

**Susanne Carolinne Penha Ferreira Cutrim**

**Alergia a Proteína do Leite de Vaca (APLV): avaliação do perfil imunológico em pacientes alérgicos submetidos ou não a terapia de indução de tolerância oral**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

**São Paulo**

**2020**

**Susanne Carolinne Penha Ferreira Cutrim**

**Alergia a Proteína do Leite de Vaca (APLV): avaliação do perfil imunológico em pacientes alérgicos submetidos ou não a terapia de indução de tolerância oral**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

**São Paulo**

**2020**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cutrim, Susanne Carolinne Penha Ferreira  
Alergia a proteína do leite de vaca (APLV) :  
avaliação do perfil imunológico em pacientes  
alérgicos submetidos ou não a terapia de indução de  
tolerância oral / Susanne Carolinne Penha Ferreira  
Cutrim. -- São Paulo, 2020.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.  
Orientadora: Keity Souza Santos.

Descritores: 1.Alergia a proteína do leite  
2.Indução de tolerância oral 3.Linfócitos T  
reguladores 4.Células natural killer 5.MicroRNAs

USP/FM/DBD-203/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico este trabalho a minha família que é meu principal refúgio de aconchego e paz. As minhas filhas Mariana e Sofia, minhas maiores conquistas na vida. Ao meu parceiro Sérgio que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. A minha mãe e irmãos pela torcida e apoio em todos os desafios da minha vida. À Deus por sempre estar nos abençoando.*



## Agradecimentos

Agradeço a oportunidade que o Programa de Alergia e Imunopatologia me deu, desde o Mestrado e agora no Doutorado, de ter alcançado objetivos que, para grande maioria, são inalcançáveis. À minha orientadora Keity por, não só me orientar e tornar meus desafios mais “possíveis”, mas por tornar meus dias em São Paulo mais alegres. Tenho uma grande admiração pela sua capacidade intelectual e de irradiar ao seu redor tanto otimismo, alegria e amor pelo que faz, facilitando a rotina de trabalho e emanando energia boa. Ao LIM-60 que tive o prazer de trabalhar e me apresentou tantas pessoas boas que estavam sempre dispostas a me ajudar, vocês são especiais. Aos colegas que me ajudaram nas metodologias, discussões e apoio deste trabalho, minhas queridas: Priscilla Costa, Caroline Faria, Carla Alves e Anne Ventura. Agradeço também as minhas parceiras do meu grupo de pesquisa. Aos médicos, técnicos, secretários e enfermeiros do HC por serem sempre solícitos. Ao Dr. Fábio Morato e Dra. Ariana, pelo carinho, conselhos e aprendizados. À todos os pós-graduandos, residentes, pesquisadores e colegas do laboratório pelas discussões, conhecimento científico e amizade. Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pelos ensinamentos desde o mestrado, obrigada por ter me dado a oportunidade de trabalhar e me acolher no seu departamento. Agradeço também os parceiros do Laboratório HLA do Incor, pela ajuda de sempre. Aos colegas do Incor que ajudaram na última etapa do trabalho: Fernando Zilinski, Washington e Carlos Sérgio. Agradeço as mães dos pacientes que consentiram a participação dos seus filhos neste projeto. Agradeço o meu marido Sérgio Cutrim pelo seu incansável apoio incondicional, pelo seu amor verdadeiro e paciência. As minhas filhas por alegrarem minha vida e me mostrarem que, independente do resultado, o mais importante é tê-las ao meu lado. A minha família, em especial minha mãe, que sempre torceu e lutou para que nossa educação nunca fosse deixada de lado, apesar de todas as dificuldades. A todos que contribuíram com este trabalho.

## **Normalização adotada**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

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

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

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
<b>1.1 Alergia alimentar</b> .....	1
1.1.1 Mecanismos imunológicos da alergia alimentar.....	3
1.1.2 Alergia a proteína do leite de vaca (APLV) .....	7
<b>1.2 Tolerância não responsiva</b> .....	9
<b>1.3 Imunoterapia Oral</b> .....	10
<b>1.4 MicroRNAs (miRNAs)</b> .....	11
2. JUSTIFICATIVA .....	13
3. OBJETIVO.....	14
<b>3.1 Geral</b> .....	14
<b>3.2 Específicos</b> .....	14
4. MÉTODO.....	15
<b>4.1 Seleção dos pacientes</b> .....	15
<b>4.2 Desenho Experimental</b> .....	17
<b>4.3 Coleta das amostras</b> .....	17
<b>4.4 Processo de separação do soro e plasma do sangue</b> .....	17
<b>4.5 Processo de separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)</b> .....	18
<b>4.6 Descongelamento das CMSP criopreservadas</b> .....	19
<b>4.7 Padronização dos testes de cultura de CMSP com alérgenos específicos</b> .....	19
<b>4.8 Dosagem de citocinas</b> .....	20
<b>4.9 Citometria de Fluxo</b> .....	22
4.9.1 Imunofenotipagem de superfície de células Treg .....	24
4.9.2 Marcação de CMSP para detecção intranuclear de FOXP3 .....	25
<b>4.10. Avaliação dos perfis de microRNAs</b> .....	31
<b>4.11 Análise Estatística</b> .....	33
5. RESULTADOS .....	34
<b>5.1 Coorte</b> .....	34

<b>5.2 Padronização da Cultura</b> .....	36
<b>5.3 Titulação de Anticorpos</b> .....	38
<b>5.4 Comparação do perfil de Treg dos alérgicos <i>versus</i> tolerantes</b> .....	40
<b>5.5 Avaliação do perfil de citocinas</b> .....	42
<b>5.6 Avaliação frequência e perfil de células NK</b> .....	46
<b>5.7 Avaliação do perfil de miRNA</b> .....	48
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	61
<b>ANEXOS</b> .....	62
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	77
<b>APÊNDICE</b> .....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Alergia Alimentar
APLV	Alergia a Proteína do Leite de Vaca
DCs	Células Dendríticas
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cm	Centímetro
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FCεRI	<i>High affinity Immunoglobulin E receptor</i>
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
FSC-A	<i>Forward Scatter- área</i>
FSC-H	<i>Forward Scatter- height</i>
FPIES	<i>Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome</i>
FPIAP	<i>Food Protein-Induced Allergic proctocolitis</i>
FPE	<i>Food Protein-Induced Enteropatias</i>
GBV-C	<i>GB type C Virus</i>
IgE	Imunoglobulina E
ITO	Indução de Tolerância Oral
IL	Interleucinas
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MiRNAs	MicroRNAs
non-IgE-GI-Fas	<i>Gastrointestinal Food allergies</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldeído
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time PCR</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
Rpm	<i>Rotation per minute</i>
SSC-A	<i>Side Scatter- área</i>
Treg	Células T regulatórias
TSLP	Limfopoiétina estromal
APC	Células apresentadoras de antígeno
TCR:	Receptor de células T
NK	Natural Killer
ILCs	Células Linfóides Inatas

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismos do desenvolvimento de respostas tolerantes e efectoras a alérgenos alimentares.....	3
Figura 2 – Desenho experimental .....	17
Figura 3 - Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações de linfócitos T (*) .....	24
Figura 4 - Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações de NK (*).....	28
Figura 5 - Subpopulações de células NK definidos a partir da densidade de ligantes CD56 e CD16.....	29
Figura 6 - Detecção intranuclear de citocinas INF-g, IL-10 e IL-13.....	30
Figura 7 - Tratamento IDO .....	34
Figura 8 - Abordagem utilizada no presente estudo para diagnóstico e proposta de testes e divisão dos grupos.....	36
Figura 9 - (6A) Teste de cultura utilizando leite puro sem IL-2 (6B) Teste de cultura utilizando IL-2 .....	37
Figura 10 - Viabilidade celular comparando estímulo leite puro (120 $\mu$ g/ml) versus mix de proteínas (120 $\mu$ g/ml) em 8 dias de cultura em amostra pré e pós 6 meses da ITO.....	38
Figura 11 – Estratégia de análise para titulação dos anticorpos (*).....	39
Figura 12 - Produção de células Treg nos diferentes tempos de tratamento e em pacientes tolerantes .....	41
Figura 13 - Análise da quantidade de citocinas circulantes em cada grupo de estudo.....	43
Figura 14 - Citocina IL17F foi borderline com p=0,05 entre os tempos PRE e POS6M.....	44
Figura 15 - Avaliações individuais I.....	45
Figura 16 - Avaliações individuais II.....	46
Figura 17 - Análise da porcentagem de células NK circulantes em cada grupo de estudo.....	47
Figura 18 - Análise da porcentagem de células NK secretoras de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-13 e IL-10. ....	48
Figura 19 – Delineamento experimental para as análises de miRNA.....	49
Figura 20 - Volcano Plot - Grupo pré-tratamento versus tolerante espontâneo	50
Figura 21 - Expressão de miRNAs comparando os grupos tolerantes versus pós 6 meses de tratamento.....	51
Figura 22 – Expressão de miRNAs comparando os grupos tolerantes versus pós 12 meses de tratamento.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Painel de analitos avaliados por Luminex.....	22
Tabela 2 - Anticorpos monoclonais utilizados na marcação de superfície das populações de células imunológicas de interesse .....	25
Tabela 3 - Marcadores Intracelulares.....	26
Tabela 4 - Anticorpos monoclonais utilizados na marcação de superfície das populações de células imunológicas de interesse. ....	27
Tabela 5 - Marcadores Intracelulares.....	28
Tabela 6 – Dados epidemiológicos dos indivíduos incluídos .....	35
Tabela 7 - Volume final a ser utilizado em cada condição experimental para os anticorpos titulados .....	40
Tabela 8 - Expressão dos miRNAs comparando-se os Grupos Pré-tratamento versus Tolerante.....	49
Tabela 9 - Expressão de miRNAs comparando os grupos tolerantes versus pós 6 meses de tratamento.....	51
Tabela 10 - Expressão de miRNAs comparando os grupos tolerantes versus pós 12 meses de tratamento.....	52

## RESUMO

Cutrim SCPF. *Alergia a proteína do leite de vaca (APLV): avaliação do perfil imunológico em pacientes alérgicos submetidos ou não a terapia de indução de tolerância oral* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Alergia ao leite de vaca é a alergia alimentar mais comum entre os lactentes e crianças jovens, acometendo cerca de 2,5% das crianças com menos de 3 anos de idade. Isso ocorre porque as proteínas do leite de vaca são as primeiras consumidas em grande quantidade por uma criança. A terapia de indução de tolerância oral (ITO) tem sido utilizada como um tratamento de escolha para muitos pacientes com APLV. A taxa de sucesso varia de paciente para paciente, a média é de 70% a 80%, podendo ou não estar associado à taxa de anticorpos IgE específicos desses pacientes. Sabe-se que as células Treg aumentam após a imunoterapia, entretanto existem poucos trabalhos utilizando células em cultura com estímulos específicos. Pouco se sabe sobre o papel de outras células como as NK na alergia ou durante a imunoterapia. Um aumento de células NK em crianças que desenvolveram alergia alimentar pós transplante é relatado na literatura. Sendo assim, partindo da hipótese de que o aumento de células NK estaria relacionado com o desenvolvimento de alergia alimentar investigamos se haveria um decréscimo das células NK circulantes após a imunoterapia. Para isso, avaliou-se o perfil imunológico de pacientes alérgicos a proteína do leite de vaca pré e pós-tratamento de dessensibilização comparados com um grupo de crianças que foram alérgicas e se tornaram tolerantes espontaneamente e outro de crianças sensibilizadas às proteínas do leite, sem sintomas clínicos. Os perfis imunológicos dos três grupos de pacientes envolvidos foram comparados considerando: perfil de citocinas circulantes usando Luminex; populações de células T reguladoras (Treg) e células Natural Killer (NK) por citometria de fluxo além da expressão de miRNAs circulantes por RT-PCR. Células mononucleares periféricas foram testadas em diferentes tempos de cultura com alérgenos específicos do leite em diferentes concentrações para avaliação de Treg. Entretanto, na tentativa de padronização da cultura, foi verificado que as amostras eram insuficientes para essa abordagem. Já para as células NK, apesar de termos observado que nos seis meses que se sucedem ao fim da imunoterapia há um pequeno aumento do número de células circulantes este volta a cair após 12 meses de tratamento, não havendo diferença estatística em relação ao número de células antes da imunoterapia. Foi verificado que essas células tinham perfil citotóxico, de subtipo NK1 e produção de IFN- $\gamma$ , predominantemente. A avaliação do perfil de citocinas no plasma destes pacientes nos diferentes tempos mostrou aumento na produção de IL-10, IL-12p70 e IL-1 $\beta$  após 12 meses de tratamento, mas não em relação ao grupo tolerante e aumento da produção de IL-21 ao longo do tratamento e quando comparado o grupo antes do tratamento com o grupo tolerante. A análise do perfil de microRNAs circulantes mostrou diferenças de expressão entre os diferentes tempos sendo: pré-tratamento vs tolerantes espontâneos, 12 miRNAs up-regulated e 1 down-regulated; tolerantes



espontâneos vs pós 6 meses de tratamento, 12 miRNAs up-regulated; tolerantes espontâneos vs pós 6 meses de tratamento, 12 miRNAs up-regulated; tolerantes espontâneos vs pós 12 meses de tratamento, 4 miRNAs up-regulated. O miRNA 520a envolvido nas vias de sinalização de IL9 e IL4 mostrou-se promissor entretanto a avaliação individual de sua expressão em um número maior de amostras não confirmou a expressão aumentada pós tratamento. A investigação de marcadores imunológicos durante a ITO pode auxiliar na condução da dessensibilização dos pacientes de diferentes graus de alergias. O monitoramento de células como as NKs, a cinética de citocinas pró e anti-inflamatórias após o tratamento, além de marcadores genéticos como o miRNA podem contribuir para um melhor prognóstico do paciente.

Descritores: Alergia a proteína do leite; Indução de tolerância oral; Linfócitos T reguladores; Células *natural killer*; MicroRNAs.

## ABSTRACT

Cutrim SCPF. *Cow's milk allergy (CMPA): evaluation of the immunological profile in allergic patients submitted or not to oral tolerance induction therapy* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Cow's milk allergy (CMPA) is the most common food allergy among infants and young children, affecting about 2.5% of children under 3 years of age. This is because cow's milk proteins are the first consumed in large quantities by a child. The oral immunotherapy (OIT) has been used as a treatment of choice for many patients with CMPA. The success rate varies from patient to patient, the average is 70% to 80%, and may or may not be associated with the specific IgE antibody rate of these patients. Treg cells are known to increase after immunotherapy, however there is little work using cells in culture with specific stimuli. Little is known about the role of other cells such as NK in allergy or during immunotherapy. An increase in NK cells in children who developed post-transplant food allergy is reported in the literature. Therefore, starting from the hypothesis that the increase of NK cells would be related to the development of food allergy we investigated whether there would be a decrease of circulating NK cells after immunotherapy. For this, the immunological profile of patients allergic to cow's milk protein was evaluated pre and post desensitization treatment compared to a group of children who were allergic and became spontaneously tolerant and another of children sensitized to milk proteins, without clinical symptoms. The immunological profiles of the three groups of patients involved were compared considering: circulating cytokine profile using Luminex; populations of regulatory T cells (Treg) and Natural Killer cells (NK) by flow cytometry in addition to the expression of circulating miRNAs per RT-PCR. Peripheral mononuclear cells have been tested at different culture times with milk-specific allergens at different concentrations for Treg evaluation. However, in the attempt to standardize the culture, it was found that the samples were insufficient for this approach. Already for NK cells, although we have observed that in the six months following the end of immunotherapy there is a small increase in the number of circulating cells this will fall again after 12 months of treatment, with no statistical difference in relation to the number of cells before immunotherapy. These cells were found to have cytotoxic, NK1 subsets, and produce predominantly IFN- $\gamma$ . The evaluation of the plasma cytokine profile of these patients at different times showed an increase in the production of IL-10, IL-12P70 and IL-1beta after 12 months of treatment, but not in relation to the tolerant group and increased IL-21 production during treatment and when compared to the group before treatment with the tolerant group. Analysis of the profile of circulating miRNAs showed differences in expression between different times being: pre-treatment vs spontaneous tolerants, 12 miRNAs up-regulated and 1 down-regulated; spontaneous tolerants vs post 6 months of treatment, 12 miRNAs up-regulated; spontaneous tolerants vs post 6 months of treatment, 12 miRNAs up-regulated; spontaneous tolerants vs after 12 months of treatment, 4 miRNAs up-regulated. miRNA 520a involved in the IL9 and IL4 signaling pathways was promising however the individual evaluation of its expression in a larger number of samples did not confirm the increased post-treatment

expression. The investigation of immunological markers during ITO can assist in the desensitization treatment of patients of different degrees of allergies. Monitoring of cells such as NK, kinetics of pro and anti-inflammatory cytokines after treatment, as well as genetic markers such as miRNA may contribute to a better patient prognosis.

Descriptors: Cow's milk allergy; Oral immunotherapy; T-lymphocytes, regulatory; natural killer cells; MicroRNAs.

## **1. INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas, a alergia alimentar (AA) tem assumido uma prevalência e gravidade crescentes, estimando-se que atinja atualmente 5% das crianças com menos de 5 anos e 4% dos adolescentes e adultos (1). As alergias alimentares tornaram-se um grande problema de saúde pública nas últimas décadas impactando negativamente na qualidade de vida de diversas pessoas. O problema tem se agravado pelo fato da população consumir cada vez mais alimentos processados, complexos e com rótulos inadequados (2).

A alergia alimentar é caracterizada como uma reação imunológica adversa a um determinado componente, na grande maioria das vezes, proteico do alimento quando ingerido, mediada, principalmente, por uma resposta de hipersensibilidade tipo I (3). As manifestações clínicas da alergia alimentar são muito variáveis, geralmente aparecem dentro de minutos ou até 2 horas após a ingestão dentre as principais incluem: urticária, angioedema, rinoconjuntivite, sintomas gastrointestinais, asma e reações anafiláticas (4).

As opções terapêuticas para alergias alimentares são muito limitadas e a possibilidade de abordagem ativa, para induzir a tolerância alimentar, têm sido utilizada como tratamento. A dificuldade de indução da tolerância depende do alimento que desencadeia a alergia. Pacientes com alergia ao leite, ovo, soja e trigo têm mais sucesso na indução tolerogênica, enquanto que alimentos como amendoim, nozes, peixes e mariscos são de mais difícil tratamento (5).

### **1.1 Alergia alimentar**

As doenças atópicas tendem a ocorrer em uma progressão denominada marcha atópica, na qual a manifestação inicial da doença atópica na infância ou no início da infância é frequentemente dermatite atópica, seguida pelo desenvolvimento escalonado de alergia alimentar, rinite alérgica e asma (6).

A alergia alimentar é uma reação patológica do sistema imunológico desencadeada pela ingestão de um antígeno proteico alimentar. A exposição a quantidades muito pequenas de alimentos alergênicos pode desencadear sintomas clínicos, como distúrbios gastrointestinais, urticária e inflamação das vias aéreas, variando em gravidade de leve a risco de vida. A alergia alimentar

é distinta da intolerância alimentar, pois a intolerância não surge da desregulação do sistema imunológico; por exemplo, a intolerância à lactose surge de fatores não imunes, como má absorção de lactose e deficiência de lactase (7).

A fase de sensibilização alérgica tem início quando as células dendríticas reconhecem os alérgenos alimentares. Os antígenos alergênicos são apresentados nas moléculas do MHC-II para células T *naive*. Esse reconhecimento poderá desencadear uma resposta efetora ou tolerogênica. Em respostas tolerogênicas, a ausência de moléculas coestimulatórias expressas em APCs e a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  induzem a expansão de Tregs específicos e diminuem a frequência de células Th2, levando a um estado de tolerância. No entanto, as DCs expressam moléculas coestimulatórias e citocinas Th2, que induzem a produção de anticorpos do isotipo IgE pelos linfócitos B. Esses sIgE liga-se a receptores de alta afinidade (Fc $\epsilon$ RI) na superfície de basófilos e mastócitos para uma resposta mais rápida em casos de reexposições subsequentes. A fase efetora acontece quando existe a reexposição ao alérgeno específico, a IgE liga-se às superfícies celulares e ativa as células efetoras, desencadeando um processo de degranulação, com liberação de diferentes moléculas como histamina, PG-D, LTC<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, PAF e ECF-A e quimiocinas e citoquinas, levando a inflamação e danos nos tecidos (8). (Figura 1)

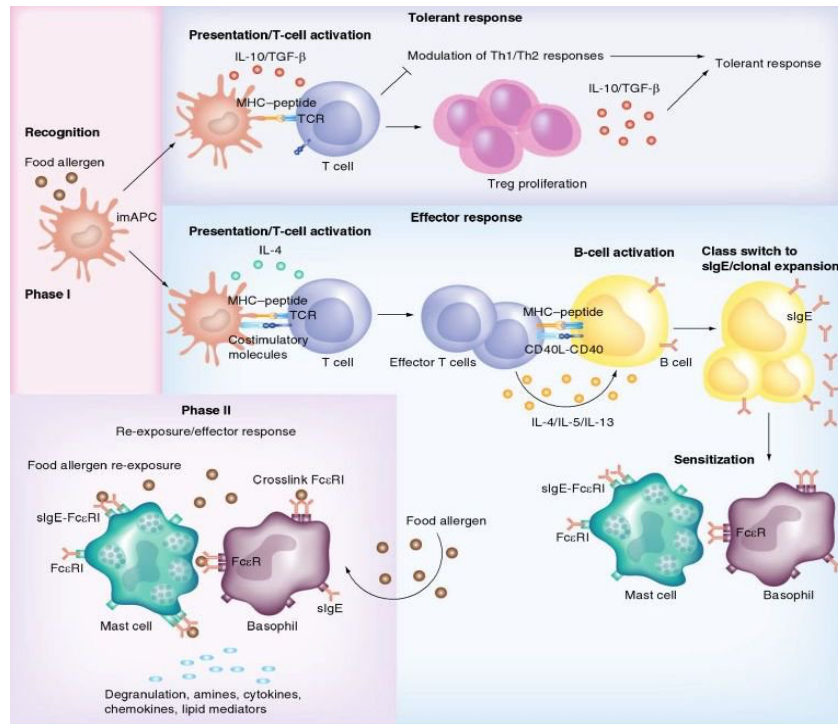


Figura 1- Mecanismos do desenvolvimento de respostas tolerantes e efetoras a alérgenos alimentares.

Fonte: *Immunotherapy* [01 Jul 2013, 5(7):755-768]

A fase efetora ou imediata pode ocorrer no contato subsequente ao contato de sensibilização, depois de vários contatos ou pode nunca ocorrer e o indivíduo fica apenas sensibilizado. A reatividade IgE específica não necessariamente vai se traduzir em uma manifestação clínica. Se a presença dessas IgE específicas irá se traduzir em sintomas clínicos de alergia depende de vários fatores, como níveis de IgE totais e específicas no sangue, epítomos específicos de IgE e seu grau de policlonalidade (mono ou polissensibilizado), o equilíbrio em células Tregs e Th1/Th2 e o polimorfismo dos FCεRI (9).

### 1.1.1 Mecanismos imunológicos da alergia alimentar

Os mecanismos imunológicos envolvidos na alergia consistem basicamente no desencadeamento de respostas imunológicas inata e adaptativa, envolvendo respostas inflamatórias padrão Th2 e anticorpos IgE, predominantemente. Os anticorpos IgE se ligam avidamente em receptores FcRI

de superfície dos mastócitos, basófilos e em células apresentadoras de antígenos (APCs) (10).

Durante a fase de sensibilização, as células T CD4+ alérgico-específicas sintetizam um cluster de citocinas típicas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Essas citocinas estão associadas à manutenção do desenvolvimento de células Th2, ativação de eosinófilos (células efetoras da hipersensibilidade tipo I), manutenção da produção de IgE e estimulando células epiteliais a secretarem muco. Quando ocorre uma reexposição, a resposta inflamatória é potencializada com citocinas IL-25, IL-31 e IL-33 (11). A predominância de células Th2 causa a morte celular e consequente lesão tecidual, assim como a alta prevalência de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) produzidas por células Th1 é comumente observado em pacientes com doenças atópicas. As células Th1 tem um importante papel na fase efetora da doença alérgica induzindo a morte por apoptose das células epiteliais e/ou no tecido muscular liso na asma e de queratinócitos na dermatite atópica (12).

A interleucina 33 (IL-33) é uma citocina nuclear derivada de tecido, da família IL-1 com papéis críticos na homeostase e reparo do tecido, imunidade tipo 2, infecção viral, inflamação e alergia. IL-33 ativa vias de sinalização dependentes do adaptador Myd88 em células imunes que expressam o receptor de citocina IL-1RL1 (ST2), incluindo muitos tipos de células envolvidas na imunidade tipo 2, como mastócitos, basófilos, eosinófilos, o subconjunto TH2 de células T auxiliares e células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2s) (13-16). ILC2s, que produzem grandes quantidades das citocinas Th2 como IL-5 e IL-13 em resposta à IL-33 e têm papéis críticos na imunidade tipo 2, inflamação alérgica e homeostase de eosinófilos, são os principais alvos da IL-33 *in vivo* (13-15, 17).

As células endoteliais que garantem a integridade dos vasos sanguíneos, expressam, constitutivamente, a IL-33 no seu núcleo e quando existe qualquer dano no tecido, esse é biologicamente ativado (18, 19). Essa proteína funciona como um alarme (alarmina) que sinaliza o sistema imunológico. Seu papel como sensor bioquímico das atividades proteolíticas é bem estudado nas alergias respiratórias, porém nas alergias alimentares não. Diante do seu importante papel no desencadeamento da resposta inflamatória

após a exposição ao alérgeno, esse pode ser um importante marcador molecular para monitoramento nas terapias de dessensibilização.

#### 1.1.1.1 Células *Natural Killer* e a Alergia

As células *natural killer* (NK) têm sido convencionalmente associadas à vigilância imune de células tumorais, bem como à defesa antiviral. No entanto, os recentes avanços na caracterização fenotípica e funcional das células NK sustentam sua capacidade de regular a resposta imune aos alérgenos. As células NK desempenham um importante papel na patogênese da inflamação alérgica por meio da interação com células dendríticas (DCs) e Células T. Elas também estão envolvidas em duas das doenças alérgicas mais comuns: asma e dermatite atópica (DA) (20).

As células NK podem ser divididas com base nas densidades relativas da expressão da molécula de superfície CD56, em 2 subconjuntos principais: células NK CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>bright</sup>. As células CD56<sup>dim</sup> NK compreendem 90% das células NK do sangue periférico, possuem alta capacidade citolítica e secretam baixos níveis de citocinas, enquanto as células CD56<sup>bright</sup> NK secretam um grande número de citocinas, mas adquirem citotoxicidade somente após ativação prolongada. A célula CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> subconjunto é encontrado em baixas frequências em órgãos linfóides secundários, como linfonodos e amígdalas, e essas células respondem vigorosamente à IL-2 produzida localmente (21).

A expressão dos marcadores de células NK CD16 (receptor de baixa afinidade para a porção Fc de IgG [FcγRIIIA]) ou CD56 (molécula de adesão de células neurais) permite a definição de várias diferenças de subpopulações de NK. As células NK são capazes de polarizar *in vitro* em 2 subconjuntos funcionais distintos, células NK1 ou NK2, que são análogas aos subconjuntos de células T TH1 ou TH2. Além disso, foi descrito um subconjunto regulador de células NK que secreta IL-10, mostrando supressão de células T específicas ao antígeno e da produção de IgE, desempenhando um papel imunorregulador. Embora tenha sido demonstrado que as células NK desempenham papéis importantes na



autoimunidade, câncer, transplante e gravidez, o papel das células NK na alergia não foi amplamente discutido (21).

Existem evidências de que as células NK podem ser classificadas em células NK tipo 1 (NK1) e NK tipo 2 (NK2) semelhantes ao conceito de células Th1 e Th2. Esses dados são confirmados *in vitro* e *in vivo* quando verificado a presença ou não de IFN- $\gamma$  e citotoxicidade dos conjuntos NK1 e NK2 em humanos, respondendo a perfis distintos de citocinas. As células NK cultivadas em IL-12 (NK1) produzem IL-10 e IFN- $\gamma$ , enquanto células NK cultivadas em IL-4 (NK2) produzem IL-5 e IL-13. Foi demonstrada a existência *in vivo* de subconjuntos NK de secreção de IFN-gama e de não-secreção de IFN-gama. Loza *et al.* (2002) relataram que as células NK2 são células NK imaturas, que podem ser diferenciadas em células NK0 que produzem IL-13 e IFN-gama, antes de amadurecerem totalmente e se transformarem em células NK1 (22-24).

As células NK ativadas produzem IFN- $\gamma$ , que, por sua vez, ativa macrófagos para secretar IL-12. Tanto o IFN- $\gamma$  quanto a IL-12 contribuem para a criação de um microambiente que promove Th1 enquanto suprime as respostas Th2. Demonstrou-se que as células NK que secretam IL-10 suprimem a proliferação e secreção de células T induzidas por alérgenos e antígenos, além da secreção de IL-13, semelhante à observada para as células T reguladoras. A imunoterapia específica para alérgenos em humanos demonstrou diminuir a atividade das células NK e as células NK produtoras de IFN- $\gamma$  (24).

Foi demonstrado um aumento da frequência de células NK2 produtoras de IL-4 no sangue periférico em asmáticos. O desequilíbrio dos subgrupos de NK na asma pode resultar na falta de capacidade de promover e manter o padrão de resposta Th1 apropriado durante a doença por meio de sua interação através de DCs, desencadeando uma resposta predominantemente pró-inflamatória (Th2) (22).

Não tem relatos na literatura do envolvimento das NKs no tratamento de dessensibilização oral da alergia alimentar. O envolvimento dessas células

durante o processo alérgico alimentar, foi considerado a partir de estudos que demonstraram que crianças que receberam transplante de fígado e utilizaram o imunossupressor tacrolimus, se tornaram alérgicas. O número de células natural killer (NK) foi significativamente maior nessas crianças após o transplante (25). O processo de dessensibilização oral é amplamente conhecido como uma estratégia terapêutica de sucesso, porém existem casos em que pacientes têm maior dificuldade de obter bons resultados no tratamento, provavelmente porque a modulação imunológica envolve múltiplas células e citocinas, que precisam ser melhor avaliadas e que podem indicar possíveis marcadores de monitoramento durante o tratamento.

### 1.1.2 Alergia a proteína do leite de vaca (APLV)

Alergia ao leite de vaca é a alergia alimentar mais comum entre os lactentes e crianças jovens, acometendo cerca de 2,5% das crianças com menos de 3 anos de idade (26). Isso ocorre porque as proteínas do leite de vaca são as primeiras consumidas em grande quantidade por uma criança. A incidência de APLV em crianças durante a amamentação exclusiva é relatada em 0,4 a 0,5% (27).

A alergia ao leite é desencadeada por uma resposta imune reprodutível a proteína do leite de vaca (APLV) que desencadeia diversas manifestações clínicas cutâneas, gastrointestinais, respiratórias e cardiovasculares. Pacientes com alergia persistente ao leite tem uma resposta severa e com vários padrões de resposta imune quando comparados aos pacientes com alergia transitória (28). A APLV pode ser uma reação alérgica mediada ou não por anticorpos IgE. A proliferação de linfócitos B é altamente dependente de linfócitos Th2 e suas citocinas, como as interleucinas (IL), IL-4 e IL-5. Com a ativação dos linfócitos B há grande produção de anticorpos IgE, que se ligam a receptores específicos de alta afinidade presente na membrana dos mastócitos e basófilos (12). Em pacientes sensibilizados, quando entram em contato com o alérgeno há a liberação de mediadores vasoativos, que desencadeiam as manifestações clínicas imediatas como reações cutâneas (urticária, dermatite atópica), gastrintestinais (vômito, diarreia, cólicas abdominais), respiratórias (asma, rinite,

chiado) e sistêmicas (anafilaxia com síncope, hipotensão e choque). Estes podem ser desencadeados minutos ou até 2 horas depois da exposição (29).

