



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas



Modulação da produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico de pacientes atópicos por vesículas extracelulares oriundas de células mononucleares de sangue periférico de pacientes não atópicos

Helena Maria Caleiro Acerbi Penha

UBERLÂNDIA
JANEIRO 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- A173m Acerbi, Helena Maria Caleiro, 1958-
2015 Modulação da produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico de pacientes atópicos por vesículas extracelulares oriundas de células mononucleares de sangue periférico de pacientes não atópicos / Helena Maria Caleiro Acerbi. - 2015.
103 f. : il.
- Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Alergia - Teses. 3. Exossomos - Teses. 4. Citocinas - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.



Modulação da produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico de pacientes atópicos por vesículas extracelulares oriundas de células mononucleares de sangue periférico de pacientes não atópicos

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora.

Helena Maria Caleiro Acerbi Penha

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Banca Examinadora:

Uberlândia, 30 de janeiro de 2015.

Prof. Dr. Régis de Albuquerque Campos
UFBA

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior
UFTM

Prof. Dr. Boscolli Barbosa Pereira
INGEB/UFU

Dra. Danielle Reis Napolitano
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi – orientador
ICBIM/UFU

Dedicatória



Aos meus amores de uma vida inteira:

- meus pais, Joaquim e Marly, pelo incentivo intelectual, dedicação e amor incondicionais;*
- meus irmãos, Joaquim Mário, Múcio Ricardo, Túlio Augusto, Luísa Maria, Raíssa Maria, Estêvão Márcio e Paulo Sânzio, que são os amigos de todas as horas;*
- meu marido, Cesar, pelo apoio logístico e pela compreensão;*
- meus filhos, Cesar Jr., Giovanna e Fabianna, por serem fonte de tanto amor, felicidade e orgulho.*

Epígrafe



“Quem elegera a busca, não pode recusar a travessia...”

Guimarães Rosa¹

1. Guimarães Rosa: médico, diplomata e romancista brasileiro autor de Grande Sertão: Veredas (1956).

Agradecimentos



São tantos os motivos para agradecer, graças a Deus, pelos momentos inesquecíveis, pelas pessoas incríveis que atravessam nosso caminho e nos permitem ser melhores, pois nos ajudam a realizar, mais que um projeto de pesquisa, um projeto de vida:

Ao Prof. Dr. **Ernesto Akio Taketomi**, por me receber como orientanda, por confiar em mim e no meu trabalho;

Ao Prof. Dr. **Jair da Cunha Jr.** por sua disponibilidade e colaboração;

À Profa. Dra. **Mônica Camargo Sopelete**, pelos ensinamentos, pelo apoio e pelo artigo publicado;

À Profa. Dra. **Fernanda Maria Santiago** pela força, pelo convite para compor uma banca de defesa de TCC e pelo convite para escrever um artigo;

À amiga querida, **Juliana**, pela ajuda, pela companhia, pela paciência e pelos momentos de “cultura”;

Aos amigos, participantes do projeto como voluntários e sempre presentes companheiros do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica: **Bianca, Jade, Paula, Lucas, Gabriela, Greice**, pela ajuda, pelos ensinamentos, pelo carinho e pelos momentos de descontração;

Aos amigos, alguns participantes do projeto como voluntários do Laboratório de Imunoparasitologia: Prof. Dr. **Thiago Mineo, Ana Cláudia, Maraísa, Carol, Vanessa, Patrick**, pela ajuda e pela força;

À **Renata Roland Teixeira** por seu apoio técnico no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular para a realização da ultracentrifugação;

Ao Prof. Dr. **Foued Salman Espíndola**, por ceder tão gentilmente o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular;

Ao Prof. Dr. **Marcelo Belleti** por disponibilizar o Laboratório de Histologia para confecção de imagens deste trabalho;

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia, **Marley, Max, Edilge, Zilda**, pela gentileza, disponibilidade e apoio técnico;

Às amigas queridas, **Bárbara, Daniela, Isabella e Laura**, que passaram pelo Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, mas que ainda hoje, mesmo de longe, continuam me transmitindo energias positivas;

Às secretárias do Programa de Imunologia e Parasitologia Aplicadas, **Lucileide e Lucélia**, pela eficiência, atenção e pronto atendimento durante todo o Doutorado;

Ao professor Dr. Marcelo Emílio Beletti do Laboratório de Histologia da UFU pela colaboração com a Microscopia Eletrônica;

À FAPEMIG pelo apoio financeiro;

Aos ilustres professores de minha Banca de Qualificação de Doutorado: Dr. ***Tiago Wilson Patriarca Mineo***, Dra. ***Mônica Camargo Sopelete*** e Dra. ***Bellisa Freitas Barbosa***;

Aos ilustres professores da Banca de Defesa de Tese: Dr. ***Régis de Albuquerque Campos***, Dr. ***Virmondes Rodrigues Jr.***, Dr. ***Boscolli Barbosa Pereira***, Dra. ***Daniele Reis Napolitano***.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Soro albumina bovina
Bet v 1	Alérgeno 1 de pólen de bétula
CCL5	Quimiocina ligante 5
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , grupo de diferenciação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMV	Corpos multivesiculares
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CP	Corpos apoptóticos
CpG	Dinucleotídeo citosina fosfato guanina
CTA	Comissão de Terminologia Acadêmica
DC	Célula dendrítica
DO	Densidade Óptica
DAB	3, 3'-diaminobenzina
Dpt	Extrato bruto de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
EAACI	<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked immunosorbent assay</i>
EMV	Endossomo multivesicular
ESCRT	Complexo de classificação endossomal responsável pelo transporte
FasL	Ligante do Tipo Fas
FceRI	Receptor de IgE de alta afinidade do Tipo I
FceRII	Receptor de IgE de alta afinidade do Tipo II
FoxP3	<i>Forkhead/winged helix transcription factor</i>
GATA	Fator de transição
GM-CSF	Fator estimulador de colônia macrófago granulócito
GTPase	Enzima hidrolase
HCP	<i>Heat Shock Protein Cognate</i>

HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> (Proteínas de Choque Térmico)
IE	Índice ELISA
IEC	Célula epitelial intestinal
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgD	Imunoglobulina de classe D
IgE	Imunoglobulina de classe E
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
IL	Interleucin (Interleucina)
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i> (Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância)
LTC	Leucotrienos
MHC I e II	Complexo de histocompatibilidade principal I e II
Mr	Massa molecular relativa
MP	Membrana plasmática
MUC 1	Glicoproteína mucina 1
NCBI	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa-B
NK	<i>Natural Killer cell</i> (Células Matadoras Naturais)
OVA	Ovalbumina
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	PBS adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	PBS adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-L	PBS adicionada de Tween 20 e leite em pó desnatado
PCR	<i>Polymerase Reaction Chain</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
PGD	Prostaglandina do tipo D
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i> (Fitohemaglutinina)
RANTES	Ativação normal de célula T expressa e secretada
Rab	Proteína da família GTPase
RPMI	Meio de cultura do tipo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucléico)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Polycramide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel)
SNARE	<i>Soluble NSF attachman receptor</i>
SNC	Sistema nervoso central
STAT	Sinal de transdução e ativador de transcrição
TMB	Tetrametilbenzedina
T CD4	Linfócito T auxiliar com receptor CD4
T CD4+ CD25+	Linfócito T regulador com receptor CD4 e CD25
TCP	Teste Cutâneo de Puntura
TfR2	<i>Transferrin Receptor 2</i> (Receptor Transferrina 2)
TGF	<i>Transformin Growth Factor</i> (Fator de transformação de Crescimento)
Th1	Linfócito T <i>helper 1</i>
Th2	Linfócito T <i>helper 2</i>
TLR	Receptor do tipo <i>toll like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulador
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Solução de Tris adicionada de HCl (ácido clorídrico)
Tsg101	Proteína ligadora de ubiquitina
Tween 20	<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i> (Monolaurato de
VE	Vesículas extracelulares
VIL	Vesícula intraluminar
VPS4	ATPase que usa energia da hidrólise de ATP
WAO	Organização Mundial de Alergia

Lista de tabelas

Tabela 1. Caracterização demográfica, clínica e sorológica dos participantes 61

Lista de Figuras

Figura 1 Esquema hipotético da participação de vesículas extracelulares na resposta imune na alergia	27
Figura 2 Liberação de Exossomos e microvesículas.....	36
Figura 3 A diversidade de estímulos que induzem respostas imunes de tipo Th2	43
Figura 4 Perfil cinético da produção de VE mensurada por ELISA de captura (4A) e pelo método de <i>Bradford</i> (4B).....	62
Figura 5 Perfil eletroforético de proteínas de vesículas extracelulares geradas por PBMC de participantes não atópicos (n=5) e atópicos (n=10).....	64
Figura 6 <i>Western Blot</i> representativo dos componentes de vesículas extracelulares produzidos por PBMC de participantes não atópicos (n=5) reconhecidos por anticorpos específicos.....	65
Figura 7 Microscopia de transmissão de vesículas extracelulares isoladas de PBMC de participantes atópicos (n=10) e não atópicos (n=5), estimuladas <i>in vitro</i> com PHA, ou extrato total de Dpt, ou meio de cultura completo.....	67
Figura 8 Imunomarcação com partículas de ouro de vesículas extracelulares geradas por PBMC de participantes atópicos (n=10) e não atópicos (n=5), por microscopia de transmissão.....	68
Figura 9A Níveis de IL-4, expressos em pg/mL, mensurados ao 4º dia de cultura em sobrenadantes de PBMC de participantes atópicos (n=10), pela técnica de ELISA de captura.....	70
Figura 9B Níveis de IL-5, expressos em pg/mL, mensurados ao 4º dia de cultura em sobrenadantes de PBMC de participantes atópicos (n=10), pela técnica de ELISA de captura.....	71
Figura 9C Níveis de IL-10, expressos em pg/mL, mensurados ao 4º dia de cultura em sobrenadantes de PBMC de participantes atópicos (n=10), pela técnica de ELISA de captura.....	72

Figura 9D Níveis de IL-17, expressos em pg/mL, ao 4º dia de cultura em sobrenadantes de PBMC de participantes atópicos (n=10), pela técnica de ELISA de captura..... 73

Figura 9E Níveis de IFN- γ , expressos em pg/mL, ao 4º dia de cultura em sobrenadantes de PBMC de participantes atópicos (n=10), pela técnica ELISA de captura..... 74

Quadro 1. Diferentes tipos de vesículas secretadas por células vivas..... 25

Quadro 2. Proteínas já identificadas em vesículas extracelulares..... 29

SUMÁRIO



Lista de Abreviaturas e Siglas	10
Lista de Tabelas	13
Lista de Figuras	14
Sumário	16
Resumo	19
<i>Abstract</i>	21
1. Introdução e Justificativa	
1. 1 Exossomos e Microvesículas	24
1. 2 Composição molecular de vesículas extracelulares	26
1. 3 Biogênese de vesículas extracelulares	30
1. 4 Mecanismos envolvidos na liberação de vesículas extracelulares	32
1. 5 O papel biológico de vesículas extracelulares	33
1. 6 Alergia/atopia.....	37
1. 7 A fisiopatologia na Alergia/Atopia	38
1. 8 Ácaros e alérgenos da poeira domiciliar.....	42
2. Hipóteses	
2. 1 Hipótese 1	45
2. 2 Hipótese 2	45
3. Objetivos	
3.1 Geral	47
3.2 Específicos	47
4. Material e Métodos	
4. 1 Aspectos legais	49
4. 2 Local de trabalho	49
4. 3 Participantes.....	49
4. 4 Teste Cutâneo de Puntura.....	50
4. 5 Amostra de sangue	51
4. 6 Cultura de células mononucleares de sangue periférico	51
4. 7 Isolamento de vesículas extracelulares.....	52
4. 8 Quantificação de proteínas.....	52
4. 9 Quantificação de colesterol.....	53
4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	53
4. 11 <i>Western Blot</i>	54

4. 12 Análise ultraestrutural com imunomarcação	55
4. 13 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	
4. 13. 1 Detecção de CD81.....	56
4. 13. 2 Perfil de citocinas.....	57
4. 14 Análise Estatística	59
4. 15 Biossegurança	59
5. Resultados	
5. 1 Dados demográficos e características dos participantes.....	61
5. 2 Cinética da produção de vesículas extracelulares.....	62
5. 3 Caracterização de vesículas extracelulares	
5. 3. 1 Quantificação de proteínas e colesterol.....	63
5. 3. 2 SDS-PAGE	64
5.3. 2 <i>Western Blot</i>	65
5. 3. 4 Análise ultraestrutural e Imunomarcação por microscopia eletrônica.....	66
5. 5 Perfil de citocinas.....	69
6. Discussão/Conclusão.....	75
7. Referências	84
Anexos	
1. Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa	97
2. Termo de Consentimento	98
3. Anamnese	100
4. Teste Cutâneo de Puntura	102

Resumo



Acerbi, HMC - Modulação da produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico de pacientes atópicos por vesículas extracelulares oriundas de células mononucleares de sangue periférico de pacientes não atópicos. (Tese [Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas]) Uberlândia: Instituto de Ciências Biomédica da Universidade Federal de Uberlândia, MG.

A alergia, uma doença inflamatória crônica, é um problema de saúde pública que afeta a qualidade de vida de milhões de crianças e adultos. Sua prevalência tem aumentado drasticamente em muitos países, principalmente nos países mais industrializados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de vesículas extracelulares isoladas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos não atópicos, alterarem o perfil de resposta imune na Alergia, para um perfil pró-inflamatório ou regulador. As vesículas extracelulares têm origem endossomal (exossomos) ou se originam diretamente da membrana plasmática (microvesículas) da célula que lhes deu origem. São secretadas por um grande número de células, inclusive, as implicadas na alergia, como mastócitos, células dendríticas, linfócitos T e B. São produzidas em condições fisiológicas, e nas patologias, sua secreção mostra-se aumentada. As vesículas extracelulares foram isolados a partir de PBMC de indivíduos não atópicos e caracterizadas quanto ao perfil eletroforético de suas proteínas, quanto à especificidade com técnicas de imunomarcação, como *western blot* e microscopia eletrônica de transmissão para o Receptor transferrina 2 (TFR2), CD63, CD81 e pela análise ultraestrutural. Essas vesículas foram então usadas para estimular as PBMC de indivíduos atópicos. Foi feita análise quantitativa da produção de citocinas em sobrenadante de cultura por método imunoenzimático. As vesículas extracelulares isoladas de PBMC de indivíduos não atópicos, foram capazes de influenciar o perfil de citocinas de indivíduos atópicos, modulando esse perfil, com diminuição nos níveis de IFN- γ e aumento nos níveis de IL-10, induzindo a um perfil de resposta imune com efeito regulador.

Palavras-chave: Alergia. Vesículas extracelulares. Exossomos. Microvesículas. Resposta imune. Citocinas. Eleito regulador.

Abstract



Acerbi, HMC - Modulação da produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico de pacientes atópicos por vesículas extracelulares oriundas de células mononucleares de sangue periférico de pacientes não atópicos. (Tese [Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas]) Uberlândia: Instituto de Ciências Biomédica da Universidade Federal de Uberlândia, MG.

Allergy, a chronic inflammatory disease, is a public health problem that affects the quality of life of millions of children and adults. Its prevalence has increased dramatically in many countries, especially in the industrialized one. The aim of this study was to evaluate the potential of extracellular vesicles isolated from mononuclear cells from peripheral blood (PBMC) of non-atopic individuals, to alter the immune response profile in Allergy, for a proinflammatory or regulatory profile. The extracellular vesicles have endosomal origin (exosomes) or they originated directly from the plasma membrane (microvesicles) of the cell that gave rise to it. They are secreted by a large number of cells, including involved in allergy, like mast cells, dendritic cells, T and B lymphocytes, and are produced under physiological conditions or disease, when their secretion show increased. The extracellular vesicles were isolated from PBMC of non-atopic subjects and analyzed for the electrophoretic profile of proteins, for the specificity with immunostaining technics such as western blot and transmission electron microscopy for the transferrin receptor 2 (TFR2), CD63, CD81 and the ultrastructural analysis. These vesicles were then used to stimulate PBMCs from atopic individuals. Quantitative analysis of cytokine production was made in the culture supernatant by enzyme immunoassay. Extracellular vesicles isolated from PBMC of non-atopic individuals, were able to affect the cytokine profile of atopic subjects, with modulating profile, with lower IFN- γ and increased IL-10 levels, leading to a response profile with immune regulatory effect.

Keywords: Allergy. Extracellular vesicles. Exosomes. Microvesicles. Cytokines. Immune response. Regulatory effects.

1 Introdução e Justificativa



1.1 Exossomos e microvesículas

Para manterem a homostase celular, as células constroem seu microambiente por mecanismos que afetam tanto as células vizinhas, quanto as propriedades bioquímicas do meio extracelular (SHIFRIN et al., 2012). Um desses mecanismos é o fluxo contínuo de moléculas dentro da célula, entre as organelas, onde muitas moléculas que desempenham funções celulares específicas são segregadas e compartmentadas, podendo ser transitórias ou residentes, ou ainda permanecerem em constante movimentação entre as organelas de acordo com as necessidades fisiológicas da célula (ANDERSEN; MANN, 2006).

As células também se comunicam entre si, e essa comunicação é uma característica essencial dos organismos multicelulares e pode ser mediada por contato direto célula-célula (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013), via receptor-ligante, por pontes celulares como os nanotubos (CAMUSSI et al., 2011), por junções celulares, contatos por adesão e por fatores solúveis que podem atuar sobre a mesma célula onde são produzidos, ou em células vizinhas, ou até mesmo atuar a longas distâncias de forma endócrina (TETTA et al., 2013).

Nas últimas décadas, um outro mecanismo para a comunicação intercelular foi descoberto, e ele envolve a transferência intercelular de vesículas extracelulares (VE) (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Os primeiros relatos sobre pequenas estruturas membranosas vertendo a partir da superfície das células e que tinham diversos efeitos biológico foram feitos nas décadas de 60 e 70, de forma independente, em estudos com procariontes e eucariontes. Os pesquisadores descobriram que procariontes secretavam vesículas membranosas com lipopolissacarídeos (LPS) e que a secreção de toxina bacteriana pelo *Vibrio Cholerae* se dava também por meio de vesículas (BISHOP; WORK, 1965; CHATTERJEE; DAS, 1967), essas vesículas são chamadas geralmente de microvesículas, ectossomos, micropartículas,

entre outros (HOLME et al., 1994; HESS et al.; 1999; COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009; GYÖRGY et al., 2011) (Quadro 1).

O termo exossomo foi utilizado inicialmente para nomear vesículas cujo tamanho variava de 40 a 1.000 nm e que eram liberadas por uma grande variedade de células em cultura (TRAMS et al., 1981), porém, a origem subcelular dessas vesículas permaneceu desconhecida até recentemente (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Quadro 1. Diferentes tipos de vesículas secretadas por células vivas.

Vesículas	Exossomos	Microvesículas
Tamanho	50 - 100 nm	100 - 1000 nm
Densidade	1,13–1,19 g/mL	ND
Morfologia	Como taça e bilamelar	Irregulares e eletrodensos
Sedimentação	100.000 x g	10.000 x g
Lipídios	Colesterol, esfingomielina, ceramida, fosfatidilserina	Colesterol Fosfatidilserina
Principais marcadores de Proteínas	Tetraspaninas (CD9, CD63), Alix, Tsg 101	Integrinas, selectinas, ligante CD40
Origem	Endossomos	Membrana plasmática

ND, não determinado; CD, *cluster of differentiation*. Modificado de Mathinavan et al. (2009).

Depois, o termo exossomo foi adotado para nomear vesículas de 30 a 100 nm liberadas durante a diferenciação de reticulócitos como consequência da fusão de endossomos multivesiculares (EMV) com a membrana plasmática (HARDING et al., 1984; PAN et al., 1985). Na década de 1990, pesquisadores descreveram que exossomos liberados por linfócitos B e células dendríticas (DC) também se utilizavam de EMV para a fusão com a membrana plasmática (RAPOSO et al., 1996; ZITVOGEL et al., 1998).

