

2) Quando o problema começou?

_____

3) Quantas vezes o problema aconteceu?

_____

4) Quando foi a última vez que você teve o problema?

_____

5) Quando você teve o problema, por quanto tempo ele permaneceu?

_____

6) O problema é pior em que momento do dia, semana ou ano? (Marque aqueles que se aplicam)

( ) Manhã ( )Tarde ( )Meio da semana ( )Fim de semana
( )Verão ( )Outono ( ) Inverno ( )Primavera
( )Outro, quando?_____

7) Há algo que inicia o seu problema? (Marque aqueles que se aplicam)

( )Grama ( )Poeira ( )Mofo ( )Produtos de limpeza
( )Fumaça ( )Perfume ( )Frio ( )Alimento
( )Inseto ( )Outro, qual? _____

8) Há algum medicamento que melhore o seu problema?

_____

9) Qual a gravidade do problema quando ele acontece?

( )Fraco ( )Moderado ( )Grave ( )Muito grave

II) Sintomas (Marque aqueles que se aplicam):

1) **Olho**: nenhum, coceira, lacrimejamento, vermelhidão, inchaço, secura, queimação, círculos pretos, visão borrada, outro_____
2) **Nariz**: nenhum, espirros, prurido, coriza, secreção aquosa, congestão, sangramento frequente, a perda do sentido do olfato / gosto, pólipos, sinusite frequente, ressecamento nasal, outro_____
3) **Bocaegarganta**: nenhum, dores de garganta frequentes, rouquidão, coceira na garganta, dificuldade para engolir, gânglios inchados no pescoço, respiração pela boca, garganta inflamada frequente, amigdalite frequente, outro_____
4) **Pulmão**: nenhum, tosse crônica, aperto no peito / congestão, chiado, falta de ar, chiado / tosse após o exercício, dor no peito, dificuldade em respirar, outro_____

5) **Estomago / intestino**: nenhum, náuseas e vômitos, inchaço, perda de apetite, dor abdominal ou cólica, diarreia frequente, dor ou dificuldade para engolir, azia ou indigestão, outra _____
6) **Pele**: nenhum, pele seca, urticária, inchaço, coceira, eczema, a sensibilidade da pele para os metais, produtos químicos, cosméticos, outra _____

B- Medida do teste cutâneo de puntura

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

Nome: Data:

Tel.: Cel.: Cód.:

Teste cutâneo de Puntura

	Pápula	**Eritema**
Controle Negativo		
D. pteronyssinus		
B. tropicalis		
F. domesticus		
P. americana		
Clara de ovo		
Leite		
Trigo		
Soja		
Amendoim		
Camarão		
Controle Positivo		

Observações:

Resultados expressos em tamanho da pápula e eritema em milímetros.

Resultados positivos se a pápula for maior ou igual a 3X3 mm que o controle negaivo.

_____

Responsável pelo teste

C- TCLE menores de 18 anos

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: Interação entre anticorpos específicos e células dendríticas de pacientes alérgicos

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(à) seu (sua) filho(a).

Eu_____,RG_____, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a) _____ nascido (a) em ____ / ____ /_____, seja voluntário do estudo "**Interação entre anticorpos específicos e células dendríticas de pacientes alérgicos**". Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

I) Este projeto tem como intuito avaliar a influência dos anticorpos IgA e IgG nas respostas ao ácaro de *Dermatophagoides pteronyssinus*, em induzir mecanismos capazes de modular a resposta imune dos pacientes alérgicos e não alérgicos. Portanto, contribuindo para melhorar o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na exposição ao ácaro de poeira no desencadeamento ou piora de quadros de reações alérgicas;

II) Serão colhidos 20 mL de sangue venoso em tubo de heparina (dois tubos). Caso seja necessário mais uma coleta, esta será realizada nas mesmas condições acima mencionadas,

mediante autorização. E uma coleta de 10 mL de sangue venoso em tubo sem anticoagulante (tubo seco) para dosagem dos anticorpos. Também será realizado em cada participante do estudo o teste cutâneo de punctura às principais fontes alergênicas conhecidas na região (ácaros, pelo de animais, alimentos, fungos e pólens). Os riscos tanto para a coleta quanto para o teste cutâneo são mínimos: a coleta poderá ocasionar dor e mancha roxa no local da coleta de sangue. Para reduzi-los ainda mais, a coleta de sangue será realizada por enfermeira devidamente treinada para o procedimento, utilizando material estéril e descartável, que será inutilizado após o uso em cada paciente. Já o teste cutâneo pode ocasionar as próprias crises alérgicas. Caso isso aconteça, você será imediatamente examinado pelo médico e receberá tratamento adequado;

III) A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;

IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que ele (ela) estiver sendo submetido;

VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;

VII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;

VIII) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP - no Fone 3091.7733 (e-mail: *cep@icb.usp.br*) ou pesquisador (a) responsável, Renata Harumi, telefone de contato: (11) 3091-7435 (e-mail: *renataharumi@usp.br*) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

IX) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo a mim ou ao meu (minha) filho (a).

( ) Sim ou ( ) Não

X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XII) Resolução 196/96 – Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

OBS: Assinalar abaixo com (x):

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, de de 20

( ) Paciente / ( ) Responsável _____

Testemunha 1: _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha2: _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____
Renata Harumi Cruz

D- TCLE maiores de 18 anos

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(maiores de 18 anos)

ESTUDO: Interação entre anticorpos específicos e células dendríticas de pacientes alérgicos

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____, nascido no dia ____/____/_____, na cidade de_____, estado _____ portador do RG_____, e do CPF_____, residente no endereço_____, cidade _____, estado_____, concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "**Interação entre anticorpos específicos e células dendríticas de pacientes alérgicos**". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

I) Este projeto tem como intuitoavaliar a influência dos anticorpos IgA e IgG nas respostas ao ácaro de *Dermatophagoides pteronyssinus*, em induzir mecanismos capazes de modular a resposta imune dos pacientes alérgicos e não alérgicos. Portanto, contribuindo para melhorar o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na exposição ao ácaro de poeira no desencadeamento ou piorade quadros de reações alérgicas;

II) Serão colhidos 20mL de sangue venoso em tubo de heparina (dois tubos).Caso seja necessário mais uma coleta, esta será realizada nas mesmas condições acima mencionadas, mediante autorização. E uma coleta de 10 mL de sangue venoso em tubo sem anticoagulante (tubo seco) para dosagem dos anticorpos.Também será realizado em cada participante do estudo o teste cutâneo de punctura às principais fontes alergênicas conhecidas na região (ácaros, pelo de animais, alimentos, fungos e pólens). Os riscos tanto para a coleta quanto para o teste cutâneo são mínimos: a coleta poderá ocasionar dor e mancha roxa no local da coleta de sangue. Para reduzi-los ainda mais, a coleta de sangue será realizada por enfermeira devidamente treinada para o procedimento, utilizando material estéril e descartável, que será inutilizado após o uso em cada paciente. Já o teste cutâneo pode ocasionar as próprias crises alérgicas. Caso isso aconteça, você será imediatamente examinado pelo médico e receberá tratamento adequado;

III) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;

IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VIII) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim.

( ) Sim ou ( ) Não

IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP -, no Fone 3091.7733 (e-mail: *cep@icb.usp.br*) ou pesquisador (a) responsável, Renata Harumi, telefone de contato: 3091-7435(e-mail: *renataharumi@usp.br*) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XII) Resolução 196/96 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, de de 20

( ) Paciente / ( ) Responsável _____

Testemunha 1: _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha2: _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Renata Harumi Cruz