As reações não mediadas por IgE compreendem reações citotóxicas, por imunocomplexos e mediadas por células (dermatite herpetiforme, proctocolite, enterocolite, hemossiderose) (30), que se tornam evidentes horas ou dias após a ingestão do alérgeno (4). Representam a minoria das reações imunológicas a alimentos e são bem menos caracterizadas, mas, normalmente, são devidas a uma inflamação aguda ou crônica no trato gastrointestinal, em que os eosinófilos e os linfócitos T parecem desempenhar um papel importante. Clinicamente é muito difícil identificar um dos dois tipos, necessitando de testes de confirmação de tolerância a lactose ou testes genéticos (12).

Doenças gastrointestinais induzidas por alimentos não mediadas por anticorpos IgE (do inglês non-IgE Gastrointestinal Food allergies - non-IgE-GI-FAs) são responsáveis por uma proporção desconhecida de alergias alimentares e, portanto, pouco entendidas. Dentro desses distúrbios incluem a síndrome de enterocolite induzida por proteína de alimento (do inglês Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome - FPIES), proctocolite alérgica induzida por alimento (do inglês Food Protein-Induced Allergic proctocolitis - FPIAP) e enteropatias induzidas por proteínas de alimentos (do inglês Food Protein-Induced Enteropathies - FPE). Os principais alérgenos envolvidos são leite de vaca e soja, principalmente nas FPIES, desencadeando no paciente vômito, palidez e letargia (31). A fisiopatologia das non-IgE-GI-FAs, assim como as alergias alimentares IgE mediadas necessitam de estudos mais sofisticados para o desenvolvimento de biomarcadores que viabilizariam uma terapia mais específica.

O diagnóstico de APLV é confirmado após quatro principais avaliações: anamnese e exame clínico, dieta de restrição, testes para detecção de IgE específica (*in vivo* e *in vitro*) e testes de provocação oral. Muitos autores discutem o diagnóstico baseando-se como parâmetro único a sensibilização IgE específica para proteína do leite *in vitro* ou *in vivo*, como não sendo eficiente, devendo ser avaliado também o contexto clínico do paciente (32). É importante ressaltar que alguns pacientes apresentam ausência de IgE específica, sendo

recomendados o teste de provocação oral para confirmação do diagnóstico em casos de história sugestiva (33), enquanto outros apresentam IgE específica para leite sem sintomas clínicos.

## **1.2 Tolerância não responsiva**

Estudos clínicos mostram que a incidência de alérgenos IgE- específicos é 10 vezes maior que a incidência de alergia alimentar (34), sugerindo um nível adicional de regulação de tolerância além daquele que simplesmente previne o início de uma resposta imunológica tipo IgE e Th2. Além disso, pacientes com mutações no Stat3 que levam à Síndrome hiper-IgE apresentam menos reações anafiláticas a alérgenos alimentares (35). Gri (2008) mostrou que células Treg podem suprimir a desgranulação de mastócitos IgE-sensibilizados após exposição ao antígeno via interações OX40/OX40 L (36). Em alergia alimentar, foi demonstrado que a transferência de Treg poderia suprimir a anafilaxia e restaurar a homeostasia Th17 intestinal através do enriquecimento de IL-6 derivadas de mastócitos. Este processo seria independente de OX40 e mediado via TGF- $\beta$  (37). Além disso, células Treg podem regular negativamente Fc $\gamma$ R1 de mastócitos in vitro (38). Esta forma de tolerância ativa, que ocorre apesar da presença de um sistema imune sensibilizado a um antígeno IgE-específico parece ser diferente daquela que ocorre após a dessensibilização, que está associada com a internalização de Fc $\gamma$ R1 e IgE e alteração de ativação Syk (39, 40).

Estudos que compreendam o sistema imunológico tolerogênico desencadeado pela ITO em alguns pacientes ou outras terapias acerca das alergias alimentares, especialmente ao leite de vaca, são necessários para melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Investigações em protocolos de ITO são necessários para se verificar se a tolerância a longo prazo pode ser induzida, além de um maior conhecimento dos pacientes que podem se beneficiar destes protocolos, aqueles com alto risco de alergia persistente e reações anafiláticas graves.

O entendimento do comportamento imunológico desses pacientes pode permitir uma terapia mais específica, evitando dietas de restrição

desnecessárias. Os inúmeros caminhos para intervenção que estão agora a ser explorados em fase pré-clínica e em estudos clínicos oferecem esperança por melhores tratamentos em um futuro próximo.

### **1.3 Imunoterapia Oral**

A imunoterapia alérgeno-específica é uma das estratégias utilizada mais por vários pesquisadores para o tratamento das doenças alérgicas, que tem como objetivo induzir a tolerância imunológica através da ativação de células T regulatórias (Treg) e que vem sendo utilizada mais recentemente no tratamento da AA. O tratamento de imunoterapia oral consiste em administrar via oral baixas doses do alérgeno para induzir o estado não responsivo do sistema imune.

Várias terapias têm sido estudadas nas últimas décadas para o tratamento das alergias alimentares. Uma delas baseia-se no tratamento direcionado à determinadas citocinas, mediadores e receptores envolvidos nessas alergias. Esses testes, ainda em fase pré-clínica em modelos murinos, em geral, modulam ou inibem mediadores imunológicos envolvidos no processo inflamatório das alergias, sem a necessidade da restrição alimentar (28).

A imunoterapia oral (ITO) tem sido utilizada como um tratamento de escolha para muitos pacientes com APLV. Consiste em um tratamento que o alimento, no caso o leite de vaca, é ingerido pelo paciente em concentrações que vão aumentando gradualmente ao longo dos meses. A taxa de sucesso varia de paciente para paciente, a média é de 70% a 80%, podendo ou não estar associado à taxa de anticorpos IgE específicos desses pacientes (42, 43). Presume-se que o ITO induz ou restaura um estado imunológico tolerante do organismo ao alimento. No entanto, uma distinção deve ser levantada entre a dessensibilização, onde o alérgeno é ingerido sem sintomas durante tratamento, sendo ingerido ininterruptamente, e a tolerância, onde o alimento pode ser ingerido sem sintomas de alergia apesar de períodos de abstinência. Os estudos até agora indicam que a ITO induz dessensibilização e não tolerância (44). Staden et al. verificaram em um estudo de ITO de leite e ovo em crianças, que 64% tiveram sucesso no tratamento, porém quando re-desafiados com os alimentos meses depois somente 34% foram irresponsivos, ou seja,

desenvolveram tolerância ao alimento (45). A indução de tolerância a longo prazo, demonstrada por um aumento na produção de células Treg FoxP3+ por CSPM e baixos níveis de citocinas do tipo Th2 foram relatadas em poucos estudos de ITO apenas para ovo e amendoim, mas não para leite.

Embora alguns artigos resumam os efeitos da concentração de antígenos na tolerância oral (46, 47) [ou seja, baixas doses de antígenos direcionam para uma resposta de células Treg, enquanto altas doses de antígenos levam à anergia e deleção de células T (46), a maioria das evidências mostram que uma associação entre Treg e baixas doses de antígenos é peça chave para indução de tolerância na alergia alimentar. Ganeshan *et al.* (2009) mostrou que a perda de tolerância oral para amendoim foi associada à diminuição das respostas Treg, mas por outro lado, altas doses de antígenos poderiam levar à supressão das respostas alérgicas (47).

#### **1.4 MicroRNAs (miRNAs)**

São uma classe de RNA e fita única envolvidos no silenciamento de genes pós-transcripcionais que estão envolvidos no ajuste fino das redes gênicas visto que cada miRNA pode ter como alvo vários genes (48).

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não-codificantes com 18 a 22 nucleotídeos de comprimento e altamente conservadas ao longo da evolução. Parecem ser um dos mecanismos reguladores epigenéticos fundamentais que levam à supressão da expressão gênica pela degradação do mRNA ou inibição da tradução. Foi demonstrado que os miRNAs estão envolvidos em muitos processos biológicos, transdução de sinal, proliferação/diferenciação celular, apoptose e respostas ao estresse (49, 50).

Os mecanismos moleculares e celulares que participam na resposta Th2 são complexas, fazendo do estudo da alergia um desafio. Múltiplas células da resposta inata e adaptativa incluindo eosinófilos, mastócitos, basófilos, células linfoides do tipo 2 (ILC2), células Th2, Th9, Treg e células B orquestram e afetam essa resposta. (51)

Embora os estudos de como os miRNAs e seus alvos gênicos regulam a resposta alérgica ainda sejam muito iniciais já está claro que miRNAs apresentam efeitos robustos nas respostas imunes e que o estudo destas interações pode responder questões fundamentais sobre a resposta Th2 (52).

Uma abordagem para identificar miRNAs envolvidos na patogênese da alergia é descobrir quais miRNAs são diferencialmente expressos em tecidos saudáveis e doentes. Estudos para avaliação do perfil de miRNA em amostras de tecidos humanos biopsiados e em modelos animais de doenças como asma, esofagite eosinofílica e dermatite de contato mostram uma diferença de expressão de aproximadamente 10-20% dos miRNAs. Os trabalhos que avaliam miRNA no plasma/soro de pacientes são mais escassos, embora estudos preliminares sugerem que miRNAs extracelulares (ex-miRNA presentes em fluidos como soro/plasma, saliva, lavados) podem ser úteis como biomarcadores para a doença alérgica com habilidade de classificar a doença alérgica em subtipos ou atividades, e que ex-miRNAs relevantes podem contribuir para a patogênese da doença. Como os miRNAs podem regular o funcionamento do sistema imunológico, eles também podem estar envolvidos na inflamação alérgica. Perfis de miRNA em algumas condições alérgicas como asma, rinite alérgica, dermatite atópica e esofagite eosinofílica já foram relatados (53, 54).

Não encontramos na literatura nenhum estudo relacionando expressão de miRNAs e tratamento em alergia. Buscamos então identificar diferenças na expressão de miRNAs entre pacientes antes e após o tratamento de ITO. Como referência para comparação utilizamos um grupo de crianças que eram alérgicas a leite, mas tornaram-se tolerantes espontaneamente, sem a necessidade do tratamento. Nossa hipótese é que o perfil de miRNAs de pacientes pós tratamento apresenta uma mudança no perfil de expressão que é mais semelhante ao perfil do grupo tolerante espontâneo quando comparados ao grupo pré tratamento.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A terapia de indução de tolerância oral (OIT) é usada regularmente em crianças com alergia a proteína do leite de vaca e tem se mostrado bastante eficaz clinicamente. No entanto, eventos adversos ocorrem com frequência durante a terapia. Porém, não existem muitos estudos sobre os mecanismos de dessensibilização oral em pacientes com alergia alimentar, permanecendo ainda mal compreendidos.

Os níveis de evidência também são baixos e, às vezes, ocorrem eventos alérgicos graves e frequentes durante a OIT. Não há protocolos padronizados em diretrizes de alergia pediátrica de vários países. Os estudos com observações de acompanhamento de longo prazo e tolerância clínica, são raros. Além disso, a tolerância clínica por OIT geralmente não é bem definida e obscura. Assim, vários mecanismos ainda precisam ser estudados, envolvendo, não somente a pesquisa celular, mas também de mediadores químicos que favorecem o microambiente imunológico favorável para o bom prognóstico clínico.



### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Geral**

Avaliação do perfil imunológico de pacientes alérgicos a proteína do leite de vaca pré e pós-tratamento de imunoterapia oral padronizado no HCFMUSP, tolerantes espontâneos e crianças sensibilizadas sem sintomas clínicos.

#### **3.2 Específicos**

- Verificar a produção de células T reguladoras específicas em cultura a partir de células CMNSP destes indivíduos, após estímulo específico com leite; porcentagens de células T reguladoras; e populações celulares de Linfócitos;

- Comparar os perfis imunológicos avaliados em crianças com APLV pré e pós-tratamento de imunoterapia oral (ITO), tolerantes espontâneos e crianças sensibilizadas sem manifestações de sintomas clínicos, em relação a:

- Dosagem de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, envolvidas em respostas inflamatórias, anti-inflamatórias, Th1, Th2 e Th17 no plasma desses indivíduos;

- Expressão do perfil de microRNAs no plasma;
- Frequência e perfil de células NK;
- Avaliar a expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-13 produzidas por células NK.

## 4. MÉTODO

### 4.1 Seleção dos pacientes

Os pacientes com APLV (de 4 a 17 anos) foram sendo convocados, junto ao HCFMUSP. Estes pacientes, previamente, passaram pela avaliação clínica diagnóstica de APLV. Os pacientes selecionados para o protocolo de imunoterapia oral devem preencher os seguintes critérios:

Inclusão:

- ✓ Ser APLV e ter acima de 5 anos;
- ✓ Pelo menos um episódio de anafilaxia;
- ✓ História de reação ou provocação pelo menos 1 ano positiva.

Exclusão:

- ✓ Endoscopia positiva para EoE;
- ✓ Asma não controlada;
- ✓ Doença neoplásica ou autoimune.

Foram colhidas informações pelo médico alergista sobre a história da queixa atual e manifestações clínicas como o início dos sintomas, última crise alérgica e outros alimentos potenciais alérgenos, sempre relatados pela mãe ou responsável.

As informações a respeito da relação entre a introdução do leite de vaca e seus sintomas, sua melhora no processo com exclusão do leite de vaca e derivados e, por fim, qual leite foi introduzido, estão sendo obtidas desde o primeiro recrutamento. Outras informações como tipo de parto, intervenção medicamentosa e episódios de anafilaxia também estão sendo colhidas utilizando-se um questionário auxiliar (ANEXO 1).

Os pacientes que estão no protocolo de dessensibilização estão sendo recrutados para assinatura do Termo de Consentimento, aprovado pelo projeto nº 2.753.158/18, e realização *prick-test* para estabelecer a diluição do leite de vaca que estão sendo administradas no início do protocolo de dessensibilização. A primeira dose administrada nesse paciente é a diluição de menor reação na pele (tamanho da pápula) desencadeada do *prick-test*.

O protocolo de dessensibilização tem a duração de aproximadamente 3 (três) meses, onde o paciente, acompanhado pelo médico, tem a administração oral com diluições do leite de vaca que são oferecidas em intervalos de tempo pré-estabelecidos. A diluição será diminuída conforme os dias de tratamento, levando-se em consideração a resposta e evolução do paciente frente ao protocolo (ANEXO 2).

Estão sendo realizadas coletas de sangue antes do início do tratamento ( $T_0$ ), no dia do desafio ao final do tratamento (Dia D), 6 e 12 meses após o fim do tratamento ( $T_1$  e  $T_2$ ).

Para as análises comparativas estão sendo utilizadas amostras de dois outros grupos:

1 – Pacientes APLV sensibilizados que se tornaram tolerantes espontâneos antes dos 5 anos,

2 – Pacientes sensibilizados sem manifestações clínicas. Para seleção deste grupo de pacientes, estamos tendo a colaboração do ambulatório de alergia de insetos, onde a maioria dos pacientes são crianças. Ao pedirem os exames de IgE específicos para venenos de insetos, também está sendo solicitado exame específico para IgE de leite. Aqueles que tiverem resultado positivo serão convidados a participar do estudo.

## 4.2 Desenho Experimental

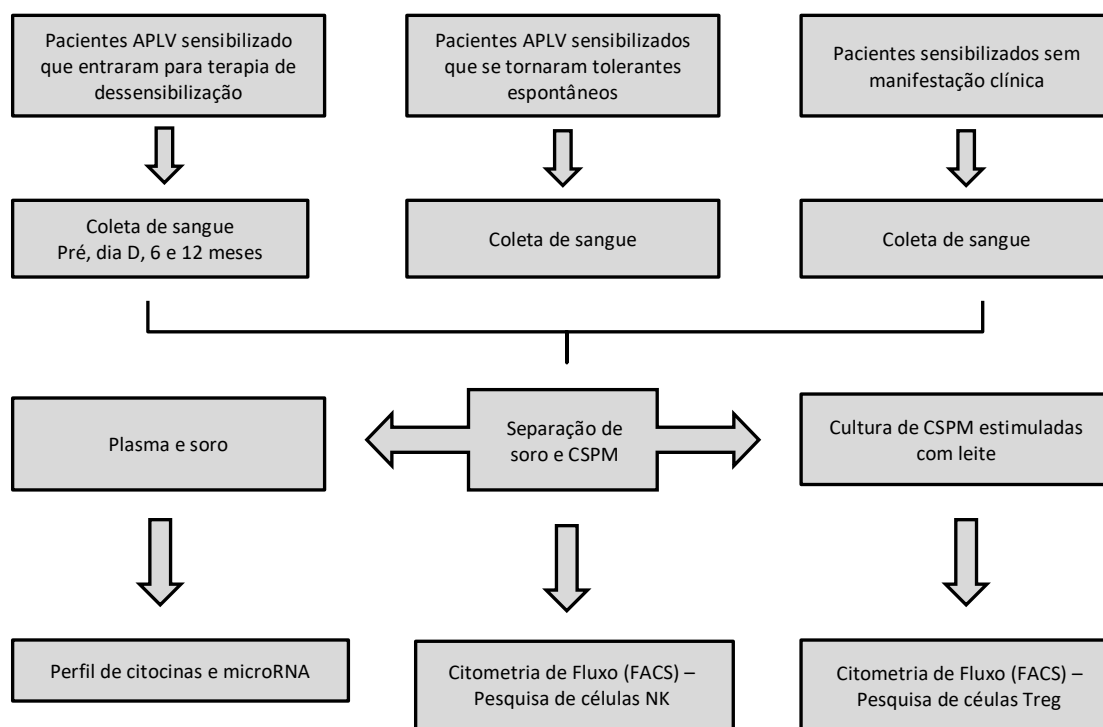


Figura 2 – Desenho experimental

## 4.3 Coleta das amostras

A coleta do sangue total foi realizada através da punção venosa utilizando materiais descartáveis e a técnica de coleta a vácuo, com tubos heparinizados e não heparinizados.

Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas lentamente e devidamente armazenadas para o encaminhamento ao Laboratório de Alergia e Imunopatologia da FMUSP – LIM60, onde serão processadas em até 24 horas.

## 4.4 Processo de separação do soro e plasma do sangue

Em cabine de segurança biológica nível 2, esterilizada por 15 minutos com exposição a luz ultravioleta (UV), tanto os tubos heparinizados quanto os secos com o sangue coletado de cada voluntário, foram centrifugados por 10 minutos a 2300 rpm, em temperatura de 18 a 20°C. O soro e o plasma foram transferidos para criotubos de 1 mL e armazenados no freezer a -20°C para posterior utilização na dosagem de citocinas por LUMINEX e no teste de microRNA.

#### **4.5 Processo de separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)**

Em cabine de segurança biológica nível 2, esterilizada por 15 minutos com exposição a luz UV, o tubo de sangue coletado de cada voluntário foi diluído com 10 mL de Solução Tampão Salina Hank's (HBSS) (Gibco™).

Posteriormente, foram cuidadosamente transferidos 10 mL de sangue para outros tubos contendo 15 mL de solução de gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences). Estes foram centrifugados por 30 minutos a 2300 rpm em temperatura de 18 a 20°C.

Após a centrifugação, as células se separaram por densidade de gradiente, formando uma “nuvem” (*buffy coat*). Essa camada de interesse com as células mononucleares do sangue periférico, foram transferidas para outros tubos de 50 mL, completando o volume total com HBSS e centrifugadas por 10 min à 1700 rpm duas vezes, para as células sejam lavadas e retirado o excesso de Ficoll.

As hemácias foram lisadas utilizando a Solução Tampão Lise ACK (Gibco™). A sua ação foi neutralizada após 3 minutos, adicionando meio de cultura meio RPMI enriquecido – R10 (10% de Soro Fetal Bovino, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 1 mM de penicilina/estreptomicina, 55 µM de 2-mercaptoetanol, e 10 mM da solução de ácido sulfônico - HEPES) e contadas com contador automatizado Countess (Modelo C10281, Invitrogen) segundo instruções do fabricante. Depois foram centrifugados novamente por 10 minutos a 1700 rpm em temperatura de 18 a 20°C.

As células foram ressuspensas no volume necessário de meio de congelamento, composto por 90% Soro Fetal Bovino (GIBCO™), 10% Dimetil Sulfoxideo (DMSO) (Hybri-Max®) e transferidas para criotubos, onde cada um tinha cerca de  $1,5 \times 10^6$  de células. Esses permaneceram armazenados no freezer -80°C por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, foram transferidos para o tanque de nitrogênio líquido, onde permaneceram estocados até a realização dos demais experimentos.

#### **4.6 Descongelamento das CMSP criopreservadas**

Este procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica nível previamente esterilizada por 15 minutos através da exposição a UV.

O número de criotubos necessários foram retirados e mantidos em um recipiente com gelo seco até o momento do seu descongelamento. Os criotubos foram parcialmente descongelados em banho-maria a 37°C. Foi adicionado 1 mL de meio de cultura R10 no criotubo, gotejado lentamente. Posteriormente o conteúdo total da amostra foi transferido para um tubo cônico contendo R10, previamente identificado, pelo procedimento de gotejamento. Para a realização da lavagem do criotubo será adicionado mais 1 mL de R10 e este volume transferido para o tubo contendo R10.

Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1700 rpm em temperatura de 4 a 6°C; o sobrenadante será desprezado e as células ressuspensas com meio RPMI enriquecido – R10 (10% de Soro Fetal Bovino, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 1 mM de penicilina/estreptomicina, 55 µM de 2-mercaptoetanol, e 10 mM da solução de ácido sulfônico - HEPES) e contadas com contador automatizado Countess (Modelo C10281, Invitrogen) segundo instruções do fabricante. Novamente o tubo será centrifugado e as células ressuspensas em R10 no volume de  $1,0 \times 10^6$  células/ml e transferidas para a placa de cultura celular com fundo plano MULTIWELL™ 24 poços (FALCON ®/Becton Dickinson).

#### **4.7 Padronização dos testes de cultura de CMSP com alérgenos específicos**

Para padronização da técnica, foi necessário a utilização de amostras de pacientes adultos alérgicos, que não estão na coorte do estudo, pois as quantidades de amostras são escassas por serem de crianças. Foram feitas incubações com um mix dos alérgenos específicos caseína, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina com diferentes concentrações (40, 80 ou 120 µg/mL) diluídos em RPMI, ou ainda utilizando leite puro (marca Molico) nas mesmas concentrações. Foram utilizados alguns valores de concentrações e tempos segundo o estudo de Motrich et al., 2003, que serviram como base para o nosso teste (55).

As células mononucleares de sangue periférico foram descongeladas e distribuídas em uma placa de 48 poços de fundo plano (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) a uma concentração de 700 mil a 1 milhão de células em 500 uL de volume por poço. Essas foram incubadas com uma mistura equimolar dos três principais alérgenos do leite de vaca: lactalbumina, lactoglobulina e caseína nas concentrações de 40, 80 ou 120 µg / mL; no controle positivo utilizou-se fitohemaglutinina (PHA-L-P1668- C. estoque: 2mg/mL) C. final 10mg/mL ou somente meio (controle negativo). Foram feitos testes nas mesmas condições utilizando IL-2 em alguns poços, pois é uma citocina usada para estimular proliferação de células T reguladoras (56), com o intuito de otimizar as amostras, pois foram obtidas poucas células na separação das CMSP. Todas as combinações de células e proteínas foram feitas em duplicada. As placas foram incubadas por 24, 48, 72h ou 8 dias a 37 °C em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes da cultura foram coletados a cada período e congelados para serem analisados conforme a oportunidade de análise em outros painéis utilizando kits de ensaio multiplex por beads (Merck Millipore) na plataforma Luminex 100, para avaliação da viabilidade da técnica na análise de citocinas no sobrenadante da cultura proposta na pesquisa.

#### **4.8 Dosagem de citocinas**

A tecnologia xMAP (*multiple analyte profiling*) da LUMINEX® possui o princípio similar ao ELISA sanduíche. Microesferas coloridas fluorescentes (também chamadas de *beads*) ligam-se de forma covalente aos anticorpos de captura. Os anticorpos de captura são colocados diretamente contra o biomarcador desejado. Após uma série de lavagens para remover as proteínas não ligadas, anticorpos de detecção são adicionados para criar o complexo sanduíche. A detecção final do complexo é formada com a adição do conjugado de streptavidina-ficoeritrina. A ficoeritrina serve como um indicador fluorescente.

O princípio do ensaio Luminex® está baseado em três principais elementos da tecnologia xMAP:

- a) *Beads* que possuem um código de cor distinto ou um endereço espectral que permite discriminação individual na suspensão multiplex. Isto permite

detecção simultânea de inúmeros tipos diferentes de moléculas em um único poço.

b) Nos equipamentos Magpix, são utilizados LEDs, e identificação e quantificação é realizado por imagens de câmera CCD. No equipamento Luminex 200, é utilizado o princípio de citometria de fluxo com 2 lasers associados para medir diferentes moléculas ligadas a superfície das *beads*.

(1) LED ou laser vermelho – 635nm – classifica as *beads* em cores distintas, portanto identifica os diferentes biomarcadores;

(2) LED ou laser verde – 532nm – ao excitar a ficoeritrina gera um sinal proporcional a concentração do biomarcador na amostra.

c) Processador de sinal digital que administra os dados da fluorescência.

O teste multiplex utilizando a tecnologia xMAP da Luminex®, ou ensaio Luminex® possibilita quantificar múltiplas citocinas ao mesmo tempo e em diversos tipos de amostras, incluindo amostras de soro, de plasma, tecidos e células em cultura. Para uma perfeita sensibilidade, é importante preparar adequadamente amostras e diluições da curva padrão.

Manter todas as amostras congeladas até o uso. A diluição de padrão, controles, e amostras devem ser de acordo com a bula do kit.

As amostras são analisadas no equipamento Magpix com tecnologia xMAP (Luminex Corp., Austin, TX). As concentrações das amostras desconhecidas são estimadas a partir da curva padrão, utilizando o equipamento de leitura Magpix xMAP e com software XPONENT 4.2 (Luminex Corp., Austin, TX). A análise dos dados é feita pelo software Milliplex Analyst 5.1 (EMD Millipore). Os níveis das citocinas são expressos em pg/mL ou ng/mL.

As amostras de plasma foram preparadas para análise em uma placa de 96 poços utilizando um kit Human Th17 Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay (CAT. HTH17MAG-14K) seguindo os protocolos específicos dos kits fornecidos pela Millipore. Os analitos foram quantificados utilizando um leitor de microesferas Magpix, que utiliza a tecnologia xMAP, perfil de múltiplos analitos (Tabela 1), (Luminex Corp., Austin, TX) e o software XPONENT 4.2 (Luminex). A tecnologia xMAP utiliza microesferas magnéticas fluorescentes que são



codificadas por cores e revestidas com anticorpos de captura específicos de analito, e podem dosar simultaneamente vários analitos em uma única amostra. Depois que as microesferas capturaram os analitos, um anticorpo de detecção biotinilado se liga a esse complexo. A estreptavidina PE então se liga como uma molécula indicadora. Dentro do equipamento, as microesferas magnéticas são mantidas em uma monocamada por um ímã, onde dois LEDs são usados para excitar o corante ligado à microesfera, e o corante da molécula indicadora, respectivamente. Uma câmera CCD captura essas imagens, que são analisadas pelo software Milliplex Analyst (Millipore).

As concentrações de citocinas (pg/ml) foram determinadas com base no ajuste de uma curva padrão para a intensidade média de fluorescência *versus* pg/ml.

Tabela 1 - Painel de analitos avaliados por Luminex

GM-CSF	IL-17E/IL-25
IFN $\gamma$	IL-17F
IL-1 $\beta$	IL-21
IL-2	IL-22
IL-4	IL-23
IL-5	IL-27
IL-6	IL-28A/IFN $\lambda$ 2
IL-9	IL-31
IL-10	IL-33/NF-HEV (mature)
IL-12 (p70)	MIP-3 $\alpha$ /CCL20
IL-13	TNF $\alpha$
IL-15	TNFB / Lymphotoxin $\alpha$
IL-17A/CTLA8	(LT $\alpha$ )

Para avaliação das citocinas, foram descongeladas as amostras de soro armazenadas.

#### 4.9 Citometria de Fluxo

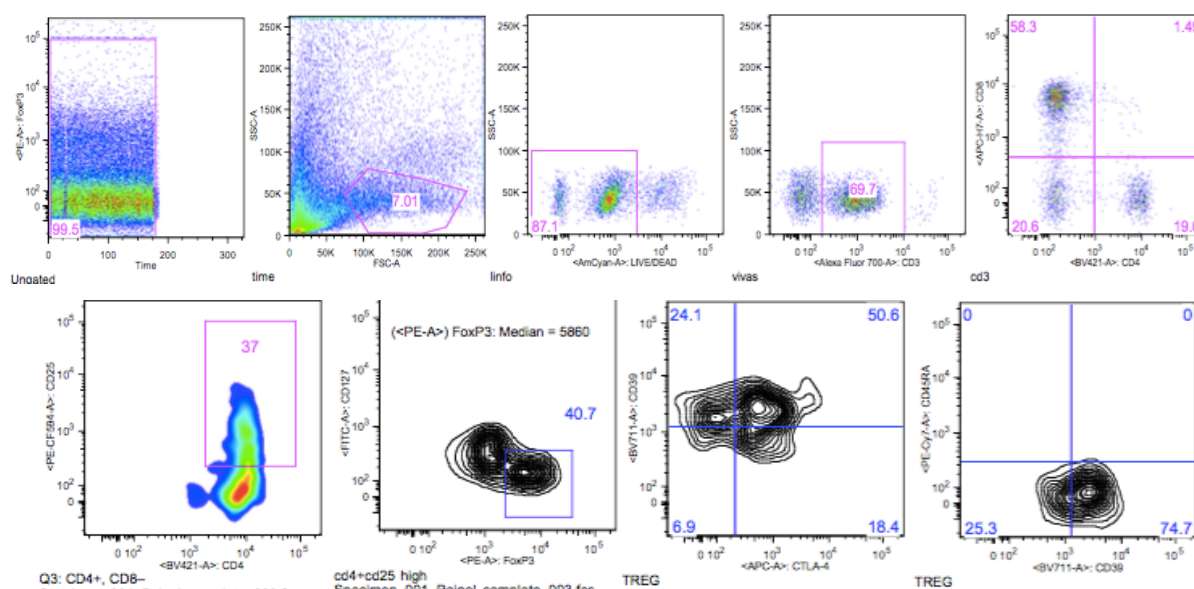
Para tentar determinar quais tipos celulares seriam avaliados no teste, foram desenhados os painéis de citometria de fluxo descritos nas tabelas 2, 3 e 4 com o objetivo de separar os linfócitos totais (CD3), subpopulações de células

T CD4, T CD8, Treg, além da viabilidade celular (live/death) e subpopulações de células NK.

Em uma outra etapa de análise, foram realizadas a imunofenotipagem para determinação da frequência de células NK (Natural Killer), assim como, o perfil dessas células nas diferentes etapas do tratamento. A avaliação foi realizada em amostras descongeladas de pacientes submetidos ao ITO, sem os estímulos em cultura.