Vesículas com características de exossomos têm sido isoladas a partir de diversos fluidos corporais, incluindo sêmen (RONQUIST; BRODY, 1985; PARK et al., 2011; ALBERTS et al.; 2012), sangue (CABY et al., 2005), urina (PISITKUN; SHEN; KNEPPER, 2004), saliva (OGAWA et al., 2011), leite materno (ADMYRE et al., 2007), líquido cefalorraquidiano (VELLA et al., 2007), ascite (ANDRE et al., 2002), líquido amniótico

(ASEA et al., 2008), e bile (MASYUK et al., 2010). A maioria das pesquisas atribui às vesículas o termo exossomo por causa de suas proteínas. Entretanto, a maioria dessas proteínas são comuns tanto para exossomos quanto para microvesículas (MV), e os métodos de purificação atualmente disponíveis não permitem uma total distinção entre elas (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

As MV são eliminadas a partir da área de superfície de células normais ou danificadas e contêm tanto componentes do conteúdo citoplasmático, quanto da membrana plasmática e a liberação dessas MV é um fenômeno fisiológico que acompanha a ativação e crescimentos celulares (BEAUDOIN; GRONDIN, 1991). Algumas células podem liberar tanto MV quanto exossomos, como plaquetas (HEIJNEN et al., 1999), células endoteliais (DEREGIBUS et al., 2007) e células de câncer de mama (MURALIDHARAN-CHARI et al., 2009), e muitos são os equívocos encontrados na literatura científica a respeito da nomenclatura dessas vesículas, pois algumas MV que brotam da membrana plasmática têm o mesmo tamanho de exossomos (BOOTH et al., 2006) (FIGURA 2).

Neste trabalho, nós nos referiremos a VE para denominarmos tanto exossomos, quanto MV.

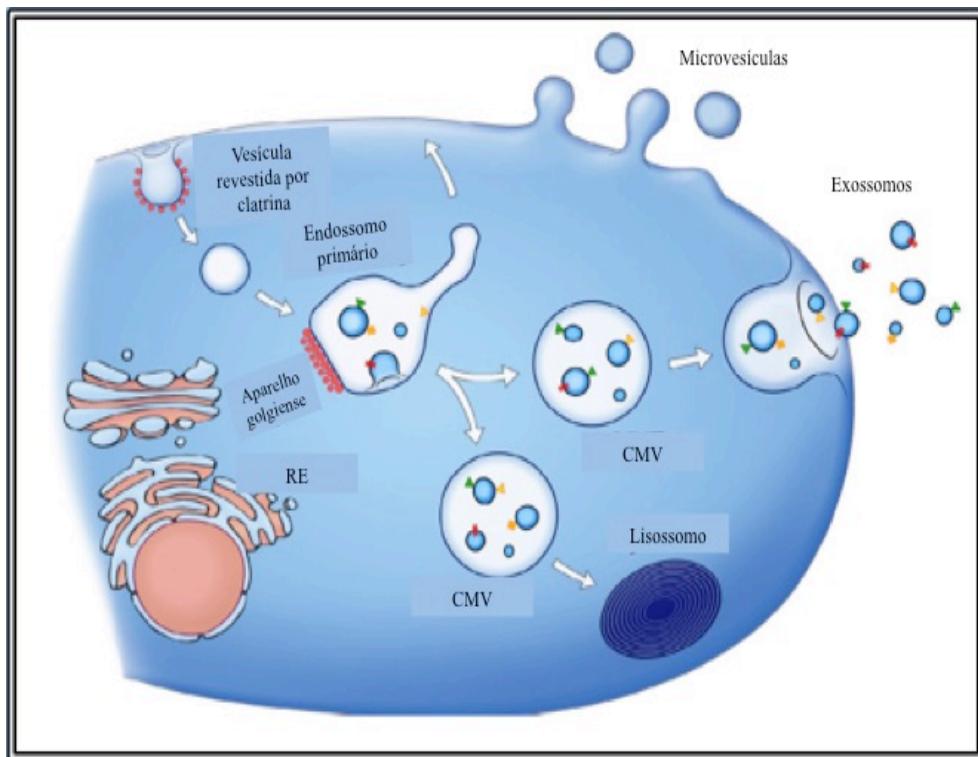
Para fazer uma distinção entre exossomos e MV é necessário uma avaliação dos mecanismos moleculares capazes de indicar a origem, a biologia e as respectivas funções dessas vesículas, padronizando os métodos para isolamento e análise das mesmas (THÉRY et al., 2006). O grande e permanente desafio é estabelecer métodos que permitam a exata discriminação entre exossomos e MV, porque diferenças quanto ao tamanho, morfologia e densidade flutuante e a composição de proteínas parecem ser insuficientes para uma clara distinção (BOBRIE et al., 2011).

1. 2 Composição molecular de VE

A composição padrão de VE está associada às células que lhes deram origem e esse padrão indica as funções dessas vesículas (HOSSEINI et al., 2013). A grande maioria dos componentes dessas vesículas são proteínas que podem geralmente estar caracterizadas dentro de dois grupos; no primeiro, o das proteínas presentes em todas elas, independentemente de sua origem e no segundo, de proteínas específicas de uma VE em particular, no primeiro

grupo estão incluídas proteínas conservadas que são necessárias à gênese e função de VE (THÉRY et al., 2002).

Figura 1: Liberação de Exossomos e MV



As MV são lançadas a partir da membrana plasmática, enquanto os exossomos, são vesículas de diferentes tamanhos que são formadas como VIL em endossomos primários em EMV e são liberados pela fusão desses EMV com a membrana plasmática. Outros EMV fundem-se com lisossomos. A divergência entre esses tipos de EMV é a formação nos endossomos primários, embora a existência de um endossomo que possa alimentar esses dois percursos, não possa ser excluído. A marcação em vermelho representa a associação entre a clatrina da membrana do endossomo e dos exossomos. As proteínas de membrana e transmembrana estão representadas por triângulos e retângulos. As setas representam a direção do transporte de lipídios e proteínas entre organelas e as EMV e a direção da secreção dos exossomos. MV: microvesículas, VIL: vesículas intraluminares, EMV: endossomos multivesiculares. Adaptado de Raposo; Stoorvogel (2013).

A análise do conteúdo protéico de diferentes fontes de VE é feita por eletroforese em gel de acrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), seguida de coloração, de *western blot* ou proteômica (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013), como realizado neste trabalho. Muitas dessas proteínas têm funções bem conhecidas e estudadas, como as

componentes do citoesqueleto, as de adesão, de fusão com a membrana, as moléculas de sinalização celular, as enzimas metabólicas, as chaperonas, as tetrapaninas e as presentes nos EMV em formação (SCHOREY, 2008; MIGNOT, 2006) (Quadro 2).

Em consequência de sua origem, vesículas originados em diferentes tipos celulares contêm proteínas associadas ao endossomo, como a Rab GTPase, a *soluble NSF attachman receptor* (SNARE), anexinas e flotilinas, outras estão envolvidas na biogênese de EMV, como a Alix e a proteína ligadora de ubiquitina (Tsg101) (VAN NIEL et al., 2006).

As proteínas Rab desempenham importante papel na especificidade do transporte de vesículas intracelulares. Elas são GTPases monoméricas, das quais são conhecidas mais de 30 variedades, sendo a maior das subfamília de proteínas GTPases, bem como a outra família de proteínas, a SNARE cujo papel central está na especificidade do tráfego vesicular e na catálise do processo de fusão (ALBERTS et al., 2008).

As proteínas de membrana são conhecidas por se aglomerarem em microdomínios na membrana plasmática ou nos endossomos, que frequentemente enriquecem as VE (RAPOSO, STOORVOGEL, 2013) e geralmente estão ancoradas a microdomínios lipídicos conhecidos por *lipids raft*, que são ricos em colesterol o que lhes permitem a fusão por meio de moléculas de adesão, como as anexinas, presentes na superfície das células-alvo (KOUMANGOYE et al., 2011).

As tetrapaninas, uma grande superfamília de proteínas de membrana de superfície celular ou transmembrana, tais como CD37, CD53, CD63, CD81 e CD82, foram identificadas pela primeira vez em VE de células B, onde aparecem 100 vezes mais concentrados em relação ao TfR2 (Receptor Transferrina 2), uma glicoproteína de membrana que medeia a captação celular de ferro a partir de uma glicoproteína do plasma, a transferrina, e neste tipo de célula podem ser consideradas como verdadeiros marcadores, tanto para a membrana plasmática quanto para os endossomos primários (ESCOLA et al., 1998), ou seja, marcam tanto exossomos quanto MV. Neste trabalho usamos as proteínas CD63, CD81 e o receptor transferrina 2 (TfR2) como marcadores específicos para VE.

Quanto à análise lipidômica, VE derivadas de reticulócitos (VIDAL et al., 1989), mastócitos, DC (LAULAGNIER, 2004), linfócitos B (WUBBOLTS, et al., 2003) foram avaliadas (HOUSSEIN, 2013), e a grande maioria delas são altamente enriquecidas por colesterol, esfingomielina, hexasilceramida, mas não fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina

(WUBBOLTS et al., 2003; LAULAGNIER et al., 2004, SUBRA et al., 2007; BROUWERS et al., 2012).

Os ácidos graxos presentes nessas vesículas são saturados ou monossaturados e juntamente com a elevada concentração de colesterol, podem explicar a liberação desses lipídios pelas VIL (vesículas intraluminares) durante a formação dos EMV (RAPOSA; STOORVOGEL, 2013). O ácido lisofosfatítico é um lipídio abundante identificado como essencial para a formação de EMV e para a biogênese de exossomos (CHU, et al., 2005). Entretanto, pouco é conhecido sobre os teores de proteínas e lipídios de MV e se esses componentes se originam somente da membrana plasmática (RAPOSA; STOORVOGEL, 2013).

Quadro 2. Proteínas já identificadas em vesículas extracelulares.

Funções	Proteínas
Componentes do Citoesqueleto	Actina, advilina, β -caderina, claudina, cofilina 1, dinamina 2, fator elongador 1 α 1, e兹rina, fascina 1, moesina, miosina de cadeia pesada, sintaxina ligadora de proteína 3, sintenina, talina, tubulina β 5 e vimetina
Proteínas de fusão de membrana	Anexina 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 11, clatrina de cadeia pesada, Rab 10, 11b, 13, 14, Rho g e sintaxina 7
Enzimas metabólicas	Transqueolases, aldeido redutase, aspartato aminotransferase, ATP citratoliase, sintase de ácidos saturados, isomerase de glicose-6-fosfato, dehidrogenase glicose-6-fosfato, piruvato quinase, dehidrogenase fosfogliconato e fosfoglicerato quinase 1
Moléculas de adesão	Vinculina, caderina 1, CD11a, b e c, CD13, CD166, CD18, galectina 3, neuropilina 1 e trombospondina 1
Formação de EMV	Alix, ubiquitina
Chaperonas	Ciclosfilina a e b, HSP-70, HSP-84, HSP-90
Estimulantes de células T	CD86, MHC I, MHC II
Família Tetraspanina	CD9, CD37, CD53, CD63*, CD81*, CD82

ATP, adenosina trifosfato; RAB, proteína da família G; CD, grupo de diferenciação; HSP, proteína de choque térmico, MHC: complexo de histocompatibilidade principal. Modificado de Hosseini et al. (2013). * Proteínas usadas como marcadores neste trabalho.

Ratajczak e colaboradores (RATAJCZAK et al., 2006), Valadi e colaboradores (VALADI et al., 2007), demonstraram que ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNA) e microRNA (miRNA) de VE podem ser traduzidos nas células alvo ou isolados a partir de VE em cultura de células (SKOG et al., 2008), ou a partir de fluidos corporais (HUNTER et al., 2008; MICHAEL et al., 2010). As VE com características de exossomos liberadas por células imunes incorporam seletivamente miRNA que podem ser funcionalmente transferidos durante a fusão com as células receptoras (MITTELBRUNN et al., 2011; MONTECALVO et al., 2012).

Recentemente, análises por sequenciamento de RNA de VE mostraram que, além de mRNA e miRNA, elas também apresentam grande variedade de pequenas espécies de RNA não codificados, incluindo transcritos de RNA que se sobrepõem às regiões de codificação de proteínas, sequências de repetição, RNA estruturais, fragmentos de RNA transportador (tRNA) e pequenos RNA de transferência (BELLINGHAM; COLEMAN; HILL et al., 2012; NOLTE-‘t HOEN et al., 2012).

O banco de dados ExoCarta (<http://www.exocarta.org>), criado em 2009 por Mathinavan e colaboradores fornece um catálogo de proteínas, lípidos, RNA que já foram identificados em VE a partir de diferentes fontes e podem fornecer uma lista de componentes que correspondem a ambos, MV e exossomos (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Esse catálogo foi atualizado recentemente como Vesiclopédia, um compêndio que continuamente pode ser complementado por novas contribuições de diferentes grupos de pesquisa, utilizando tanto quanto possível, padronizados protocolos de isolamento (KALRA et al., 2012).

1.3 Biogênese de VE

As células eucarióticas estão em contato com o ambiente recebendo sinais, tais como os enviados por citocinas e quimiocinas, absorvendo nutrientes e secretando proteínas para o espaço extracelular (KELLER et al., 2006). Para absorver e secretar substâncias das mais diversas, cada célula tem uma rede complexa de vesículas nas quais esses processos ocorrem e utilizando esses compartimentos, as células não só absorvem macromoléculas do

meio externo (endocitose) como também liberam proteínas ou carboidratos recém sintetizados (exocitose) (KELLER et al., 2006).

A via endocítica compreende um sistema de compartimentos heterogêneos formados por endossomos primários ou iniciais, endossomos secundários ou tardios e os lisossomos. Os endossomos primários são os principais sítios de entrada do material endocitado, enquanto os endossomos secundários recebem hidrolases lisossomais recém sintetizadas diretamente da rede trans-Golgi. Os lisossomos e os endossomos tardios constituem o principal sítio de degradação lipídica e protéica. Alguns subgrupos de endossomos tardios contêm pequenas vesículas intraluminais e são conhecidos por corpos multivesiculares (CMV) ou EMV (DENZER et al., 2000). Uma vez formados, os EMV participam de processos como a organização das proteínas que serão degradadas pela fusão com os lisossomos; servem como sítio de armazenamento ou fundem-se com a membrana plasmática liberando as VIL no meio extracelular, e ao produto dessas VIL, chamamos exossomos (KELLER et al., 2006).

Os mecanismos moleculares envolvidos na biogênese de EMV apresentam proteínas evolutivamente conservadas em quatro complexos multiprotéicos: complexo de classificação endossomal responsável pelo transporte (ESCRT) 0, I, II, e III, que se associa a proteínas acessórias, como a Alix e a VPS4, que é uma enzima da família ATPase que usa energia da hidrólise de ATP para dissociar proteínas ESCRT (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). O complexo ESCRT 0, I e II reconhece e sequestra proteínas da membrana que delimita o endossomo, enquanto o complexo ESCRT III é responsável pela cisão e brotamento das vesículas intraluminares (VIL) (HURLEY, 2010).

Os mecanismos envolvidos na biogênese de EMV demonstra o potencial papel do complexo ESCRT na formação de exossomos (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). As tetraspaninas aparecem altamente concentradas nos EMV e são estratégicas na formação de VIL e exossomos (SIMONS; RAPOSO, 2009). As moléculas de MHC II nos exossomos estão associadas a grandes complexos de proteínas que também contêm tetraspaninas (WUBBOLTS et al., 2003; BUSCHOW et al., 2009). A proteína TfR, que nos reticulócitos está relacionada à secreção de exossomos, interage com a Alix, uma proteína acessória de complexo ESCRT (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013) para a ordenação de proteínas nos EMV (GÉRMINARD; GASSART; BLANCH 2004).

Como os constituintes citosólicos são recrutados para compor as VE ainda não está claro, porém estudos indicam que existe uma associação da membrana das vesículas com proteínas chaperonas como a HSP70 que são encontradas em algumas vesículas originadas da maioria dos tipos celulares (THÉRY et al., 2001; GÉRMINARD et al., 2004). A chaperona HSP70 interage com o TfR durante a maturação dos reticulócitos, porém em outros tipos celulares isso não ocorre (GÉRMINARD et al., 2004).

Os mecanismos celulares envolvidos na formação e liberação de VE variam muito, uma vez que exossomos são formados em EMV e as MV originam por brotamento direto a partir da membrana plasmática (Figura 2), embora muitas vias possam ser compartilhadas durante a formação de ambas as estruturas (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

As MV transportam constituintes da membrana citoplasmática, como proteínas e lipídios de sua célula de origem, são liberadas durante a apoptose precoce e são menores que os corpos apoptóticos que transportam exclusivamente DNA (ácido desoxirribonucleico) (INAL; FAIRBROTHER; HEUGH, 2013). Os mecanismos envolvidos na geração de MV a partir da membrana plasmática é bastante indefinido, mas as vias de ativação são muito semelhantes às de formação de exossomos, com a ação de pequenas GTPases, como a ARF6, por exemplo, as proteínas do citoesqueleto, actina-miosina, o recrutamento de Tsg101, subunidade do complexo ESCRT I (MURALIDHARAN-CHARI et al., 2009, 2010), portanto, as estruturas moleculares para a biogênese de exossomos e MV podem compartilhar os mesmos mecanismos (RAPOSO; STOORVOGEL 2013).

1. 4 Mecanismos envolvidos na liberação de VE

Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na cisão e liberação de MV da membrana plasmática e os envolvidos na mobilização de EMV secretoras para a periferia da célula, sua ancoragem e fusão com a superfície celular (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Esses mecanismos requerem o citoesqueleto, actina e microtúbulos, associados a motores moleculares, como as kinesinas e miosinas, interruptores moleculares, pequenas GTPases, e as estruturas de fusão, como o complexo SNARE (CAI et al.; 2007).

A secreção de MV pode ser ativada por receptores purinérgicos com ATP (WILSON et al., 2004), no caso das plaquetas, por exemplo, elas são estimuladas a liberar VE em resposta à ativação do receptor de trombina (HEIJNEM et al., 1998) e as células dendríticas, por outro lado aumentam a liberação de MV, alterando a composição proteica em resposta à ativação por lipopolissacarídeos (OBREGON et al., 2006; NOLTE-‘T HOEN et al., 2012).

As células dendríticas imaturas carregadas com peptídeo via MHC II são estimuladas a liberar MV em resposta à sua interação com as células T o que corrobora o papel dessas VE nas respostas imunes (BUSCHOW et al, 2009). As células neurais, durante a despolarização da membrana plasmática aumentam a rápida secreção de MV (FAURÉ et al, 2006.; LACHENAL et al., 2011) e a ativação de CD3 nas células T estimula a liberação de exossomos por essas células (BLANCHARD et al., 2002).

Um gatilho central para a liberação de VE parece envolver o aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , como demonstrado por Savina et al. (2005) em uma linhagem celular na leucemia mieloide aguda (eritroleucemia) e em mastócitos (RAPOSO et al., 1997). Outros tipos de células de origem hematopoiética ou não, tais como as células T citotóxicas, plaquetas, mastócitos, neurônios, oligodendritos, células Schwann e células epiteliais intestinais (IEC), também usam essa mesma rota para liberarem suas vesículas (SIMONS; RAPOSO, 2009; THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA et al., 2009).

1. 5 O papel biológico de VE

As funções biológicas dessas vesículas ainda não estão totalmente compreendidas, porém, sua capacidade de interagir com uma variedade de tipos celulares já foi comprovada (THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009). Mathinavan e colaboradores (MATHINAVAN et al., 2009) descreveram em um artigo de revisão os mecanismos de ação envolvidos nas vias de comunicação intercelular as quais as VE têm papel principal. Dentre esses mecanismos, eles descreveram o modo *Justacrine*, que é a interação das proteínas ancoradas na superfície dessas vesículas com os receptores das células-alvo. Outro mecanismo proposto é que as proteínas ancoradas na superfície das VE podem ser clivadas

por proteases presentes no meio extracelular, e passam assim, a agirem como ligantes solúveis (KOUMANGOYE et al., 2011).

Dependendo da célula ou tecido de origem, diferentes funções podem ser atribuídas às VE, além da comunicação intercelular podem agir como mediadores na resposta imune, como coadjuvantes na apoptose, na angiogênese, na inflamação e na coagulação (THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009). Desde a década de 90 já se conhece a capacidade das células do sistema imunológico liberarem VE (RAPOSO et al., 1996), atualmente já são conhecidas várias moléculas que compõem essas vesículas e que são usadas como mensageiras entre as células imunes ou entre células imunes e células-alvo, ora estimulando, ora inibindo, ou mesmo modulando as diferentes etapas da resposta (KOUMANGOYE, et al., 2011).

Um dos primeiros estudos relatando a interação funcional de VE com outras células foi feito sobre a motilidade do espermatozoide promovido por prostassomos, que são MV secretadas por células epiteliais da próstata no fluido seminal (STEGMAR; RONQUIST, 1982). Os prostassomos são ricos em lipoproteínas e seu papel fisiológico é melhorar a motilidade dos espermatozoides e os protegê-los contra os mecanismos de defesa imunológica do trato genital feminino (BURDEN et al., 2006).

As células tumorais também secretam VE em seus microambientes e não há evidências de que estas contribuam para a progressão do tumor, ou angiogênese ou a migração de células tumorais em metástases (RAK, 2010), porém, essas vesículas também podem conter moléculas imunossupressoras, que podem inativar linfócitos T ou as células *natural killer* (NK), suprimindo assim, a resposta imune antitumoral (ZHANG; GRIZZLE, 2011). Zitvogel e colaboradores (ZITIVOOGEL et al., 1998) usaram VE geradas por DC em ensaios experimentais em modelos murinos com tumores, e observaram uma resposta imune antitumoral muito eficiente.

Devido às características dessas vesículas de carrearem moléculas importantes de suas células de origem, elas podem ser usadas no diagnóstico de doenças, principalmente no câncer, pois fornecem material biológico de forma não invasiva, pois podem ser isoladas em todos os fluidos corporais, o que Pant e colaboradores (PANT et al., 2012) chamaram de “biópsia líquida”.

Especula-se que as VE possam estar envolvidas nas reações alérgicas (RAPOSO et al., 1997) e a caracterização das mesmas na resposta imune alérgica poderá melhorar a

abordagem nas alergias e promover uma alternativa às terapias usuais (ADMYRE et al., 2007). Uma melhor compreensão do papel dessas vesículas nas reações alérgicas pode nos fazer entender como as manifestações clínicas nas alergias podem ser prevenidas ou levar ao desenvolvimento de terapêuticas mais eficientes, uma vez que essas vesículas já foram isoladas a partir de células epiteliais pulmonares de pacientes asmáticos durante a inflamação alérgica (ADMYRE et al., 2008).

Em indivíduos com alergia, a ativação de células B alérgeno-específicas possivelmente aumenta a liberação de VE como apresentadoras de抗ígenos, com o poder de ativar células Th2 alérgeno-específicas (ADMYRE et al., 2007) (FIGURA 3). Segundo estudo feito por Ekström e colaboradores (ELSTRÖN et al., 2007), VE geradas por DC foram capazes de induzir alergia, pois continham muitas das moléculas essenciais para funcionarem como APC, como as moléculas do MHC II, as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, bem como diversas moléculas de adesão, como as anexinas, que podem direcionar essas vesículas para os receptores celulares (THÉRY et al., 2002).

Em um estudo comparativo, modelos murinos com asma apresentaram maior concentração de VE no fluido bronquialveolar (BALF) do que o observado em animais saudáveis (KULSHRESHTHA et al., 2013), mais ou menos como já havia sido descrito por Prado e colaboradores (PRADO et al., 2008), que usaram VE alérgeno-específicas geradas em animais sensibilizados e as administraram em outros ainda não sensibilizados, induzindo tolerância e proteção contra a sensibilização por alérgenos, além de potencializar a supressão de manifestações clínicas importantes na alergia, os elevados níveis de IgE no soro, a produção de citocinas de perfil Th2 e a inflamação das vias aéreas.

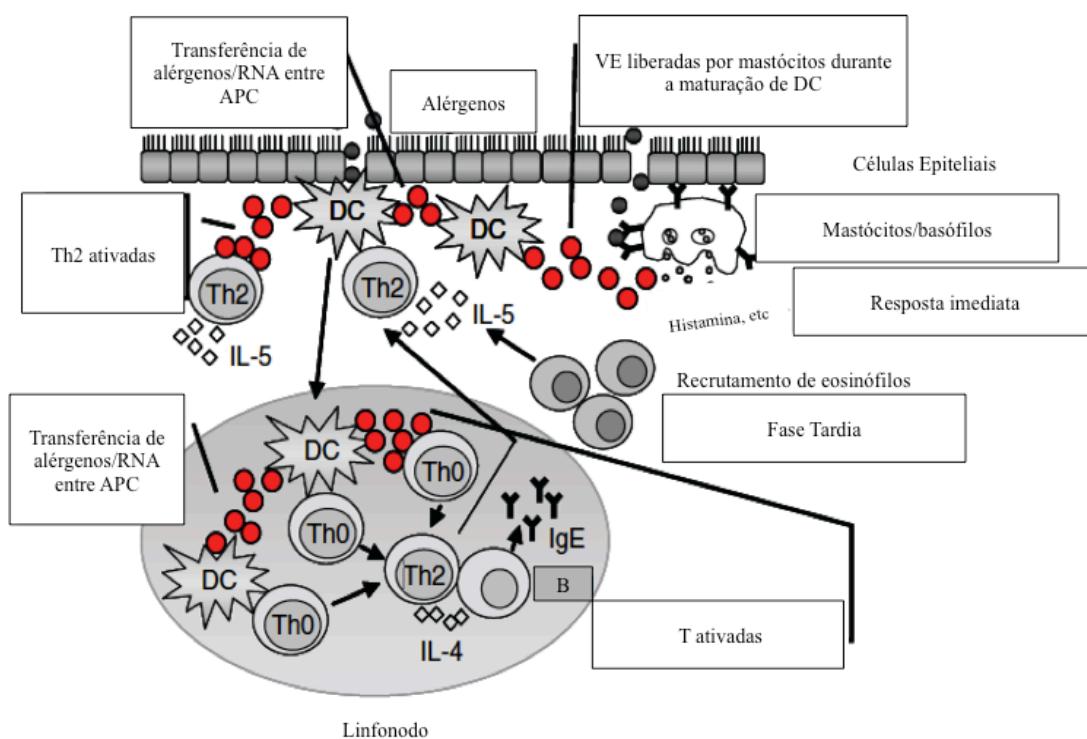
A análise de VE isoladas de leite materno (ADMYRE et al., 2007), mostrou que essas contêm moléculas como a glicoproteína mucina 1 associada à superfície celular (MUC-1), MHC classe I e II, CD86 e proteínas HSP o que as gabaritam a agirem como reguladoras, pois foram capazes de inibir as citocinas pró-inflamatórias IL-2 e IFN- γ e induziram a proliferação de células Treg e FOXP3 $^{+}$ (células CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$), porém o papel biológico dessas vesículas isoladas do leite materno e seu impacto no desenvolvimento da alergia carece de maiores estudos (ADMYERE et al., 2007).

As VE de mastócitos, células altamente ativas nas reações alérgicas, foram observadas induzindo maturação de DC e também transportando RNA funcionais para células receptoras, sugerindo assim um novo caminho de comunicação entre as células nas reações

alérgicas (SKOKOS et al., 2003), mas o inverso também foi observado, por exemplo, em VE geradas no intestino (tolerossomos) ou de glândulas mamárias, foram capazes de bloquear a resposta clássica de perfil Th2, prevenindo o desenvolvimento da alergia (ADMYRE et al., 2007).

Corroborando a participação de VE na alergia, pacientes asmáticos moderados quando comparados aos saudáveis, apresentaram diferença significativa de miRNA carreados por VE, indicando que essa diferença pode ser importante na resposta inflamatória que conduz à reatividade brônquica na asma, o que tornaria possível o uso de métodos de avaliação dessas vesículas como uma ferramenta diagnóstica para essa doença (LEVÄNEN et al., 2013).

Figura 2 – Esquema hipotético da participação de VE na resposta imune na alergia.



DC, células dendrítica; Th, linfócito T “helper”; IL, interleucina. Adaptada de Lambrecht (2005).

Considerando que as VE sejam capazes agir de sobre a resposta imune durante as reações inflamatórias nas vias aéreas e que a alergia é um importante problema de saúde que afeta a qualidade de vida de milhões de crianças e adultos, e sua prevalência aumenta drasticamente em muitos países, o presente trabalho teve o intuito de analisar o comportamento de PBMC de indivíduos atópicos estimuladas com VE geradas por indivíduos não atópicos, em ensaios *in vitro*. De modo especial, avaliar a capacidade dessas VE alterarem o perfil de resposta imune, de Th2 para Th1 ou Treg, o que poderá contribuir futuramente para o desenvolvimento de formas alternativas de diagnóstico e terapêutica para as doenças alérgicas.

1.6 Alergia e Atopia

As mudanças no estilo de vida das pessoas, a alimentação, o consumo de produtos industrializados, ricos em conservantes e outros produtos químicos, bem como a redução do contato de crianças com micro-organismos, devido às melhores condições de higiene e vacinação, permitiram mudanças nas características imunológicas dos indivíduos, predispondo-os, por exemplo, a doenças de etiologia alérgica (TAMAY et al., 2014).

As alergias/atopias são doenças inflamatórias crônicas, heterogêneas, que afetam a qualidade de vida de milhões de crianças e adultos e são responsáveis por gastos que impactam a saúde pública. Essas doenças são conhecidas há tempos, com relatos de suas manifestações na China Antiga e na Grécia (SIMONS, 1994). De acordo com a Organização Mundial de Alergia (WAO), as doenças alérgicas afetam 30 - 40% da população mundial, e a prevalência dessas doenças está aumentando em proporções epidêmicas, principalmente em países industrializados (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008). Entre as crianças de países desenvolvidos, o percentual fica em torno de 40% e estas continuarão alérgicas durante a vida adulta, com sintomas de asma alérgica, rinite alérgica e alergias respiratórias (ADMYERE et al.; 2008). Na sua grande maioria, a patologia das doenças alérgicas crônicas, como a dermatite atópica e a asma alérgica é o resultado, a longo prazo, de um processo inflamatório crônico no local da exposição ao alérgeno (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008).

Em 2003, a Organização Mundial de Alergia (WAO) propôs uma nova nomenclatura para as definições de alergia, onde o termo hipersensibilidade deve ser usado

para descrever sintomas ou sinais reproduzíveis (por testes de puntura para diagnóstico), causados pela exposição a um estímulo definido em uma dose tolerada. Por outro lado, a intolerância sugere uma resposta fisiológica anormal a um agente, mas sem mediação imune (JOHANSSON et al., 2004).

O termo alergia foi inicialmente empregado por Clemens Von Pirquet juntamente com Béla Schick em 1906. Von Pirquet usou o termo alergia a partir da junção de dois vocábulos gregos, *allos* e *ergon*, o primeiro termo que significa a palavra ‘outro’ (pela mudança no estado fisiológico original) e o segundo significa ‘ação’, em referência às reações anafiláticas que eram observadas nas manifestações da doença do soro (SIMONS, 1994).

O termo atopia foi sugerido para designar uma característica que torna um indivíduo suscetível ao desenvolvimento de vários tipos de alergias, diferentemente da alergia em si, onde a reação de hipersensibilidade é desencadeada por mecanismos imunológicos específicos. A atopia refere-se à tendência pessoal ou familiar de produzir anticorpos IgE em resposta à baixas doses de alérgenos ambientais (JOHANSSON et al., 2004). Crianças que apresentam histórico familiar de alergia têm de 50 a 80% de risco de desenvolver a doença (FERREIRA; COELHO; TRINDADE, 2007). Fatores ambientais podem aumentar a incidência de alergia, principalmente nas crianças e esses fatores, destacam-se a dieta, as enteroviroses, o sedentarismo e a obesidade (DIB; TSCHIEDEL; NERY, 2008), somados aos mecanismos patogênicos, como a transferência transplacentária de anticorpos maternos ou de citocinas, além da exposição aos alérgenos desde o útero, como às toxinas bacterianas, ao tabaco, aos alimentos alergênicos, infecções virais e núcleo familiar composto por muitos membros (REIS, 2003; ZAC, 2005).

1.7 A fisiopatologia na Alergia/Atopia

O desdobramento da resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigênico e de várias etapas da resposta imune do hospedeiro. O alérgeno é processado pelas células apresentadoras de抗ígenos (APC) e resulta na formação de peptídos que são apresentados às células T CD4⁺ ligadas às moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (PAUL; ZHU, 2010).

O período de sensibilização aos alérgenos ocorre primeiramente entre um e dois anos de idade (REIS, 1997), embora algumas sensibilizações possam ocorrer ainda intraútero a partir de seis meses de gestação (GERN, 2000).

A presença de um microambiente placentário com perfil de resposta imune do tipo T *helper* 2 (Th2) é importante para a sobrevivência da gestação a termo e algumas sensibilizações a antígenos alimentares e inalatórios podem ser observadas já no segundo trimestre de gestação, portanto, o perfil Th2 é característico ao nascimento e muitas das respostas imunológicas a alérgenos já podem ser detectadas nesse período (REIS, 2003). Após o nascimento, a maturação do sistema imunológico é caracterizada pelo desenvolvimento de um equilíbrio de perfil de resposta Th1/Th2 e a eficiência e a cinética desse processo é geneticamente determinada, mas influenciada pelo meio ambiente onde a criança cresce (BJORKSTÉN, 1999). Os linfócitos Th1 secretam principalmente as citocinas IL-2 e IFN- γ , e os linfócitos Th2, as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13 (PULEDTRAN; ARTIS, 2012).

Em indivíduos atópicos, os linfócitos T CD4+ virgens diferenciam-se em linfócitos Th2 efetores predominante, que secretam as citocinas citadas anteriormente, além das IL-27, IL-33, TNF- α , a GM-CSF, as quimiocinas CCL5 (RANTES, *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*), eotaxinas, e o PAF (fator ativador plaquetário) que serão responsáveis pela manutenção do processo inflamatório (PAUL; ZHU, 2010; PULEDTRAN; TANG, 2010; JONES; CARNEY; DAVIS, 1998), além do fator de transcrição GATA, ligado à proteína 3 (GATA-3), do sinal de transdução e ativador de transcrição 5 (STAT-5), e STAT-6 (PAUL; ZHU, 2010; PULEDTRAN; TANG, 2010).

As citocinas produzidas por linfócitos Th2 estimulam a produção de imunoglobulina de classe E (IgE) pelas células B e os complexos imunes formados por IgE e alérgeno ligam-se a receptores Fc ϵ R1 e R1 de alta afinidade presentes na superfície de basófilos e mastócitos, ativando a secreção de citocinas e de mediadores inflamatórios, como a histamina, heparina e serotonina, além do recrutamento e ativação de macrófagos, eosinófilos, da contratilidade de músculo liso e hipersecreção de muco (PAUL; ZHU, 2010, PULEDTRAN; TANG; MANICASSAMY, 2010). O receptor de baixa afinidade de IgE, CD23 ou Fc ϵ RII, é expresso por várias células do sistema imune, incluindo células B. A IgE ligada ao CD23 facilita a captação do alérgeno pelas células B, o que aumenta a apresentação às células T e consequentemente, as respostas imunológicas secundárias (JIAU et al., 2014).

Pacientes alérgicos geralmente apresentam níveis séricos elevados de IgE total e específica (GEHA; JABARA; BRODEUR, 2003).

Os eosinófilos são frequentemente recrutados para sítios inflamatórios durante as alergias respiratórias e sua função efetora envolve a liberação de proteínas granulares tóxicas, espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas e mediadores lipídicos (leucotrienos, prostaglandinas etc). Sua capacidade para armazenar mediadores inflamatórios previamente formados, quimiocinas e fatores de crescimento disponíveis para uso imediato desempenha múltiplos papéis que favorecem a iniciação e manutenção das respostas imunológicas nas reações inflamatórias alérgicas (POSSA et al., 2013). A histamina, um dos mediadores da inflamação alérgica, causa um aumento da circulação sanguínea local e da permeabilidade dos vasos sanguíneos, causando vasodilatação, edema e contração dos músculos lisos. As enzimas triptase e quinase liberadas também pelos mastócitos, ativam as metaloproteínas que causam destruição tecidual e esses fenômenos são responsáveis pelas manifestações clínicas preliminares das reações alérgicas, ocorrendo nos primeiros 30 minutos seguidos à exposição alergênica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Além da clássica dicotomia entre os perfis Th1/Th2, outras subpopulações de células T, tais como células T reguladoras (Treg), células Th17, e mais recentemente descritas, as células B reguladoras (Breg), são conhecidas por estarem ativadas em doenças alérgicas (SCHMIDT-WEVER; AKADIS; AKADIS, 2007).

As células Th17, induzidas por citocinas IL-1b em associação com IL-6 ou IL-23, presentes no processo imunopatológico das reações de hipersensibilidade imediata, produzem um padrão complementar de citocinas, incluindo a IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26. A presença da IL-17 tem sido encontrada nos pulmões, lavado broncoalveolar, escarro e no soro de indivíduos atópicos. Além disso, o aumento dos níveis de IL-17 tem sido correlacionado com o aumento da gravidade da doença corroborando, assim, para o envolvimento da IL-17 na patogênese da doença e na manutenção de um status pró-inflamatório nos processos alérgicos observados em pacientes alérgicos (WONG et al., 2001; OBOKI et al., 2008).

As Treg, que são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição FOXP3, induzem à síntese de IL-10 e TGF- β , que inibem resposta Th2 e Th1, sendo importantes na inibição e desenvolvimento de doenças alérgicas (AKDIS et al., 2006). Existem poucos relatos da atividade de Treg sobre as células Th2 em humanos, mas estudos *in vitro* com timócitos humanos já demonstraram que clones de células Th2 foram relativamente

resistentes à ação de alérgenos (COSMI, 2004), ou ainda que células T CD4+CD25+ de sangue periférico foram capazes de suprimir a proliferação e produção de citocinas do tipo Th2 por células T CD4 + CD25+ estimuladas *in vitro* com alérgeno (TIEMESSEN, et al. 2002). Assim, as Treg podem agir para evitar inadequadas respostas de perfil Th2 a alérgenos ambientais. Uma possível razão para o desenvolvimento de sensibilização atópica, portanto, seria uma deficiência ou fracasso de tal regulação. Embora as observações iniciais não tenham encontrado nenhuma diferença clara na capacidade de supressão de células T CD4+ CD25+ entre indivíduos controle e alérgicos (COSMI, 2004).

Um novo subconjunto de célula B foi identificada recentemente, formado por células B reguladoras (Breg), que assim como o subconjunto Treg, foi caracterizado por sua capacidade de produzir IL-10 e restringir quadros de inflamação grave (MAURI; BOSMA, 2012; SHEN et al., 2014).

São exemplos de manifestações clínicas nas alergias: rinite alérgica, asma alérgica, eczema atópico, os quais agem localmente nos órgãos-alvo, e a anafilaxia sistêmica, na qual a reação alérgica é potencialmente fatal (DOAN; MELVOLD; WALTENBAUGH, 2006).

A rinite alérgica, por exemplo, prevalece na população mundial entre 10 – 25% (BOUSQUET et al., 2012), embora não fatal, compromete a qualidade de vida do indivíduo e impacta sobremaneira os gastos públicos com saúde (SHOENWETTER, 2000). Além disso, a rinite alérgica predispõe os indivíduos à sinusite, à otite média e à asma. Os indivíduos com rinite alérgica podem ser agrupados em 4 subgrupos: na intermitente leve; na intermitente moderada/grave; na persistente leve e na persistente moderada/grave (BOUSQUET; et al., 2012). Na dermatite atópica, a resposta é observada na pele, após contato com o alérgeno que induz uma inflamação local com a formação de pápulas ou placas edematosas pruriginosas, que podem evoluir para formas eczematosas mais crônicas com hiperplasia epidérmica e/ou descamação excessiva do epitélio (MCGIRT; BECK, 2006).

Apesar do notável conhecimento a respeito de mecanismos celulares e moleculares que controlam as respostas imunes Th1 e Th17, pouco ainda se conhece sobre como a resposta Th2 é iniciada e orquestrada, e o porquê da resposta Th2 ser gerada por estímulo alergênico ou por helmintos ainda continua um mistério. A diversidade de estímulos que induzem a uma resposta Th2, a montagem de diferentes tipos de células que parecem ter papel-chave nessa resposta, e o fato de que há algumas respostas variantes de Th2, são

desafios a serem vencidos quando se estuda o perfil de resposta imunológica de linfócitos Th2 (PULENDRAN; ARTIS, 2012) (Figura 1).