Todas as células foram lidas no Citômetro de Fluxo modelo BD LSRFortessa (BD Biosciences) utilizando o programa FACS-Diva 6.1 (BD Biosciences, San Jose, CA). Beads Anti-mouse IgG (BD Biosciences, San Jose, CA) foram utilizados com cada fluorocromo separadamente e empregados para o procedimento de compensação. A análise dos dados será realizada no programa FlowJo 8.7 (FlowJo Software, Tree Star, Ashland, OR). Na estratégia de análise, primeiramente selecionar o gráfico dos parâmetros de dispersão frontal Foward Scatter (FSC, eixo x) e dispersão lateral de luz Side Scatter (SSC, eixo y) no qual será possível identificar e selecionar a população de interesse, excluindo os debris e células mortas. A seleção foi feita com base no conhecimento prévio do tamanho (FSC) e da granularidade (SSC) da população celular de interesse.

A estratégia de análise utilizada para separação linfócitos totais e suas subpopulações do sangue periférico está mostrada na Figura 3.



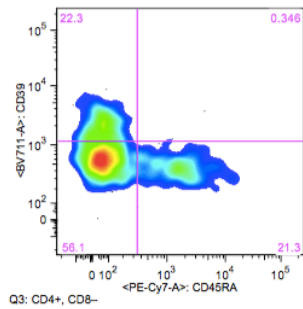


Figura 3 - Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações de linfócitos T (\*)

(\*) NOTA: Os dados foram analisados em gráficos de *dot plot* baseados nos seguintes parâmetros: Time x PE, para checar o *status* do *laser*; Live/Dead, marcador de viabilidade celular, para excluir as células mortas e os marcadores de exclusão; FSC-H x FSC-A, para excluir células duplicadas na aquisição (Singlets); SSC-A x Live/Dead viabilidade celular; SSC-A x CD3, para identificação da população de linfócitos; CD25 x CD4, para identificação da população de linfócitos TCD4CD25<sup>high</sup>; CD127 x FoxP3 para identificação da população de linfócitos TCD127<sup>low</sup>FOXP3<sup>+</sup>; Purificação CD45RO x CD39

#### 4.9.1 Imunofenotipagem de superfície de células Treg

Para citometria de fluxo, CMSP ( $10^6$  células/poço) foram cultivadas com os estímulos específicos já descritos acima, em placas de 24 poços sob as mesmas condições de estímulo realizadas para mensuração de citocinas. Primeiramente, foram feitos testes para estabelecer titulações e o melhor tempo de incubação. A placa foi centrifugada a 1800 rpm por 5 minutos, para a realização da lavagem celular, o sobrenadante foi desprezado e as células ajustadas na concentração de  $1 \times 10^6$  em  $200 \mu\text{l}$  e distribuídas em outra placa de 96 poços fundo em “V”, foi feita uma nova lavagem repetindo o procedimento anterior.

Foi acrescentado  $170 \mu\text{l}$  de MACS Buffer composto por 498 mL de Tampão Salina Fosfatada 7,2 (GIBCO™) (PBS 1x), 2 mL de EDTA [500mM], 2,5 g de Albumina de Soro Bovino (SIGMA®) (BSA), colocado em cada poço e feito a homogeneização, centrifuga-se a 1800 rpm por 5 minutos e despreza-se o sobrenadante.

Realizou-se a marcação com o *pool* de anticorpos monoclonais de superfície (Tabela 2). A definição das populações positivas e negativas para os marcadores que não têm boa separação nos gráficos será baseada na análise

de FMO (*Fluorescence Minus One*). Realizou-se nesta etapa o FMO para CD45RA, CD39, CD25 e CD127. Após a adição dos reagentes, permaneceram sob incubação por 30 minutos no escuro a 4 °C. Incuba-se a placa no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente.

Tabela 2 - Anticorpos monoclonais utilizados na marcação de superfície das populações de células imunológicas de interesse

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>
<b>CD3</b>	UCHL1	ALEXA 700	BD
<b>CD4</b>	RPA-T4	Pacific Blue	BD
<b>CD8</b>	SK1	APC-H7	BD
<b>CD25</b>	M-A251	PE-CF594 (Texas Red)	BD
<b>CD39</b>	A1	Percp CY5,5	Biologend
<b>CD45-RA</b>	HI100	PECY7	Biologend
<b>CD127</b>	HIL-7R-M21	FITC	BD
<b>Live/Dead</b>	-	AMCYAN	Invitrogen

#### 4.9.2 Marcação de CMSP para detecção intranuclear de FOXP3

Após a incubação dos anticorpos de superfície por 30 minutos, foi feita uma nova lavagem, centrifugando a 1800 rpm por 5 minutos e desprezando o sobrenadante.

Para marcação intracelular, é feita a preparação dos reagentes de fixação (buffer A) e permeabilização (buffer C) conforme instruções do fabricante.

Após a lavagem das células adiciona-se 200 µl do Buffer A (1X) em cada poço, para fixar, homogeneizando e deixa-se incubando por 10 minutos em temperatura ambiente.

Após centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos, lava-se por mais uma vez a placa com 170 µl de MACS Buffer e descarta o sobrenadante. Ressuspende em 200 µl do Buffer C, para permeabilizar as células. Incuba-se por 30 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos, lava-se por mais duas vezes a placa com 170 µl de MACS Buffer e descarta o sobrenadante.

Foi feito um de marcadores intracelulares anti-FOXP3 e CTLA-4 (Tabela 3) utilizando a titulação ajustada em um volume final de 100 µl por poço. A placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Foi feito o FMO para FOXP3.

Após incubação foi feita a centrifugação da placa por 5 minutos a 1800 rpm e desprezado o sobrenadante, esse procedimento foi repetido por duas vezes. Após a lavagem é feita a fixação em 100 µl de PFA 1% e incubar por 15 minutos. Centrifuga-se por 5 minutos a 1800 rpm descarta o sobrenadante e ressuspende-se em 300 µl de PBS 1X, homogeneizando as amostras e transferindo para os tubos de leitura no citômetro de fluxo. Esses permanecem armazenados na geladeira a 4°C até a realização da aquisição.

Tabela 3 - Marcadores Intracelulares

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>
<b>FOXP3</b>	259D/C7	PE	BD
<b>CTLA-4</b>	BNI3	APC	BD

### 3.9.3 - Imunofenotipagem de superfície de células NK

Para marcação de superfície das CMSP, as amostras foram descongeladas conforme protocolo de descongelamento já apresentado acima, acertando a concentração de células para  $2 \cdot 10^6$  células/poço em 200 µl de meio. A placa foi centrifugada a 1800 rpm por 5 minutos, para a realização da lavagem celular, o sobrenadante foi desprezado e as células ajustadas na concentração e distribuídas em outra placa de 96 poços fundo em “U”, foi feita uma nova lavagem repetindo o procedimento anterior.

Foi acrescentado 170 µl de MACS Buffer composto por 498 mL de Tampão Salina Fosfatada 7,2 (GIBCO™) (PBS 1x), 2 mL de EDTA [500mM], 2,5 g de Albumina de Soro Bovino (SIGMA®) (BSA), colocado em cada poço e feito a homogeneização, centrifuga-se a 1800 rpm por 5 minutos e desprezou-se o sobrenadante.

Realizou-se a marcação com o *pool* de anticorpos monoclonais de superfície (Tabela 4) nas diluições previamente padronizadas. Após a adição dos reagentes, permaneceram sob incubação por 30 minutos no escuro a 4°C. Incuba-se a placa no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente.

Tabela 4 - Anticorpos monoclonais utilizados na marcação de superfície das populações de células imunológicas de interesse.

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>
<b>Live/Dead</b>	-	Indo-I	Life Invitrogen/Thermo
<b>CD56</b>	B159	PE.Cy7	BD Pharmingen
<b>CD16</b>	3G8	APC-Cy7	BD Pharmingen
<b>CD3</b>	UCHT1	PerCP-Cy5	BD Pharmingen
<b>CD14</b>	Mop9	PE Texas Red	BD Horizon
<b>CD19</b>	HIB19	PE-CF594	BD Horizon

#### 3.9.4 Marcação de CMSP para detecção intranuclear de citocinas INF- $\gamma$ , IL-10 e IL-13.

Após a incubação dos anticorpos de superfície por 30 minutos, foi feita uma nova lavagem, centrifugando a 1800 rpm por 5 minutos e desprezando o sobrenadante.

Para marcação intracelular, foi feita a preparação dos reagentes de fixação com Cytofix/Cytoperm utilizando conforme instruções do fabricante, foi adicionado 100uL/poço e incubado em temperatura ambiente.

Após a lavagem das células adiciona-se 100  $\mu$ l de Perm/wash (1X) em cada poço, para permeabilizar a célula, e centrifuga a 1800 rpm por 5 minutos. Após a lavagem, foi realizado um *pool* dos marcadores intracelulares descritos na tabela 5, utilizando a titulação ajustada em um volume final de 100  $\mu$ l por poço. A placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente.

A definição das populações positivas e negativas para os marcadores que não têm boa separação nos gráficos, foi baseada na análise de FMO

(Fluorescence Minus One). Nessa etapa foi realizado FMO para INF- $\gamma$ , IL-10 e IL-13 em um poço.

Após incubação foi feita a centrifugação da placa por 5 minutos a 1800 rpm e desprezado o sobrenadante, esse procedimento foi repetido por duas vezes. Após a lavagem é feita a fixação em 100  $\mu$ l de PFA 1% e incubar por 15 minutos. Centrifuga-se por 5 minutos a 1800 rpm descarta o sobrenadante e ressuspende-se em 300  $\mu$ l de PBS 1X, homogeneizando as amostras e transferindo para os tubos de leitura no citômetro de fluxo. Esses permanecem armazenados na geladeira a 4°C até a realização da aquisição.

Tabela 5 - Marcadores Intracelulares

Anticorpo		Clone	Fluorocromo	Marca
IFN- $\gamma$		25723.11	FITC	BD
IL-13		JES10-5A2	BV711	BD
IL-10		JES3-19F1	APC	BD

A estratégia de análise utilizada para separação de células NK e suas subpopulações do sangue periférico está mostrada na Figura 4.

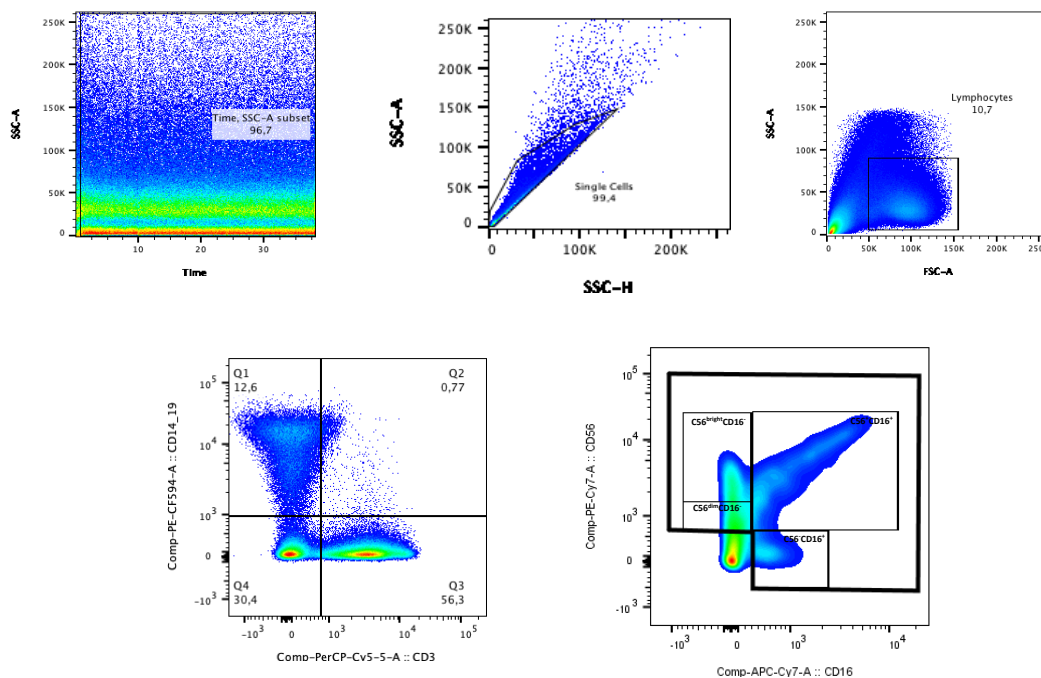


Figura 4 - Estratégia de análise utilizada para separar as subpopulações de NK (\*)

4. (\*) NOTA: Os dados foram analisados em gráficos de *dot plot* baseados nos seguintes parâmetros: A) Time x PE, para checar o *status* do *laser*, Live/Dead, marcador de viabilidade celular, para excluir as células mortas e os marcadores de exclusão; FSC-H x FSC-A, para excluir células duplicadas na aquisição (Singlets); SSC-A x Live/Dead viabilidade celular; SSC-A x CD3, para identificação da população de linfócitos; CD3<sup>-</sup> x CD19<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup>, marcadores de exclusão; CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> x CD56<sup>+</sup>, para identificação da população de NK ; CD56 x CD16 para separação de *gates* CD16<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>, CD16<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>, CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> e CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>

A partir do gate de células NK, com base na densidade do ligante de superfície CD56 e CD16, foram subdivididos em diferentes fenótipos. Os subgrupos formados de células, indicaram diferentes perfis de NK: com atividades citotóxicas, regulatórias ou não funcionais de acordo com (24), como mostrado na figura 5.

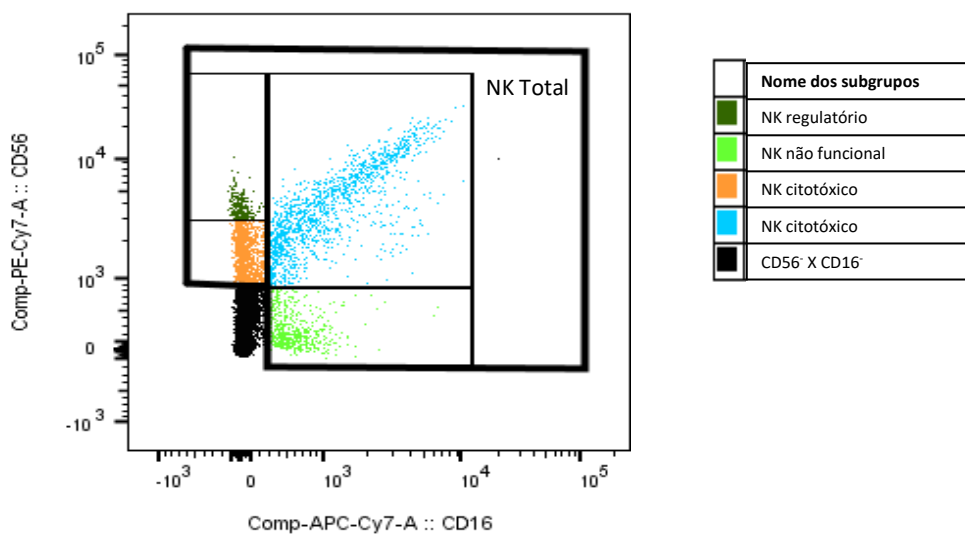


Figura 5 - Subpopulações de células NK definidos a partir da densidade de ligantes CD56 e CD16

A partir do *gate* NK total, foi analisado a quantidade de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-13 produzidas por essas células (Figura 6) .



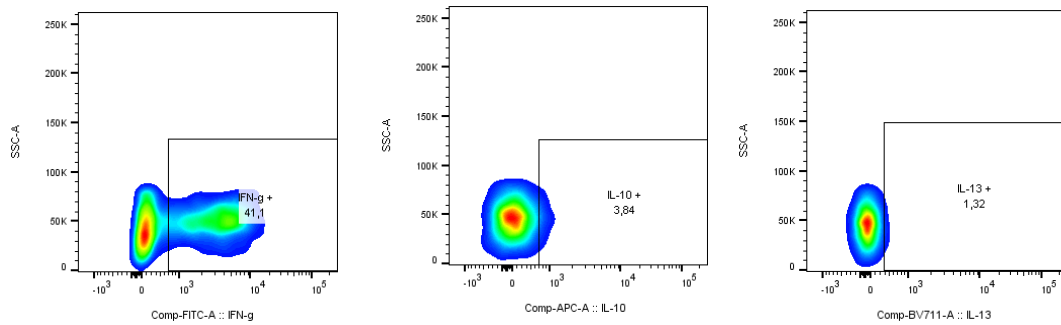


Figura 6 - Detecção intranuclear de citocinas INF- $\gamma$ , IL-10 e IL-13.

### 3.10 Extração e determinação da concentração de RNA total

Primeiramente foi verificado a qualidade do soro, através da avaliação do grau de hemólise das amostras por nanodrop 2000 (nanoDrop. Technologies, Delaware, EUA). Os níveis de hemoglobina livre na amostra de soro foram avaliados e os picos de absorvância em 414 nm foram considerados como indicativos de hemoglobina livre (57). Como os soros com hemólise interferem na detecção de microRNAs, faz-se necessário a verificação prévia.

Após retiradas do freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , as amostras foram mantidas à temperatura ambiente e submetidas à extração de RNA, por meio do kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen, Alemanha), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, 1mL da solução QIAzol foi adicionado a 200 $\mu\text{l}$  de soro, sendo em seguida, homogeneizados vigorosamente em vortex por 15 segundos, e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente para promover a dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Após a incubação, 3 $\mu\text{l}$  do miRNA-39 sintético de *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39; Qiagen, Alemanha) foram adicionados como controle “spike-in”, para normalização dos dados. Em seguida, foram adicionados 200 $\mu\text{l}$  de clorofórmio (Merk, Alemanha), e a amostra homogeneizada, vigorosamente, por 30 segundos, seguidos por 5 minutos de incubação à temperatura ambiente. As amostras foram, então, submetidas à centrifugação sob força de 14.000g a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 20 minutos, para a separação das fases aquosa e orgânica. A fase aquosa foi, então, transferida

para outro microtubo de 1,5ml onde foram adicionados 1,5 volumes de etanol 100% (Merk, Alemanha) para a precipitação do RNA total. A purificação do RNA total extraído foi realizada por meio das colunas miRNeasy (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA final foi eluído das colunas em 14µl de água RNase-free (Qiagen, Alemanha).

Usualmente, a determinação da concentração e qualidade do RNA de uma amostra é mensurada por meio de espectrofotometria ultravioleta (UV). Para a realização do screening em busca do perfil diferencial de microRNAs, nós fizemos, inicialmente, a quantificação de RNA por espectrometria (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Delaware, EUA), com base na relação da absorbância A260nm: A280nm e da leitura a A320nm. As razões de absorbância A260/280 foram utilizadas como critério da qualidade e da pureza das extrações. A razão 260/280 indica, principalmente, a possível contaminação por material proteico, fenol ou outro contaminante, e também informa a boa qualidade da amostra, quando possui resultado em torno de 2,0 (Thermo Scientific – Technical Bulletin). Apesar da boa pureza em nossas amostras, este tipo de método não é adequado para estudos de detecção de miRNAs em biofluidos, por uma série de fatores. Entre eles, está o baixo conteúdo de RNA (e alta concentração de proteínas) no soro e o baixo volume de amostra utilizado para a extração. Somados, estes fatores tornam a quantificação de RNA por espectrofotometria UV extremamente difícil. Nestes casos, é amplamente recomendado o uso de um volume de RNA fixo para todas as amostras ao invés de uma quantidade (ng) como molde para a reação de transcrição reversa. Desta forma, um método alternativo para monitoração das amostras deve ser empregado. Tratando-se de soro ou plasma, o uso de miRNAs sintéticos (spike-in) é um dos métodos mais aceitos para monitorar a eficiência da extração de RNA, síntese de cDNA (pela técnica de transcrição reversa) e amplificação por PCR (58). Assim, foi empregado, neste estudo, o uso de uma quantidade conhecida do miRNA sintético Cel-miR- 39 (Qiagen).

#### **4.10. Avaliação dos perfis de microRNAs**

Para a realização da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

é necessário que os RNAs extraídos das amostras sejam convertidos em DNA complementar (cDNA), por meio da reação de transcrição reversa. Os primers Megaplex™ RT foram utilizados para a síntese de cDNA. Os primers Megaplex™ RT contam com dois pools de primers para microRNAs humanos, o pool A e o pool B, cada um destinado para a transcrição reversa dos microRNAs contidos nas placas de PCR array TaqMan® low-density array (TLDA) A e B. A reação foi montada de acordo com a recomendação do fabricante: 0,8 µl de Megaplex™ RT Primers (10x), 0,2 dNTPs com dTTP (100mM), 1,5µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µl), 0,8 µl 10x RT Buffer, 0,9 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,1 µl RNase Inhibitor (20U/µl), 0,2µl água livre de Nuclease. Ao material da reação com de 4,5 µl, foram acrescentados 3 µl de RNA total, contendo 500ng, totalizando o volume de 7,5 µl de reação. Os tubos foram colocados no termociclador (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com velocidade máxima de rampa, e com o seguinte protocolo de ciclos: 40 ciclos de 16°C por 2 minutos, 1 minuto a 42°C, 1 segundo a 50°C e 1 ciclo de 85°C por 5 minutos, essas diferentes temperaturas são importantes nos processos de anelamento, extensão e polimerização. As amostras ficaram a 4°C até serem retiradas do equipamento e armazenadas a -80°C. Como trabalhamos com soro, foi necessário realizar a técnica de pré-amplificação, para aumentar a quantidade de cDNA e para melhorar a sensibilidade da reação TaqMan® qPCR. Usamos um Kit contendo, TaqMan PreAmp Master Mix (2x); Megaplex PreAmp Primers (10x) e água livre de nucleases. Nós utilizamos 22,5µl da reação de PreAmp nos tubos contendo o produto de RT (2,5µl). A pré-amplificação seguiu como seguinte protocolo de ciclos: 10 minutos a 95°C, 2 min a 55 ° C, 2 min a 72 ° C, seguido de 12 ciclos de 15 s a 95 ° C, 10 min a 99,9 ° C e 4 min a 60 ° C.

As diferenças de expressão dos miRNAs foram avaliadas no software de análise Expression Suite (Applied Biosystems – Thermo). Os miRNAs foram considerados diferencialmente expressos quando o fold change >2 e p<0,05.

#### **4.11 Análise Estatística**

Os testes estatísticos utilizados serão obtidos através do programa Prisma 6.

A correlação da diferença da expressão nos períodos dia D, pós 6 e 12 meses com o período pré-tratamento entre as populações de células analisadas será obtida por meio do Teste T pareado.

A diferença estatística será considerada significativa a partir do valor de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Coorte

Os pacientes recrutados para o estudo, são crianças com idades entre 4 a 17 anos, acompanhados por até 1 ano após tratamento de dessensibilização. O tempo de tratamento varia entre os pacientes, alguns têm alta em torno de 4 meses outros têm a duração de até 10 meses (Tabela 4). Até o momento foram incluídos 19 pacientes no estudo, sendo:

- 6 tolerantes espontâneos;
- 1 sensibilizado sem sintomas clínicos;
- 18 pacientes foram incluídos no protocolo de Indução de Tolerância Oral (ITO).

A figura 4 a seguir ilustra como é feita a realização do tratamento IDO.

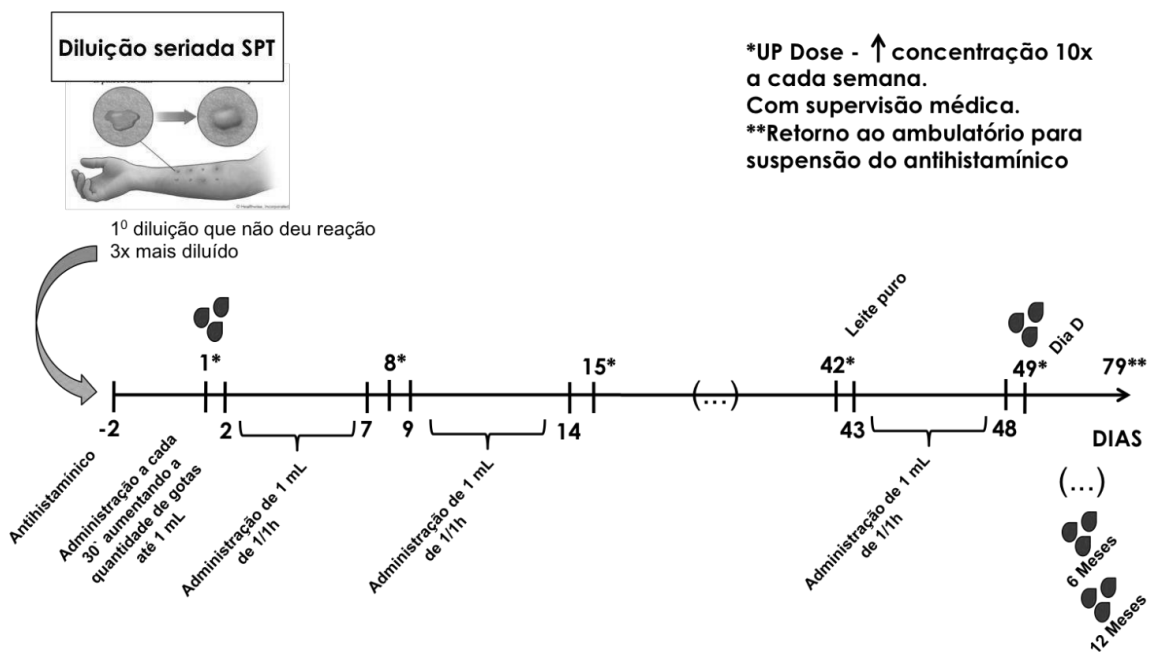


Figura 7 - Tratamento IDO

Tabela 6 – Dados epidemiológicos dos indivíduos incluídos

<b>Pacientes ITO</b>			
<b>Nº do paciente</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tempo de tratamento</b>
1 - GV		M	
2 - DML		F	
3 - GFA		M	
4 - ISF		F	
5 - MCS		M	
6 - VD		M	
7 - RMRM	6	M	5
8 - GGOB	12	F	5
9 - RXB	4	M	5
10 - CRF	7	F	4
11 - RBF	12	F	10
12 - LSN	17	M	8
13 - TSS	15	M	4
14 - AEV	11	M	4
15 - BVFSC	6	F	4
16 - AVR	6	F	6
17 - ICMF	14	F	6
18 - MBM	3	F	6
<b>Pacientes tolerantes espontâneos</b>			
<b>Nº do paciente</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	
19 - YSR	9	F	
20 - VCO	5	M	
21 - AFT	5	M	
22 - LLS	8	F	
23 - GCN	9	F	
24 - AS	3	F	
<b>Pacientes sensibilizados sem sintomas</b>			
<b>Nº do paciente</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	
25 - ISO	6	M	

As amostras foram distribuídas nos diferentes testes realizados de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 5.

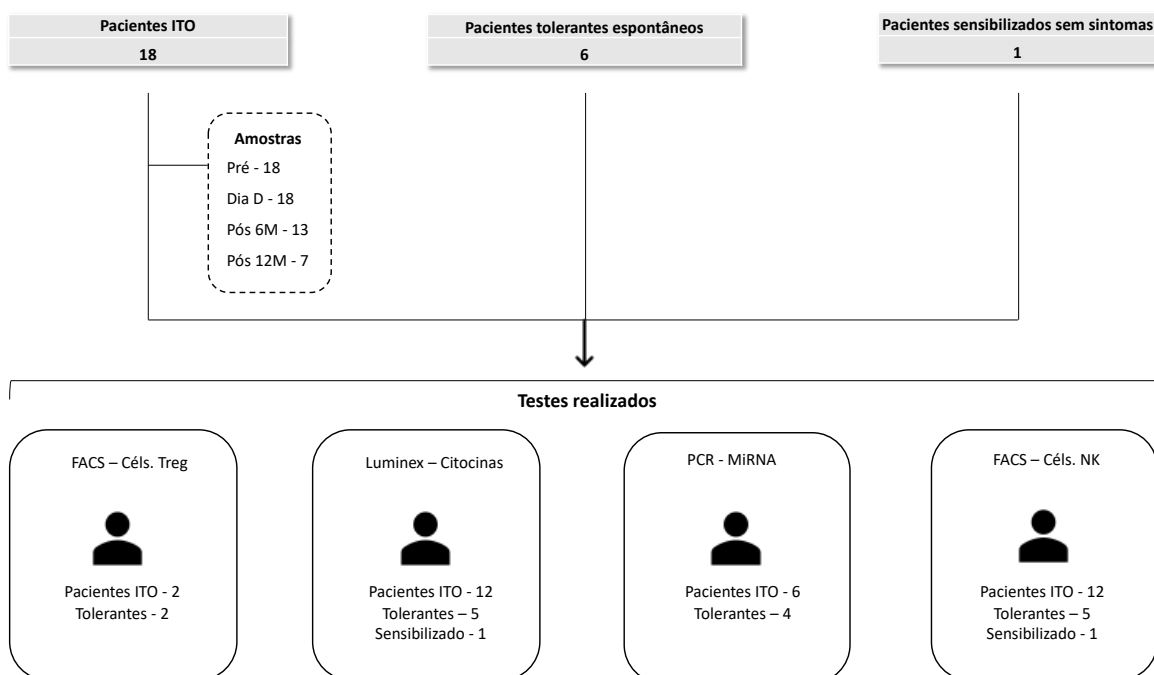


Figura 8 - Abordagem utilizada no presente estudo para diagnóstico e proposta de testes e divisão dos grupos.

## 5.2 Padronização da Cultura

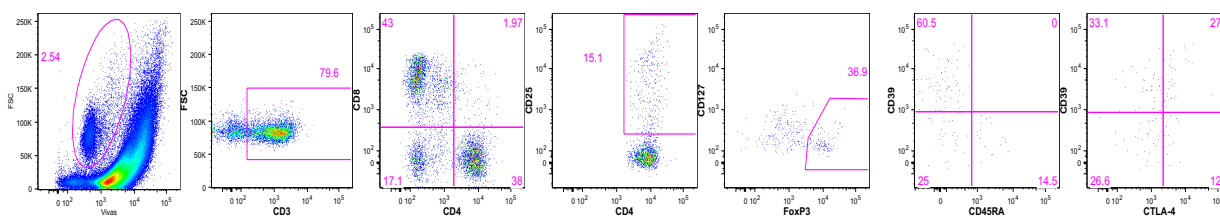
O desenho do painel de citometria para fenotipagem das populações estudadas, foi feito a partir do levantamento de dados da literatura. Antes da aquisição dos anticorpos, foram feitos testes com os anticorpos utilizando amostras de adultos alérgicos e crianças alérgicas que foram excluídas do estudo. Foram feitas comparações entre marcações em condições similares ao do trabalho, pós cultura com os alérgenos específicos, descongelando as células para a marcação ou até mesmo marcando em amostras frescas, ambos sem fazer a cultura (dados não apresentados). Essa etapa foi importante para que fosse verificado qual o melhor procedimento a ser adotado nos testes e se com estimulação em cultura, teria um diferencial sobre os resultados.

Para a padronização da cultura, foram realizados testes com diferentes tempos e concentrações de estímulos para verificar a viabilidade celular e citotoxicidade, nessa etapa as células foram estimuladas com leite desnatado comercial Molico.

Foram avaliados períodos de incubação de 48, 72 e 96 horas. Foi verificado que a viabilidade celular diminuía conforme o aumento de dias de incubação, porém quanto a concentração, foi escolhido para o teste 120 µg/ml porque foi verificado uma porcentagem de viabilidade celular muito próxima das outras concentrações.