1.8 Ácaros e alérgenos da poeira domiciliar

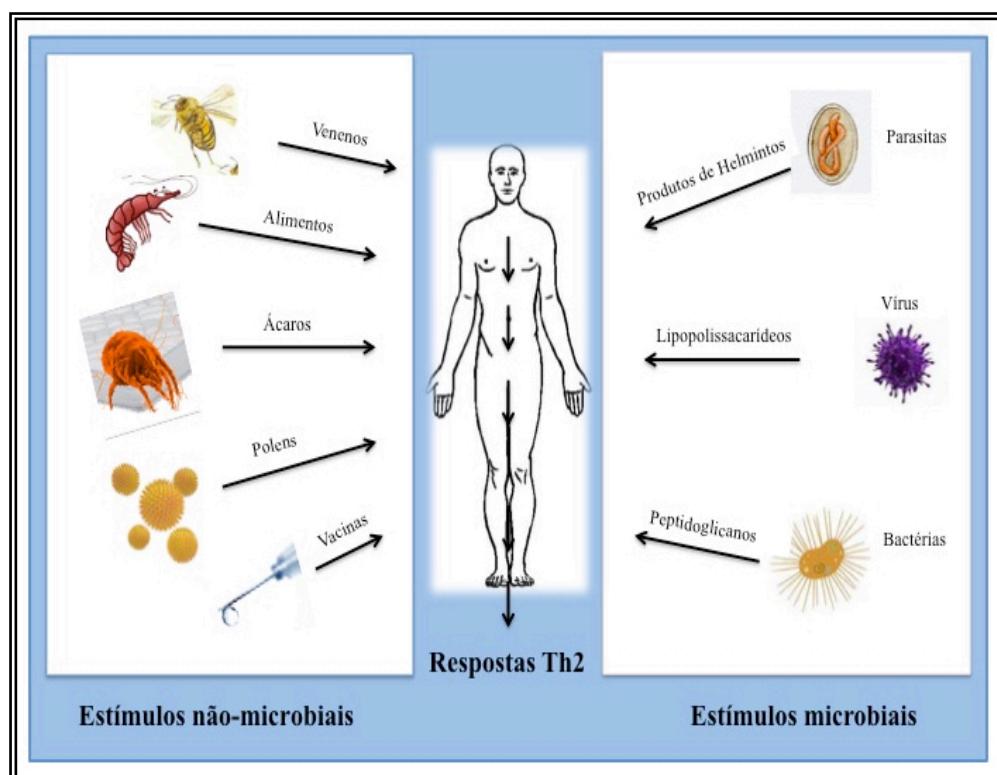
O ambiente doméstico é rico em partículas em suspensão, os aeroalérgenos, de fontes orgânicas e inorgânicas, como fibras vegetais, partículas de móveis estofados, areia, terra, peças do vestuário, escamação humana, restos de alimentos, resíduos químicos e produtos de vários micro-organismos (bactérias, vírus e fungos) e macro-organismos (animais domésticos, insetos e ácaros) que são capazes de estimular uma resposta imune (SELTZER, 1994). Esses aeroalérgenos, em geral, são proteínas solúveis de baixo peso molecular, que podem facilmente se desprender da sua fonte, o que facilita sua dispersão aérea e a penetração no trato respiratório (LÓPEZ et al., 2010).

Dentre os ácaros da poeira domiciliar, destacam-se os das famílias Pyroglyphidae (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*) e Echimyopodidae (*Blomia tropicalis*). Esses ácaros são importantes fontes de alérgenos para sensibilização em indivíduos geneticamente predispostos (JIMÉNEZ, 2007). Esses ácaros têm mais de 20 componentes alergênicos identificados, contudo a fonte mais importante de aeroalérgenos destes aracnídeos são as partículas fecais cobertas por proteases resultantes de resíduos de degradação da lisina (LÓPEZ et al., 2010). Os ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae* são os mais abundantes da poeira doméstica, representando 80 – 90% do total, além de serem aeroalérgenos com farta distribuição geográfica, principalmente em países tropicais e subtropicais (GELBER et al., 1993), pois o meio ambiente interfere na proliferação e sobrevivência dos ácaros que requerem condições específicas de temperatura e umidade (BOQUETE et al., 2006).

No Brasil o *D. pteronyssinus* predomina sobre os outros ácaros. Em 1991, um estudo com crianças de São Paulo - SP, verificou alta frequência nos níveis de IgE específica a *D. pteronyssinus*, em torno de 95% (ARRUDA et al., 1991). Na cidade de Uberlândia - MG, segundo Almeida e colaboradores (ALMEIDA et al., 2006), a maioria dos indivíduos sensibilizados a *B. tropicalis*, também estão sensibilizados a *D. pteronyssinus* (89%), o que indica alta sensibilização concomitante entre as duas espécies.

Em um outro estudo realizado pelo nosso laboratório, o de Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia, foi demonstrado que os níveis de sensibilização aos ácaros de *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis* na população de Uberlândia – MG, foram de 61,7%, 59,9% e 54,7%, respectivamente, confirmando serem esses ácaros importantes fontes de aeroalérgenos para os indivíduos desta região (SOARES et al., 2007).

Figura 3: A diversidade de estímulos que induzem respostas imunes de tipo Th2.



Esses estímulos apresentam marcantes diferenças quanto ao tamanho, forma, estrutura, propriedades químicas e físicas. Podem, por exemplo, apresentarem-se em nanômetros, como no caso dos alérgenos e até vários metros de comprimento, como alguns parasitas helmintos. Adaptado de Pulendran e Artis (2012).

2 Hipóteses



2. 1 Hipótese 1

- ✓ VE geradas por PBMC de indivíduos não atópicos (estímulos homólogos), podem modificar o perfil de resposta imune de PBMC de indivíduos atópicos, de um perfil de Th2, para um perfil Th1.

2. 2 Hipótese 2

- ✓ VE geradas por PBMC de indivíduos não atópicos (estímulos homólogos), podem modificar o perfil de resposta imune de PBMC de indivíduos atópicos, de um perfil de Th2, para um perfil Treg.

3 Objetivos



3. 1 GERAL

- ✓ Avaliar o potencial de VE geradas por PBMC de indivíduos não atópicos modularem a produção de citocinas por PBMC de indivíduos com alergia respiratória.

3. 2 ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar VE de PBMC de indivíduos atópicos e não atópicos;
- ✓ Comparar o perfil eletroforético das proteínas de vesículas isoladas de participantes atópicos e não atópicos;
- ✓ Determinar o peso molecular aproximado das proteínas de VE;
- ✓ Analisar a especificidade das VE isoladas de participantes não atópicos;
- ✓ Observar a morfologia e a membrana bilipídica de VE geradas por indivíduos atópicos e não atópicos;
- ✓ Avaliar a expressão das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e IFN- γ secretadas *in vitro* por PBMC de indivíduos atópicos estimuladas por VE geradas por indivíduos não atópicos.

4 Material e Métodos



4. 1 Procedimento ético

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), órgão do Conselho Nacional de Saúde (CNS) sob o nº 274/11 (ANEXO 1).

Os indivíduos que concordaram em participar deste estudo assinaram um Termo de Consentimento (ANEXO 2), pelo qual foram informados sobre todos os procedimentos adotados, segundo as normas da Resolução CNS 196/96, que regulamenta a ética em pesquisa envolvendo seres humanos.

Neste documento, o nome da pesquisa foi informado, bem como seus objetivos. Em seguida, os participantes passaram por uma anamnese (Anexo 3), segundo os critérios adotados pelo ISAAC - *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (1998), para auxiliar na avaliação clínica inicial de cada um deles, supervisionada pelo médico alergista responsável, Dr. Ernesto Akio Taketomi.

A todos os participantes foi resguardado o direito de se retirar do estudo, em qualquer momento, sem necessidade de explicação.

4. 2 Local de estudo

Os procedimentos técnicos foram realizados nas dependências dos Laboratórios de Alergia e Imunologia Clínica, de Bioquímica e Biologia Molecular e de Imunohistoquímica da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, nos Blocos 4C, 2A, 2E, respectivamente.

4. 3 Participantes

De um total de 15 indivíduos de ambos os gêneros, foram selecionados voluntários atópicos (10) e não atópicos (5) entre os alunos dos cursos de graduação e pós-

graduação, professores e funcionários de nossa instituição. Os participantes foram selecionados depois de passarem por critérios que permitiram a sua inclusão ou exclusão.

Para inclusão como atópicos, os participantes apresentaram sintomas respiratórios relacionados à poeira domiciliar, após anamnese (ANEXO 3), Teste Cutâneo de Puntura (TCP) positivo ao *D. pteronyssinus* e reatividade IgE específica por ELISA (*Enzyme-Liked Immunosorbent Assay*) (IE: índice ELISA > 1,2) (BOUSQUET et al., 2001).

Foram excluídos aqueles que usaram anti-histamínicos ou corticosteroides, por via oral ou tópica, na semana anterior ao teste ou por período de tempo prolongado (BERNSTEIN; STORMS 1995) e também, aqueles cuja região do teste cutâneo apresentava lesões dermatológicas. Grávidas e menores de idade também ficaram fora da pesquisa.

Foram considerados participantes atópicos aqueles cujos TCP apresentaram resultados com pápulas e eritemas maiores que 3 mm em relação ao controle negativo.

Os participantes não atópicos são assintomáticos para alergia (ANEXO 3), apresentaram TCP negativo para os extratos brutos dos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*, além de outros aeroalérgenos, como epitélios de cão e gato (ANEXO 4).

4. 4 Teste cutâneo de puntura (TCP)

A hipersensibilidade do participante foi avaliada por uma bateria de testes para aeroalérgenos (ANEXO 4), pelo TCP: um volume de aproximadamente 10 µL de cada extrato (FDA *Allergenic/Immunotech* Farmácia de Manipulação, Rio de Janeiro, Brasil) foi depositado na região antebraquial anterior (CTA – COMISSÃO DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA, 2001), após antisepsia do local com álcool 70 %. Como controle positivo foi usado cloridrato de histamina a 10 mg/mL (Bayer Co., EUA) em solução contendo glicerol a 50%, diluente que foi utilizado como controle negativo da reação (SQUILLACE et al., 1997).

Uma puntura cutânea (Puntores Aiko, Rio de Janeiro, Brasil) foi feita no local de depósito das gotas e depois de 15 minutos foi medido o diâmetro ortogonal das pápulas formadas com uma régua milimetrada (*Morrow Brown Disposable/Skin Test Needle Aller Guard®*, Topeka, KS, EUA).

O resultado foi considerado positivo nas pápulas com diâmetro maior que 3 mm em relação ao controle negativo (OWNBY, 1998). Foram selecionados os participantes atópicos para o extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

4.5 Amostras de sangue

Por meio de punção venosa na fossa cubital (COMISSÃO DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA, 2001), cada indivíduo forneceu 20 mL de sangue. O sangue heparinizado com 36 µl de heparina foi misturado à solução de PBS filtrado (1:1) em temperatura ambiente. Ao sangue diluído (10 mL de sangue + 10 mL de PBS) foi acrescentado 7,5 mL de *Ficoll-Hipaque* (densidade: 1,077 g/mL, Histopaque-1077, Sigma Aldrich) para a separação das PBMC.

Após centrifugação a 2.200 rpm por 20 minutos a 15 °C ou temperatura ambiente, a nuvem celular contendo PBMC, foi aspirada e transferida para um tubo, sendo completada com 10 mL de PBS estéril gelado. A suspensão celular, mantida em banho de gelo, foi então centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspensionado por duas vezes com PBS estéril gelado e centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos a 4°C.

Após as etapas anteriores, o sedimento celular foi ressuspensionado com 2 mL de meio de cultura completo, composto por meio de cultura do tipo *Roswell Park Memorial Institute* - RPMI (*Gibco Laboratories*, Paisley, Escócia), contendo gentamicina a 40 µg/mL e soro fetal bovino a 10% previamente ultracentrifugado (*Sorvall*, WX 90, 80,2 TFT-rotor, Osterode, Alemanha) a 100.000 x g por 18 horas a 4°C, para a eliminação de VE de origem bovina. A suspensão celular foi mantida em banho de gelo até a contagem das células em câmara hemocitométrica de *Neubauer*.

4.6 Cultura de PBMC

As PBMC isoladas de participantes atópicos e não atópicos com densidade igual a 2×10^6 células/mL/poço (500 µL de suspensão celular) foram cultivadas em triplicata em

placa de cultura (TPP®, *Techno Plastic Products*, Trasadingen, Suíça) com 24 poços, seguida pela adição de 100 μ L de mitógeno (fitohemaglutinina - PHA a 5 μ g/mL), ou 100 μ L de extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt a 10 μ g/mL) ou 100 μ L de meio de cultura completo. A todos os poços foi adicionado 400 μ L de meio de cultura RPMI, resultando em um volume final de 1.000 μ L/poço. As placas foram incubadas por 5 dias a 37 °C e 5% de CO₂ (LOZANO et al., 2004).

4.7 Isolamento de VE

Após os 5 dias de cultura, o sobrenadante foi removido da placa e foi feito um *pool* de cada estímulo, pois as PBMC foram cultivadas em triplicata. Sequencialmente o sobrenadante foi purificado por meio das seguintes centrifugações (*Sorvall*, YW 16, 60,2 TFT-rotor, Osterode, Alemanha), todas a 4°C: 1°. 3.000 x g por 20 minutos; 2°. 10.000 x g por 30 minutos; 3°. 100.000 x g por 1 hora em ultracentrífuga (*Sorvall*, WX 90, 80,2 TFT-rotor, Osterode, Alemanha). O último sobrenadante foi removido tão completamente quanto possível e o sedimento foi ressuspensido em 1 mL de PBS e centrifugado por 1 hora a 100.000 x g. O novo sobrenadante foi removido e ao sedimento foi acrescentado 100 μ L de PBS fresco. O material foi armazenado a -70 °C (ZITVOGEL et al., 1998). O descongelamento de VE para subsequentes utilizações se deu de forma gradual, com o material passando do resfriamento de -70 °C para -20 °C por 24 h, depois para -4 °C por mais 24 h e finalmente, temperatura ambiente.

4.8 Quantificação de Proteínas

As concentrações proteicas das vesículas extracelulares isoladas de PBMC de participantes atópicos e não atópicos foram determinadas pelo método de *Bradford* (*Bio-Rad Laboratories*, Richmond, CA), de acordo com os valores de densidade óptica (DO) da curva de calibração com soroalbumina bovina (*Bovine serum albumin* – BSA, Sigma) em diluições seriadas de 1.000 a 15 μ g/mL em PBS. Foi usado o corante de *Bradford*. A leitura da DO foi realizada em espectrofotômetro (*Biotek Epoch*, Vermont, EUA) a 570 nm e seus valores

foram calculados por meio do *software Microplate Manager 4.0* (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, EUA). As amostras foram distribuídas em alíquotas e congeladas a -70 °C (SMITH et al., 1985). Muito provavelmente as proteínas quantificadas faziam parte das membranas ou mesmo do interior das vesículas. Não foi usado nenhum tipo de tampão de lise.

4. 9 Quantificação de colesterol

A dosagem de colesterol das vesículas isoladas a partir de PBMC de indivíduos atópicos e não atópicos foi realizada por método enzimático-colorimétrico, utilizando um *kit* comercial *Bioclin* (*Obelis S.A.*, Bélgica). A curva padrão foi preparada em diluições duplas seriadas do reagente contendo a concentração de 200 mg/dL de colesterol segundo as instruções do fabricante.

A curva padrão e as amostras contendo VE foram incubadas em microtubos com solução imunoenzimática de detecção de colesterol à 37°C por 30 minutos. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 10.000 x g, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante obtido da curva padrão de colesterol e das amostras, foi transferido para uma microplaca de poliestireno e as absorbâncias foram monitoradas a 500 nm em leitora de placas *BioTek Epoch* (Vermont, EUA). Os valores de densidade óptica das amostras foram convertidos em concentrações em µg/mL de conteúdo total de colesterol, de acordo com a curva padrão.

4. 10 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As proteínas isoladas de VE foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). As amostras, contendo VE em PBS, foram solubilizadas em tampão de amostra, contendo Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% e glicerol a 20%, e então submetidos a um aquecimento de 95°C (*Aquecedor Termobath ALB64 – Finemould Precision* Ind., Co., Seul, Coréia do Sul), por 5 minutos. O padrão de peso molecular *Wide*

Range (*Sigma-Aldrich Co.*, St. Louis, EUA) foi utilizado como recurso para o cálculo das massas moleculares relativas das bandas proteicas presentes nas amostras.

O gel foi acoplado entre duas placas de vidro, no sistema de mini-gel SE 215 (*Hoefer Pharmacia Biotech Inc.*, San Francisco, EUA), conectado a um gerador *Electroforesis Power Suply EPS 301* (*Amersham Pharmacia Biotech*, Uppsala, Suécia) e então submetido a uma corrente constante de 25 mA, por aproximadamente 1 hora 30 minutos, para a migração das proteínas. A coloração foi feita com *Comassie Brilliant Blue G-250*, que realiza uma reação eletrostática com os grupamentos amino das proteínas e peptídeos, permitindo a visualização de até 0,5 µg/cm² de produto no gel.

O software *ImageJ* (*National Institutes of Health*, NIH, USA) foi utilizado para se obter os valores de massas moleculares das bandas visualizadas no gel, baseado nos valores de mobilidade relativa (Rf). A documentação do gel foi realizada após a sua dessecção em folhas de papel celofane, por digitalização com aparelho *scanner* (HP2200 LTX, *Hewlett Packard*, Co., EUA).

4.11 Western Blot

Para identificar marcadores específicos, proteínas das amostras separadas por SDS-PAGE foram transferidas eletroforeticamente para membranas de nitrocelulose (*Bio-Rad Laboratories*, EUA). As membranas foram cortadas em tiras de 3 mm e bloqueadas por 2 horas em PBS contendo 0,05% de monolaurato de polioxietileno sorbitano (*Tween 20*, *Sigma-Aldrich Co.*) (PBS-T) mais 5% de leite desnatado (PBS-TM), seguido de incubação durante a noite em temperatura ambiente com os anticorpos monoclonais primários: CD63 (1:100 - clone 2B5, *Sigma-Aldrich Co.*, St. Louis, EUA), CD81 (1:100 - clone 2B7, *Sigma-Aldrich Co.*) e TfR2 (1:100 – clon3e 3C5, *Sigma-Aldrich Co.*).

As tiras foram lavadas 5 vezes em PBS-T e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com anti-IgG humana biotinilada, como anticorpo secundário (1: 200 – *Sigma-Aldrich Co.*). Após novas lavagens, as tiras foram incubadas com estreptavidina peroxidase (1:250 - *Sigma-Aldrich Co.*) por 1 hora em temperatura ambiente. As bandas imunorreativas foram detectadas pela adição de substrato (H₂O₂ 0,03% e diaminobenzidina [DAB, *Sigma-Aldrich Co.*]) (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

Toda a reação foi procedida sob agitação pendular lenta e constante, à temperatura ambiente. Para a documentação, as tiras foram dessecadas em papel de filtro e digitalizadas.

4.12 Análise ultraestrutural e imunomarcação

Gotas contendo 10 µg de amostras de VE isoladas de PBMC de participantes atópicos e não atópicos ressuspensos em PBS foram dispostas em um pedaço de parafilme. Em seguida, com uma pinça, delicadamente, uma grade de níquel revestida de carbono *Formvar®* (SPI-Chem™ *Formvar® Resina, SPI Supplies, West Chester, PA, EUA*) foi colocada sobre cada gota durante 30 – 60 minutos (a face revestida voltada para a gota contendo as amostras).

Três gotas de 30 µL de PBS foram colocadas no parafilme para lavar sequencialmente as grades, posicionando-as na parte superior das gotas de PBS. Papel absorvente foi usado para a retirada do excesso de PBS entre as lavadas, com o cuidado para que o mesmo não entrasse em contato com a área revestida.

As amostras foram coradas durante 30 minutos em banho de gelo com 5 µL de acetato de uranila a 2%. O líquido em excesso foi removido com papel de filtro *Whatman* e após 10 minutos as amostras foram analisadas por microscópio eletrônico de transmissão (*Zeiss, EM 109, Carl Zeiss Optical, Inc, Alemanha*).

Para a imunomarcação, as amostras foram fixadas com uma gota de paraformaldeído a 2% sobre o parafilme durante 10 minutos. A etapa de lavagem foi repetida. Logo a seguir as grades foram transferidas para uma gota de 30 µL dos anticorpos primários monoclonais CD81 e CD63 seguidas de incubação durante 40 minutos. As grades foram novamente lavadas, agora em gotas de BSA a 0,1% em PBS e secas delicadamente com papel absorvente.

Gotas contendo 30 µL de anticorpo secundário marcado com 10 nm de ouro foram dispostas no parafilme e receberam as grades contendo as amostras com VE por 40 minutos. Após esta etapa, as grades foram lavadas em PBS por 10 minutos e incubadas em gotas contendo 2,5% de gluteraldeído por 10 minutos. As grades foram novamente lavadas em 5 gotas de água deionizada.

As grades foram contrastadas por adição de uma gota com 2% de acetato de uranila por 15 minutos, seguida de uma gota de metilcelulose a 0,13% e 0,4% de acetato de uranila por 10 minutos. O excesso de água foi retirado com papel absorvente e as grades ficaram expostas ao ar com o lado revestido para cima por 5 minutos para secagem. As mesmas foram examinadas ao microscópio eletrônico (Zeiss, EM 109, Carl Zeiss Optical, Inc, Alemanha) (CLAYTON et al., 2008).

4. 13 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

4. 13. 1 Detecção de CD 81 (ELISA DE CAPTURA)

As PBMC de participantes não atópicos foram cultivadas com o mesmo protocolo descrito anteriormente, PBMC de densidade igual a 2×10^6 células/mL/poço (500 μ L de suspensão celular) foram cultivadas em triplicata em placa de cultura (TPP®, *Techno Plastic Products*, Trasadingen, Suíça) com 24 poços, seguida pela adição de 100 μ L de mitógeno (fitohemaglutinina - PHA a 5 μ g/mL), ou 100 μ L de extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt a 10 μ g/mL) ou 100 μ L de meio de cultura completo. A todos os poços foi adicionado 400 μ L de meio de cultura RPMI, resultando em um volume final de 1.000 μ L/poço. As placas foram incubadas durante 7 dias a 37° C e 5% de CO₂ (LOZANO et al., 2004). A cada dia, o sobrenadante foi removido da placa e foi feito um *pool* de cada estímulo para a detecção de CD81.

As placas foram sensibilizadas por 18 horas com anticorpos monoclonais anti-CD81 (1:300) diluídos em tampão carbonato 60 mM, pH 9,6 em um volume de 50 μ L/poço por 18 horas, a 4° C.

Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo *Tween* 20 (*Sigma-Aldrich Co.*) a 0,05% (PBS-T).

Os sítios ativos dos poços foram então bloqueados, em volume de 100 μ L/poço, com solução PBS-T contendo BSA (*Sigma-Aldrich Co.*) a 1% (PBS-T-BSA), por 1 hora, à temperatura ambiente, sendo que essa última solução foi utilizada como diluente dos reagentes utilizados nas etapas posteriores.

As amostras de VE geradas por PBMC após estímulo com o mitógeno PHA, com o extrato bruto de Dpt e meio de cultura completo diluídas na proporção de 1:2, foram adicionados em volumes de 50 µL/poço, após três lavagens prévias com PBS-T. Como controles da reação, foi utilizado a solução tampão PBS.

Após incubação, a 37º C por 2 horas, as placas foram lavadas por seis vezes com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG humana biotinilada (R&D Systems. Minneapolis, MN) diluído a 1:1000, em volume de 50 µL/poço, durante 1 hora, a 37º C.

Após novo ciclo de seis lavagens com PBS-T, adicionou-se o conjugado Estreptavidina-peroxidase (*Sigma-Aldrich Co.*), diluído a 1:500 em PBS-T/BSA, em volume de 50 µL/poço e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos.

A revelação da reação foi feita com substrato enzimático peróxido de hidrogênio (*Sigma-Aldrich Co.*) a 0,03%, acrescido de ácido 2,2'-diazino-bis-3-etyl-benzotiazol (ABTS - *Sigma-Aldrich Co.*) diluídos em tampão citrato-fosfato 70 mM, pH 4,2. Ácido sulfúrico 2M foi usado para interromper a reação.

As densidades ópticas foram determinadas pelo leitor de placas ELISA (*BioTek Epoch*, Vermont, EUA) e seus valores foram calculados por meio do *software Microplate Manager 4.0* (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, EUA).

4. 13. 2 Perfil de citocinas

As PBMC de participantes atópicos foram cultivadas com o mesmo protocolo descrito anteriormente para a detecção de CD81. As PBMC foram lavadas duas vezes em PBS estéril e ressuspensas a uma densidade de 2×10^6 células/mL (método de exclusão por *Trypan*) em meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino livre de VE por ultracentrifugação a 100.000 x g por 18 horas a 4°C. Em seguida, 500 µL de suspensão celular (2×10^6 células/mL) foi adicionada a cada poço de uma placa de 24 poços de cultura.

As VE geradas por PBMC de participantes atópicos e não atópicos geradas após estímulos com mitógeno PHA (VE A), extrato bruto de Dpt (VE B) e meio de cultura completo (VE C) foram usadas como estímulos nas seguintes condições experimentais: 1^a condição (controles): 100 µL de PHA (5 µg/mL), ou 100 µL de Dpt (10 µg/mL), ou 100 µL de meio de cultura; 2^a condição (estímulo autólogo, VE geradas pelo próprio indivíduo): 100

μ L de VE A (1 mg/mL) ou 100 μ L de VE B (1 mg/mL) ou 100 μ L VE C (1 mg/mL); 3^a condição (estímulo homólogo, VE geradas por indivíduo não atópico): 100 μ L de VE A (1 mg/mL) ou 100 μ L de VE B (1 mg/mL) ou 100 μ L de VE C (1 mg/mL), em seguida todos os poços receberam 400 μ L de meio de cultura RPMI completo perfazendo um total de 1.000 μ L por poço.

Após 96 horas de cultura para todas as condições, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70°C até a análise da produção de citocinas.

As células foram expostas às três condições experimentais em triplicata. Os níveis das citocinas: IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e IFN- γ foram quantificados pelo método imunoenzimático ELISA de captura de acordo com as instruções do fabricante (*R&D Systems*, Minneapolis, MN) (SLUNT et al., 1996).

Resumidamente, as placas de poliestireno de alta afinidade (*Corning Incorporated Costar*[®]) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura por 18 horas à temperatura ambiente.

Após a lavagem com PBS-T, as placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, os sobrenadantes de cultura foram adicionados, não diluídos. Simultaneamente, as curvas padrões das respectivas citocinas recombinantes foram realizadas com diluições duplas seriadas.

Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados por 2 horas à temperatura ambiente.

Após subsequentes lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático H₂O₂ a 0,03% e tetrametilbenzedina (TMB, *Sigma-Aldrich Co.*). Ácido sulfúrico 2M foi usado para interromper a reação.

A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e filtro de referência a 570 nm. Os valores da DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com as curvas padrões obtidas com as respectivas citocinas recombinantes humanas, utilizando-se o software *Microplate Manger PC* versão 4.0 (*Bio-Rad Laboratories Inc.*, Hercules, EUA). O limite de detecção foi de 31 pg/L (IFN- γ , IL-10) e 15 pg/mL (IL-4, IL-15, IL-17).

4. 14 Análise estatística

Para todas as análises estatísticas e confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, EUA).

A comparação entre os dados obtidos nos grupos foi analisada por testes não paramétricos, uma vez que as variações não apresentavam distribuição normal pelo teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. Foram utilizados os testes *Kruskall-Wallis*, quando apropriado, e o teste de comparação de Dunn foi empregado para examinar as comparações entre os grupos. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

4. 15 Biossegurança

Todos os procedimentos anteriormente citados foram realizados em laboratórios com Nível de Biossegurança 1 e 2 (NB-1 e NB-2), utilizando metodologia de segurança específica na manipulação de materiais biológicos, incluindo a prática e técnica laboratorial, os equipamentos de segurança e construção das instalações (MINEO, 2005).

5 Resultados



5.1 Dados demográficos e características dos participantes

As características demográficas, clínicas e sorológicas dos participantes voluntários deste trabalho estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização demográfica, clínica e sorológica dos participantes atópicos (n=10) com rinite alérgica leve/moderada e participantes não atópicos (n=5).

Participantes	Gênero	Idade (anos)	Diagnóstico	<i>D. pteronyssinus</i>	
				Média de Pápula (mm*)	ELISA-IgE (IE**) (mm*)
P 1	M	29	Rinite	6	1,6
P 2	F	56	NA	0	1,0
P 3	F	27	Rinite	8	3,7
P 4	F	59	NA	0	1,1
P 5	F	30	Rinite	6	1,4
P 6	M	64	NA	0	0,9
P 7	F	23	Rinite, dermatite	5	1,6
P 8	M	30	NA	0	1,0
P 9	M	20	Rinite	7	2,3
P 10	M	27	NA	0	1,1
P 11	M	22	Rinite, dermatite	5	2,5
P 12	F	22	NA	0	0,9
P 13	F	22	Rinite	8	3,4
P 14	F	22	NA	0	1,1
P 15	M	24	Rinite, dermatite	6	2,4

**Os índices ELISA (IE) fazem parte de um banco de dados de participantes atópicos e não atópicos do Laboratório de Alergia e Imunonologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia. P, participante; M, gênero masculino, F, gênero feminino; *mm, milímetros; ELISA, *Enzyme-Liked Immunosorbent Assay*; IgE, imunoglobulina de classe E; NA, não atópico. FONTE: Acerbi (2015).

Os 15 participantes foram escolhidos e separados em dois grupos; atópicos (10) e não atópicos (5). Os participantes apresentavam idade média de 30,5 anos, maioria do gênero feminino (9) e foram selecionados, incluídos/excluídos, pelo diagnóstico clínico de rinite alérgica, alguns com casos concomitantes de dermatite atópica, positividade no TCP ao extrato total de *D. pteronyssinus* e ELISA-IgE > 1,2. Nenhum deles descreveu sintomatologia para asma.

Os sintomas mais comuns reportados pela maioria dos participantes do grupo atópico foram: irritação nos olhos e nas vias aéreas superiores, coriza e espirros, características de rinite alérgica intermitente leve a moderada. Os participantes não atópicos eram assintomáticos, com TCP negativo para o extrato bruto de *D. pteronyssinus* e outros 7 aeroalérgenos, com IE < 1,2. Todos os participantes deste estudo foram orientados por escrito e assinaram uma declaração de Consentimento Livre segundo as normas do CEP da UFU (ANEXO 2).

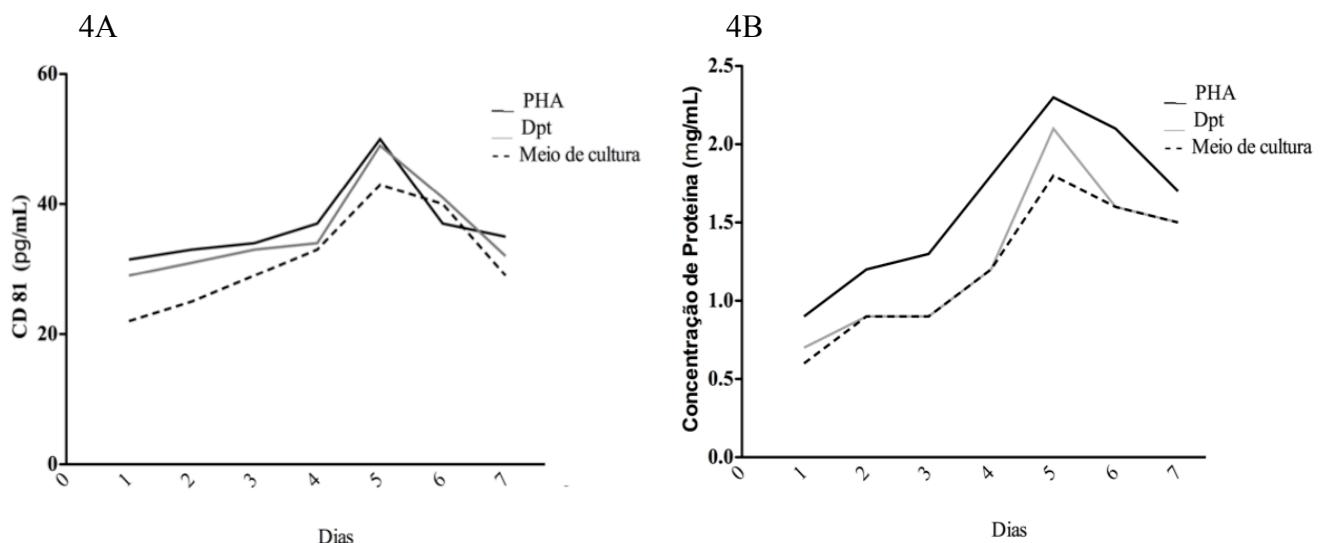
5. 2 Cinética da produção de VE por PBMC

Para investigar as melhores condições para a produção e subsequente liberação de VE, os sobrenadantes de cultura de PBMC dos indivíduos não atópicos foram monitorados por 7 dias e avaliados quanto aos teores de proteínas totais e de CD 81 das amostras contendo VE. As VE de participantes não atópicos foram as escolhidas por elas se tratarem de estímulos homólogos, mais relevantes para este trabalho.

Para traçar o perfil cinético da produção e liberação de VE nos sobrenadantes de cultura de PBMC foi usado um *pool* de VE liberadas por PBMC de dois participantes não atópicos após estímulo com mitógeno PHA, ou extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), ou meio de cultura completo.

A liberação de VE mostrou-se mais eficiente no 5º dia de cultivo celular, quando observou-se maior concentração de proteínas, concentração essa, que diminuiu gradativamente no 6º e 7º dias (FIGURAS 4A e 4B). A concentração proteica encontrada para o marcador CD81 foi expressa em pg/mL e para as proteínas totais em mg/mL.

Figura 4. - Perfil cinético da produção de VE mensurada por ELISA de captura (4A) e pelo método de *Bradford* (4B).



Cinética de produção de VE analisada usando a concentração proteica de CD81 (pg/mL) (FIGURA 4A) e de proteínas totais (FIGURA 4B) liberadas em sobrenadantes de cultura de PBMC de participantes não atópicos após diferentes estímulos. Em ambos os métodos de detecção, a melhor *performance* na produção de VE se deu ao 5º dia de cultura. PBMC, células mononucleares de sangue periférico. FONTE: Acerbi (2015).

5.3 Caracterização de VE

5.3.1 Quantificação de proteínas e colesterol

As amostras contendo VE gerada por PBMC de participantes atópicos e não atópicos após estímulos com PHA, ou extrato total de Dpt, ou meio de cultura completo foram avaliadas quanto à concentração de proteínas e de colesterol, que indicaram teoricamente, quanto de VE foram geradas por cada participante.

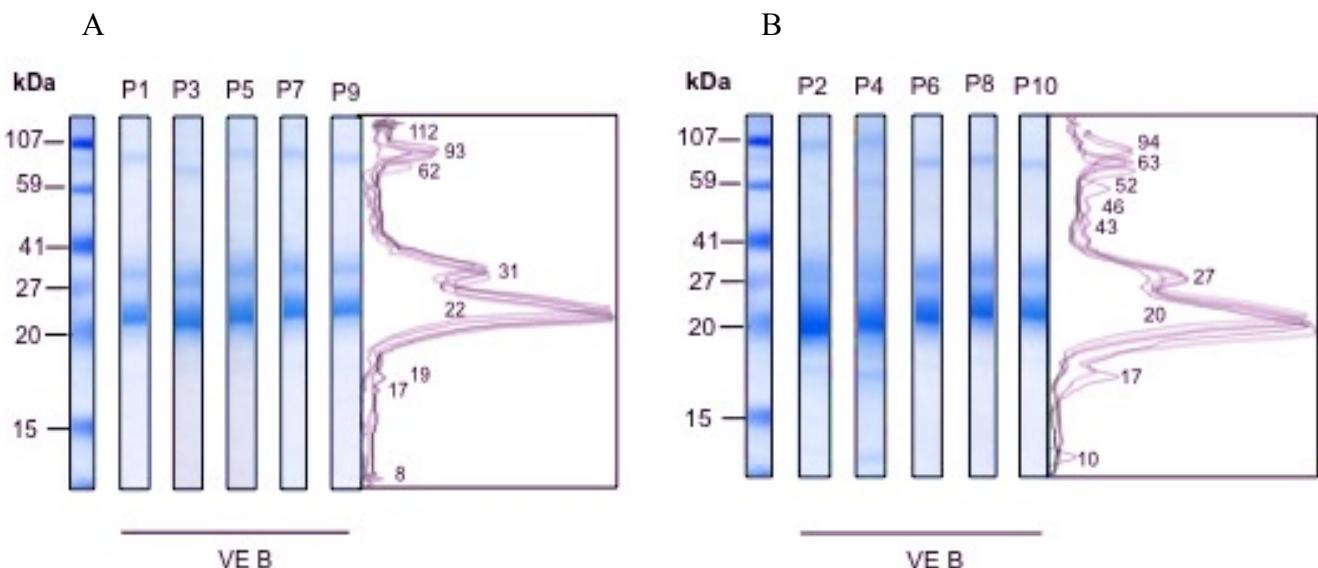
Quando analisadas pelo método de *Bradford*, as amostras de VE provenientes de PBMC de participantes atópicos estimuladas com PHA, ou extrato total Dpt, ou meio de cultura completo, geraram VE cuja concentração de proteínas foi de 0,9 a 3,0 mg/mL, ao passo que a concentração de proteínas de VE geradas por PBMC de participantes não atópicos foi de 0,8 mg/mL a 2,8 mg/mL.

O kit comercial Bioclin foi usado para avaliar a concentração de colesterol das amostras contendo VE de ambos os grupos. A menor concentração de colesterol encontrada foi de 0,8 mg/mL a máxima de 1,8 mg/mL.

4.3.2 SDS-PAGE

Após separação por eletroforese em gel de acrilamida a 10% das proteínas constitutivas de VE, os resultados demonstraram que as VE isoladas de ambos os grupos, são compostas predominantemente por bandas de proteínas com pesos moleculares compreendidos entre 10 kDa a 112 kDa, embora, como esperado, a proporção relativa das bandas seja variável entre os participantes não atópicos (FIGURA 5A) e atópicos (FIGURA 5B) sob os respectivos estímulos, PHA, ou extrato total de Dpt ou meio de cultura completo.

Figura 5 – Perfil eletroforético de proteínas de VE geradas por PBMC de participantes não atópicos e atópicos.

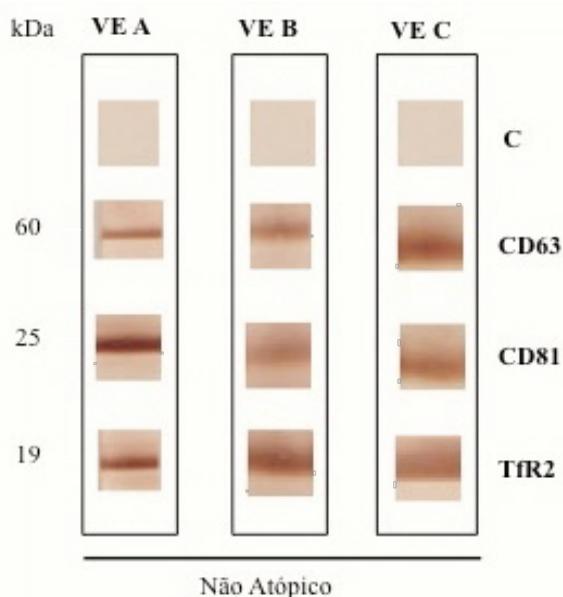


(SDS-PAGE 10%) representativo de amostras de proteínas de VE liberadas em sobrenadantes de cultura de PBMC, após estímulos com PHA, ou extrato de Dpt, ou meio de cultura completo. Perfil proteico de não atópicos (FIGURA 7A) e atópicos (FIGURA 7B). Os padrões de massa molecular (kDa) estão indicados à esquerda. As massas moleculares relativas das bandas mais expressivas estão representados à direita. PBMC, células mononucleares de sangue periférico; PHA, fitohemagglutinina; SDS-PAGE, gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio; VE B, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com extrato total de Dpt (*Dermatophagoides pteronyssinus*) P, participantes. FONTE: Acerbi (2015).

5.3.3 Western Blot

A capacidade de reconhecimento das bandas polipeptídicas presentes nas VE geradas a partir de PBMC isoladas de participantes não atópicos foi avaliada por *Western Blot* para detecção dos marcadores CD63, CD81 e TfR2. Na Figura 6 está sendo apresentada a detecção de marcadores específicos para VE, sendo que como controle foi usado PBS.

Figura 6 – *Western Blot* representativo dos componentes de VE produzidos por PBMC de participante não atópico reconhecidos por anticorpos específicos para certificação de que as estruturas isoladas eram mesmo VE.



Cada *spot* marcado pelos anticorpos foi recortado e montando de acordo com o peso molecular de cada proteína. À esquerda estão os pesos moleculares em kDa dos marcadores CD63, CD81 e TfR2. PBMC, células mononucleares de sangue periférico; CD, grupo de diferenciação; TfR2, receptor transferrina 2; C, controle; VE A, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com PHA; VE B, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; VE C, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com meio de cultura completo; PBS, solução salina tamponada com fosfatos. FONTE: Acerbi (2015).