Buscando na literatura foi verificado que as células T reguladoras, se expandiam em ensaios com tempos de culturas superiores a 7 dias (59). Como o objetivo do trabalho é verificar a porcentagem e produção de citocinas dessas células, foi avaliado o ensaio de cultura 7 ou 8 dias de incubação com estímulos. Foi verificado no ensaio de 8 dias uma viabilidade menor de células, diante disso, foi acrescentada IL-2 na cultura da amostra PRE, na tentativa de otimizar e garantir a viabilidade das células Tregs do ensaio (Figura 6). Foi verificado que a utilização foi importante para expansão/manutenção das células durante o ensaio.

#### A. Quantidade de células adquiridas no poço PRE LP=290719



#### B. Quantidade de células adquiridas no poço PRE LP+IL-2=393718

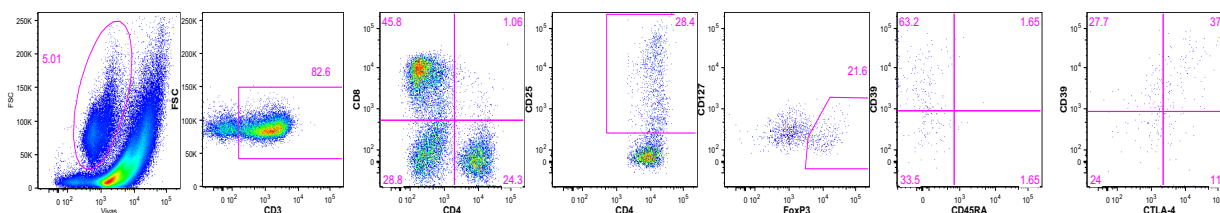


Figura 9 - (6A) Teste de cultura utilizando leite puro sem IL-2 (6B) Teste de cultura utilizando IL-2

Além do estímulo com leite foi feito um estímulo com o mix de caseína,  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina que são as proteínas mais alergênicas do leite.



Comparando a cultura para avaliar qual seria o melhor estímulo a ser utilizado, foi verificado que quando utilizado o leite puro resultava em menos mortes celulares que quando utilizado o mix de proteínas (Figura 7).

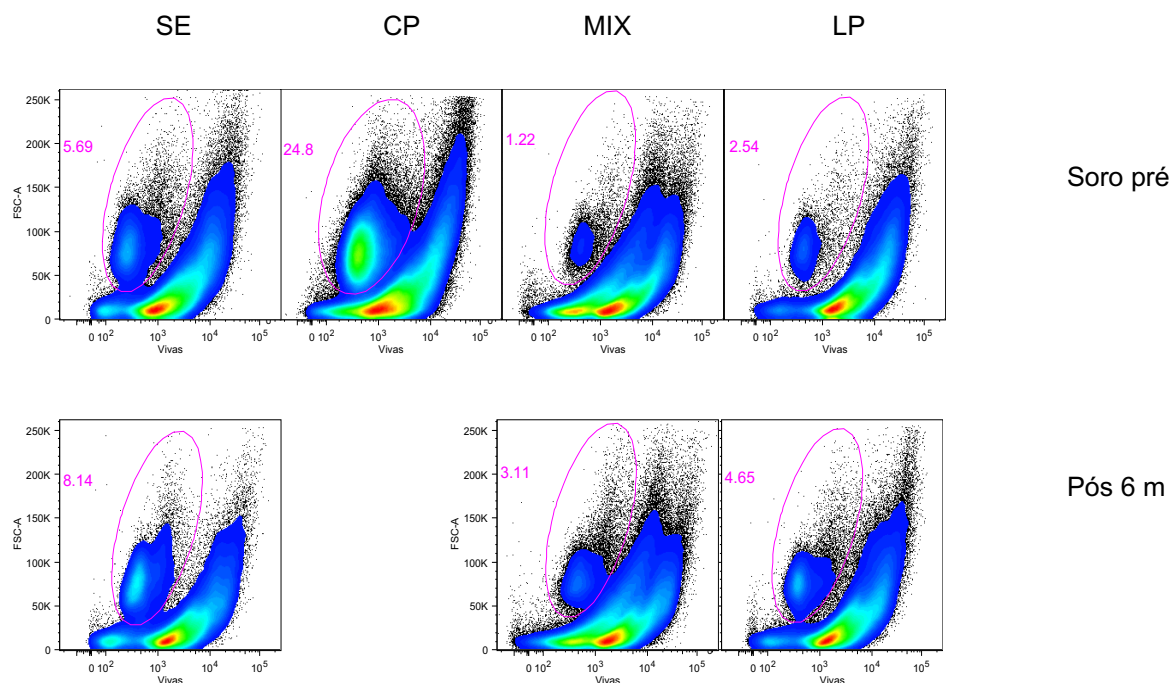


Figura 10 - Viabilidade celular comparando estímulo leite puro (120  $\mu$ g/ml) versus mix de proteínas (120  $\mu$ g/ml) em 8 dias de cultura em amostra pré e pós 6 meses da ITO.

### 5.3 Titulação de Anticorpos

Os anticorpos selecionados para compor os painéis de citometria de fluxo, não estavam titulados ainda. Dessa forma, esses anticorpos foram titulados utilizando alguns anticorpos já titulados, disponibilizados gentilmente pelo grupo do Prof. Esper Kallas. Esses foram usados como controle para as titulações dos novos adquiridos.

A Figura 8 mostra a estratégia utilizada na titulação e a Tabela 5 mostra a titulação final desses anticorpos.

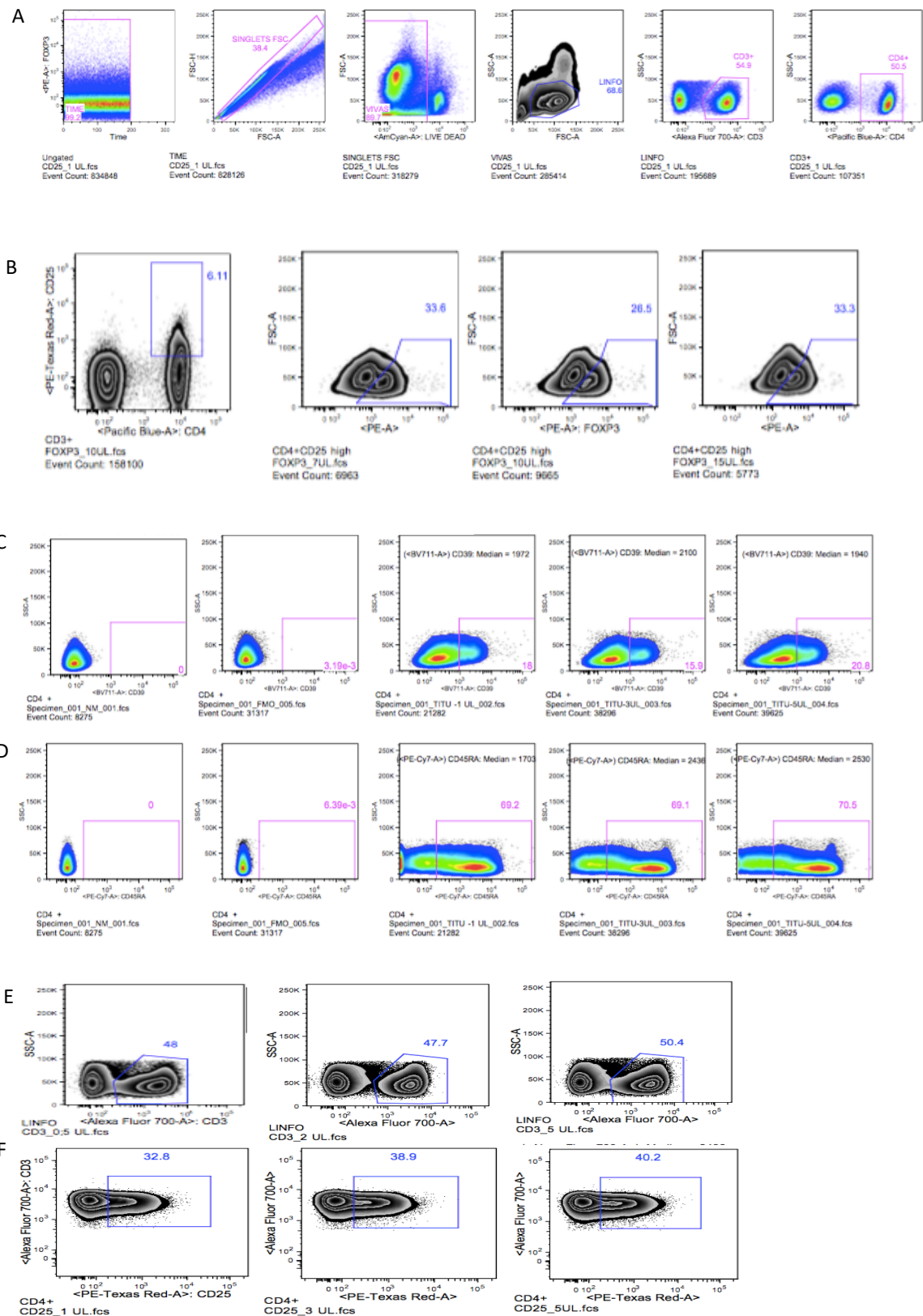


Figura 11 – Estratégia de análise para titulação dos anticorpos (\*).

(\*) NOTA: A) ESTRATEGIA DE ANALISE: Time x PE, para checar o *status* do *laser*; Live/Dead, marcador de viabilidade celular, para excluir as células mortas; FSC-H x FSC-A, para excluir células duplicadas na aquisição (Singlets); FSC-A x SSC-A para identificação da população de linfócitos; em B) TITULAÇÃO DO FOXP3: na população de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> nos seguintes volumes de FOXP3 – 7 µL, 10 µL, 15 µL em C) TITULAÇÃO DO CD39: na população de CD4<sup>+</sup> nos seguintes volumes de CD39 - 1 µL, 3 µL, 5 µL em D) TITULAÇÃO DO CD45RA: na população de CD4<sup>+</sup> nos seguintes volumes de CD39 - 1 µL, 3 µL, 5 µL em E) TITULAÇÃO DO CD3: nos seguintes volumes de 0,5 µL, , 2 µL, 5 µL em F) TITULAÇÃO DO CD25: na população CD3 x CD4<sup>+</sup> nos seguintes volumes de CD25 - 1 µL, 3 µL, 5 µL.

Tabela 7 - Volume final a ser utilizado em cada condição experimental para os anticorpos titulados

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Volume (µl)</b>
<b>CD3</b>	UCHTI	ALEXA 700	0.5
<b>CD4</b>	RPA-T4	BV421	<b>3</b>
<b>CD8</b>	SK1	APC-H7	4
<b>CD25</b>	M-A251	PE-CF594 (Texas Red)	3
<b>CD39</b>	TU66	BV711	2
<b>CD45-RA</b>	HI100	PECY7	2
<b>CD127</b>	HIL-7R-M21	FITC	4
<b>FOXP3</b>	259D/C7	PE	10
<b>CTLA-4</b>	BNI3	APC	15
<b>Live/Dead</b>		AARD-7	0.4

#### **5.4 Comparação do perfil de Treg dos alérgicos versus tolerantes**

Para testar os parâmetros selecionados até aqui e verificar se seria melhor utilizar como estímulo leite total ou mix de alérgenos, foi realizado um experimento com células de dois pacientes alérgicos nos diferentes tempos de tratamento (pré, dia D, pós 6 meses e pós 1 ano) comparados a dois tolerantes espontâneos em relação à produção de células Treg. Foi realizada cultura de 8 dias e os anticorpos para marcação na titulação realizada (Figura 9) (Apêndice 1). Este experimento, entretanto, foi inconclusivo. Eram 2 pacientes alérgicos e apresentaram respostas opostas. O controle positivo, PHA também não foi um

bom controle e não será utilizado nos próximos experimentos. O controle negativo parece ser suficiente para o experimento.

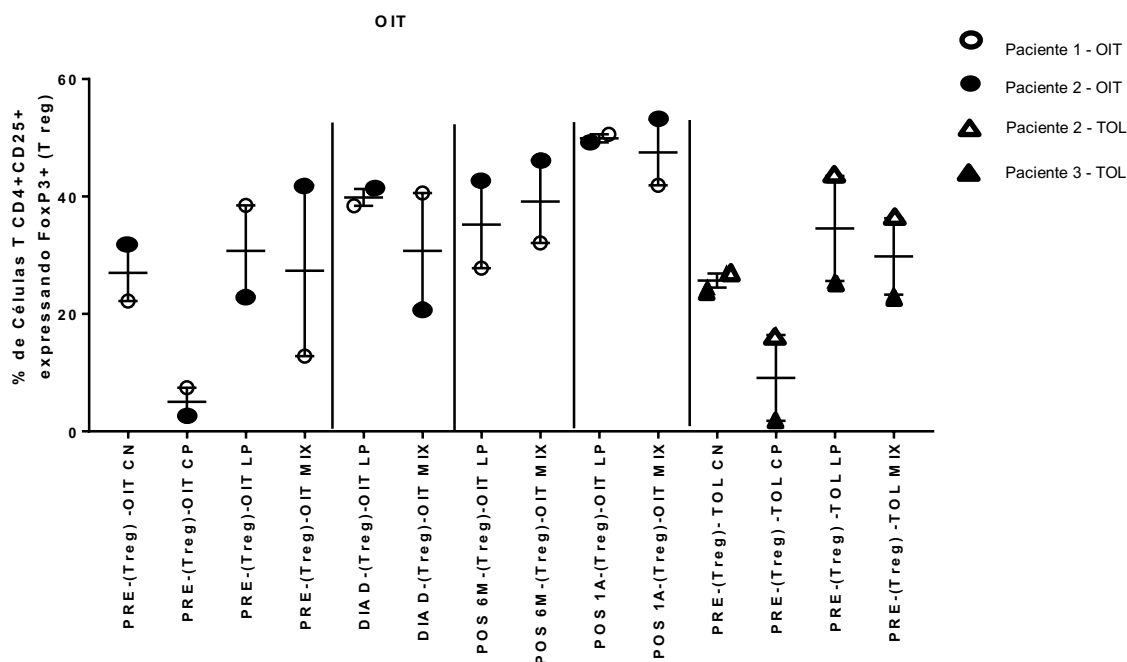


Figura 12 - Produção de células Treg nos diferentes tempos de tratamento e em pacientes tolerantes

Ao analisar individualmente o alérgico 1 comparando ao tolerante 1 considerando leite total verifica-se um aumento da frequência de Treg CD4+ CD25+ FOXP3+ após a cultura de células do paciente pós 1 ano de tratamento de dessensibilização oral quando comparado com os tempos pré, dia D e pós 6 meses. Quando comparado com a frequência de Treg CD4+ CD25+ FOXP3+ entre pacientes (tratado x tolerante), foi verificado que o paciente em tratamento apresentou uma porcentagem maior que a encontrada no paciente tolerante espontâneo (Figura 10).

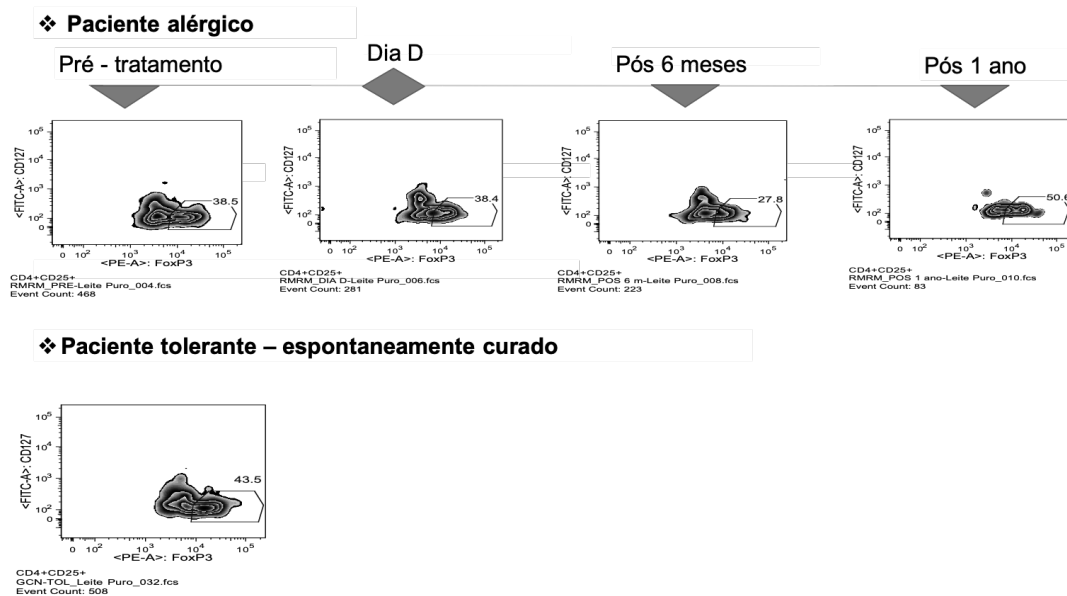


Figura 10. Produção de células Treg específicas de paciente alérgico e tolerante após estímulo com leite desnatado.

Diante das dificuldades encontradas na padronização do teste, foi verificado que seria necessária uma quantidade maior de amostras para validação dos experimentos. Devido essa limitação, foi decidido que seriam feitas investigações de outras células e citocinas, potenciais influenciadores do perfil imunológico, que o protocolo contemplasse a quantidade de CMSP armazenada.

## 5.5 Avaliação do perfil de citocinas

A circulação 25 citocinas foi verificada no plasma ou soro dos pacientes com amostras coletadas. A análise macro de todas as citocinas detectadas encontra-se na figura 10. A avaliação da quantidade circulante de cada uma das citocinas analisadas e comparadas aplicando-se teste-T não pareado mostrou que houve aumento na produção de IL-10, IL-12P70 e IL-1beta após 12 meses de tratamento, mas não em relação ao grupo tolerante e aumento da produção de IL-21 ao longo do tratamento e quando comparado o grupo antes do tratamento com o grupo tolerante. A citocina IL17F foi *borderline* com  $p=0,05$  entre os tempos PRE e PÓS 6M (Fig. 11). As avaliações individuais encontram-se nas figuras 12, 13 e 14.

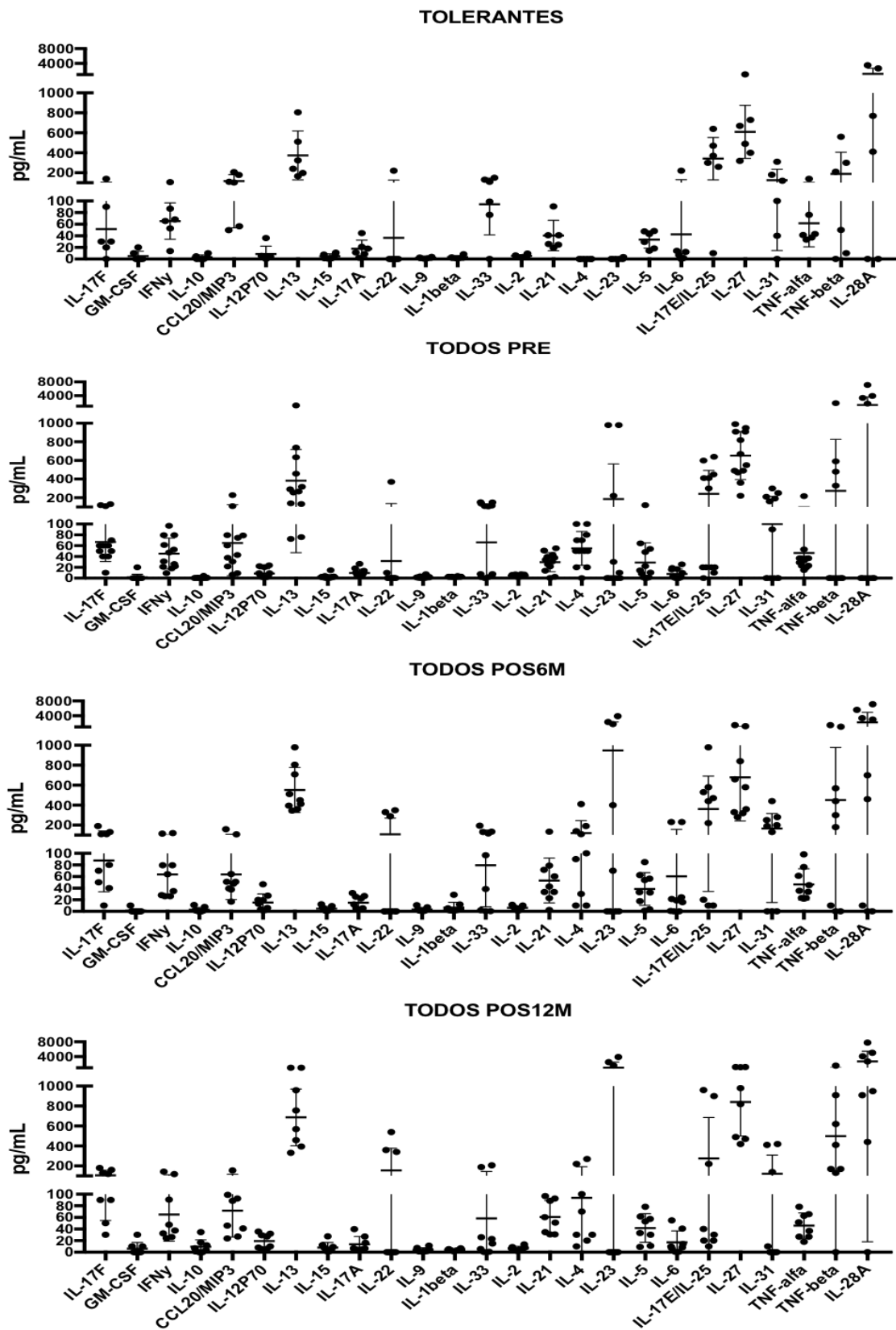


Figura 13 - Análise da quantidade de citocinas circulantes em cada grupo de estudo.

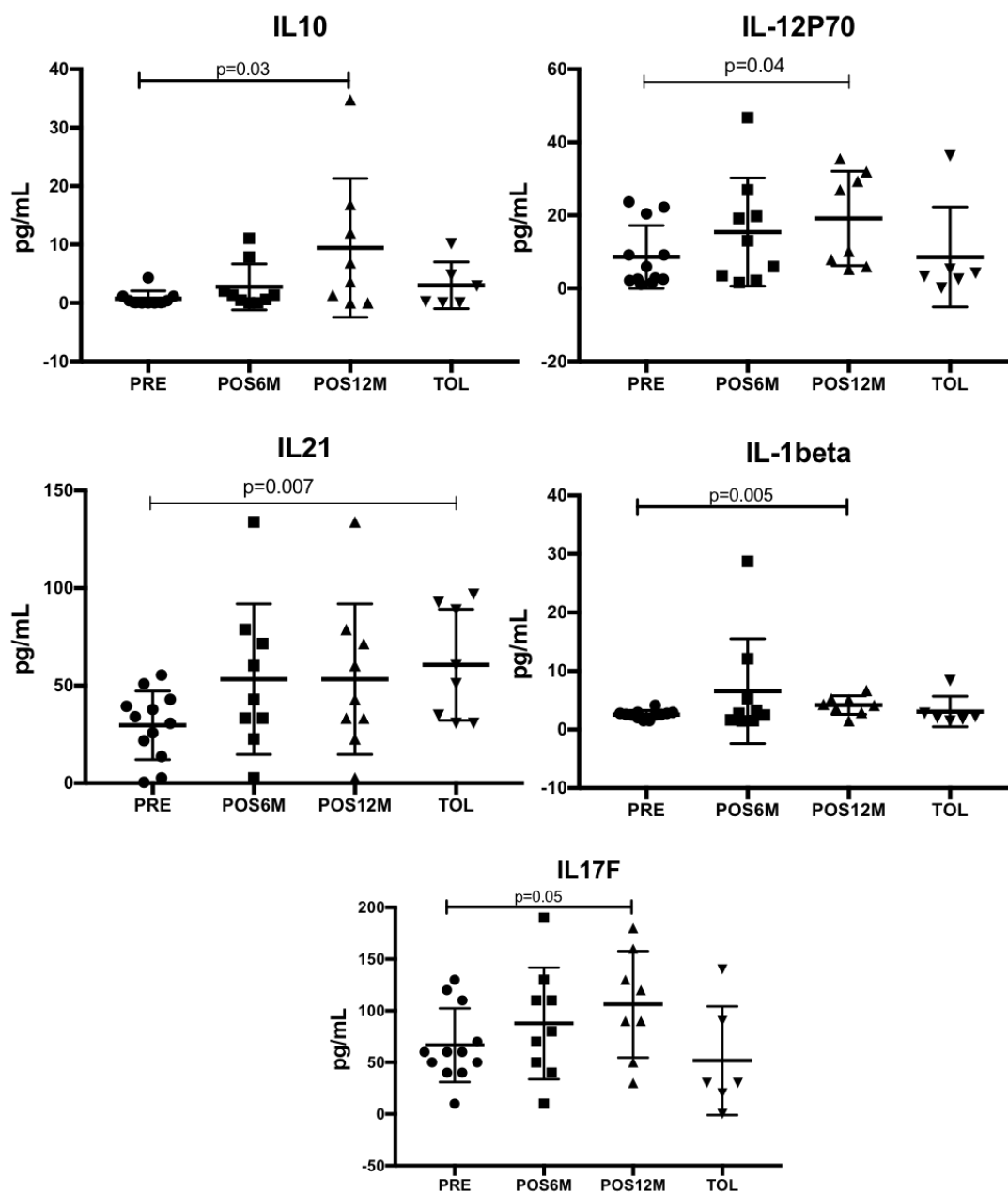


Figura 14 - Citocina IL17F foi borderline com  $p=0,05$  entre os tempos PRE e POS6M

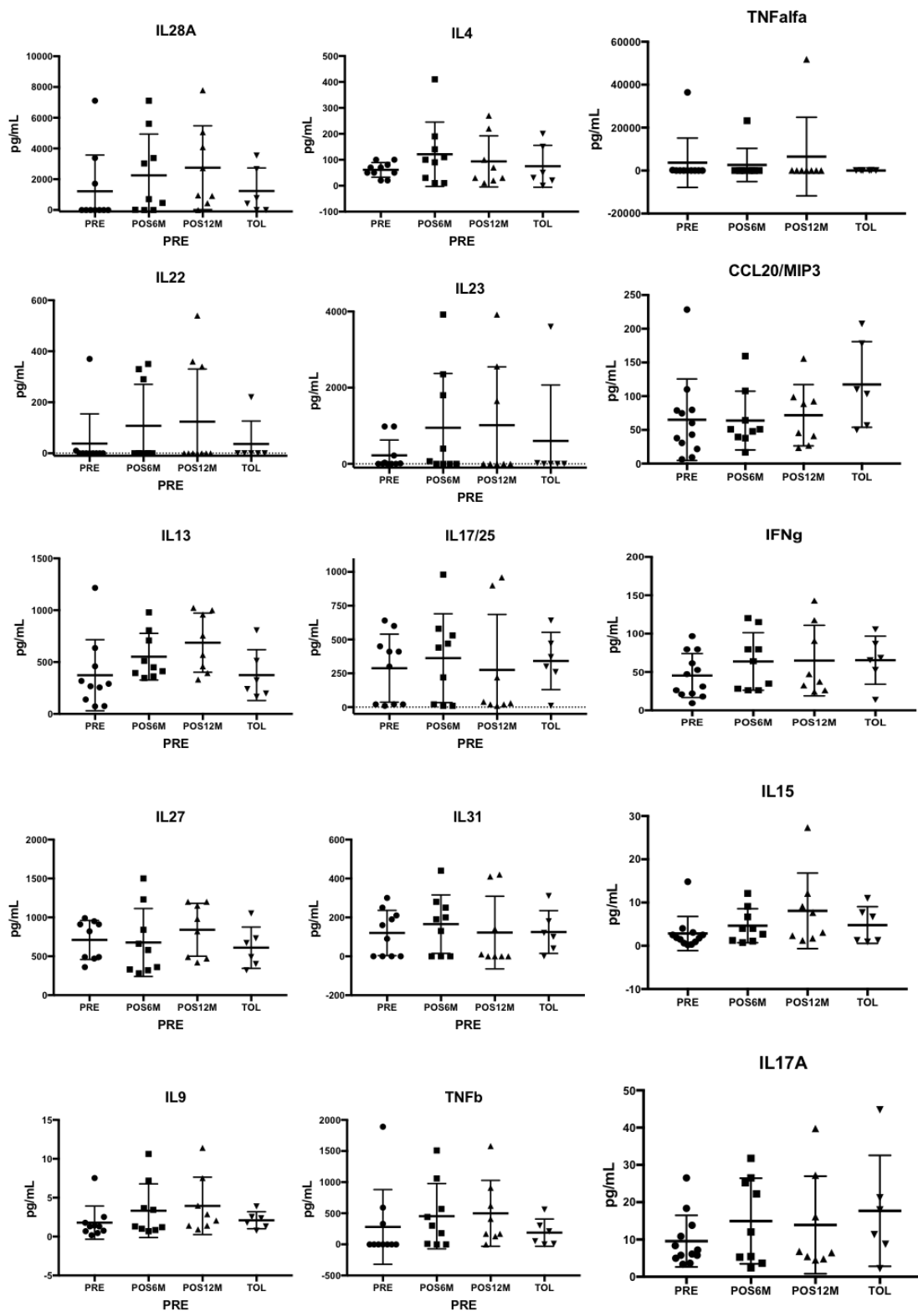


Figura 15 - Avaliações individuais I



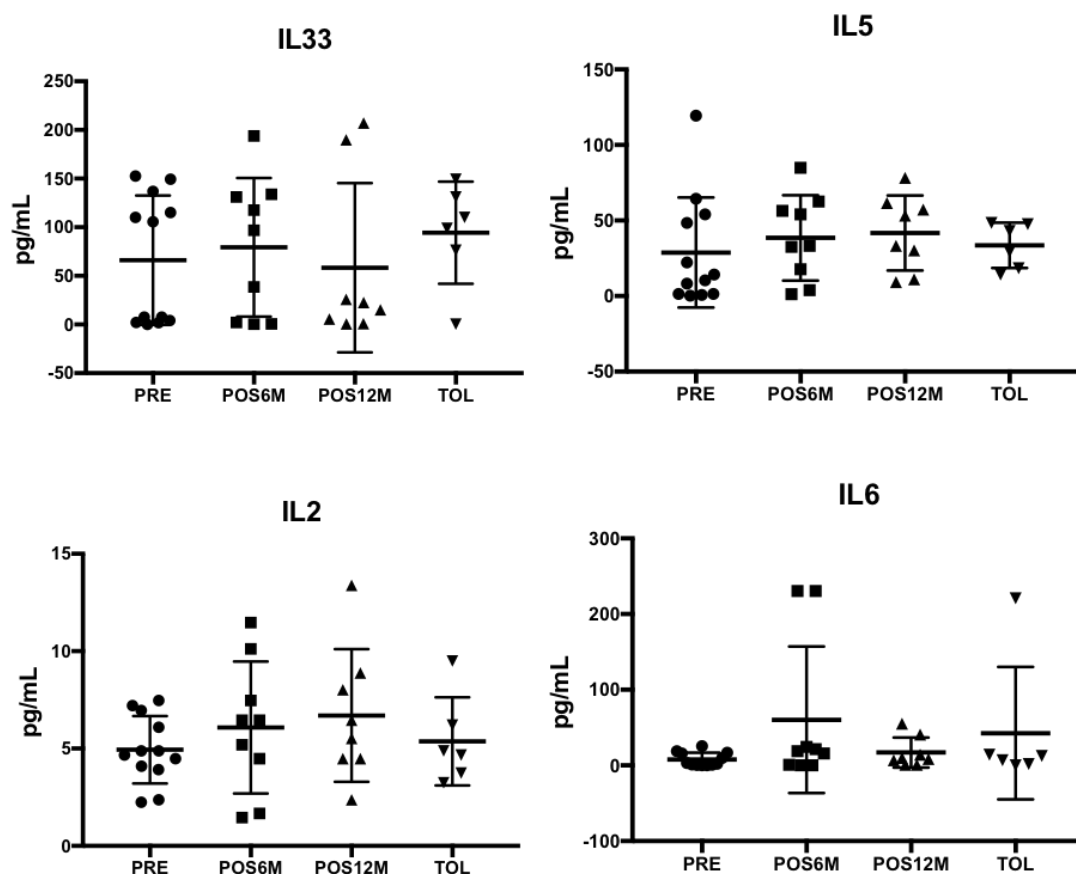


Figura 16 - Avaliações individuais II

### 5.6 Avaliação frequência e perfil de células NK

Para avaliação da frequência de células NK, foram incluídas as seguintes amostras de CPMN:

- 09 pacientes alérgicos pré-tratamento e dia D, sendo 7 desses com amostras pós 6 meses e 4 com amostras pós 1 ano de tratamento;
- 05 pacientes tolerantes espontâneos;
- 01 paciente sensibilizado sem sintoma.

Os resultados demonstraram que, dentro da população total de NK, houve a prevalência de células citotóxicas comparado a população reguladora. As células NK totais parecem aumentar a frequência para depois cair durante o tratamento, com diferença significativa PRÉ e pós 12M de tratamento, mas não em relação ao grupo tolerante.

Foi observado que houve um aumento gradativo de porcentagem das células citotóxicas ao longo do tratamento, primeiramente diminuindo no dia D e aumentando pós 6 e 12 meses, com diferença significativa PRÉ e pós 12M.

Foi verificado que as células NK parecem não contribuir para o perfil regulador durante o tratamento de dessensibilização oral (Figura 15).

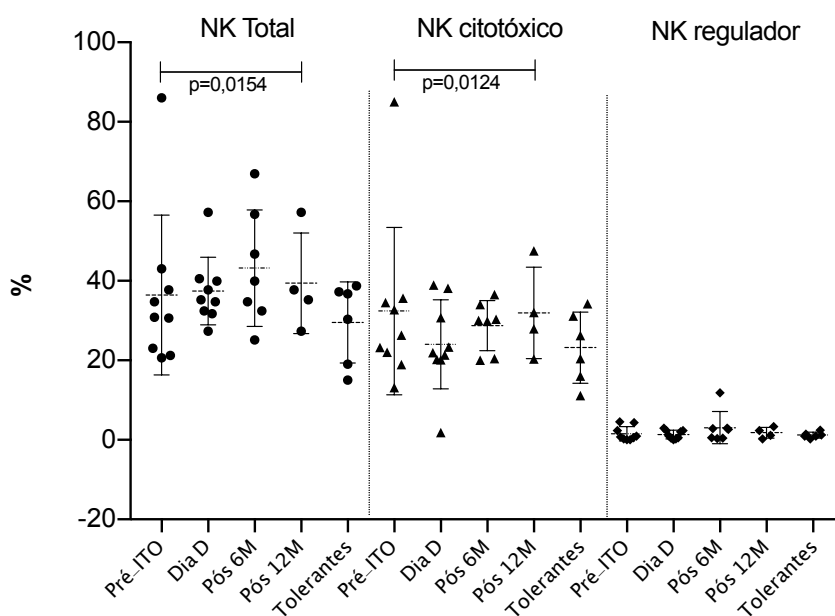


Figura 17 - Análise da porcentagem de células NK circulantes em cada grupo de estudo.

As citocinas IFN- $\gamma$ , IL-13 e IL-10, foram avaliadas a partir da população de NK total. Dessas foi verificado que a maior porcentagem de produção era da citocina IFN- $\gamma$ , com queda de produção significativa no dia D quando comparado a amostra PRÉ. Foi verificado o aumento gradativo dessa citocina durante o tratamento, apesar de não ter conferido significância, o gráfico mostra uma tendência.

A citocina IL-10, apesar de ter produção, se mantém nas mesmas proporções nos diferentes grupos. Houve uma porcentagem muito baixa de células NK produtoras de IL-13 (Figura 16).

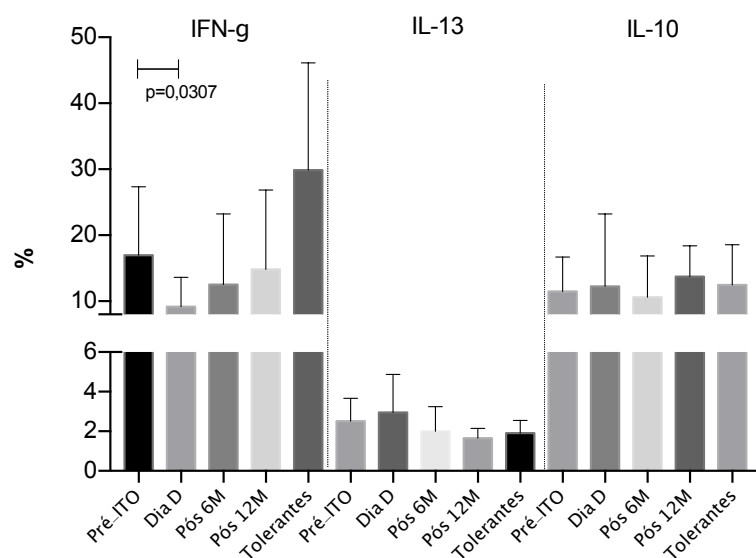


Figura 18 - Análise da porcentagem de células NK secretoras de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-13 e IL-10.

### 5.7 Avaliação do perfil de miRNA

Foram incluídas amostras de soro de:

- 06 pacientes alérgicos pré-tratamento e pós 6 meses, sendo 3 destes com amostras pós 1 ano de tratamento.
- 04 pacientes tolerantes espontâneos

As análises para comparação entre grupos foram feitas como elucidados no esquema a seguir (Figura 17):

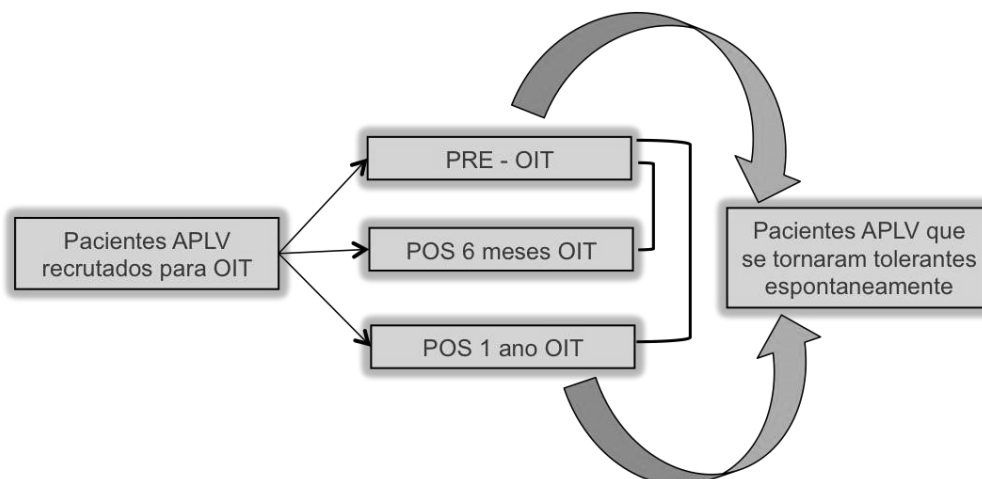


Figura 19 – Delineamento experimental para as análises de miRNA

As diferenças de expressão dos miRNAs foram avaliadas no software de análise Expression Suite (Applied Biosystems – Thermo). Os miRNAs foram considerados diferencialmente expressos quando o fold change >2 e  $p < 0,05$ .

Quando comparados Grupo Pré-tratamento vs Grupo Tolerantes espontâneos foram observados 12 miRNAs up-regulated e 1 down-regulated. Os miRNAs com \* são aqueles que também se encontram diferencialmente expressos nos outros grupos (Figura 18).

Tabela 8 - Expressão dos miRNAs comparando-se os Grupos Pré-tratamento versus Tolerante

<b>UP – regulated</b> (fold change)	*1274a (9,78)	*302a (8,69)	627 (9,61)	766 (7,38)
	*1274b (82,545)	*483-5p (7,00)	605 (7,87)	346 (13,48)
	*1262 (17,27)	*99b (4,69)	720 (10,28)	1290 (9,43)
<b>DOWN - regulated</b>	**520a (0,209)			

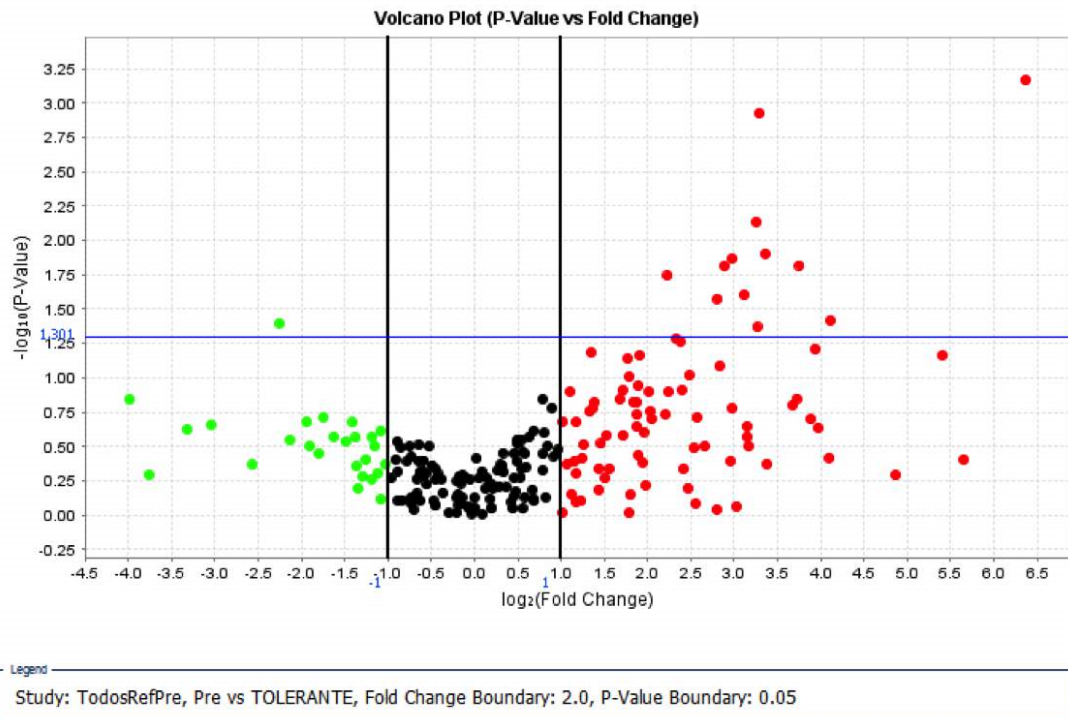


Figura 20 - Volcano Plot - Grupo pré-tratamento versus tolerante espontâneo

Quando comparados Grupo Tolerantes espontâneos vs Grupo Pós 6 meses de tratamento foram observados 12 miRNAs *up-regulated*.

Tabela 9 - Expressão de miRNAs comparando os grupos tolerantes versus pós 6 meses de tratamento.

<b>UP – regulated</b> (fold change)	*1274a (9,78)	*302a (8,69)	106b (3,79)	92a (5,75)
	*1274b (82,545)	*483-5p (7,00)	425-5p (8,36)	194 (5,54)
	*1262 (17,27)	*99b (4,69)	375 (7,24)	660 (4,34)

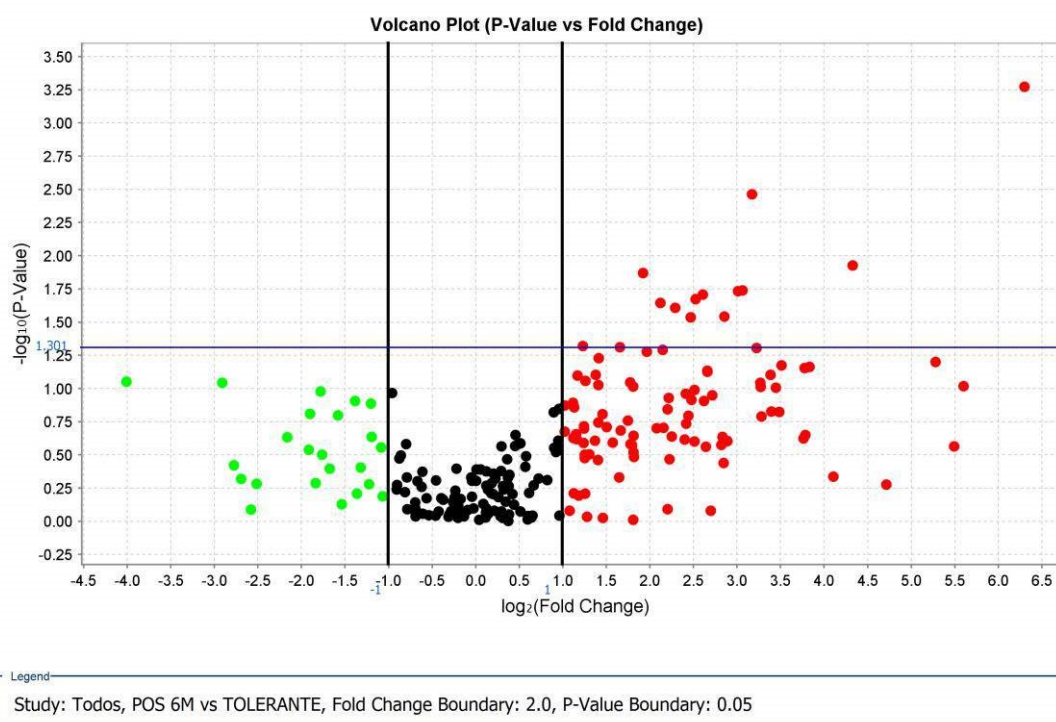
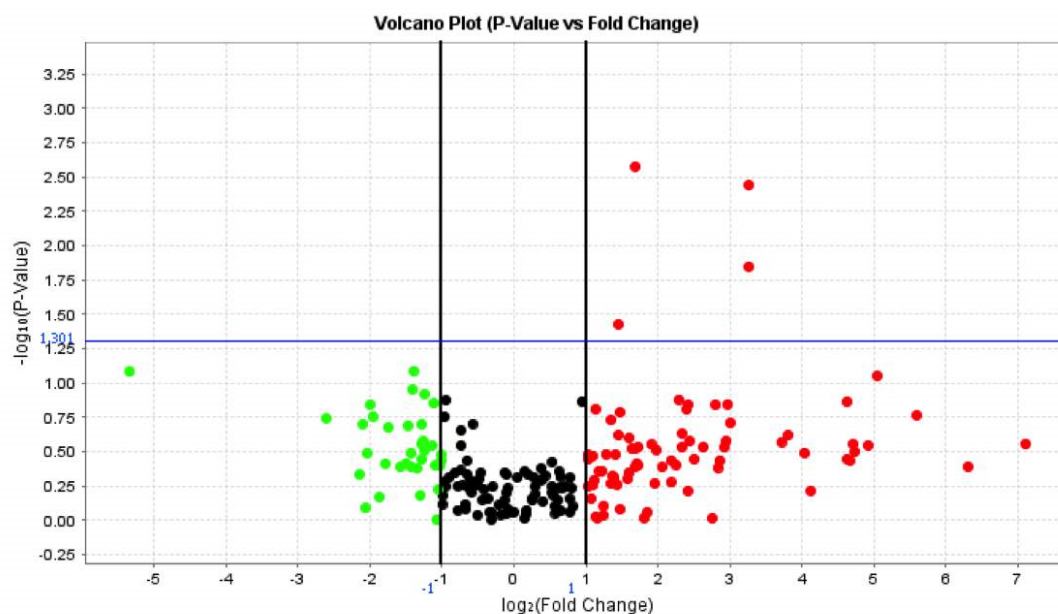


Figura 21 - Expressão de miRNAs comparando os grupos tolerantes versus pós 6 meses de tratamento.

Já ao compararmos Grupo Tolerantes espontâneos vs Grupo Pós 12 meses de tratamento foram observados apenas 4 miRNAs *up-regulated*.

Tabela 10 - Expressão de miRNAs comparando os grupos tolerantes versus pós 12 meses de tratamento.

<b>UP – regulated</b> (fold change)	**520a (3,28)	*302a (9,60)	432# (9,60)	548c (2,72)
--	---------------	--------------	-------------	-------------



Legend  
Study: TodosRefPre, POS 1 ANO vs TOLERANTE, Fold Change Boundary: 2.0, P-Value Boundary: 0.05

Figura 22 – Expressão de miRNAs comparando os grupos tolerantes versus pós 12 meses de tratamento

Os miRNAs diferencialmente expressos estão sendo utilizados para análise de vias de sinalização através do software de análise IPA – Ingenuity Pathway Analysis. Essa busca leva tempo até chegar ao refinamento para

verificar em que alvos gênicos estes miRNAs estariam atuando. Até o presente momento temos que para os 27 miRNAs alterados foram encontrados 3286 genes alvo (*experimentally observed* ou *high predicted*). Várias vias de sinalização podem ser afetadas seja por ativação ou inibição.

Das buscas realizadas até o momento mostrou-se interessante a via de sinalização da IL-4 – fator chave para o *switch* de resposta Th2. A figura a seguir mostra que os miRNAs 520a-5p e 548-5p, que se encontram aumentados nos pacientes pós 12 meses de tratamento, inibem a via de sinalização da produção de IL-4. Esses resultados mostram-se bastante promissores e a validação da expressão deste miRNA por PCR em tempo real de outras amostras de pacientes alérgicos pré e pós tratamento irá mostrar se esse aumento de expressão é reprodutível em um n maior.

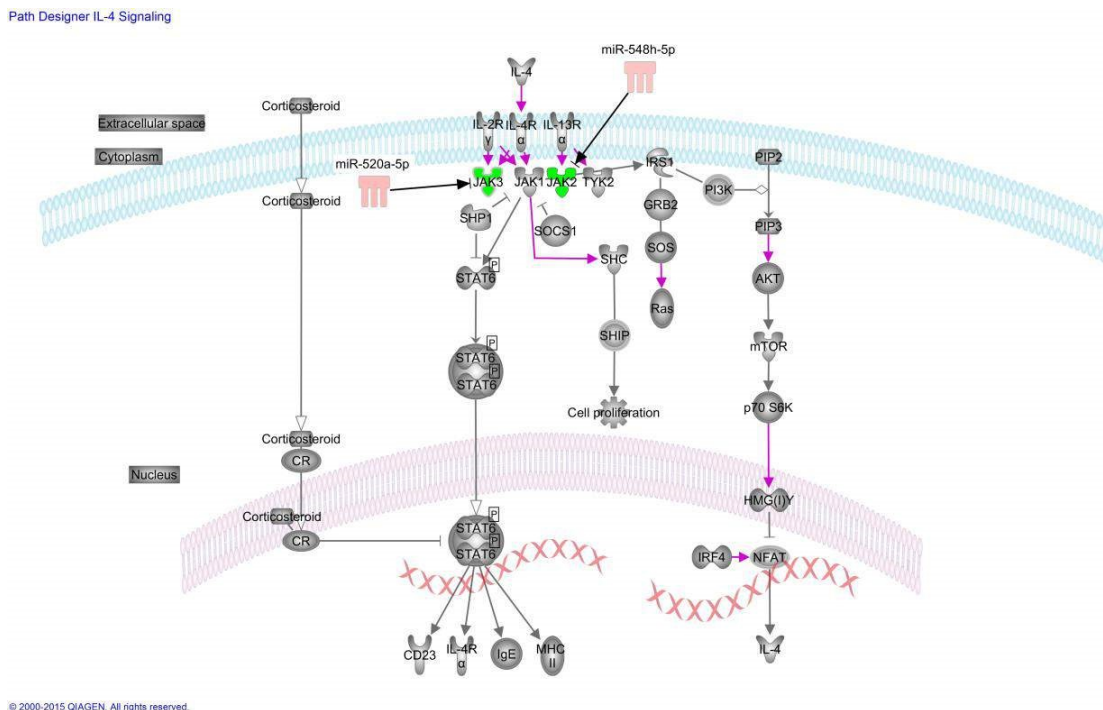


Figura 23 - Via de sinalização proposta pelo software Ingenuity Patway Analysis envolvendo o miRNA diferencialmente expresso miR520-5p.



Também foi feita a comparação utilizando o grupo Pré-tratamento comparado aos grupos Pós tratamento 6 e 12 meses. O teste-t pareado mostrou que existe diferença de expressão quando comparados os grupos sendo:

- Pré vs Pós 12 meses  $p < 1.18706E-34$  x
- Pré vs Pós 12 meses  $p = 0$
- Pós 6 meses vs Pós 12 meses  $p < 0.036693428$

Estes resultados indicam que há diferença já a partir de 6 meses de tratamento e que a maior diferença entre os grupos ocorre após 12 meses de tratamento, quando comparado com o grupo pré-tratamento conforme esperado.

## 6. DISCUSSÃO

A busca de uma melhor compreensão dos principais mecanismos imunológicos envolvidos nas respostas alergias, pode ser vital para o aprimoramento e desenvolvimento de novas terapias.

Os protocolos de dessensibilização são diversos e, mesmo com um determinado protocolo, o ritmo de aumento da dose do alérgeno varia consideravelmente entre os pacientes, devido a reações alérgicas imprevisíveis, o que confunde a análise dos mecanismos que medeiam a dessensibilização oral. O tratamento pode variar de 4 meses a 1 ano, dependendo do paciente, isso ocorre pelo fato dos mecanismos de dessensibilização oral em pacientes com alergia alimentar serem mal compreendidos (60).

Esta trabalho tenta entender o porquê e como os mecanismos imunológicos estão relacionados ao melhor ou pior prognóstico do paciente durante a terapia de dessensibilização oral, investigando como se comportam imunologicamente os alérgicos durante o tratamento, nos períodos pré, dia D (dia que é consumido o alérgeno sem diluição) pós 6 e 12 meses de tratamento além de compará-los com pacientes tolerantes espontâneos e pacientes sensibilizados não-responsivos.

São levantados três principais mecanismos imunológicos importantes amplamente pesquisados: a dessensibilização oral, a sensibilização a alérgenos, a "tolerância não responsiva" e a reação anafilática.

Presume-se que o tratamento de dessensibilização oral induz ou restaura um estado imunológico tolerante do organismo ao alimento. No entanto, uma distinção deve ser considerada entre a dessensibilização, onde o alérgeno é ingerido ininterruptamente pelo paciente sem sintomas durante tratamento, porém esse estado pode ser perdido caso deixe de administrá-lo. Os mecanismos imunológicos envolvidos nesse processo, ainda não são bem compreendidos, mas há um aumento na anticorpos IgG4 específicos para alérgenos, observados logo após 8 semanas depois de iniciado o ITO, assim como diminuição de anticorpos IgE específicos (61-64).

O possível estado tolerogênico adquirido pelos pacientes, pode envolver mecanismos celulares e humorais. Além da diminuição de anticorpos IgE e IgG4 específicos, foi verificado em camundongos, a diminuição da reatividade de basófilos e mastócitos devido a diminuição da expressão de ligantes de superfície de alta afinidade para receptores IgE específicos (65).

A terapia pode também, ao invés de somente dessensibilizar, induzir a tolerância imunológica no paciente, permitindo que o alimento seja ingerido sem sintomas de alergia apesar de períodos de abstinência. A célula cujo seu envolvimento é bastante pesquisado nesse mecanismo, são as células Treg. O aumento de células Tregs nos pacientes durante a ITO foi observado em um período de 9 a 34 semanas após início de tratamento (66, 67), mas o período exato que isso acontece ainda é incerto. Em nosso estudo, foi incluída a investigação da frequência das células Treg após cultura alérgeno-específico das amostras dos pacientes nos diferentes pré e pós terapia.

A etapa de padronização exigia um volume maior de amostras pois essas seriam testadas com os três principais alérgenos do leite (caseína,  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina) em diferentes tempos. Apesar de ter estabelecido as concentrações e o tempo de incubação, foi verificado que havia alta taxa de mortalidade durante o processo. Entretanto, foram realizados testes-piloto com amostras de pacientes pré, dia D, pós 6 e 12 meses de tratamento, comparando-os com amostras de pacientes tolerantes espontâneos. Quando analisadas as amostras de 2 pacientes alérgicos nos diferentes tempos, os resultados foram inconclusivos pois se mostraram opostos quando comparado a porcentagem dessas células.

As células Treg são reguladores chave de células inatas e adaptativas na imunidade, ela se acumula localmente durante o curso de várias infecções crônicas, inibem as respostas imunológicas e limitam os efeitos da doença (67). Nossos resultados apontaram um aumento de frequência de células Treg CD4+ CD25+ FOXP3+ nas amostras de cultura pós 1 ano de tratamento quando comparado aos tempos pré, dia D e pós 6 meses chegando a ser maior que o encontrado no paciente tolerante espontâneo. Essa expansão pós 1 ano da ITO, foi acompanhada pelo aumento de IL-10 no mesmo período, visto por LUMINEX,

nas amostras avaliadas. A IL-10 é uma citocina regulatória chave que também é produzida por DCs e uma série de outras células T. Ela é responsável por atenuar as respostas Th2 específicas ao alérgeno e induzir a manutenção das populações de Treg pois inibe diretamente células pró-inflamatórias como mastócitos, basófilos e eosinófilos, levando a um estado de insensibilidade a antígenos ingeridos ou tolerância oral (68-70). Como resultado, menos IL-4 é produzida, o que diminui a recombinação e troca de isotipo IgE pelas células B e a diferenciação de células Th2 (71).

Os miRNAs 520a-5p e 548-5p, que se encontram aumentados nos pacientes pós 12 meses de tratamento, inibem a via de sinalização da produção de IL-4. Esses resultados estão de acordo com imunoterapia com veneno de abelha que reduziu consideravelmente a expressão in vitro de interleucina-4 (IL-4) em células T estimuladas por alérgenos ou células mononucleares do sangue periférico misto (PBMCs) e aumentou significativamente a produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pelas células T (72). Nossos resultados indicam que as células NK podem participar da manutenção do perfil anti-inflamatório durante a imunoterapia oral, juntamente com as células T, produzindo interferon- $\gamma$ .

As diferenças de atuação dessas células no curso da imunoterapia e nos pacientes tolerantes espontâneos pode ser explicado pelo fato dessas células desempenharem funções dinâmicas na regulação da resposta imune. Nas infecções virais, as Tregs diminuem a eficácia das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos estágios iniciais da doença (73, 74). Porém, após o controle da infecção as Tregs têm um papel protetivo, controlando as respostas imuno-mediadas (75, 76). Outros estudos destacam um mecanismo das células Treg para se adaptarem às condições inflamatórias em toda a evolução da natureza de uma infecção para ajustar a imunidade adaptativa anti-patógeno e proteger o hospedeiro da patologia (77).

Paralela a investigação celular, foram realizadas análises no soro das amostras coletadas. Foram avaliadas a presença de citocinas no microambiente e correlacionar com o aumento da porcentagem das células analisadas (Treg e NK). Direcionamos a investigação para a citocina IL-33 devido ser uma citocina alarmina com importante papel no perfil Th2 e na asma, assim como um sensor

de protease de diversos alérgenos ambientais. Sua clivagem aciona células linfoides inatas (ILCs) e produção de citocinas de padrão inflamatório (78-79). Juntamente a esse painel, foi verificada a cinética de outras citocinas que poderiam nos fornecer importantes resultados com a investigação celular.

Nossos resultados demonstraram que, apesar da IL-33 ser produzido em maior quantidade, os resultados não foram significativos quando comparados os diferentes tempos e grupos, porém sua produção foi expressiva, atingindo até 200 pg/ml. No entanto, a IL-1 $\beta$  da mesma família da IL-33, demonstrou um aumento significativo nas amostras pós 1 ano quando comparada as amostras pré. As Tregs respondem de forma distinta as IL-33 e IL-1 $\beta$  mesmo esses sendo da mesma família (IL-1). Estudos demonstraram que a estimulação de IL-1 $\beta$  quase anulou completamente a capacidade supressora das células Treg em células Th17 de camundongos. Alvarez *et al.* mostraram que os dois membros distintos da família de citocinas IL-1, IL-33 e IL-1 $\beta$ , têm efeitos diferentes na atividade funcional do ligante Foxp3<sup>+</sup> das células Treg de mucosa durante o desafio imunológico, enquanto a IL-33 estabiliza esse ligante na superfície celular, a IL-1 $\beta$  não. Estudos já mostraram que a estabilidade da expressão de Foxp3 e a função das células Treg é um processo dinâmico ditado pelo ambiente inflamatório (80).

As funções das células NK são controladas, não apenas pela ativação via receptores, mas também pela presença de citocinas produzidas no microambiente, por outros tipos de células. Nos resultados do LUMINEX, cuja avaliação foi a partir do soro das amostras, foram verificadas duas citocinas IL-IL-12P70 e IL-21 que apresentaram produções diferentes na comparação entre os tempos e grupos, respectivamente, estudados. Essas estão associadas ao aumento da citotoxicidade das NKs (81). O aumento da IL-12P70 pós 12 meses de tratamento, está de acordo com o aumento de células NK citotóxicas, investigada a partir dos fenótipos NK CD16+CD56<sup>dim</sup> e CD16+CD56<sup>+</sup>.

Dois subconjuntos de células NK humanas foram definidos pela expressão diferencial da superfície celular de CD16 e CD56 em linfócitos CD3- em circulação. As células NK CD16+CD56<sup>dim</sup> representam a maioria das células NK no sangue, enquanto as demais são células NK CD16-CD56<sup>bright</sup>.

Subconjuntos de células NK em humanos com perfis de citocinas distintos, como as células NK produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 ou IL-22, que representam células NK1, NK2, NKreg ou NK22, respectivamente, e podem exibir propriedades pró ou anti-inflamatórias (20).

As células NK são divididas em quatro subconjuntos diferentes, de acordo com seu padrão de secreção de citocinas. As células NK cultivadas em IL-12 e IL-18 (NK1) produzem IFN- $\gamma$  e inibem a produção de IgE, enquanto as células NK cultivadas em IL-4 (NK2) produzem IL-5 e IL-13. As células NKreg produzem IL-10 e TGF- $\beta$  e suprimem a produção de IgE. O subconjunto NK22 secreta IL-22 e pode ter um papel na proteção das barreiras das células epiteliais (82). Nossos resultados demonstraram maior porcentagem de produção da citocina IFN- $\gamma$  NKs específicas, com queda de produção significativa no dia D quando comparado a amostra pré, sugerindo que a população predominante nos nossos testes foi de NK1. Foi verificado o aumento gradativo dessa citocina durante o tratamento, apesar de não ter conferido significância, o gráfico mostra uma tendência, indicando que essas células auxiliam no controle da inflamação a partir do início do tratamento, porém após o tratamento, ela desempenha o papel modulador ou mantenedor do perfil anti-inflamatório Th1.