5. 3. 4 Análise morfológica de VE e imunomarcação por microscopia eletrônica de transmissão

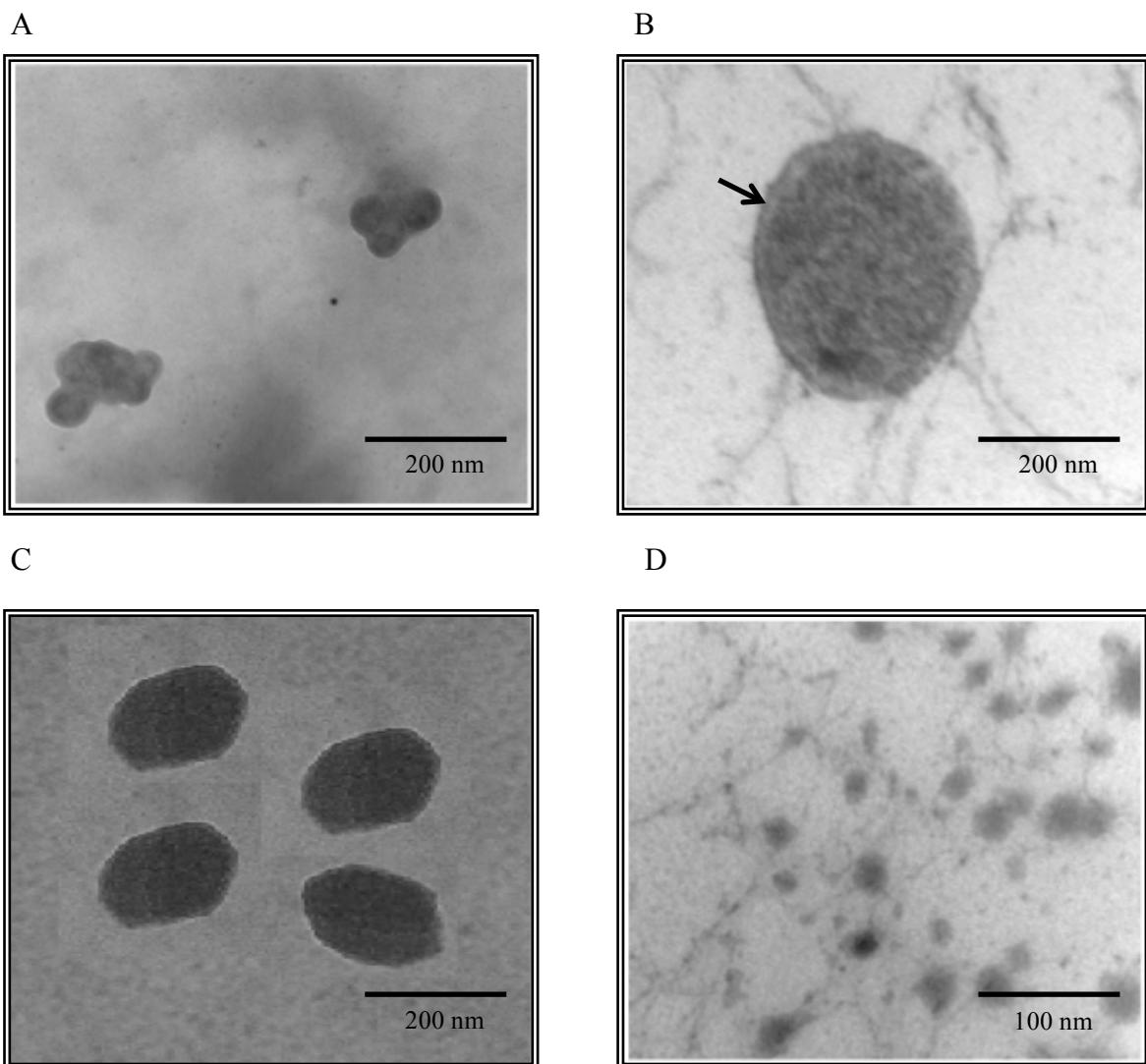
Com o intuito de investigar e validar a presença de VE nas amostras obtidas dos grupos estudados, realizamos análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão em parceria com o professor Dr. Marcelo Emílio Beletti do Laboratório de Histologia da UFU.

A análise ultraestrutural revelou vesículas arredondadas, de pequenas dimensões, com contornos uniformes e com depósitos eletrodensos (FIGURAS 7A e 7B), com morfologia semelhante às vesículas de compartimentos endossômicos, com tamanho não maiores que 150 nm, correspondentes às características descritas na literatura como sendo de exossomos.

Como a membrana plasmática, as VE apresentam membrana plasmática bilipídica, que pode ser vista indicada pela seta na figura 7B. As Figuras 7C e 7D mostram aglomerados de VE com contornos irregulares, eletrodensas ou não que podem ser caracterizadas como MV.

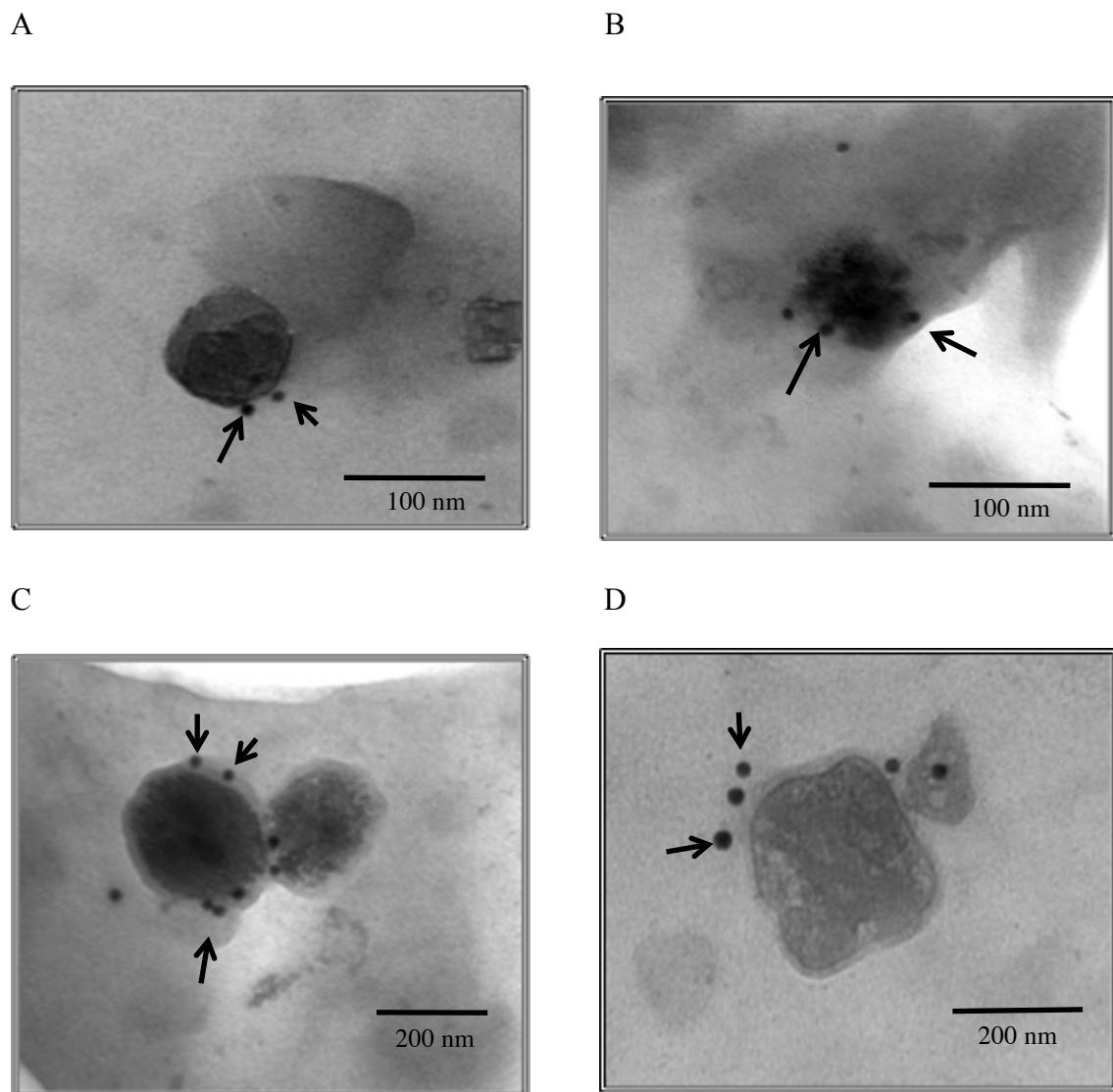
A imunomarcação com partículas de ouro coloidal na superfície das vesículas para os marcadores CD63 e CD81 confirmou que as estruturas geradas por PBMC de participantes atópicos (Figuras 8A e 8B) e participantes não atópicos (FIGURAS 8C e 8D) aparentemente têm fenótipo de VE, uma vez que as proteínas transmembrana CD63 e CD81 foram marcadas como indicado pelas setas. Marcações para CD63 nas Figuras 8A e 8D e para CD81 nas Figuras 8B e 8C.

Figura 7 – Fotomicrografia de VE isoladas de PBMC de participantes atópicos e não atópicos após estímulos com PHA, Dpt e meio de cultura completo.



O sedimento obtido por ultracentrifugação do sobrenadante de cultura de PBMC de participantes atópicos (FIGURAS 7A e 7C) e não atópicos (FIGURAS 7B e 7D) foi processado e analisado por microscopia eletrônica de transmissão. Figura 7A – Estruturas membranosas medindo em média 100 nm com superfícies regulares e eletrodensas, típicas de exossomos. Figura 7B - A seta indica a camada bilipídica típica de VE. Nas Figuras 7C e 7D – Populações de VE de contornos irregulares eletrodensas ou não, tal qual MV. Barras 200 nm e aumento de 85.000x, barra de 100 nm e aumento de 140.000x. VE, vesículas extracelulares; PBMC, células mononucleares de sangue periférico; PHA, fitohemaglutinina; Dpt, extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*. FONTE: Acerbi (2015).

Figura 8 – Imunomarcação com partículas de ouro coloidal de VE geradas por PBMC de participantes atópicos e não atópicos.



O sedimento obtido por ultracentrifugação do sobrenadante de cultura de PBMC de participantes atópicos (FIGURAS 8A e 8C) e não atópicos (FIGURAS 8B e 8D) foi processado e analisado por microscopia eletrônica de transmissão. As marcações positivas para CD63 (FIGURAS 8A e 8B) e CD81 (FIGURAS 8C e 8D) estão indicadas pelas setas. Barras 100 nm/85.000x e 200 nm/140.000x, respectivamente. PBMC, células mononucleares de sangue periférico. FONTE: Acerbi (2015).

5.4 Perfil de Citocinas

Em nosso modelo experimental, usamos como estímulos homólogos, VE isoladas de PBMC de participantes não atópicos e como estímulos autólogos, VE isoladas do próprio participante, com o objetivo de avaliarmos se o MHC II expresso pelas VE poderia se interpor em suas funções, e o que observamos foi que sob os diferentes estímulos, os níveis de citocinas mensuradas tiveram respostas diferentes, ainda que algumas, sem diferença estatística significativa. Após quatro dias de cultura, os níveis de citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e IFN- γ , expressos em pg/mL, foram mensurados em sobrenadantes de cultura de PBMC isoladas de participantes atópicos após estímulos com PHA, ou extrato total de Dpt ou meio de cultura completo, com os estímulos autólogos e com os estímulos homólogos. As análises estatísticas foram feitas comparando os estímulos autólogos e homólogos entre si (VE A – A *versus* VE A – H; VE B – A *versus* VE B – H; VE C – A *versus* VE C – H) e comparando os estímulos autólogos e homólogos com o meio de cultura completo.

Como demonstrado na Figura 9A, sob ação dos estímulos autólogos e homólogos os níveis de IL-4 diminuíram, porém com diferença estatística somente quando comparados ao meio de cultura completo ($p < 0,05$).

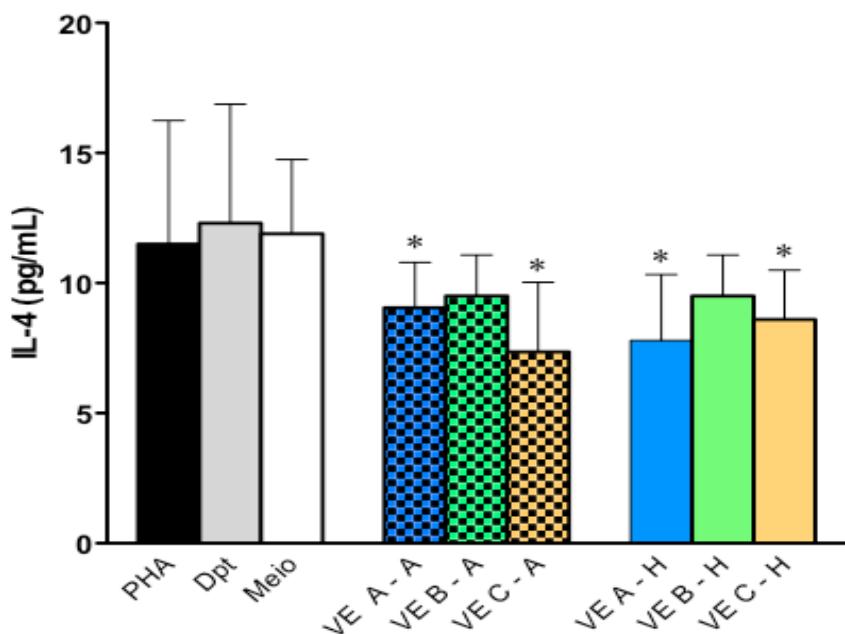
Em relação aos níveis de IL-5 (FIGURA 9B) houve aumento na produção dessa citocina, com diferença estatística significativa, quando comparados estímulos autólogos com VE geradas após estímulo com PHA, extrato total de Dpt e o meio de cultura completo. Quando comparados os níveis de IL-5 após estímulos autólogos e homólogos entre si, a diferença estatística significativa é observada somente entre VE – A *versus* VE A – H.

No gráfico da Figura 9C, os níveis de IL-10 foram significantemente maiores quando as PBMC foram estimuladas com VE homólogas. A diferença pode ser vista na comparação entre os estímulos de VE autólogas e VE homólogas entre si, VE C – A *versus* VE C – H, como também quando comparados os níveis de IL-10 gerados por VE homólogas e o meio de cultura completo ($p < 0,05$).

Quando comparamos os níveis de IL-17 secretados por PBMC de indivíduos atópicos após os estímulos com meio de cultura completo com os estímulos homólogos gerados após estímulo com PHA, observamos um aumento nesses níveis, porém sem diferença significativa. Houve discreta diminuição de IL-17 após estímulos autólogos e homólogos, entretanto, sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

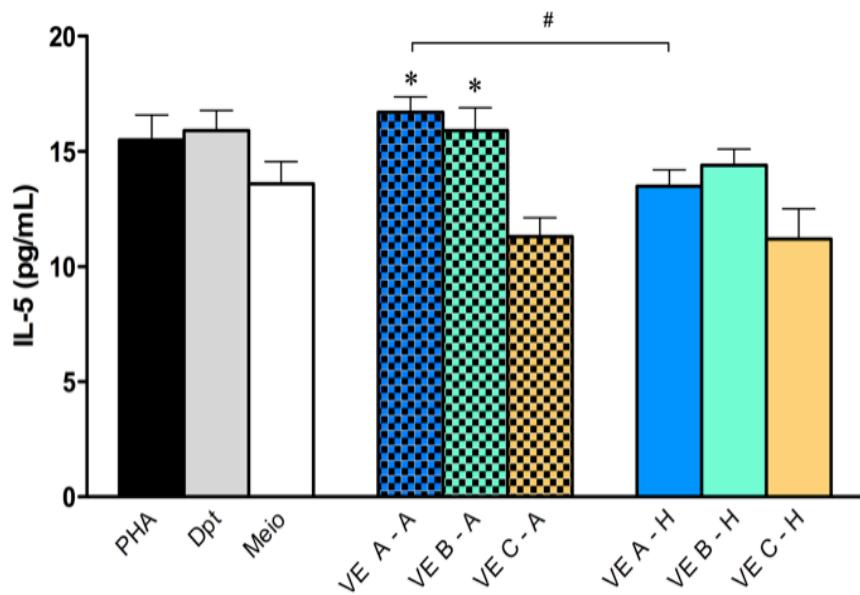
Os níveis de IFN- γ exibidos na Figura 9E demonstram uma diminuição dessa citocina quando comparados os estímulos autólogos e homólogos em relação ao meio de cultura completo, porém sem diferença estatística significativa. Essa diferença é significativa quando comparados os estímulos VE A - A *versus* VE A - H ($p < 0,05$).

Figura 9A – Níveis de IL-4, expressos em pg/mL, mensurados ao 4º dia de cultura em sobrenadantes de PBMC de participantes atópicos (n=10) pela técnica de ELISA de captura.



PMBC de participantes atópicos foram estimuladas com mitógeno PHA (5 μ g/mL), ou extrato total de Dpt (10 μ g/mL), ou meio de cultura completo, como controles, ou VE autólogas (A, B, C 1 mg/ml) ou VE homólogas (A, B, C – 1 mg/mL). Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn ($p < 0,05$). *Diferença estatística significativa em relação ao meio de cultura completo (barra branca). IL, interleucina; VE, vesículas extracelulares; PBMC, células mononucleares de sangue periférico; PHA, fitohemaglutinina; Dpt, extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; A, estímulo autólogo; H, estímulo homólogo; VE A, vesículas extracelulares geradas após estímulo com o mitógeno PHA, VE B, vesículas extracelulares geradas após estímulo com o extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; VE C, vesículas extracelulares geradas após estímulo com meio de cultura completo. FONTE: Acerbi (2015)

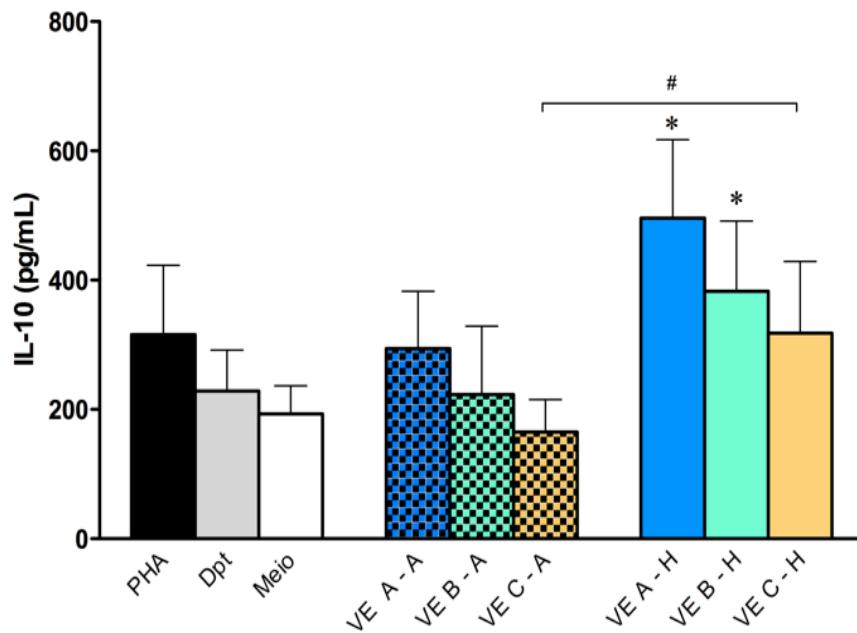
Figura 9B – Níveis de IL-5 (FIGURA , expressos em pg/mL, mensurados ao 4º dia de cultura em sobrenadantes de PBMC de participantes atópicos (n=10), pela técnica de ELISA de captura.



PBMC de participantes atópicos foram estimuladas com mitógeno PHA (5 µg/mL), ou extrato total de Dpt (10 µg/mL), ou meio de cultura completo, ou VE autólogas (A ou B ou C 1 mg/mL) ou VE homólogas (A ou B ou C 1 mg/mL). Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn ($p < 0,05$). *Diferença estatística significativa em relação ao meio de cultura completo (barra branca).

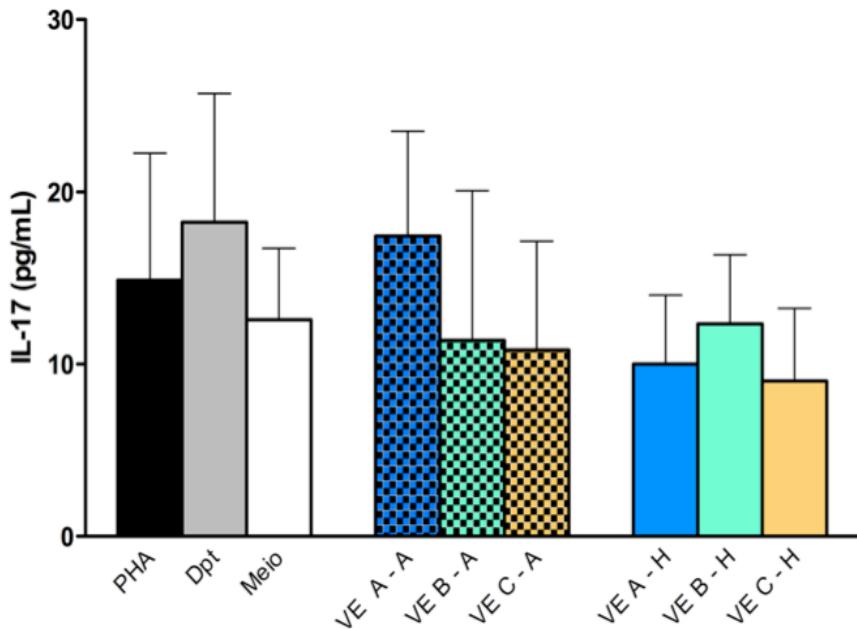
#Diferença estatística significativa quando comparados os estímulos autólogos e homólogos. IL, interleucina; VE, vesículas extracelulares; PBMC, células mononucleares de sangue periférico; PHA, fitohemagglutinina; Dpt, extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; A, estímulo autólogo; H, estímulo homólogo; VE A, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com o mitógeno PHA, VE B, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com o extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; VE C, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com meio de cultura completo. FONTE: Acerbi (2015).