Estudos demonstram que as células NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> estão envolvidas na capacidade de promover a maturação das células dendríticas (CD) e/ou as CD imaturas. Em pacientes com asma intermitente a atividade funcional das NK estava reduzida na maioria dos pacientes. O comprometimento da função das células NK indica uma incapacidade no controle da inflamação exercida pelas células NK1 (83)

As células linfóides inatas (ILCs) contribuem para as respostas imunes secretando citocinas efetoras e regulando as funções de outras células imunes inatas e adaptativas, exercendo papel complementar as células T. As ILCs estão presentes nos órgãos linfóides e não linfóides e são particularmente abundantes nas barreiras da mucosa, onde são expostas a alérgenos, micróbios comensais e patógenos. pode ser separado nas 3 linhagens principais ILC1s, ILC2s e ILC3s, de acordo à sua capacidade de produzir citocinas tipo 1, tipo 2 ou tipo 17,

respectivamente (84-86). Em camundongos, as células NK que produzem IFN- $\gamma$  inibem a expansão da ILC2, homólogos ao padrão Th2, e a produção de citocinas tais como IL-5, IL-9, IL-13 (87).

A elucidação das principais vias de tolerância oral pode identificar novas estratégias para aumentar a eficácia dos tratamentos de imunoterapia para alergia alimentar. Novas estratégias com foco na maximização do ambiente regulatório no qual a tolerância oral é induzida podem melhorar a eficácia dos tratamentos de imunoterapia (88,89). Os mecanismos imunológicos locais associados à ITO ainda precisam ser investigados, mais particularmente no que diz respeito às células envolvidas na captação e resposta aos alérgenos no local de administração.

## 7. CONCLUSÃO

- A célula *Natural Killer* desempenha papel importante na manutenção do perfil anti-inflamatório pós tratamento, através da produção de IFN- $\gamma$ ;
- A produção de IL-10 pós 1 ano de tratamento pode contribuir para a manutenção do perfil tolerante;
- Os miRNAs 520a-5p e 548-5p, que se encontram aumentados nos pacientes pós 12 meses de tratamento, inibem a via de sinalização da produção de IL-4 (perfil Th2);
- As citocinas envolvidas nos mecanismos imunológicos durante tratamento de imunoterapia oral, podem auxiliar no monitoramento e modulação da resposta imune;
- O acompanhamento das citocinas envolvidas nos mecanismos imunológicos durante e pós 1 ano de tratamento da imunoterapia oral, podem auxiliar no monitoramento e/ou manutenção do perfil tolerante do paciente.



## ANEXOS

### ANEXO 1 – Questionário Auxiliar

#### Avaliação do perfil de citocinas pré e pós tratamento em crianças APLV Instrumento de Coleta de dados

Nº RGHC \_\_\_\_\_ (para preenchimento da pesquisadora)

Local onde reside o participante da pesquisa (cidade/estado):

\_\_\_\_\_

#### Parte A: Fatores de Risco

1. Sobre características dos pais e gravidez

1.1 Idade da mãe quando engravidou? \_\_\_\_\_

1.2 Idade do pai no momento da gravidez? \_\_\_\_\_

1.3 Grupo sanguíneo e fator Rh da mãe \_\_\_\_\_ e do pai \_\_\_\_\_

1.4 Cor da pele/ raça da mãe?

( x )Branca ( )Preta ( )Parda ( )Amarela ( )Indígena

1.5 Cor da pele/raça do pai?

( x )Branca ( )Preta ( )Parda ( )Amarela ( )Indígena

1.6 Realizou pré-natal? ( )Não ( )Sim

1.6.1 Se sim a questão acima (1.7), teve intercorrências? ( )Não ( )Sim, quais?

\_\_\_\_\_

1.7 Fez suplementação de vitamina D durante a gravidez? ( )Não ( )Sim, como?

\_\_\_\_\_

1.8 Tomava banho de sol? Em caso afirmativo, descreva quais partes do corpo expostas, horário do dia, tempo de exposição e quantidade de vezes por semana.

\_\_\_\_\_

1.9 Fez dieta de restrição durante a gravidez? ( )Não ( )Sim

1.9.1 Caso afirmativo a questão anterior, a partir de quantas semanas?

\_\_\_\_\_

1.9.2 Qual alimento foi excluído? (pode marcar mais de uma alternativa)

( )Leite de vaca ( )Soja ( )Ovo ( )Crustáceos ( )Oleaginosas

( )Carne de vaca ( )Glúten ( )Cacau ( )Carne de porco e seus derivados

( )Outros

\_\_\_\_\_

1.10 Qual o Tipo de Parto ( )Normal ( )Natural ( )Cesáreo

1.10.1 Teve intercorrências durante trabalho de parto/parto? ( )Não ( )Sim, quais?

---

---

1.12.2 Em caso de cesária, a mesma ocorreu por agendamento da data ou por início do trabalho de parto?

---

---

2. Sobre exposição a microorganismos/poluentes (quanto a criança)

2.1. Onde mora? ( )Casa ( )Apartamento

2.1.1 Se em casa, tem quintal ou jardim? ( )Não ( )Sim

2.1.2 Se sim a questão anterior (2.1.1), as crianças costumam brincar neles? ( )Não ( )Sim

2.2 Tem animal de estimação? ( )Não ( )Sim, qual? \_\_\_\_\_

2.3 Qual a situação socioeconômica do núcleo familiar da criança?

( ) Classe A - > 15 salários mínimos

( ) Classe B – 5 a 15 salários mínimos

( ) Classe C – 3 a 5 salários mínimos

( ) Classe D – 1 a 3 salários mínimos

( ) Classe E – Até 1 salário mínimo

2.4 A criança foi exposta a um ambiente com fumantes? ( )Não ( )Sim

2.5 A criança costuma brincar em locais de contato com natureza? ( )Não ( x )Sim

Se sim: ( )Diariamente ( )Até 3x por semana ( )Quinzenal ( )Mensal

3. Sobre predisposição genética da criança

3.1 Alguém da família tem história de alergia ( )Não ( )Sim, quem?

( )mãe ( )pai ( )irmão ( )\_\_\_\_\_

3.1.1 Em caso afirmativo a questão anterior, qual apresentação da alergia?

( )Rinite alérgica ( )Dermatite Atópica ( )Asma Alérgica ( )Alergia Alimentar

3.1.1.1 Para o caso de marcar Dermatite Atópica a questão anterior, especifique qual o parente: \_\_\_\_\_

3.1.2 Para o caso de alergia alimentar, qual(is) alérgeno(s) envolvido(s)?

( )Ovo ( )Frutos do Mar ( )Soja ( )Leite de vaca ( )Trigo ( )

Outro: \_\_\_\_\_

3.1.3 Houve cura da alergia? ( )Não ( )Sim, idade que curou

---

4. Sobre amamentação e introdução alimentar da criança

4.1 A criança teve contato com leite de vaca na maternidade? ( ) Não ( ) Sim

4.2 A amamentação logo após o nascimento foi facilitada e ocorreu? ( ) Não ( ) Sim

4.3 A criança foi amamentada? ( ) Não ( ) Sim

4.3.1 Por quanto tempo foi amamentada a criança?

\_\_\_\_\_

4.4 A amamentação precisou de complemento? ( ) Não ( ) Sim

4.4.1 Com quantos meses (ou dias) veio a necessidade de complementar?

\_\_\_\_\_

4.4.2 Qual o leite escolhido (antes do diagnóstico de AA) para complementação?

\_\_\_\_\_

4.5 Houve dieta materna para alérgenos de forma preventiva após o parto?

\_\_\_\_\_

4.6 Com que idade foi iniciada a introdução alimentar e pelo que você começou?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4.6.1 Qual a sequência de alimentos escolhida para introdução alimentar?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4.6.2 Existia intervalo de dias para observação de cada alimento? ( ) Não ( ) Sim

4.6.2.1 De quantos dias

\_\_\_\_\_

4.7 Com que idade se deu o 1º contato, via leite materno, da criança com:

- leite de vaca \_\_\_\_\_ - soja \_\_\_\_\_ - ovo \_\_\_\_\_

- peixe \_\_\_\_\_

- amendoim \_\_\_\_\_ - trigo \_\_\_\_\_ - nozes \_\_\_\_\_

- cacau \_\_\_\_\_

- arroz \_\_\_\_\_ - batata doce \_\_\_\_\_ - aveia \_\_\_\_\_

- corantes e aditivos \_\_\_\_\_

4.8 Com que idade se deu o 1º contato direto da criança com:

- leite de vaca \_\_\_\_\_ - soja \_\_\_\_\_ - ovo \_\_\_\_\_

- peixe \_\_\_\_\_

- amendoim \_\_\_\_\_ - trigo \_\_\_\_\_ - nozes \_\_\_\_\_

- cacau \_\_\_\_\_

- arroz \_\_\_\_\_ - batata doce \_\_\_\_\_ - aveia \_\_\_\_\_

- corantes e aditivos \_\_\_\_\_

5. Quanto ao perfil da criança - nascimento

5.1 Sexo: ( ) M ( ) F

5.2 Tempo de gravidez? ( ) < 37 semanas \_\_\_\_\_ ( ) 37 a 41 semanas ( ) > 41 semanas

5.3 Peso? ( ) < 2.500 Kg ( ) > 2.500 Kg ( ) < 1.500 Kg ( ) < 1000 g ( ) > 4000 g

- 5.4 Altura? \_\_\_\_\_ cm
- 5.5 Apgar? 1º \_\_\_\_\_ 5º \_\_\_\_\_
- 5.6 Grupo sanguíneo e fator Rh? \_\_\_\_\_
- 5.7 Apresentou mancha vermelha na pele? ( ) Não ( ) Sim, local \_\_\_\_\_
- 5.8 Apresentou hipoglicemia? ( ) Não ( ) Sim
- 5.8 Preciso de cuidados intensivos ao nascer? ( ) Não ( ) Sim
- 5.8.1 Em caso afirmativo à questão 5.8, motivo? \_\_\_\_\_
- 5.9 Preciso de oxigênio? ( ) Não ( ) Sim
- 5.10 Preciso de fototerapia? ( ) Não ( ) Sim

6. Quanto ao perfil da criança recém nascida

6.1. Marque a(s) alternativas que correspondam ao perfil do seu filho quando recém nascido.

Sono	<input type="checkbox"/> Dorme apenas no colo da mãe. <input type="checkbox"/> Sono leve e não mais que 30 minutos seguidos. <input type="checkbox"/> Alternância de sono e vigília a cada 2 a 4 horas, uniformemente distribuídos entre dia e noite e totalizando 16-18h de sono. <input type="checkbox"/> Sono inquieto com expressões de dor.
Alimentação	<input type="checkbox"/> Mama a cada 2 – 4 horas. <input type="checkbox"/> Dá intervalo > 4 horas entre as mamadas. <input type="checkbox"/> Irritabilidade durante a mamada, porem mama. <input type="checkbox"/> Sinal de arqueamento do tronco durante mamada. <input type="checkbox"/> Recusa a mamar.
Padrão Intestinal	<input type="checkbox"/> Eliminação de mecônio em 24 h. Aspecto das fezes escuras e esverdeadas, asséptico e viscoso. <input type="checkbox"/> Eliminação de mecônio após 36 – 48 h. <input type="checkbox"/> Fezes de transição entre 4º e 5º dia. Aspectos das fezes líquidas, castanho, esverdeadas, odor forte. <input type="checkbox"/> Fezes lácteas: amareladas, semilíquidas ou pastosas, podendo ser explosivas e espumosas <input type="checkbox"/> Número de evacuações variável, relacionado com freqüência e quantidade de alimento ingerido. <input type="checkbox"/> Fezes endurecidas <input type="checkbox"/> Presença de muco <input type="checkbox"/> Presença de sangue vivo <input type="checkbox"/> Flatulência excessiva
Padrão Gástrico	<input type="checkbox"/> Cólica de freqüência diária, com início por volta da 3ª semana, mais comumente ao final do dia, com duração de 2 a 4 horas ininterruptas, de início e término súbito e sem causa aparente. <input type="checkbox"/> Cólica de freqüência diária, em qualquer horário do dia, de duração variada e comumente durante ou após mamadas. <input type="checkbox"/> Cólica de freqüência diária, podendo ocorrer várias vezes ao dia, sempre antes da evacuação de fezes líquidas e pastosas. <input type="checkbox"/> Presença de regurgitação (retorno involuntário do alimento ou conteúdo gástrico para a boca ou para fora, sem a atividade muscular abdominal e diafragmática que caracterize o vômito). <input type="checkbox"/> Presença de ânsia e/ou vômitos (expulsão forte e rápida do conteúdo gástrico pela boca, associada à contração característica da musculatura torácica e abdominal). <input type="checkbox"/> Presença de vômitos com presença de sangue.

	( ) Presença de vômitos com bile.
Pele	Presença de dermatite ( )Não ( )Sim Resolução da dermatite apenas com corticóide tópico ( )Não ( )Sim
Padrão Respiratório	Identificou alterações? ( )Não ( )Sim, quais? _____ _____
Outros	Identificou outras alterações não relatadas acima? ( )Não ( )Sim, quais? _____ _____ _____

## 7. Quanto ao diagnóstico de Alergia Alimentar

7.1 Com que idade seu filho começou a apresentar sinais e sintomas de alergia alimentar?  
\_\_\_\_\_ meses

7.1.1 Quais sinais e sintomas seu filho apresentou?

---

7.1.2 Estes sinais e sintomas variavam de acordo com o alérgeno envolvido? Se sim, relacione alérgeno e sintomatologia apresentada:

---

7.2 Com que idade seu filho teve o diagnóstico de Alergia Alimentar? \_\_\_\_\_ meses.

7.2.1 Qual o diagnóstico recebido?

( ) Alergia Alimentar IgE mediada

( ) Alergia Alimentar tipo mista

( ) Alergia Alimentar não IgE mediada

7.2.1.1 Recebeu outro diagnóstico relacionado com a Alergia Alimentar? ( ) Não ( ) Sim, qual?

( ) Esofagite Eosinofílica Alérgica

( ) Asma

( ) Gastrite Eosinofílica Alérgica eosinofílica alérgica

( ) Gastroenterocolite

( ) Proctite induzida por proteína alimentar proteína alimentar

( ) Enteropatia induzida por

( ) Enterocolite induzida por proteína alimentar(FPIES) Gastroesofagico

( ) Doença do Refluxo

( ) Doença Celíaca

( ) Síndrome de Heiner

( ) Dermatite Atópica

( ) Rinite

( ) Outros

---



---

7.3 O que foi utilizado para fechar o diagnóstico de Alergia Alimentar?

- Colhido histórico e realizado exame físico da criança.
  - Exclusão do alérgeno por 2 a 4 semanas seguido de desencadeamento oral.
  - Teste de provocação oral aberto – em consultório ou hospital o profissional levou a criança ter contato com a proteína suspeita.
  - Teste de provocação oral placebo cego simples – em hospital foi ofertado o alérgeno e placebo, onde apenas o médico sabia quando ofertado o alérgeno e quando ofertado o placebo.
  - Teste de provocação oral placebo duplo cego – em hospital foi ofertado o alérgeno e placebo, onde médico, paciente e família não sabiam quando ofertado o alérgeno e quando ofertado o placebo.
  - Exames in vitro – Rast Sanguíneo para os alérgenos suspeitos.
  - Exame in vivo – Prick Test
  - Exame in vivo – Patch Test
  - Exame de sangue oculto nas fezes
  - Endoscopia
  - Colonoscopia
  - Outros
- 
- 

7.3.1 Para os casos da realização de Rast Sanguíneo, Prick Test e Patch Test, com que idade a criança foi submetida pela primeira vez a estes exames? \_\_\_\_\_ meses.

7.3.1.1 Houve um resultado positivo? ( ) Não ( ) Sim

7.3.2 Quais as principais alterações de exames já apresentadas por seu filho?

---

---

7.4 Para quais alimentos (se possível cite as proteínas) foi constatado hipersensibilidade?

---

---

8. Quanto ao tratamento da alergia alimentar

8.1 Qual foi o tratamento indicado pelo médico para tratamento da alergia alimentar?

- Dieta de exclusão com controle de traços industrializados
  - Dieta de exclusão com controle de traços domiciliares e industrializados
  - Dieta de exclusão sem controle de traços
  - Dieta de exclusão apenas do alérgeno principal sem exclusão dos seus derivados
  - Transplante fecal
  - Aleitamento Materno
  - Outros
- 

8.2 Foram utilizados medicamentos em uso contínuo? ( ) Não ( ) Sim, quais?

( ) Vitamina D. Prescrição:

---

( ) Corticoides. Prescrição:

---

( ) Domperidona. Se sim, coloque a prescrição e sua relação com o peso da criança:

---

( ) Omeprazol. Prescrição:

---

( ) Ranitidina. Se sim, coloque a prescrição e sua relação com o peso da criança:

---

( ) Antialérgico em uso prolongado. Prescrição:

---

( ) Probióticos. Prescrição:

---

( ) Outros:

---

8.2.1 Você observou mudanças na clínica de seu filho pós uso de vitamina D? ( ) Não

( ) Sim, quais?

---

---

8.2.2 Você observou mudanças na clínica de seu filho pós uso de probióticos? ( ) Não

( ) Sim, quais?

---

---

8.3 Algum medicamento que mesmo não sendo de uso contínuo ou prolongado acha importante relatar?

( ) Não ( ) Sim, quais?

---

---

8.4 Após o diagnóstico de alergia alimentar, tendo você utilizado fórmulas infantis, qual foi a escolhida?

( ) Leite de cabra

( ) Soja. Qual? \_\_\_\_\_

( ) Parcialmente hidrolizadas. Qual? \_\_\_\_\_

( ) Extensamente hidrolizadas. Qual? \_\_\_\_\_

( ) Aminoácidos livres. Qual? \_\_\_\_\_

8.4.1 Houve não adaptação a fórmula inicialmente testada? ( ) Não ( ) Sim

8.4.1.1 Qual fórmula de eleição para substituição? \_\_\_\_\_

8.5 Houve internações hospitalares em decorrência da alergia alimentar? ( ) Não ( ) Sim, motivo e número de vezes?

---

---

8.6 Qual (is) especialidades médicas acompanham seu filho?

---

8.6.1 Existem outros profissionais que acompanham seu filho? ( ) Não ( ) Sim, quais? \_\_\_\_\_

8.7. A criança tem cartão de vacina atualizado ( ) Sim ( ) Não, por quê?

---

---

8.8. Qual (is) o(s) tratamentos(s) que a criança foi submetida? \_\_\_\_\_

8.9. Qual (is) exames/procedimentos cirúrgicos já realizados?

---

## 9. Quanto a outros alimentos

Seu filho reage a:

( ) Leite de vaca	( ) Leite de cabra ( ) Carne de Vaca
( ) Leguminosas	( ) Soja ( ) Ervilha ( ) Lentilha ( ) Amendoim ( ) Grão de bico ( ) Feijão ( ) Outro _____
( ) Castanhas	( ) Castanha de caju ( ) Castanha do Pará ( ) Avelã ( ) Nozes
( ) Peixes	( ) Salmão ( ) Linguado ( ) Peixe espada ( ) Merluza ( ) Pescada da branca ( ) Outro _____
( ) Crustáceos	( ) Ácaros ( ) Camarão ( ) Siri ( ) Carangueijo ( ) Barata ( ) Lagosta
( ) Cereais	( ) Trigo ( ) Arroz _____ ( ) Milho ( ) Cevada ( ) Aveia ( ) Centeio
( ) Leite de vaca	( ) Carne de vaca ( ) Leite de cabra
( ) Pólen	( ) Fruta crua _____ ( ) Vegetal cru _____ ( ) Maçã crua ( ) Pêssego cru ( ) Melão cru
( ) Látex	( ) Kiwi ( ) Banana ( ) Abacate
( ) Frutas	_____
( ) Legumes	_____
( ) Tubérculos	_____
( ) Corantes	Sabe especificar o corante? ( ) Não ( ) Sim, qual(is)? _____ Reage a outros aditivos? ( ) Não ( ) Sim, qual(is)? _____
( ) Medicamentos	Sabe especificar o medicamento? ( ) Não ( ) Sim, qual(is)? _____ _____



10. Qual a idade de seu filho hoje: \_\_\_\_\_ meses.

11. Já apresentou cura para alergia alimentar? ( )Não ( )Sim, com que idade: \_\_\_\_\_ meses.

Se seu filho apresentou cura, responda:

11.1 Apresentou cura para todos os alérgenos envolvidos?

---

11.2 Tolerar o alérgeno em qualquer quantidade e forma de apresentação?

---

11.3 Curou com alguma outra forma de apresentação alérgica? ( )Não ( )Sim, qual(is)?

---

11.4 Após quantos meses de reintrodução do alérgeno foi atestado cura?

---

**ANEXO 2 – Protocolo de dessensibilização de pacientes alérgicos à proteína do leite de vaca.**

Leite de Vaca	Dias	hora	Dose/posologia
Diluição 1: 1.000.000	1	9:00 9:30 10:00 10:30 11:00 14:00 14:30	Intervalo entre doses: 30 minutos até chegar em 1 mL 1 gota 2 gotas 4 gotas 8 gotas 16 gotas 16 gotas 1 mL de hora em hora até as 20h
	2-7		1 mL de hora em hora até as 20h (iniciar 30 minutos após o café da manhã)
Diluição 1:100.000	8	9:00 9:30 10:00 10:30 11:00 14:00 14:30	Intervalo entre doses: 30 minutos até chegar em 1 mL. 1 gota 2 gotas 4 gotas 8 gotas 16 gotas 16 gotas 1 mL de hora em hora até as 20h
	9-14		1 mL de hora em hora até as 20h (iniciar 30 minutos após o café da manhã)
Diluição 1: 10.000	15	9:00 9:30 10:00 10:30 11:00 14:00 14:30	Intervalo entre doses: 30 minutos até chegar em 1 mL 1 gota 2 gotas 4 gotas 8 gotas 16 gotas 16 gotas 1 mL de hora em hora até as 20h
	16-21		1 mL de hora em hora até as 20h (iniciar 30 minutos após o café da manhã)
Diluição 1:1.000	22	9:00	Intervalo entre doses: 30 minutos até chegar em 1 mL 1 gota

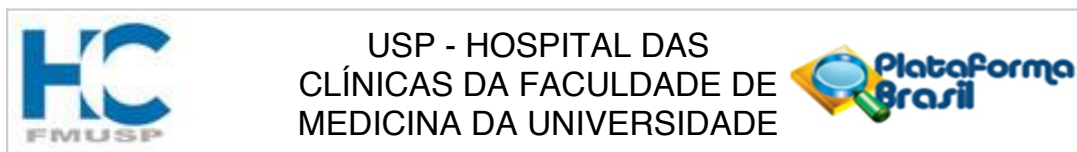
		9:30 10:00 10:30 11:00 14:00 14:30	2 gotas 4 gotas 8 gotas 16 gotas 16 gotas 1 mL de hora em hora até as 20h
	23-28		1 mL de hora em hora até as 20h (iniciar 30 minutos após o café da manhã)
Diluição 1:100	29	9:00 9:30 10:00 10:30 11:00 14:00 14:30	Intervalo entre doses: 30 minutos até chegar em 1 mL 1 gota 2 gotas 4 gotas 8 gotas 16 gotas 16 gotas 1 mL de hora em hora até as 20h
	30-35		1 mL de hora em hora até as 20h (iniciar 30 minutos após o café da manhã)
Diluição 1:10 (1 mL leite puro + 9 mL água)	36	9:00 9:30 10:00 10:30 11:00 14:00 14:30	Intervalo entre doses: 30 minutos até chegar em 1 mL 1 gota 2 gotas 4 gotas 8 gotas 16 gotas 16 gotas 1 mL de hora em hora até as 20h
	36-41		1 mL de hora em hora até as 20h (iniciar 30 minutos após o café da manhã)
Leite Puro	42	9:00 9:30 10:00 10:30 11:00 14:00 14:30	Intervalo entre doses: 30 minutos até chegar em 1 mL 1 gota 2 gotas 4 gotas 8 gotas 16 gotas 16 gotas 1 mL de hora em hora até as 20h
	43-48		1 mL de hora em hora até as 20h

			(iniciar 30 minutos após o café da manhã)
--	--	--	---

Observações e Orientações:

- O primeiro dia de cada diluição nova é conduzido sob supervisão direta do médico.
- O aumento da concentração do extrato diluído do alimento está programado para ser feito a cada 7 dias, desde que o paciente esteja assintomático, e clinicamente estável de qualquer patologia que seja portador. Assim, o retardo na progressão das doses pode ser eventualmente necessário.
- O paciente iniciará o uso diário de anti-histamínico, prescrito pelo médico, dois dias antes de começar o procedimento de indução de tolerância, e manterá seu uso contínuo até completar o tratamento.
- As refeições ingeridas pelo paciente durante a indução (especialmente no dia de aumento da dose) devem ser leves, sem corantes, de preferência preparadas em casa, manter leitura de rótulos a fim de evitar exposição ao alérgeno. Nos intervalos da manhã e da tarde, optar por frutas habituais e toleradas na dieta comum do paciente.

## ANEXO 3 - Parecer Consubstanciado da Coordenadoria de Ética em Pesquisa da FMUSP.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Alergia a Proteína do Leite de Vaca (APLV): avaliação do perfil imunológico em pacientes alérgicos submetidos ou não a terapia de indução de tolerância oral

**Pesquisador:** Keity Souza Santos

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 78095917.1.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.753.158

#### Apresentação do Projeto:

O estudo "Alergia a Proteína do Leite de Vaca (APLV): avaliação do perfil imunológico em pacientes alérgicos submetidos ou não a terapia de indução de tolerância oral" avaliará os mecanismos imunológicos envolvidos na alergia à proteína do leite de vaca e os mecanismos imunológicos envolvidos na indução de tolerância oral a esta proteína. Os pacientes serão submetidos à indução de tolerância oral onde o alimento será ingerido em concentrações gradativamente aumentadas. A seleção dos pacientes e o tratamento, ou seja, a dessensibilização com o leite de vaca serão realizados pela equipe médica do ambulatório de Alergia Alimentar do HCFMUSP. Os pesquisadores deste estudo realizarão apenas a avaliação laboratorial do sangue periférico coletado em estudo previamente e aprovado por este CEP, sob o nºCAAE6554831660000068. Porém, o projeto referido apresenta TCLE apenas para os pacientes com alergia a proteína do leite de vaca.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliação do perfil imunológico de pacientes alérgicos a proteína do leite de vaca pré e pós-tratamento de dessensibilização, tolerantes espontâneos e crianças sensibilizadas sem sintomas clínicos. Comparar os perfis imunológicos avaliados em crianças com APLV pré e pós-tratamento de indução de tolerância oral (ITO), tolerantes espontâneos e crianças sensibilizadas sem manifestações de sintomas clínicos, em relação à:- Dosagem de citocinas, quimiocinas e

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar

**CEP:** 05.403-010

**UF:** SP

**Município:** SÃO PAULO

**Telefone:** (11)2661-7585

**Fax:** (11)2661-7585

**E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

fatores de crescimento, envolvidas em respostas inflamatórias, antiinflamatórias, Th1, Th2, Th17; - porcentagens de células T reguladoras;- Populações celulares tais como Linfócitos (T e B) e monócitos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos estão relacionados à coleta de sangue periférico. Benefícios: O entendimento do comportamento imunológico desses pacientes abriria novas possibilidades de tratamento para Alergia à Proteína do Leite.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Conforme relatado pelo investigador do estudo, um grupo de pacientes está incluído em projeto aprovado previamente pelo CEP sob o nº CAAE 6554831660000068 e, portanto, o TCLE já foi assinado por estes pacientes. Entretanto, este protocolo incluirá 2 outros grupos: a) pacientes tolerantes e b) pacientes de outro ambulatório (de alergia de insetos). O TCLE e de Assentimento foram anexados a este estudo e estão adequados, incluindo as explicações sobre os procedimentos médicos que serão realizados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de consentimento livre e esclarecido e de assentimento foram incluídos para todos os pacientes, inclusive para os pacientes dos grupos controles (grupos b e c do estudo).

**Recomendações:**

Alterar nas Informações básicas do projeto que o termo de consentimento não será dispensado. Outras análises estão descritas acima.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências. Observar o item recomendações.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.



Continuação do Parecer: 2.753.158

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_772777.pdf	22/06/2018 00:23:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_SUSANNE_FINAL.pdf	22/06/2018 00:22:30	Susanne Carolinne Penha Ferreira Cutrim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeAssentimento12a18anos.pdf	22/06/2018 00:22:18	Susanne Carolinne Penha Ferreira Cutrim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeAssentimento7a11anos.pdf	22/06/2018 00:22:04	Susanne Carolinne Penha Ferreira Cutrim	Aceito
Outros	Resposta_questionamentos.docx	01/06/2018 16:31:27	Keity Souza Santos	Aceito
Outros	FAPESP.docx	11/05/2018 19:47:46	Keity Souza Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	08/05/2018 06:30:24	Keity Souza Santos	Aceito
Outros	Questionario.docx	08/05/2018 06:28:14	Keity Souza Santos	Aceito
Outros	Keity.pdf	08/05/2018 06:27:44	Keity Souza Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_2.PDF	08/05/2018 06:22:07	Keity Souza Santos	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 04 de Julho de 2018

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## 8. REFERÊNCIAS

1. NIAID-Sponsored Expert Panel; Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(suppl 6):S1–S58
2. Taylor SL, Hefle SL. Food allergen labeling in the USA and Europe. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006;6:186-90.3.
3. Sicherer SH, Sampson HA (2010) Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 suppl 2):S116–S125
4. Mansoor DK, Sharma HP (2011) Clinical presentations of food allergy. *Pediatr Clin North Am* 58:315–326
5. A. Wesley Burks, Stacie M. Jones, Joshua A. Boyce, Scott H. Sicherer, Robert A. Wood, Amal Assa'ad and Hugh A. Sampson NIAID-Sponsored 2010 Guidelines for Managing Food Allergy: Applications in the Pediatric Population. *Pediatrics* 2011;128;955; originally published online October 10, 2011;
6. Thomsen, S. F. Epidemiology and natural history of atopic diseases. *Eur Clin Respir J*. 2015; 2():.
7. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2016 Dec; 16(12): 751–765.
8. Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy*. 2012 Jan 5;2(1):2.
9. Shin JS, Greer AM. The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Jun; 72(12): 2349–2360.
10. Host A, Halken S Cow's milk allergy: where have we come from and where are we going? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2014 Mar;14(1):2-8.
11. Nowak-Węgrzyn, A. , Katz, Y. , Mehr, S. S , Koletzko S. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 135 (5): 1114–1124, 2015.
12. Spergel JM. From atopic dermatitis to asthma: The atopic march. *Ann Allergy, Asthma Immunol. Ann. Allergy Asthma Immunol.*; 2010;105(2):99–106.
13. Cayrol, C. & Girard, J. P. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr. Opin. Immunol*. 31C, 31–37 (2014).



14. Molofsky, A. B., Savage, A. K. & Locksley, R. M. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation. *Immunity* 42, 1005–1019 (2015).
15. Liew, F. Y., Girard, J. P. & Turnquist, H. R. Interleukin-33 in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 676–689 (2016).
16. Cayrol, C. & Girard, J. P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol. Rev.* 281, 154–168 (2018).
17. Artis, D. & Spits, H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, 293–301 (2015).
18. Cayrol, C. & Girard, J. P. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 9021–9026 (2009).
19. Luthi, A. U. et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31, 84–98 (2009).
20. Syh-Jae Lin, Yen-Chang Lee, Dah-Chin Yan, Ming-Ling Kuo; Chapter Thirty-Eight - Natural killer cells in allergy, Editor(s): Michael T. Lotze, Angus W. Thomson, *Natural Killer Cells*, Academic Press, Pages 511-517 (2010).
21. Deniz G, van de Veen W, Akdis M. Natural killer cells in patients with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Sep;132(3):527-535. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.030.
22. Wei H, Zhang J, Xiao W, Feng J, Sun R, Tian Z. Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:841-7.
23. Peritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, Aste-Amezaga M, Trinchieri G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 1998;161:5821-4
24. Gunnur Deniz & Mubeccel Akdis (2011) NK cell subsets and their role in allergy, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11:7, 833-841, DOI: 10.1517/14712598.2011.572549
25. Mori F, Angelucci C, Cianferoni A, et al. Increase of natural killer cells in children with liver transplantation-acquired food allergy. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2018;46(5):447-453. doi:10.1016/j.aller.2017.09.030.
26. Crisafulli G, Caminiti L, Pajno GB (2012) Oral desensitization for immunological E-mediated milk and egg allergies. *Isr Med Assoc J* 14:53–56.