Figura 9C - Níveis de IL-10, expressos em pg/mL, mensurados ao 4º dia de cultura em sobrenadantes de PBMC de participantes atópicos (n=10), pela técnica de ELISA de captura.



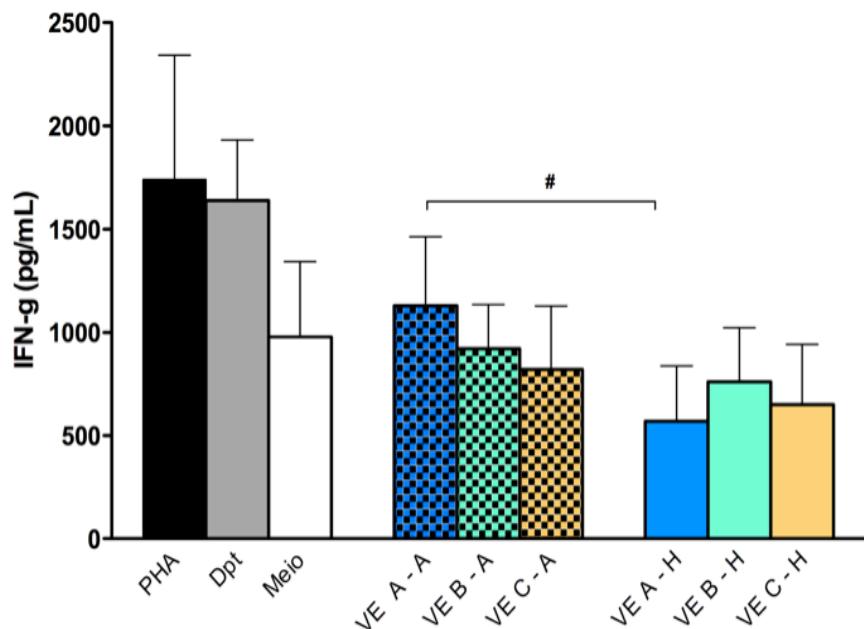
PBMC de participantes atópicos foram estimuladas com mitógeno PHA (5 µg/mL), ou extrato total de Dpt (10 µg/mL), ou meio de cultura completo, ou VE autólogas (A ou B ou C 1 mg/ml) ou VE homólogas (A ou B ou C 1 mg/mL). Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn ($p < 0,05$). *Diferença estatística significativa em relação ao meio de cultura completo (barra branca). #Diferença estatística significativa quando comparados os estímulos autólogos e homólogos. IL, interleucina; VE, vesículas extracelulares; PBMC, células mononucleares de sangue periférico; IL, interleucina; PHA, fitohemaglutinina; Dpt, extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; A, estímulo autólogo; H, estímulo homólogo; VE A, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com o mitógeno PHA; VE B, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com o extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; VE C, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com meio de cultura completo. FONTE: Acerbi (2015).

Figura 9D – Níveis de IL-17, expressos em pg/mL, ao 4º dia de cultura em sobrenadantes de PBMC de participantes atópicos (n=10), pela técnica de ELISA de captura.



PBMC de participantes atópicos foram estimuladas com mitógeno PHA (5 µg/mL), ou extrato total de Dpt (10 µg/mL), ou meio de cultura completo, ou VE autólogas (A ou B ou C 1 mg/ml) ou VE homólogas (A ou B ou C – 1 mg/mL). Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn ($p < 0,05$). IL, interleucina; VE, vesículas extracelulares; PBMC, células mononucleares de sangue periférico; PHA, fitohemaglutinina; Dpt, extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; A, estímulo autólogo; H, estímulo homólogo; VE A, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com o mitógeno PHA, VE B, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com o extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; VE C, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com meio de cultura completo. FONTE: Acerbi (2015).

Figura 9E – Níveis de IFN- γ , expressos em pg/mL, ao 4º dia de cultura em sobrenadantes de PBMC de participantes atópicos (n=10), pela técnica ELISA de captura.



PBMC de participantes atópicos foram estimuladas com mitógeno PHA (5 μ g/mL), ou extrato total de Dpt (10 μ g/mL), ou meio de cultura completo, ou VE autólogas (A ou B ou C 1 mg/ml) ou VE homólogas (A ou B ou C – 1 mg/mL). Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn ($p < 0,05$). #Diferença estatística significativa quando comparados os estímulos autólogos e homólogos. IFN, interferon; VE, vesículas extracelulares; PBMC, células mononucleares de sangue periférico; PHA, fitohemaglutinina; Dpt, extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; A, estímulo autólogo; H, estímulo homólogo, VE A, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com o mitógeno PHA, VE B, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com o extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus*; VE C, vesículas extracelulares geradas por PBMC após estímulo com meio de cultura completo. FONTE: Acerbi (2015).

6 Discussão/Conclusão



Neste trabalho isolamos, purificamos e caracterizamos VE geradas por PBMC de participantes atópicos e não atópicos, e analisamos, *in vitro*, o potencial de VE isoladas de PBMC de indivíduos não atópicos, modularam os níveis de citocinas produzidas por PBMC de indivíduos com alergia respiratória, especialmente rinite alérgica (participantes atópicos). Nossos resultados mostraram que após estímulo com VE homólogas, as PBMC isoladas de participantes atópicos alteraram seu fenótipo, não para um perfil Th1, que foi uma de nossas primeiras hipóteses, mas sim para um perfil Treg, como demonstrado nas figuras 9C e 9E, com diminuição nos níveis de IFN- γ e aumento significativo de IL-10.

A maioria dos indivíduos atópicos selecionados para este trabalho apresentaram quadro de rinite alérgica classificada como intermitente leve e somente um destes apresentou rinite alérgica moderada a grave, segundo critérios do ARIA (BOUSQUET; et al., 2004), alguns com dermatite atópica concomitante, porém nenhum deles com asma alérgica. Todos eles são naturais e residentes no Triângulo Mineiro, o que explica o fato de ser a rinite, a doença alérgica mais comum nesta região (SOPELETE et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; ALVES, 2008).

A metodologia escolhida para isolar VE que foi desenvolvida neste trabalho já está bem estabelecida. Para o estudo da concentração molecular/ou da função dessas vesículas, é fundamental utilizar métodos de isolamento de alta qualidade, que proporcionem um rendimento adequado e o menor grau possível de contaminação (LÄSSER; ELDH; LÖTVAL, 2012).

Para chegarmos na definição do tempo de duração da cultura de PBMC para a secreção de VE, avaliamos, através de experimentos iniciais, a cinética de liberação dessas vesículas em sobrenadantes de cultura, durante sete dias consecutivos usando o método de *Bradford* para quantificar proteínas totais, uma vez que a maioria dos constituintes de VE é proteico (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Avaliamos também, durante sete dias consecutivos, por meio de método imunoenzimático, a concentração da proteína transmembrana da família tetraspanina, a CD81, que é um marcador constitutivo de VE (ANDRE et al., 2007), e está envolvida na aderência celular, na sinalização funcional e na estimulação celular (DENZER et al., 2000). O que observamos foi que no 5º dia de cultura, a secreção de proteínas totais e de CD81 foi mais eficiente, produzindo maiores concentrações proteicas, decrescendo nos dias subsequentes (FIGURAS 4A e 4B).

Como somente a quantificação dos níveis de proteínas totais não seriam dados fidedignos, uma vez que as proteínas mensuradas poderiam ser de células extravasando material intracelular em decorrência de perdas e danos irreversíveis por apoptose, foi necessário uma medição específica, para a certificação, feita por meio do marcador de CD81, utilizando método imunoenzimático. Nossos dados nos informaram que no 5º dia a cinética de produção de VE atingiu seu ponto máximo. Vesículas são abruptamente liberadas pelas células em sobrenadante de cultura a partir do 5º ao 6º dia de cultura, seguido por um platô nos dias 7 a 8 (ADMYRE et al., 2007). No nosso caso, o uso do mitógeno PHA pode ter comprometido a viabilidade celular, diminuindo a secreção de VE a partir do 6º dia de cultura. A PHA é um mitógeno policlonal que tem sido amplamente utilizada em estudos *in vitro* de ativação de células, para induzir mitose por um mecanismo que é dependente de receptor de célula T (TCR), porém, nem todas as células T sofrem esse processo, e dependendo do tempo de duração da cultura, as células podem ser induzidas à apoptose (PAUL, 1999).

As VE geradas durante os dias de cultivo celular foram isoladas em etapas de centrifugação e ultracentrifugação, onde debrís celulares foram removidos o máximo possível. A caracterização das vesículas foi definida por análise ultraestrutural, pela concentração de proteínas e colesterol, pelo peso molecular relativo de suas proteínas e por marcadores qualitativos específicos para VE. A maioria dos constituintes de VE são proteínas, algumas específicas, que dependem da célula que lhes deu origem, essas são usadas como marcadores, outras, constitutivas, estão envolvidas na biogênese, na adesão celular e na fusão com a membrana (BOBRIE et al., 2011). Os lipídios, como colesterol (presente na maioria das VE) e esfingomielina, estão envolvidos na manutenção dos microdomínios lipídicos que são essenciais para a interação entre as células (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). A concentração de proteínas e colesterol nas VE isoladas de PBMC de participantes atópicos, como esperado, foi significativamente maior. Nas patologias, a secreção de VE é maior quando comparada com situações fisiológicas (SKOKOS et al., 2003; PRADO et al., 2008; SHIN et al., 2010).

Na análise do perfil eletroforético de proteínas de amostras de VE isoladas de atópicos e não atópicos, percebemos que o perfil é muito semelhante, porém, com bandas proteicas mais fortemente coradas provenientes justamente de VE geradas por PBMC de atópicos, e as massas moleculares relativas calculadas pelo *software* ImageJ indicam que inúmeras proteínas catalogadas como constituintes de VE podem estar presentes ali (FIGURA

5). O ideal para podermos afirmar com maior certeza a presença de proteínas clássicas constituintes de VE já descritas na literatura seria podermos contar com os resultados da espectrometria de massa. A proteômica de VE geradas por PBMC após cada estímulo nos ajudaria a diferenciar, não só quantitativamente, mas qualitativamente essas vesículas geradas pelos dois grupos, atópicos e não atópicos.

Visando analisar a especificidade das VE isoladas de participantes não atópicos (VE homólogas), técnicas de imunomarcação foram realizadas por meio de *western blot* e microscopia eletrônica de transmissão, associada à fenotipagem dos marcadores de membrana específicos para VE, como as tetraspaninas, CD63 e CD81. O resultado das duas técnicas (FIGURA 6 e FIGURAS 8A, 8B, 8C e 8D) nos confirmaram que as estruturas isoladas eram sem dúvidas, VE.

Como as vesículas usadas como estímulos homólogos eram as dos participantes não atópicos, essas foram as selecionadas para passarem por uma das técnicas de confirmação consideradas importantes, o *western blot*. Esta técnica evidenciou, em amostras contendo VE extraídas do grupo não atópico, a presença de bandas com pesos moleculares de 19, 25 e 60 kDa que correspondem provavelmente aos marcadores, TfR2, CD81 e CD63, respectivamente. Cada *spot* marcado pelos anticorpos foi recortado e montado de acordo com o peso molecular de cada proteína. Em cada ‘tira’ de nitrocelulose estavam dispostas amostras proteicas com VE geradas após estímulo com PHA (VE A), Dpt (VE B) e meio de cultura completo (VE C). O que encontramos foram nítidas diferenças na coloração das bandas, muito provavelmente porque os estímulos definiram a maior ou menor expressão dessas proteínas transmembranas constitutivas de VE (FIGURA 6).

As VE de participantes atópicos e não atópicos foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão e também forneceram imagens comprobatórias de que as estruturas isoladas eram mesmo VE, tanto pelos contornos arredondados regulares (FIGURA 7A), eletrodensos ou não, quanto pela nítida membrana bilipídica (FIGURA 7B), características morfológicas típicas de exossomos, segundo vasta literatura (RAPOSO et al., 1996; DENZER, et al., 2000; THÉRY, et al., 2002, INAL; FAIRBROTHER; HEUGH, 2013). Por outro lado, outras imagens revelaram estruturas com formatos irregulares, eletrodensas, agrupadas ou isoladas, semelhantes à inúmeras imagens compatíveis com as estruturas denominadas de MV (FIGURAS 7C e 7D) (INAL; FAIRBROTHER; HEUGH, 2013).

Quanto à imunomarcação, as setas na figura 8 indicam a presença dos marcadores CD63 (FIGURAS 8A e 8B) e CD81 (FIGURAS 8C e 8D), certificando o fenótipo de nossas amostras.

Assim, nossos resultados, quanto ao isolamento e caracterização de VE, são inequivocamente verossímeis. Vários relatos corroboram que nossos resultados tratam-se de estruturas vesiculares de origem endossomal ou originadas diretamente da membrana plasmática. Exossomos são produzidos como VIL dentro de EMV e apresentam pequenas dimensões (RAPOSO et al.; 1996; WOLFERS et al., 2001, EKSTRON, 2007), além disso, são definidas como vesículas membranosas de forma arredondada, bastante homogêneas com diâmetro não superior a 150 nm por microscopia eletrônica (BARD et al., 2001), por outro lado, as microvesículas apresentam contornos nem sempre regulares e são liberadas de forma constitutiva a partir da superfície da célula (HUGEL, et al., 2005), ou quando as células tornam-se desafiadas por química ou estresse físico (INAL; FAIRBROTHER; HEUGH, 2013). A exata definição de exossomos e MV continua sendo um desafio a ser vencido, tanto pela diversidade, quanto pelos subtipos com propriedades físicas e biológicas sobrepostas (HIND et al., 2010). Entretanto, acreditamos que nosso modelo experimental para isolar, purificar e caracterizar VE foi estabelecido com base nos critérios descritos anteriormente e pode assim, ser considerado bem sucedido.

Para avaliar se as VE secretadas por PBMC de indivíduos não atópicos, sob ação de diferentes estímulos, podem efetivamente desempenhar importante papel nas reações alérgicas, inclusive mudando o perfil de resposta imune, em especial sobre o perfil de citocinas, usamos as VE isolados de PBMC de participantes não atópicos, aos quais chamamos de estímulo homólogo, para estimular *in vitro* as PMBC de atópicos e subsequentemente avaliamos a produção de citocinas nos sobrenadantes de cultura celular pelo método imunoenzimático ELISA.

É importante lembrar que o número baixo de participantes interfere sobremaneira no resultado estatístico, mas ainda assim, serve de parâmetro e padronização para futuros ensaios, além disso, é importante ressaltar que todos os nossos participantes foram diagnosticados com rinite alérgica intermitente leve a moderada, dois participantes com IE > 3, mas em compensação, muitos outros no limite do *cut off* de 1,2, portanto, são compatíveis os níveis próximos a basais das citocinas IL-4 e IL-5 obtidos neste estudo (FIGURA 9A e 9B, respectivamente). Um outro fato interessante a ser comentado, e que talvez tenha interferido

nesse baixos níveis de IL-4 e IL-5 produzidos, é que a maioria de nossos participantes é composta por mulheres e segundo Hughes; Clark (2007), o sistema imune apresenta dimorfismo sexual, o que predispõe as mulheres à respostas imunes, humoral e celular, superiores, ou seja, as manifestações clínicas são menos intensas, que parecem estar relacionadas aos hormônios sexuais (ANSAR AHMED et al., 1985). Como exemplo da influência dos hormônios sexuais na resposta imune, os mesmos Hughes e Clarck (2007) demonstraram, *in vitro*, que DC expressam receptores para estrógeno e progesterona, o que explica a influência desses hormônios na diferenciação de DC a partir de monócitos, pois esses hormônios regulam a ativação das DC por aumentarem a expressão de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD86, bem como o MHC II.

Uma das hipóteses originalmente sugerida por nós, de que VE geradas por PMBC de indivíduos não atópicos (estímulos homólogos), poderiam levar à mudança no perfil de resposta imune, de Th2 para Th1, não se confirmou, mesmo porque os níveis de IL-4 e IL-5 (FIGURA 9A e 9B, respectivamente) obtidos após os estímulos, continuaram apenas basais. Podemos enumerar alguns fatores que podem ter interferido na produção/aferição dos níveis de citocinas IL-4 e IL-5, além do já comentado anteriormente em relação aos hormônios sexuais, por exemplo; o tempo de cultura, 4 dias, pode ter afetado a liberação dessas citocinas, mas em contrapartida, com mais dias colocaríamos em cheque a viabilidade celular, devido ao uso de mitógeno PHA e de extrato total de Dpt; a sensibilidade da técnica de detecção de citocinas, a metodologia aplicada, uma vez que o ELISA em comparação a dosagem de citocinas por *Cytometric Bead Array* (CBA), por exemplo, apresenta níveis menores do limiar de detecção; esses fatos nos fazem refletir sobre a estratégia que usamos para quantificar os níveis dessas citocinas.

Quando avaliamos o comportamento das PBMC sob ação dos diferentes estímulos, vimos que os estímulos homólogos foram capazes de diminuir os níveis de IFN- γ (FIGURA 9E), embora sem diferença significativa, quando comparados os estímulos de VE entre si, enquanto que, o que aventávamos era talvez um aumento expressivo das mesmas, com subsequente diminuição na expressão das citocinas IL-4 e IL-5. Entretanto, o efeito mais especialmente notável foi o aumento significativo na expressão de citocina IL-10 (FIGURA 9C), e diminuição de INF- γ , confirmado o papel regulador ou modular dessas vesículas. A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória capaz de suprimir tanto respostas inatas quanto adaptativas durante infecções e estados relacionados a respostas autoimunes

(SAKAGUCHI, et al., 1995). A IL-10 é produzida principalmente por células CD8+ ativadas, além de células Th virgens, Th1, Th2 ativadas e linfócitos B. Mastócitos e monócitos ativados por lipopolissacarídeos (LPS) também podem produzir IL-10, sendo fontes menos importantes (BENJAMIN; KNOBLOCK; DAYTON, 1992).

O efeito principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- β . Inibe ainda a proliferação de células Th1, mas não de Th2, diminuindo ainda a função cito-lítica e secretora de citocinas por Th1 e facilitando o desenvolvimento de respostas Th2. IL-10 atua como um co-estimulador para a proliferação de mastócitos e seus progenitores. É ainda co-estimulador no crescimento dos timócitos imaturos, agindo como fator de diferenciação para as células T citotóxicas, sendo esta ação de menos intensidade.

Thunberg e colaboradores (THUMBERG et al., 2007), em um estudo sobre a relação Th1/Treg e pólen de bétula, mostraram que tanto nos pacientes atópicos, quanto nos controles, o aumento nos níveis IL-10 suprimia a produção de citocinas de perfil Th1. Esse fato já foi visto em relação às células tumorais, onde VE tumorais funcionariam enfraquecendo a resposta imune antitumoral, afetando a resposta efetora, diminuindo os níveis de IFN- γ e aumentando os níveis de IL-10 (PANT et al., 2012).

Surpreendentemente, o aumento expressivo nos níveis de IL-10 nos leva a aventar que o perfil de resposta após estímulos com VE homólogas passou a ser Treg, embora células Th2 também produzam IL-10 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). As células Treg são constitutivamente CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FOXP3 $^{+}$, equilibram os efeitos de uma resposta imune vigorosa. Se em excesso podem limitar a magnitude e a eficiência do sistema imune (SAKAGUCHI, et al., 1995), porém, na alergia, são importantes na medida em que regulam as respostas alérgeno-específicas (DOMDEY et al., 2010), suprimindo a resposta de mastócitos, basófilos e eosinófilos, as células efetoras na inflamação alérgica (OZDEMIR; AKDIS; AKDIS, 2009). Wang e colaboradores (WANG et al., 2009) demonstraram que pacientes com asma alérgica têm resposta imune Treg CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ insuficiente, excessiva resposta Th2 alérgeno-específica e reforçando o descrito anteriormente, em contrapartida, indivíduos saudáveis, não atópicos/alérgicos, em resposta a alérgenos comuns presentes no meio ambiente, têm um maior número de células Treg alérgeno-específicas. Em modelos experimentais *in vivo*, o papel das citocinas produzidas pelas células Treg, IL-10 e TGF- β na regulação da resposta imune é complexo e depende do tempo e contexto desta resposta (PICCIRILLO, 2008). Enquanto a citocina TGF- β exerce função supressora sobre as células

alvo, modulando a expressão de FOXP3 pelas Treg, transformando as células T periféricas CD4⁺CD25⁻ em CD4⁺CD25⁺, a IL-10, inibe a ativação das APC e é antagonista do IFN- γ , sendo relacionada às reações de controle da inflamação nos tecidos alvo sexuais (ANSAR AHMED et al., 1985). Os níveis de TGF- β não foram mensurados neste trabalho.