27. SAARINEN K M , JUNTUNE-BACKMAN K, et al. Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: a prospective study of 6209 infants. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:457-61.
28. Saarinen KM1, Pelkonen AS, Mäkelä MJ, Savilahti E. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Oct;116(4):869-75. Epub 2005 Aug 19.
29. Tole JW, Lieberman P. Biphasec ana- phylaxis: review of incidence, clinical predictors, and observation recommendations. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007;27:309-26.
30. Guia prático da APLV mediada pela IgE. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* – Vol. 35. N° 6, 2012
31. Benhamou A.H.; Schäppi Tempia, M.G.; Belli, D.C.; Eigenmann P.A. An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss Med Wkly*, 139 (21–22): 300–307, 2009.
32. Sampson, H.A. Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113 (5): 805-8019, 2004.
33. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 7ª edição, 2012.
34. Cullen BR: Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*. 2004, 16: 861-865. 10.1016/j.molcel.2004.12.002.
35. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD: The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. 1999, 402 (6760 Suppl): B12-17.
36. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD: Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998, 282 (5397): 2258-2261
37. Bartel D: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–233.
38. Lu T, Rothenberg M: Diagnostic, functional and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013:132.
39. Liu T, Munitz A, Rothenberg M: Micro-RNA-21 is up-regulated in allergic airway in- flammation and regulates IL-12p35 expres- sion. *J Immunol* 2009;182:4994–5002.
40. Zhang X, Zhang Y, Li H, Hu C, Wang N, Cao P: Overexpression of miR-125b, a novel regu- lator of innate immunity, in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:140–151.

41. Solé, D.; Silva, L.R.; Filho, N.A.R.; Sarni, R.O.S. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2007. *Rev. Méd. Minas Gerais*, 18 (1 Supl 1): S1-S44, 2008.
42. Sicherer SH, Sampson HA Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Feb;133(2):291-307, 2013.
43. Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, et al. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy* 62:1261–69, 2007.
44. Longo G, Barbi E, Berti I, et al. 2007. Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J. Allergy Clin. Immunol*. 121:343–47, 2007.
45. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, et al. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J. Allergy Clin. Immunol*. 120:707–13, 2007
46. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Kozarov E et al. Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Front Microbiol*. 2015 Jan 13;5:781
47. GANESHAN, K.; NEILSEN, C.V.; HADSAITONG, A. et al. Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: A new murine food allergy model. *J Allergy Clin Immunol*; 123: 231-238, 2009.
48. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*. 2004, 16: 861-865. 10.1016/j.molcel.2004.12.002.
49. Bartel D: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–233.
50. Lu T, Rothenberg M: Diagnostic, functional and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:
51. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD: The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. 1999, 402 (6760 Suppl): B12-17.
52. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD: Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998, 282 (5397): 2258-2261.
53. Liu T, Munitz A, Rothenberg M: Micro-RNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J Immunol* 2009;182:4994–5002.

54. Zhang X, Zhang Y, Li H, Hu C, Wang N, Cao P: Overexpression of miR-125b, a novel regulator of innate immunity, in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:140–151.
55. Motrich RD, Gottero C, Rezzonico C, Rezzonico C, Riera CM, Rivero V. Cow's milk stimulated lymphocyte proliferation and TNF $\alpha$  secretion in hypersensitivity to cow's milk protein. *Clin Immunol*. 2003 Nov;109(2):203-11.
57. Wong P, Intragumtornchai T. Hospital-acquired anemia. *J Med Assoc Thai*. 2006 Jan;89(1):63-7. PMID: 16583583.
58. Chinen T, Kannan AK, Levine AG et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol* 2016 Nov;17(11):1322-1333.
59. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreessen R, Edinger M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):895-903. Epub 2004 Apr 15
60. Azouz NP, Rothenberg ME. Mechanisms of gastrointestinal allergic disorders. *J Clin Invest*. 2019;129(4):1419-1430. Published 2019 Mar 11. doi:10.1172/JCI124604
61. Skripak JM, Nash SD, Rowley H, Brereton NH, Oh S, Hamilton RG, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:1154-60.
62. Vickery BP, Scurlock AM, Kulis M, Steele PH, Kamilaris J, Berglund JP, et al. Sustained unresponsiveness to peanut in subjects who have completed peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:468-75.
63. Vickery BP, Lin J, Kulis M, Fu Z, Steele PH, Jones SM, et al. Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4 responses to major peanut allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:128-34.e3.
64. Bedoret D, Singh AK, Shaw V, Hoyte EG, Hamilton R, Dekruyff RH, et al. Changes in antigen-specific T-cell number and function during oral desensitization in cow's milk allergy enabled with omalizumab. *Mucosal Immunol* 2012;5:267-76.
65. Oka T, Rios EJ, Tsai M, Kalesnikoff J, Galli SJ. Rapid desensitization induces internalization of antigen-specific IgE on mouse mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:922-32.e16.
66. Gernez Y, Nowak-Węgrzyn A. Immunotherapy for Food Allergy: Are We There Yet? [published correction appears in *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017

Jul - Aug;5(4):1167]. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(2):250-272. doi:10.1016/j.jaip.2016.12.004

67. Syed A, Garcia MA, Lyu SC, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, et al. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:500-10.

68. Schulke S. Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Front Immunol.* 2018;9:455.

69. Chinthrajah RS, Hernandez JD, Boyd SD, Galli SJ, Nadeau KC. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2016; 137:984– 997. [PubMed: 27059726]

70. Wawrzyniak M, O'Mahony L, Akdis M. Role of Regulatory Cells in Oral Tolerance. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2017; 9:107–115. [PubMed: 28102055]

71. Azouz NP, Rothenberg ME. Mechanisms of gastrointestinal allergic disorders. *J Clin Invest.* 2019;129(4):1419-1430. Published 2019 Mar doi:10.1172/JCI124604

72. Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- $\gamma$  secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol.* 1995;154:4187–4194.

73. Sanchez, A. M. & Yang, Y. The role of natural regulatory T cells in infection. *Immunol. Res.* 49, 124–134 (2011).

74. Veiga-Parga, T., Sehrawat, S. & Rouse, B. T. Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol. Rev.* 255, 182–196 (2013).

75. Brincks, E. L. et al. Antigen-specific memory regulatory CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells control memory responses to influenza virus infection. *J. Immunol.* 190, 3438–3446 (2013).

76. Moser, E. K., Hufford, M. M. & Braciale, T. J. Late engagement of CD86 after influenza virus clearance promotes recovery in a FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell dependent manner. *PLoS Pathog.* 10, e1004315 (2014).

77. Cayrol C, Duval A, Schmitt P, et al. Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. *Nat Immunol.* 2018;19(4):375-385. doi:10.1038/s41590-018-0067-5.

78. Cayrol, C. & Girard, J. P. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 31C,31–37 (2014).
79. Molofsky, A. B., Savage, A. K. & Locksley, R. M. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation. *Immunity* 42, 1005–1019 (2015). 18. Liew, F. Y., Girard, J. P. & Turnquist, H. R. Interleukin-33 in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 676–689 (2016).
80. Cayrol, C. & Girard, J. P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol. Rev.* 281, 154–168 (2018).
81. Alvarez, F., Istomine, R., Shourian, M. et al. The alarmins IL-1 and IL-33 differentially regulate the functional specialisation of Foxp3+ regulatory T cells during mucosal inflammation. *Mucosal Immunol* 12, 746–760 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0153-5>
82. Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 2010;36:274-88.
83. Gunnur Deniz & Mubeccel Akdis (2011) NK cell subsets and their role in allergy, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11:7, 833-841
84. Scordamaglia F, Balsamo M, Scordamaglia A, et al. Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:479-85
85. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Ebert G, et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:145-9.
86. Klose CS, Flach M, Mohle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* 2014;157:340-56.
87. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(3):626-635. doi:10.1016/j.jaci.2014.11.001
88. Molofsky AB, Van Gool F, Liang HE, Van Dyken SJ, Nussbaum JC, Lee J, et al. Interleukin-33 and interferon-gamma counter-regulate group 2 innate lymphoid cell activation during immune perturbation. *Immunity.* (2015) 43:161–74. doi: 10.1016/j.immuni.2015.05.019

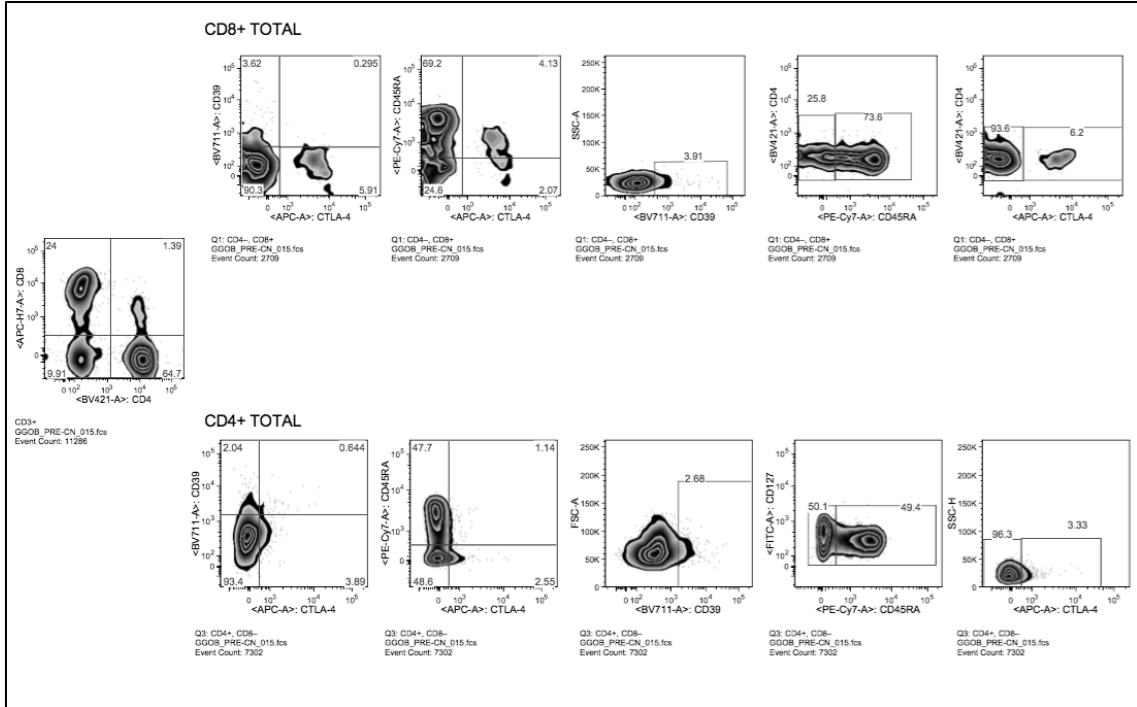
87. Tordesillas L, Berin MC. Mechanisms of Oral Tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018 Oct;55(2):107-117. doi: 10.1007/s12016-018-8680-5. PMID: 29488131; PMCID: PMC6110983.

89. Wambre E, Jeong D. Oral Tolerance Development and Maintenance. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018 Feb;38(1):27-37. doi: 10.1016/j.iac.2017.09.003. Epub 2017 Oct 26. PMID: 29132672; PMCID: PMC5776674.

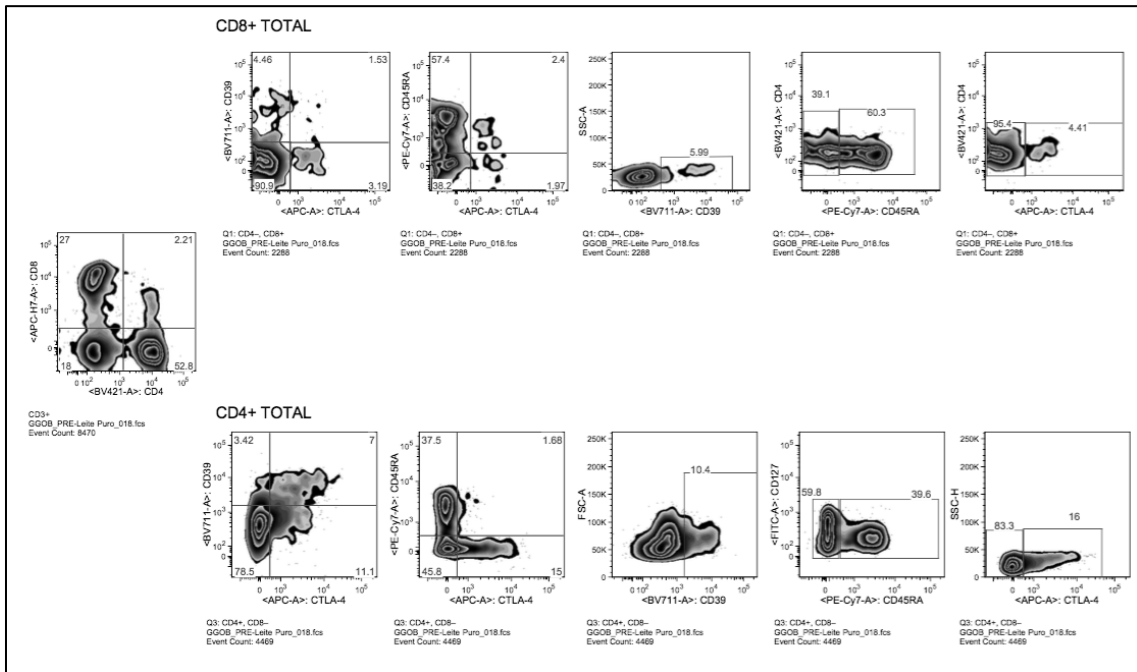
## APÊNDICE

*Dot plots* dos testes de imunofenotipagem comparando o perfil de Treg dos alérgicos em tratamento versus tolerantes.

### Avaliação do perfil Treg no grupo alérgico OIT, Controle Negativo (Paciente 2)

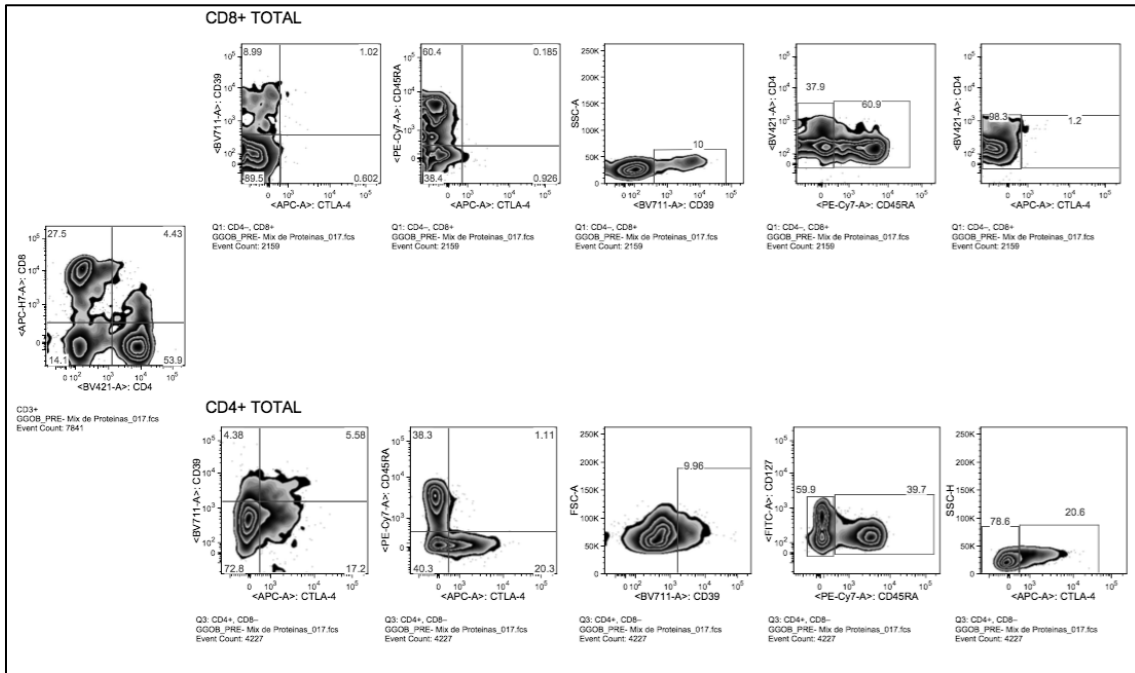


### Avaliação do perfil Treg no grupo alérgico OIT, amostra pré (Paciente 2) – Leite puro

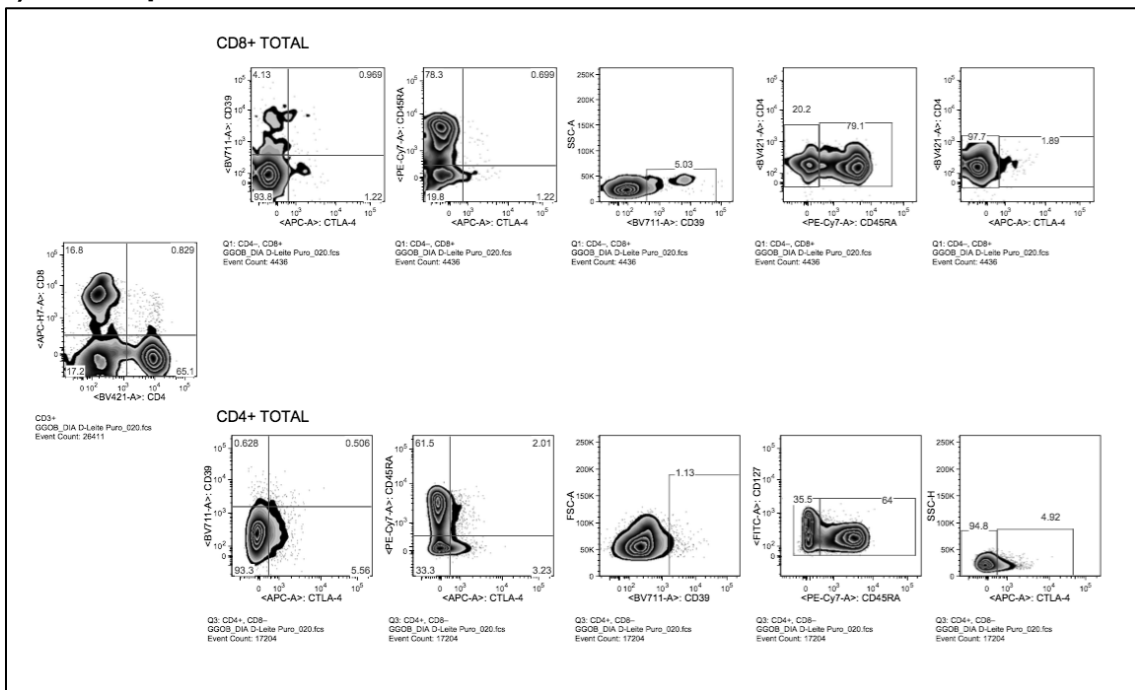




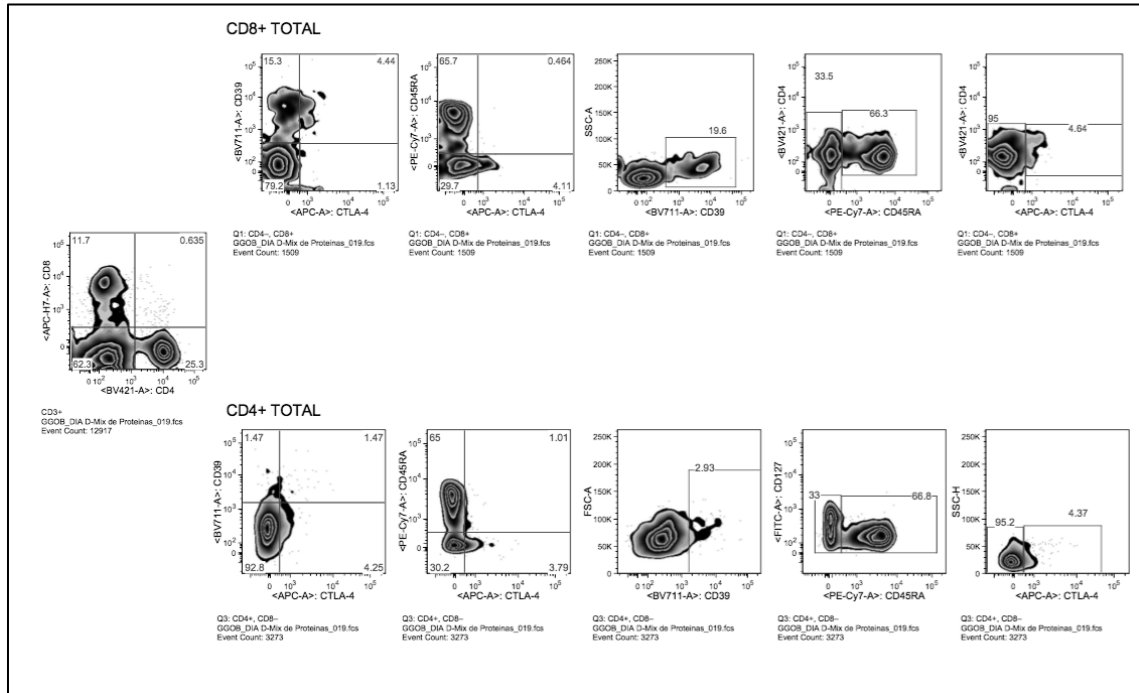
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgico OIT, amostra pré (Paciente 2) – Mix de proteínas



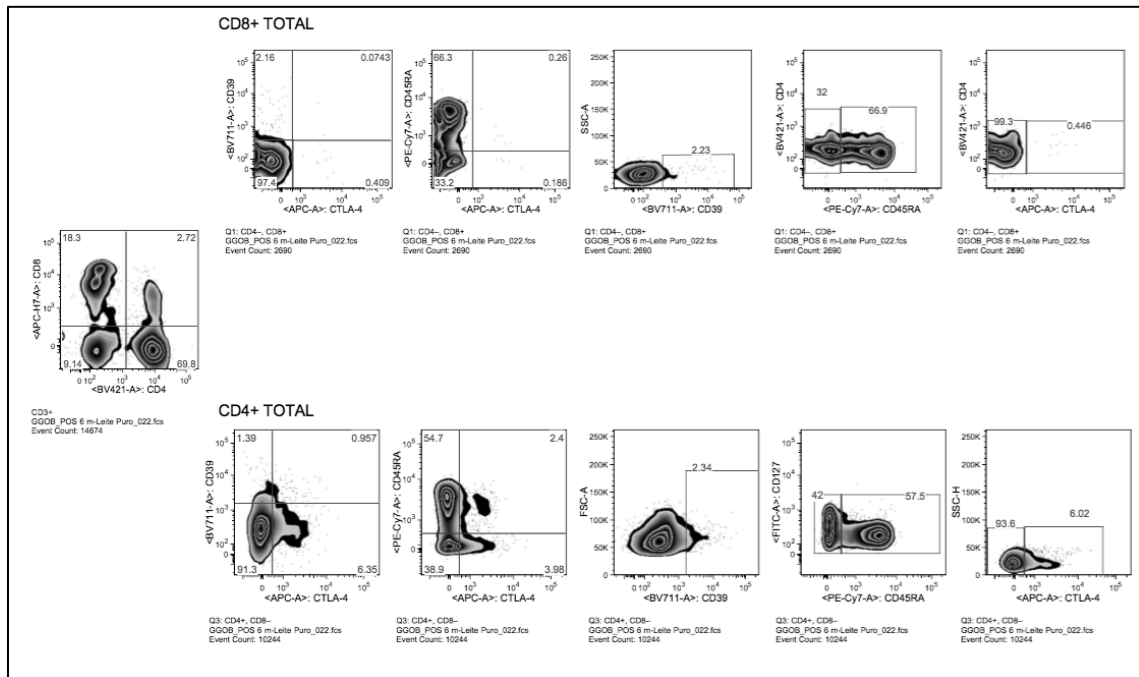
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgicos OIT, amostra dia D (Paciente 2) – Leite puro



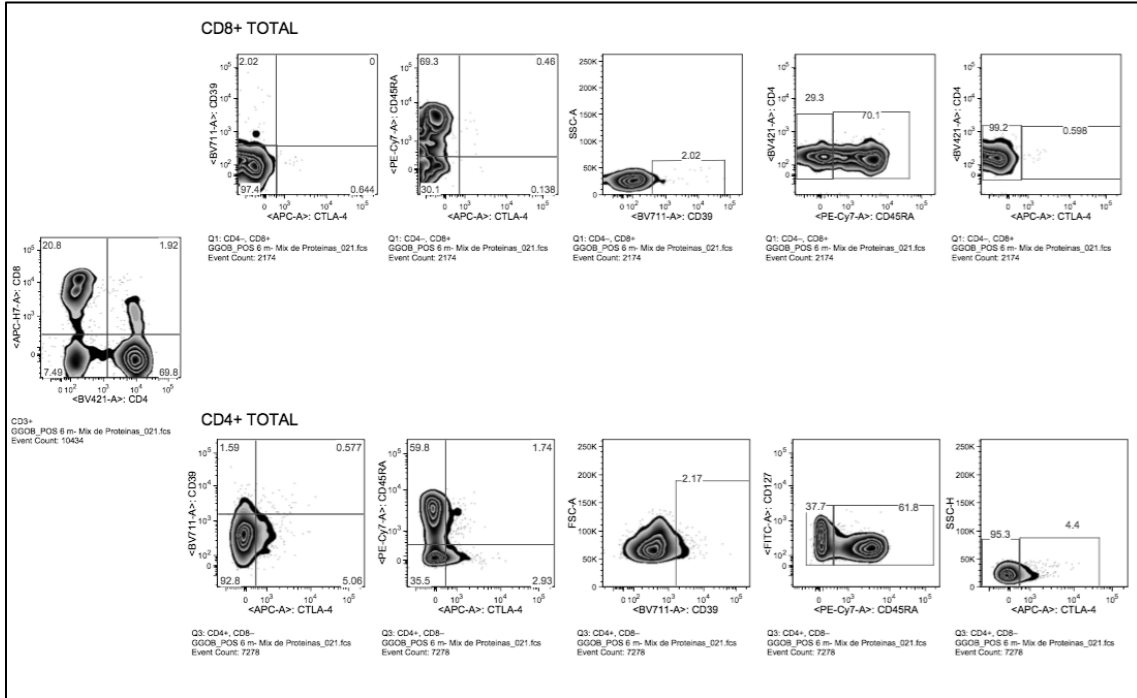
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgico OIT, amostra dia D (Paciente 2) – Mix de proteínas.



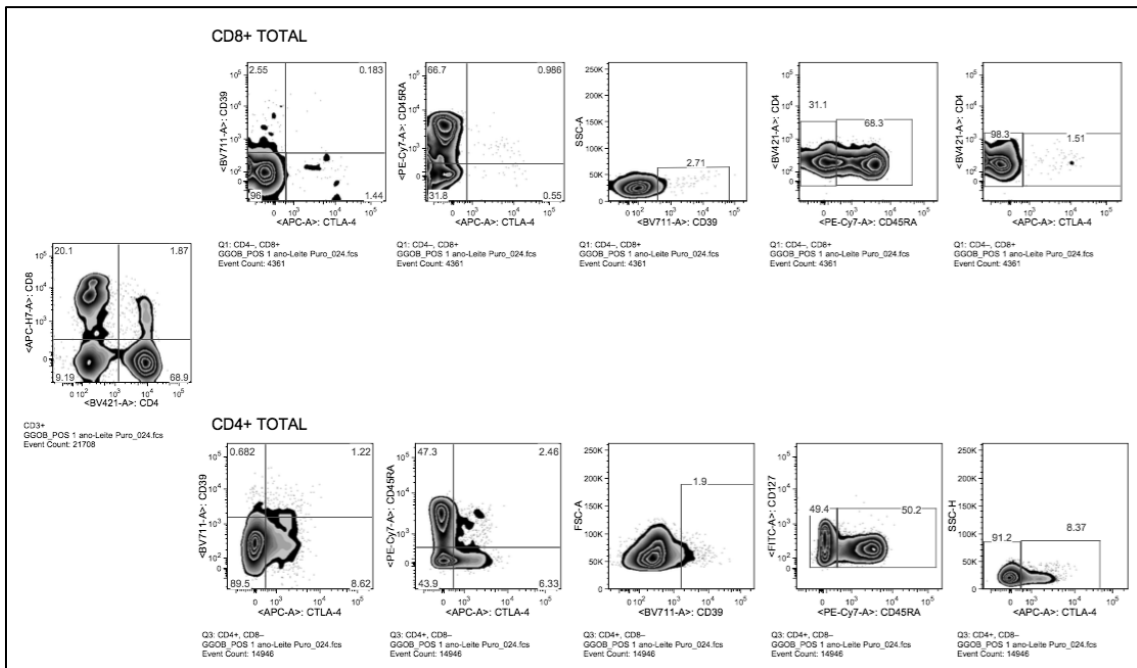
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgico OIT, amostra pós 6 meses (Paciente 2) – Leite puro



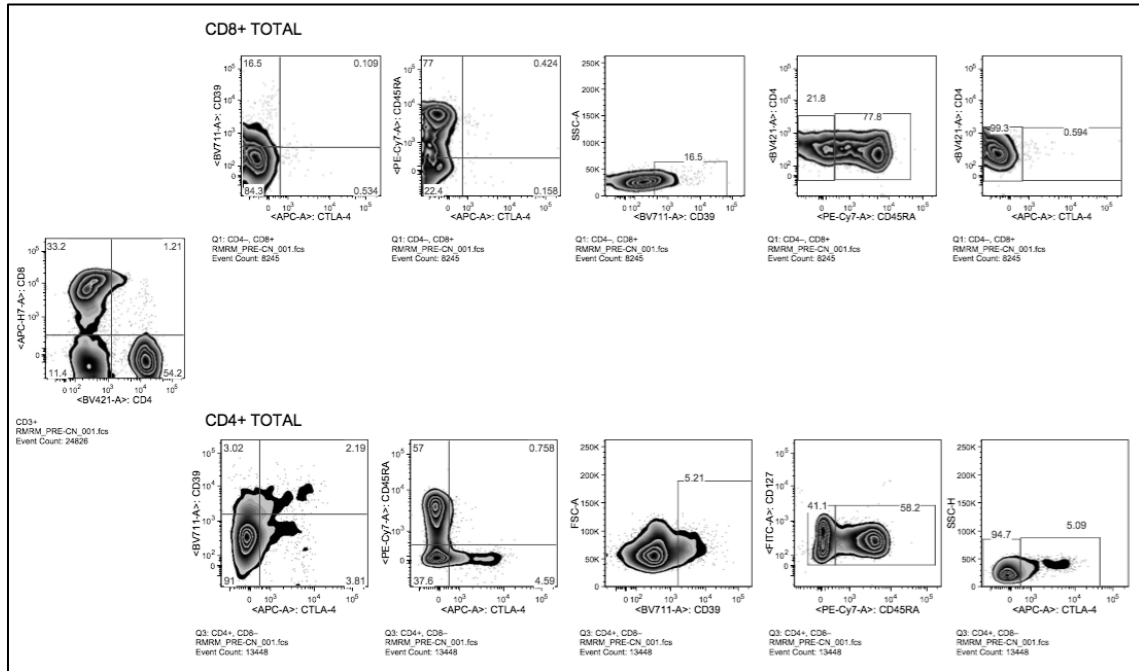
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgico OIT, amostra pós 6 meses (Paciente 2) – Mix de proteínas



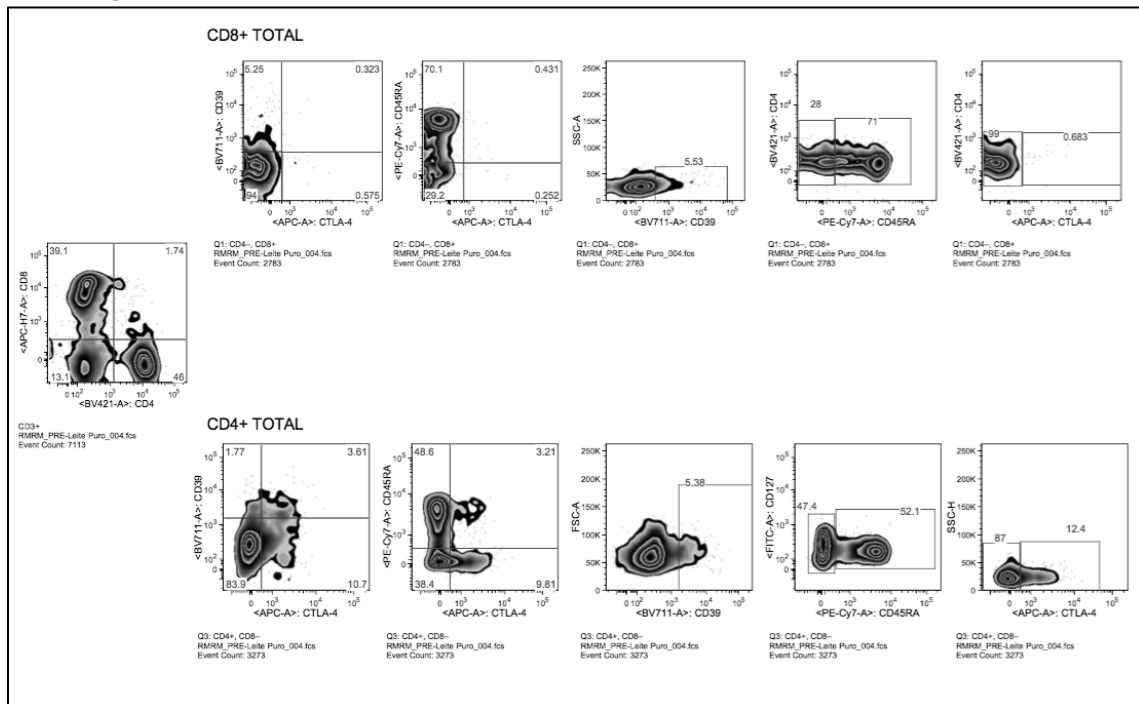
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgico OIT, amostra pós 1 ano (Paciente 2) – Leite Puro



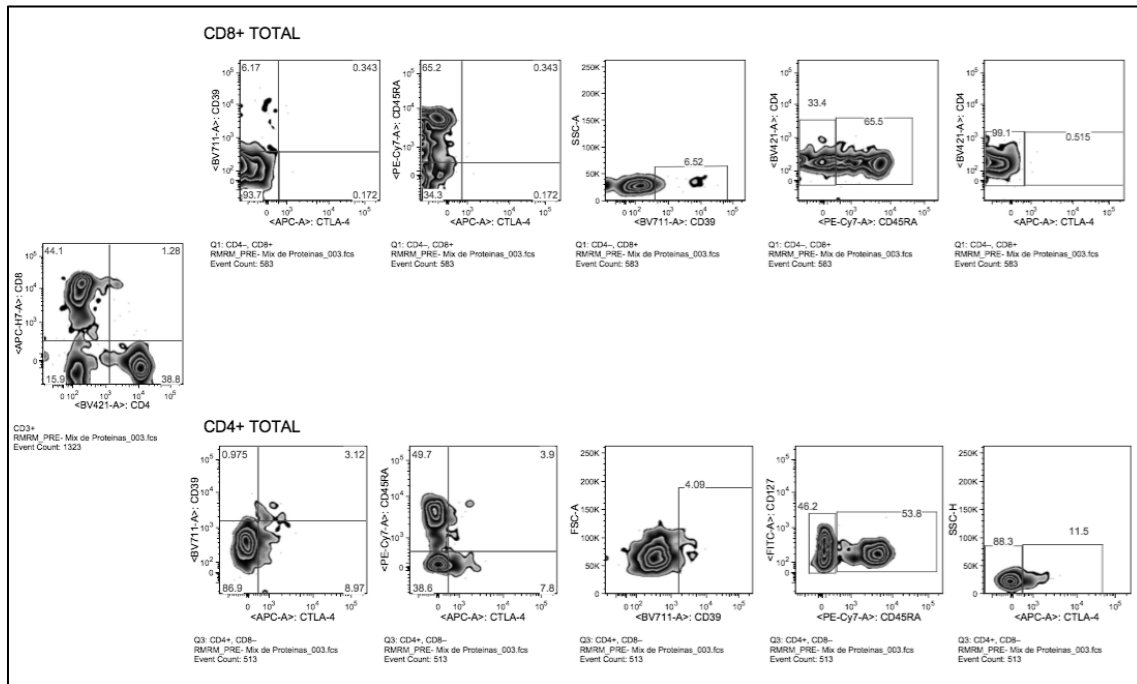
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgicos OIT (Paciente 1) – Controle Negativo



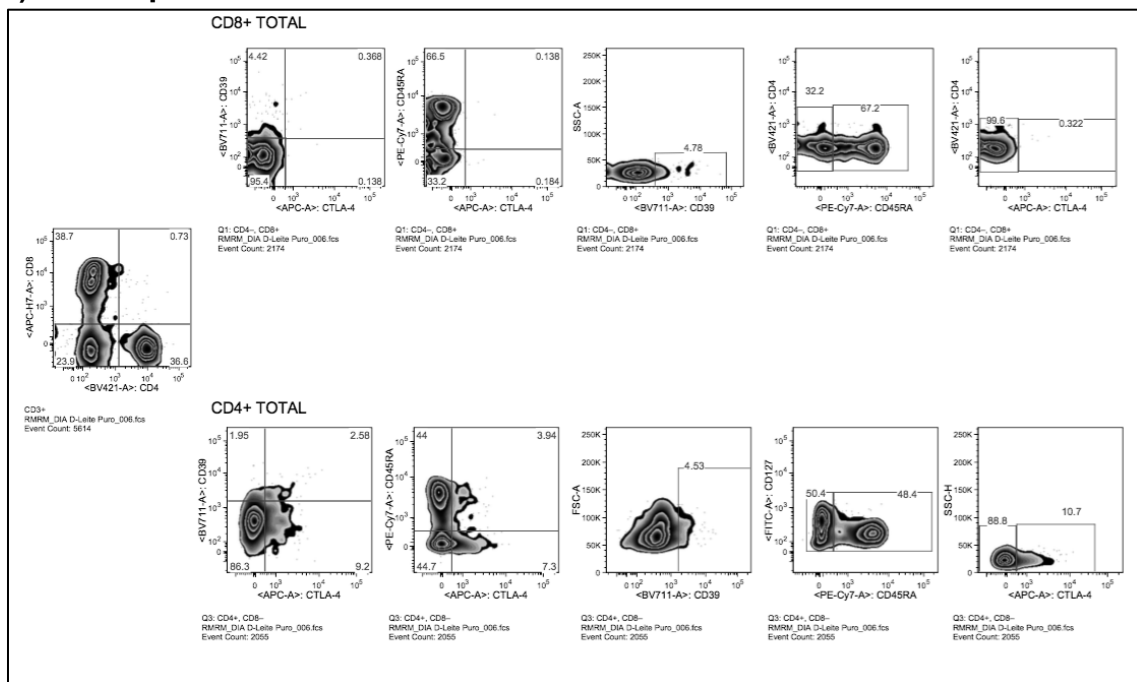
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgicos OIT, amostra pré (Paciente 1) – Leite puro



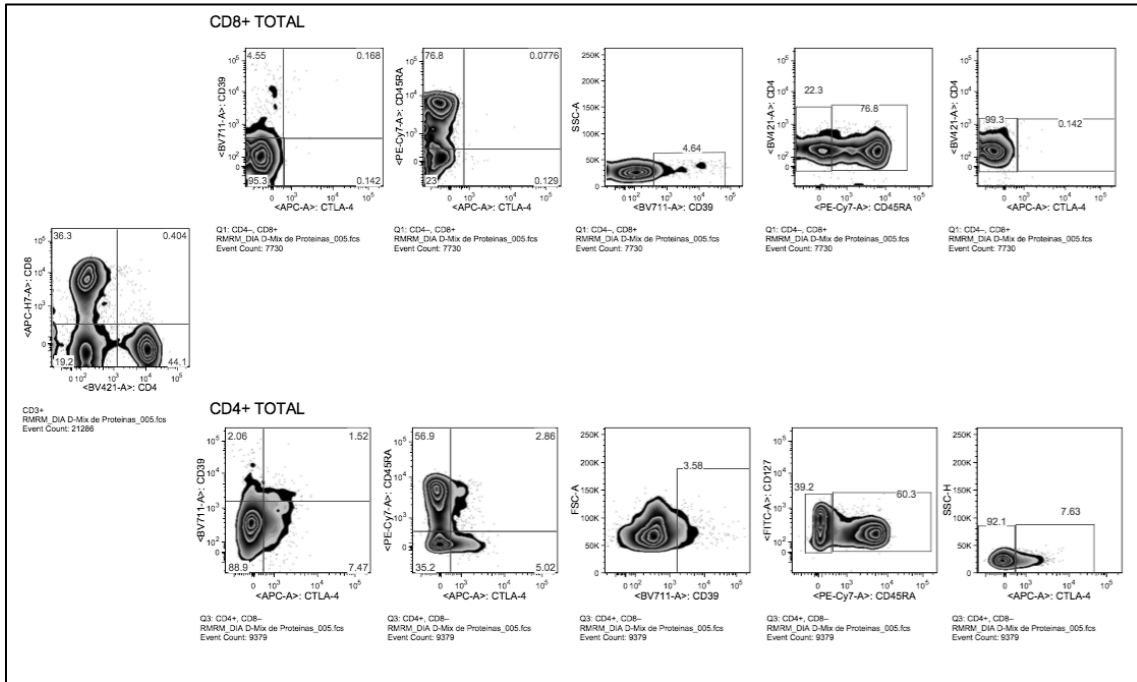
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgicos OIT, amostra pré (Paciente 1) – Mix de proteínas



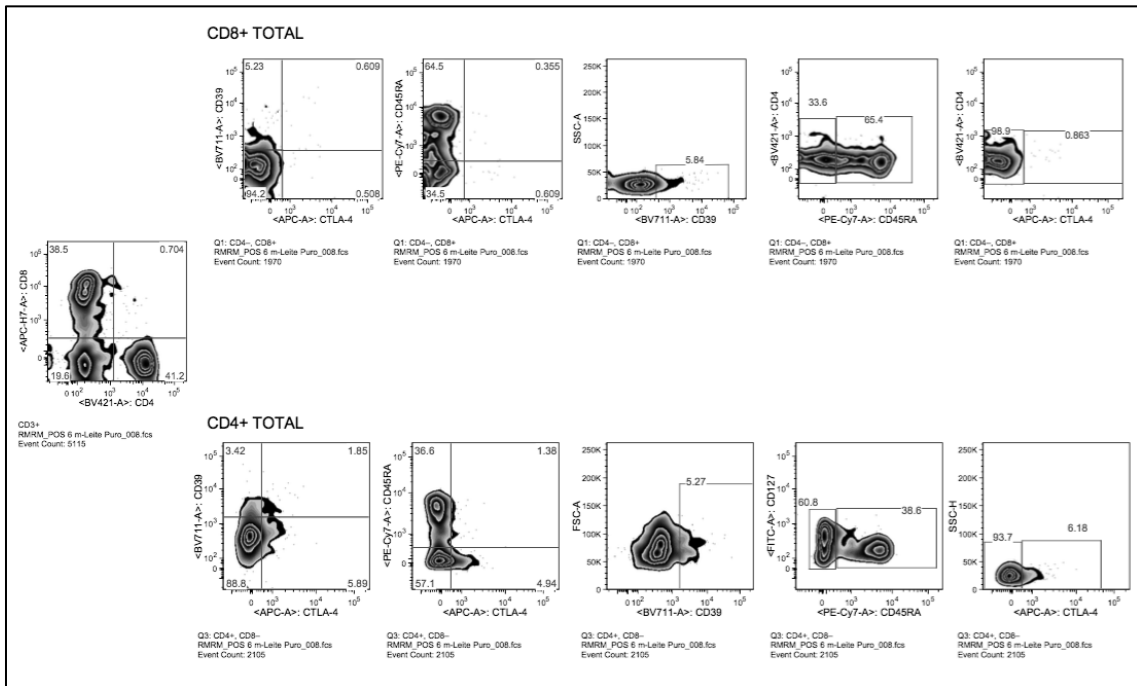
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgicos OIT, amostra dia D (Paciente 1) – Leite puro



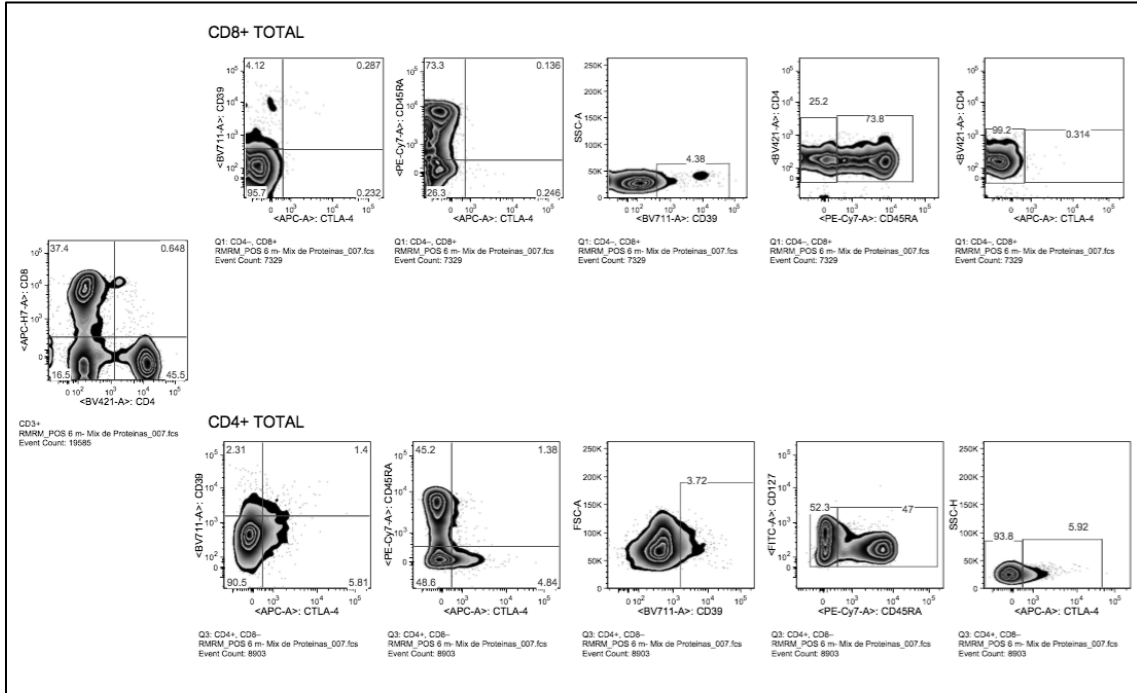
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgicos OIT, amostra dia D (Paciente 1) – Mix de proteínas



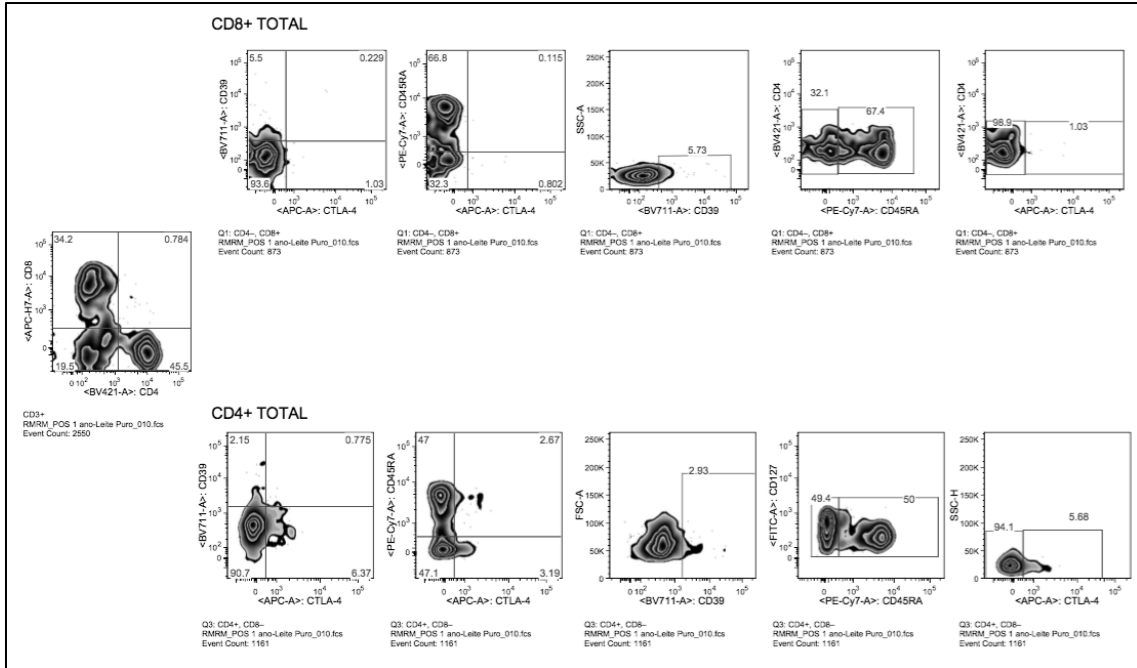
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgicos OIT, amostra pós 6 meses (Paciente 1) – Leite puro



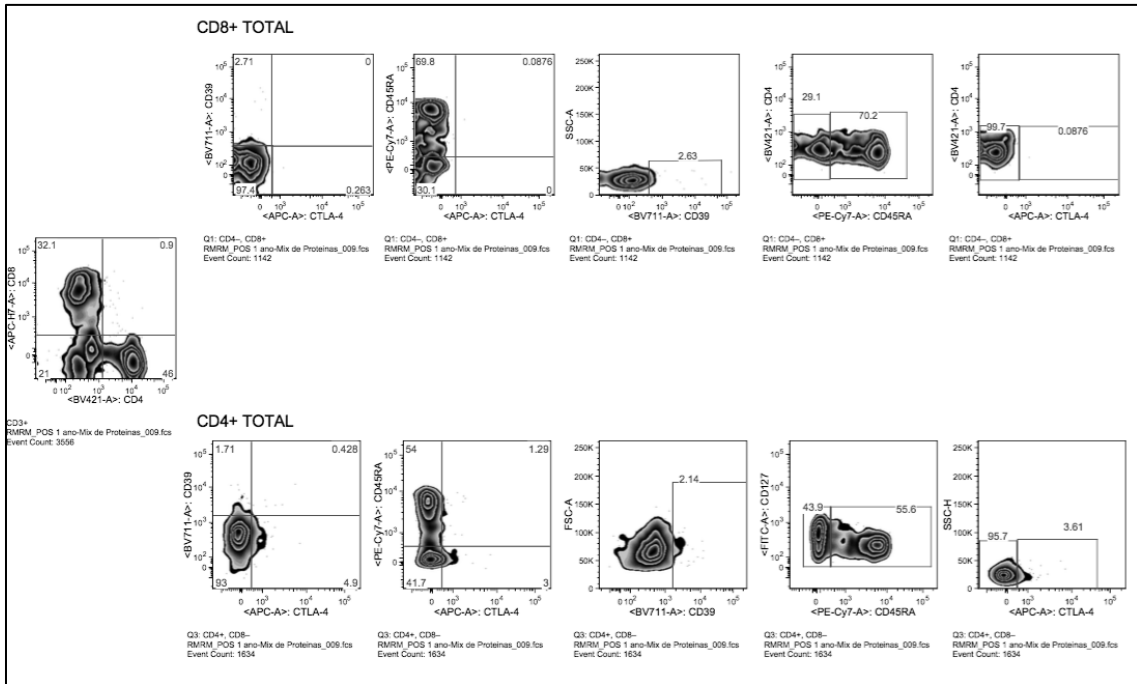
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgicos OIT, amostra pós 6 meses (Paciente 1) – Mix de proteínas



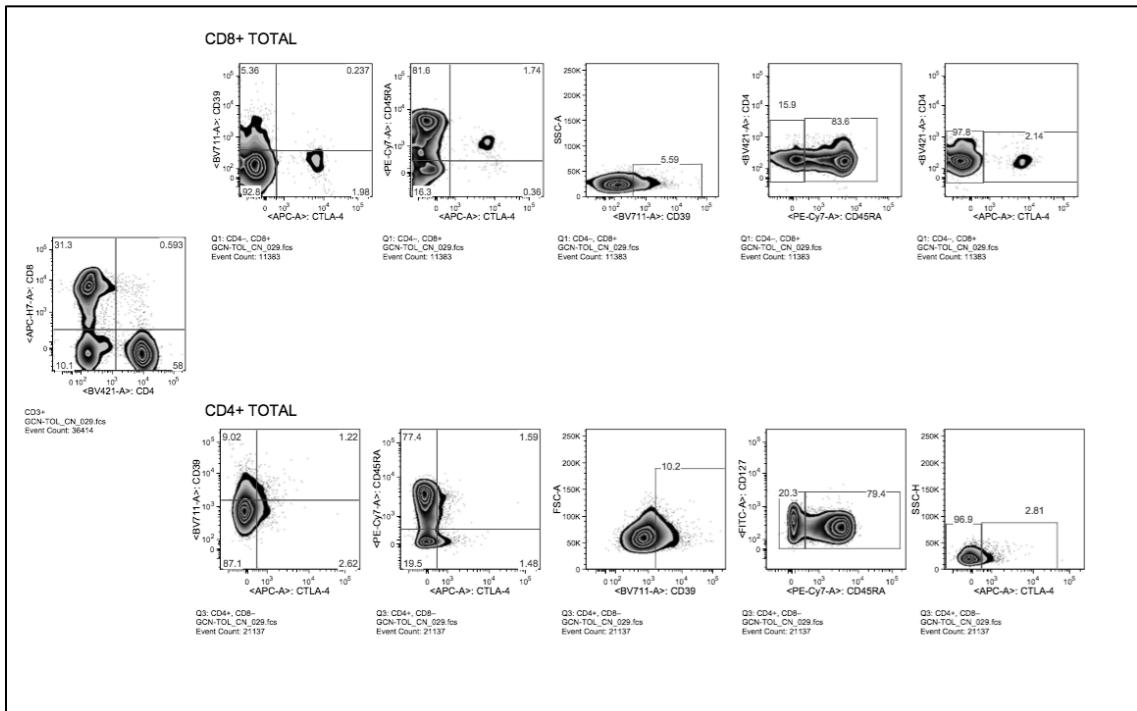
## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgicos OIT, amostra pós 1 ano (Paciente 1) – Leite puro



## Avaliação do perfil Treg no grupo alérgicos OIT, amostra pós 1 ano (Paciente 1) – Mix de proteínas

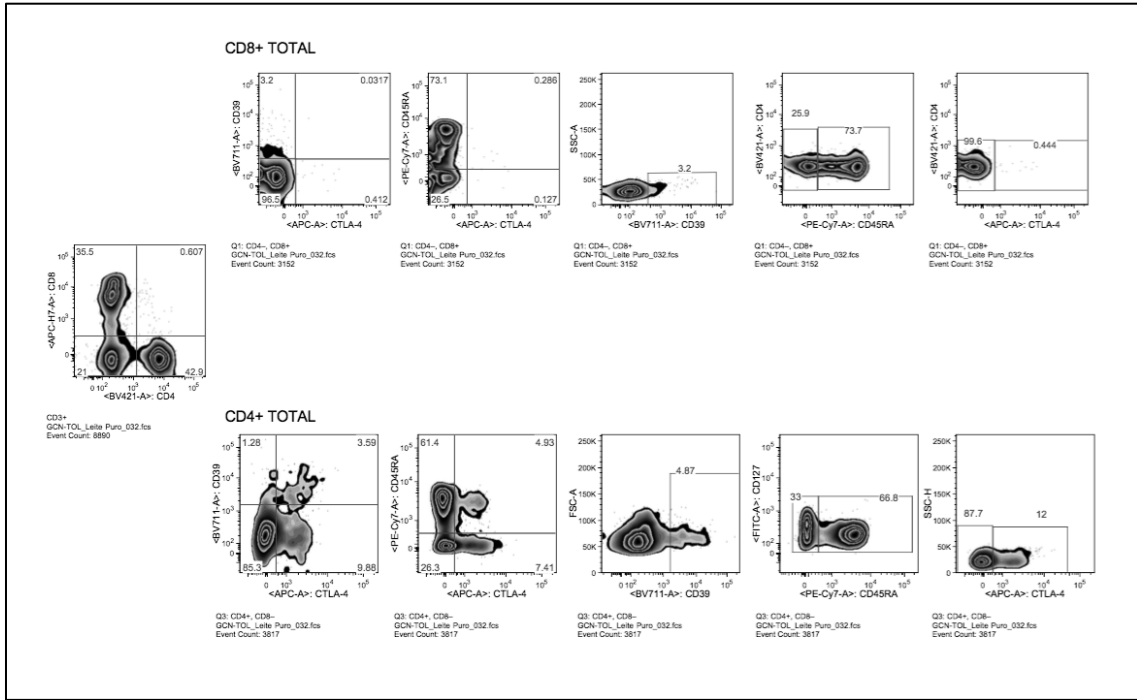


## Avaliação do perfil Treg no grupo Tolerante (Paciente 2) – Controle Negativo

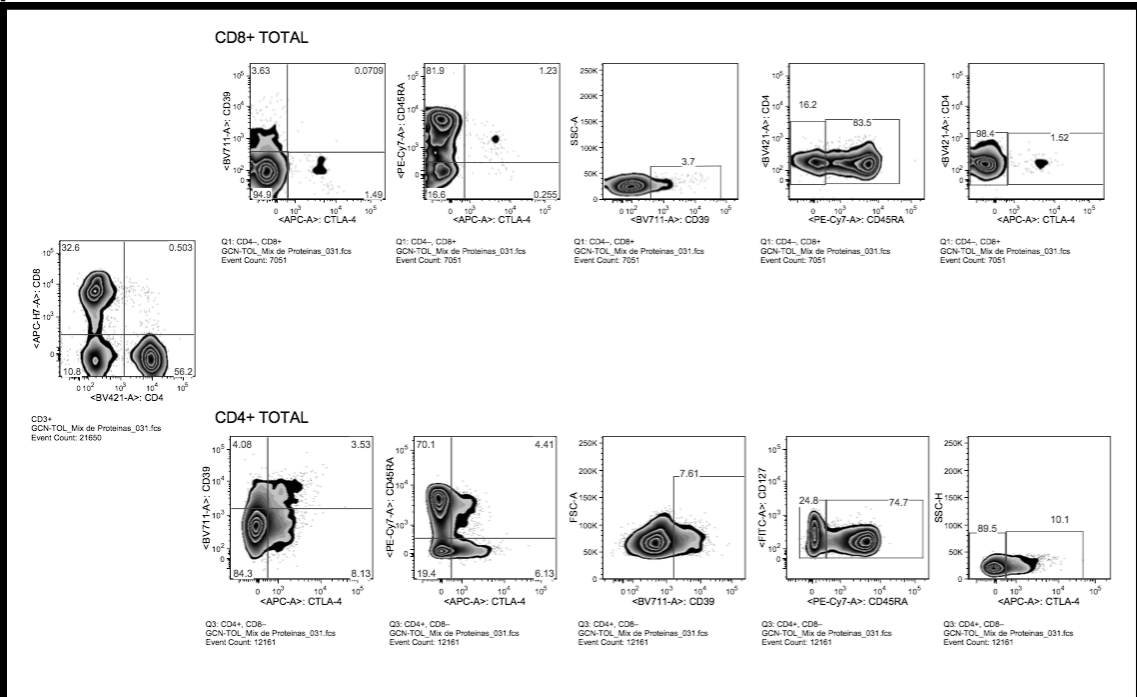




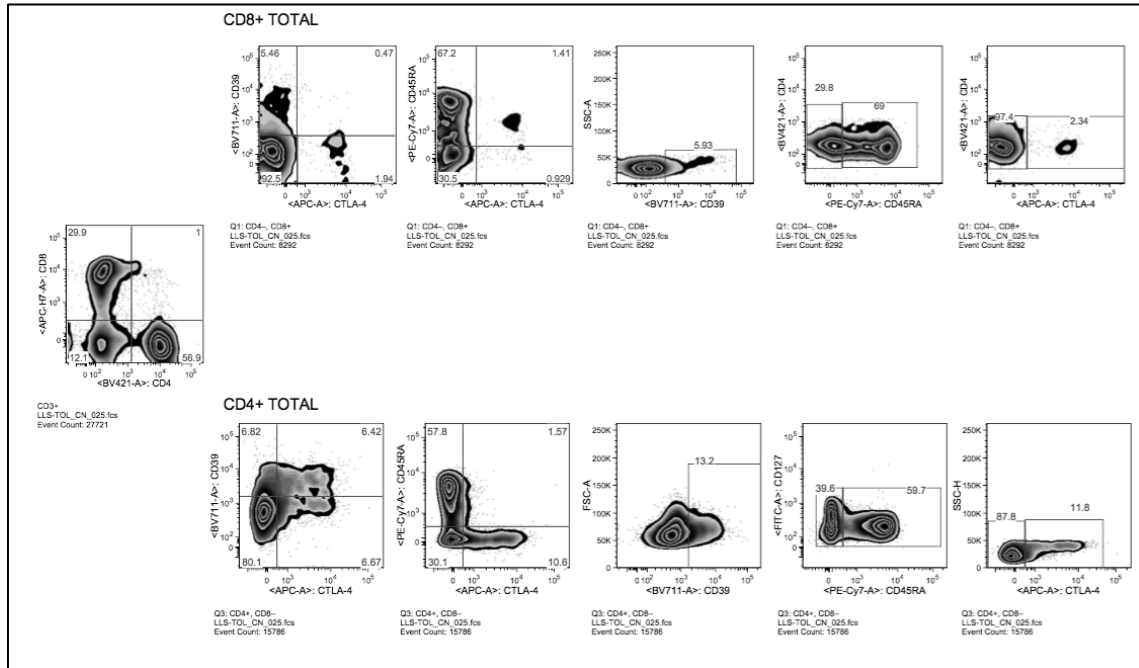
## Avaliação do perfil Treg no grupo Tolerante (Paciente 2) – Leite puro



## Avaliação do perfil Treg no grupo Tolerante (Paciente 2) – Mix de proteínas



## Avaliação do perfil Treg no grupo tolerante, controle negativo (Paciente 3)



## Avaliação do perfil Treg no grupo tolerante (Paciente 3) – Leite puro