Elevados níveis de IL-10 também inibem a produção de IgE e induzem a formação de IgG4 e IgA, que competem pelos receptores de IgE nas células efetoras, consequentemente, reduzindo a atividade inflamatória alérgica de mastócitos, basófilos e eosinófilos (VALENTA; NIEDERBERGER, 2007).

Em relação ao papel das Treg na alergia, a literatura mostra resultados controversos. Taams e colaborados (TAAMS et al., 2006) observaram *in vitro*, que a depleção de Treg em indivíduos normais pode aumentar a resposta do tipo Th2 a vários alérgenos, incluindo o leite, o níquel e gramíneas. Entretanto, em amostras de sangue de pacientes alérgicos a pólen, a depleção de Treg não afetou a liberação de citocinas T efetoras quando comparados aos controles (SKIRINDO, 2008). Em outro caso, pacientes com asma grave demonstraram alteração na sinalização de quimiocinas relacionadas às Treg, além de secreção diminuída de IL-10 (BACCHETTA; GAMBINERI; RONCAROLO, 2008; NGUYEN et al., 2009). Provoost e colaboradores (PROVOOST, et al., 2009) descreveram uma diminuição na expressão da proteína FOXP3 quando avaliaram pacientes com asma, de intermitente a moderada, e neste mesmo estudo, eles demonstraram que quando os pacientes usaram corticoide inalado apresentaram uma maior expressão de FOXP3 em comparação aos controles. As Treg também podem ser induzidas por IL-10 secretada por um subgrupo de células B, as Breg, que têm a habilidade de diminuir os níveis de IL-17 e aumentar IL-10 (FLORES-BORJA, 2013).

Se confirmadas as possibilidades de que VE possam ser importantes para a resposta imune na alergia, elas poderão constituir um novo alvo terapêutico nas doenças alérgicas, ou poderão, alternativamente, serem usadas para manipular a resposta imune de célula Th efetoras e naïves (ADMYRE et al.; 2008) para células Treg, ao invés de uma resposta inflamatória alérgica, como ocorre no decurso de uma resposta de perfil Th2, e apesar de não haver um consenso sobre os mecanismos de ação das Treg, estas células podem ser úteis na compreensão das principais doenças alérgicas.

Neste contexto, e fundamentados em tudo o que foi exposto anteriormente, concluímos com este trabalho que VE isoladas de PBMC de indivíduos não atópicos, foram

capazes de influenciar o perfil de citocinas de indivíduos atópicos, modulando esse perfil, com diminuição de IFN- γ e aumento significativo dos níveis de IL-10, induzindo a um perfil de resposta imune com efeito regulador. Este fato não indica, por si só, a possibilidade de VE virem a ser utilizadas como alvos terapêuticos para prevenção, diagnóstico e tratamento antialérgico, porém, explicita a capacidade dessas vesículas de influenciarem o perfil de resposta imune durante a secreção de citocinas na alergia.

7 Referências



- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, p. 432-452, 2008.
- ADMYRE, C. et al. B-cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T-cells to proliferate and produce Th2-like cytokines. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 120, n. 6, 1418-1424, Dec. 2007.
- ADMYRE, C. et al. Exosomes - nanovesicles with possible roles in allergic inflammation. **Allergy**, Copenhagen, v. 63, n. 4, p. 404-408, Apr. 2008.
- AGEA, E. et al. Human CD1-restricted T cell recognize of lipids form pollens. **J Exp Med**, New York, v. 202, n. 2, p. 295-308. Jul. 2005.
- AKDIS, C. A. et al. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. **J Clin Invest**, New Haven, v. 102: p. 98-106, Jul. 1998.
- AKDIS, C. A. Future of allergen-specific immunotherapy: better understanding of the mechanism, novel treatment, and lon-term-cure. **Immunol Allergy Clin North Am**, Philadelphia, v. 26, p. 13-26, May. 2006.
- AKDIS, M.; AKDIS, C. A. J Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 119, n. 4, p. 780-91, Feb. 26, 2007
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of The Cell**. 5^a. ed. Nova York: Garland Science, Taylor & Francis Group, Jun. 2012.
- ALBERTS, M. et al. Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. **Biol Reprod**, New York, v. 86, p. 82, Mar. 2012.
- ALMEIDA, K. C. et al. Responses of IgE, IgG1 and IgG4 to concanavalin-A binding Blomia tropicalis antigens in allergic patients. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 39, p. 1445-1454, Nov. 2006.
- ALVES, R. Humoral and cellular immune responses to Blomia tropicalis and concanavalin A-binding fractions in atopic patients. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 39, p. 1445-1454, Sep. 2008.
- ANDERSEN, J. S.; MANN, M. Organellar proteomics: turning inventories into insights. **EMBO Rep**, Oxford, v. 7, p. 874–879, Set. 2006.
- ANDRE, F. et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. **Lancet**, London, v. 360, p. 295– 305, Jul. 2002.
- ANSAR AHMED, S.; PENHALE, W. J.; TALA, N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 121, n. 3, p. 531-551, Dec. 1985.

- ARRUDA et al. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clin Exp Allergy**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 433-439, Jul. 1991.
- ASEA, A. et al. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. **J Reprod Immunol**, Dublin, v. 79, p. 12-17, Oct. 2008.
- BACCHETTA, R.; GAMBINERI, E.; RONCAROLO, M. G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 120, n. 2, p. 227-35, Aug. 2007
- BARD, P. et al. Proteomic analysis of exosomes secreted by Human Mesothelioma cells. **Am. J Pathol**, New York, v. 164, n. 5, p. 1807-1815, May 2004.
- BARRÈS, C. et al. Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. **Blood**, New York, v. 115, p. 696-705, Jan. 2010.
- BEAUDOIN, A. R.; GRONDIN, G. Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1071, p. 203; Nov. 1991.
- BENJAMIN, D.; KNOBLOCK, T. J.; DAYTON, M. A. Human B cell interleukin-10 cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukine-10. **Blood**, New York, v. 80, n. 5, p. 1289-1298, Fev, 1992.
- BELLINGHAM, S.A.; COLEMAN, B. M.; HILL, A. F. Small RNA deep sequencing biogenesis and function. **Nat Rev Immunol**, Oxford, v. 2, p. 569-579, Aug. 2002.
- BELLINGHAM, S. A.; COLEMAN, B. M.; HILL, A. F. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. **Nucleic Acids Res**, London, v. 40, p. 10937-10949, Nov. 2012.
- BERNSTEIN, I. L.; STORMS, W. W. Pratice parameters for allergy diagnostic testing. **Annals Allergy, Asthma, Immunol**, McLean, v. 75, p. 543-625, Dec. 1995.
- BISHOP, D. G.; WORK, E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. **Biochem. J.**, London, v. 96, p. 567-576, Aug. 1965.
- BJORKSTÉN, B. The intrauterine and postnatal environments. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 104, p. 1119-1127, Dec. 1999.
- BLANCHARD, N. et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. **J Immunol**, Baltimore, v. 168, p. 3235-3241, Apr. 2002.
- BOBRIE, A. et al. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. **Traffic**, Copenhagen, v. 12, p. 1659-1668, Dec. 2011.

- BOQUETE, C. House dust mite species and allergen levels in Galicia, Spain: a cross-sectional, multicenter, comparative study. **J Invest Allergol Clin Immunol**, Barcelona, v. 16, n. 3, p. 169-176, 2006.
- BOOTH, A. M. et al. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. **J Cell Biol**, New York, v. 172, p. 923-935, Mar. 2006.
- BOUSQUET, J. et al. Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 130, n. 5, p. 1049-1062, Nov. 2012.
- BOUSQUET, J. et al. The ARIA/ EAACI criteria for antihistamines: an assessment of the efficacy, safety and pharmacology of desloratadine. **Allergy**, Copenhagen, v. 59, p. 4-16, 2004.
- BROUWERS, J. F. et al. Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. **Proteomics**, Weinheim, v. 13, p. 1660-1666, May. 2013.
- BURDEN, H. P. et al. Prostasomes – their effects on human male reproduction and fertility. **Hum Reprod Update**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 283-292, May-Jun. 2006.
- BUSCHOW, S. I. et al. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. **Traffic**, Copenhagen, v. 10 p. 1528-1542, Oct. 2009.
- CABY, M. P. et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **Int Immunol**, Oxford, v. 17, p. 879-887, Jun. 2005.
- CAI, H.; REINISCH, K.; FERRO-NOVICK, S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. **Dev Cell**, Cambridge, v. 12 p. 671-682, May. 2007.
- CAMUSSI, G. et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. **Kidney Int**, New York, v. 78, n. 9, p. 838-848, Nov. 2010.
- CHATTERJEE, S. N.; DAS, J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. **J. Gen. Microbiol**, London, v. 49, p. 1-11, Oct. 1967.
- CHU, Z.; WITTE, D. P.; QI, X. Saposin C-LBPA interaction in lateendosomes/lysosomes. **Exp Cell Res**, New York, v. 303, p. 300-307, Feb. 2005.
- CLAYTON, A. et al. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immunomagnetic isolation and flow cytometry. **J Immunol Methods**, Amsterdam, v. 247, p. 163-174, Jan. 2001.
- COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in Cell Biol**, Cambridge, v. 19, p. 43-51, Feb. 2009.

- COSMI, L. et al. Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines. **Blood**, New York, v. 103, p. 3117–3121, Apr. 2004.
- CUSTOVIC, A. et al. A. House dust mite and cat allergen in different indoor environments. **Clin Exp Allergy**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 164-168, Dec. 1994.
- CUSTOVIC, A. et al. Domestic allergens in public places II: dog (can f 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in dust and mite, cat, dog and cockroach allergens in air in public buildings. **Clin Exp Allergy**, Oxford, v. 26, p. 1246-1252, Nov. 1996.
- DENZER, K. et al. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. **J Cell Sci**, London, v. 113, n. 19, p. 3365–3374, Oct. 2000.
- DEREGIBUS, M. C. et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. **Blood**, New York, 110, p. 2440–2448, Oct. 2007.
- DIB, S. A.; TSCHIEDEL, B.; NERY, M. Diabetes melito tipo 1: pesquisa à clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 143-145, Mar. 2008.
- DOAN, T. T.; MELVOLD, R.; WALTENBAUGH, C. **Imunologia Médica Essencial**. Tradução por Eiler Frisch Toros, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.
- DOMDEY, A. et al. The T cell response to major grass allergens is regulated and includes IL-10 production in atopic but not in non-atopic subjects. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 152, p. 243-254, Feb. 2010.
- DUDDY, M. et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. **J Immunol**, Baltimore, v. 178, p. May 2007.
- EKSTROM, K. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol**, London, v. 9, p. 654-659, Jul. 2007.
- ESCOLA, J.M. et al. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 273, p. 20121–20127, Aug. 1998.
- FAURÉ, J. et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. **Mol Cell Neurosci**, San Diego, v. 31, p. 642-648, Apr. 2006.
- FERREIRA, M.; COELHO, R.; TRINDADE, J. C. Prevenção primária da doença alérgica. **Acta Med Port**, Lisboa, v. 20, p. 15-19, May. 2007.
- FLORES-BORJA, F. et al. CD19+ CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. **Sci Transl Med**, Washington, v. 5, p. 173-179, Feb. 2013.

- GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, London, v. 454, p. 445–454, Jul. 2008.
- GEHA, R. S.; JABARA, H. H.; BRODEUR, S. R. The regulation of IgE class switch recombination: balancing immune function and disease. **Nat Rev Immunol**, London, v. 3, n. 9, p. 721-732, Sep. 2003.
- GELBER, L. E. et al. Sensibilization and exposure to indoor allergens as risk factors for asthma among patients presenting to hospital. **Am Rev Res Dis**, New York, v. 147, n. 3, p. 537-578, Mar. 1993.
- GÉMINARD, C. et al. Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. **Traffic**, Copenhagen, v. 5, p. 181–193, Mar. 2004.
- GERN, J. E. Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v. 105, p. 497-502, Feb. 2000.
- GYÖRGY, B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci**, New York, v. 68, p. 2667–2688, Aug. 2011.
- HALLAM, C. et al. House dust mite allergen in feather and synthetic pillows. **Clin Exp Allergy**, Oxford, v. 54, p. 407-408, Feb. 1999.
- HARDING, C. V.; HEUSER, J.; STAHL, P. D. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. **Eur J Cell Biol**, Stuttgart, v. 35, p. 256–263, Nov. 1984.
- HARDING, C. V.; HEUSER; J. E.; STAHL, P. D. Exosomes: Looking back three decades and into the future. **J Cell Biol**, New York, v. 200, p. 367–371, Feb. 2013.
- HEIJNEN, H. F. et al. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. **Blood**, New York, v. 91, p. 2313–2325, Apr. 1998.
- HEIJNEN, H. F. et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. **Blood**, New York, v. 94, p. 3791–3799, Dec. 1999.
- HESS, C. et al. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. **J Immunol**, Baltimore, v. 163, p. 4564–4573, Oct. 1999.
- HIND, E. et al. Red cell PMVs, plasma membrane-derived vesicles calling out for standards. **Bioch Biophys Res Commun**, New York, v. 399, p. 465–469, Sep. 2010.
- HRISTOV, M. et al. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. **Blood**, Nova York, v. 104, p. 2761–2766, Nov. 2004.

- HOLME, P. A. et al. Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. **Thromb Haemost**, Stuttgart, v. 72, p. 666-671, Nov. 1994.
- HOSSEINI, H. M. et al. The Role of Exosomes in Infectious Diseases. **Inflamm Allergy Drug Targets**, San Francisco, v. 12, p. 29-37, Feb. 2013.
- HUGEL, B. et al. Membrane microparticles: two sides of the coin. **Physiology**, Bethesda, v. 20, p. 22-27, Feb. 2005.
- HUGHES, C. G.; CLARK, E. A. Regulation of dendritic cells by female sex steroids: relevance to immunity and autoimmunity. **Autoimmunity**, v. 40, n. 6, p. 470-481, Sep. 2007.
- HUNTER, M. P. et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, p. 3694, Nov. 2008.
- HURLEY, J. H. The ESCRT complexes. **Cri Rev Biochem Mol Biol**, London, v. 45, p. 463-487, Dec. 2010.
- INAL, J. M.; FAIRBROTHER, U.; HEUGH, S. Microvesiculation and disease. **Biochem Soc Tran**, Londres, v. 1, p. 41, n. 1, p. 237-240, Feb. 2013.
- ISAAC. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. **Lancet**, London, v. 351, p. 1225-1232, Abr. 1998.
- JIAO, Y. et al. Regulatory B cells correlate with HIV disease progression. **Microbiol Immunol**, v. 54, n. 8, p. 449-455, Aug, v, 2014
- JIMÉNES, S. et al. IgE antibody response to recombinant allergens of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in tropical environment. **Allergy Clin Immunol Int**, Göttingen, v. 19, n. 6, p. 233-238, May 2007.
- JOHANSSON, S. G. et al. Revised nomenclature of allergy for global use: Report of the Nomenclature Committee of the World Allergy Organization. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 113, n. 5, p. 832-836, Oct. 2004.
- JONES, N. S.; CARNEY, A. S.; DAVIS, A. The prevalence of allergic rhinosinusitis: a review. **J Laryngol Oto**, Nottingham, v. 112, p.1019-1030, Nov. 1998.
- KALRA, H. et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. **PLoS Biol**, San Francisco, v. 10, p. 1450, Dec. 2012.
- KELLER, S. et al. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. **Immunol Lett**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 102-108, Nov. 2006.

- KOUMANGOYE et al. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes will subsequently mediate cellular adhesion and spreading. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 9, Set. 2011.
- KULSHRESHTHA, A. et. al. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 131, n. 4, p. 1194-1203, Apr. 2013.
- LACHENAL, G. et al. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. **Mol Cell Neurosci**, San Diego, v. 46, p. 409-418, Feb. 2011.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.
- LAULAGNIER, K. et al. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. **Biochem J**, London, v. 380, p. 161–171, May 2004.
- LÄSSER, C.; ELDH, M.; LÖTVAL, J. Isolation and characterization of RNA-Containing Exosomes. **J Vis Ex**, Boston, v. 59, p. 1-6, Jan. 2012.
- LEVÄNEN, B. et al. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthma. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 131, p. 894–903, Mar. 2013.
- LÓPEZ, S. et al., Immediate and dual response to nasal challenge with Dermatophagoïdes pteronyssinus in local allergic rhinitis. **Clin ExpAllergy**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 1007-1014, Jul. 2010.
- LOZANO, C. P. et al. Respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférico al alergeno recombinante BtM al acaro del polvo casero *Blomia tropicalis*. **Allergol Immunopathol**, Madrid, v. 32, n. 5, p. 247-251, Jul. 2004.
- MAURI, C.; BOSMA, A. Immune regulatory function of B cells. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 229–241, 2012.
- MCGIRT, L. Y.; BECK, L. A. Innate immune defects in atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 118, n. 1, p. 202-208, Jul. 2008.
- MASYUK, A. I. et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, Bethesda, v. 299, p. 990–999, Oct. 2010.
- MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. **J Proteomics**, Amsterdam, v. 73, p. 1907–1920, Sep. 2010.
- MATSUMOTO, S. et al. Gamma delta TCR-bearing intraepithelial lymphocytes regulate class II major histocompatibility complex molecule expression on the mouse small intestinal epithelium. **Epithelial Cell Biol**, London, v. 4, n. 4, p. 163-170, 1995.

- MICHAEL, A. et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. **Oral Dis**, Hampshirev. 16, p. 34–38, Jan. 2009.
- MIGNOT, G. et al. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. **J Cell Mol Med**, Bucharest, v. 10, p. 376-88, Apr-Jun. 2006.
- MINEO, R. et al. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: **Pesquisa na área biomédica: do planejamento a publicação**. EDUFU, Uberlândia 2005, pp. 81-111.
- MITTELBRUNN, M. et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nat Commun**, London, v. 2, p. 282, 2011.
- MONTECALVO, A. et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. **Blood**, New York, v. 119, p. 756–766, Jan. 2012.
- MURALIDHARAN-CHARI, V.; CLANCY, J. W.; PLOU, C. ARF6-regulated shedding of tumor cell derived plasma membrane microvesicles. **Curr Biol**, Cambridge, v. 19, p. 1875–1885, Dec. 2009.
- MURALIDHARAN-CHARI, V. et al. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. **J Cell Sci**, London, v. 123, p. 1603–1611, May 2010.
- NGUYEN, K. D. et al. Selective deregulation in chemokine signaling pathways of CD4+CD25(hi) CD127(lo)/(-) regulatory T cells in human allergic asthma. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 123, n. 4, p. 933-939, 2009.
- NOLTE-'T HOEN, E. N. et al. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. **Nucleic Acids Res**, London, v. 40, p. 9272–9285, Oct. 2012.
- NOLTE-'T HOEN, E. N. et al. Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. **Nanomedicine**, New York, v. 8, p. 712-720, Jul. 2012.
- OBOKI, K. et al. Th17 and allergy. **Allergology Internat**, Carlton, v. 57, p. 121-134, Jun. 2008.
- OBREGON, C. et al. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 169, p. 2127–2136, Dec. 2006.
- OGAWA, Y. et al. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. **Biol Pharma Bull**, Tokio, v. 34, p. 13–23, 2011.
- OZDEMIR, C.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. **Clin ExpAllergy**, Oxford, v. 39, p. 626-639, May 2009.

- OWNBY, D. Allergy testing: in vivo versus in vitro. **Pediatr Clin North Am**, Philadelphia, v. 35, p. 995-1009, Oct. 1988.
- PAN, B. T. et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **J Cell Biol**, New York, v. 101, p. 942 - 948, Sep. 1985.
- PANT, S.; HILTON, H.; BURCZYNSKI, M. E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. **Biochem Pharmacol**, Oxford, v. 83, n. 11, p.1484-1494, Jun. 2012.
- PARK, K. H. et al. Ca^{2+} signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. **Sci Sign**, Washington, v. 4, p. 31, May 2011.
- PAUL, W. E.; ZHU, J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? **Nat Rev Immunol**, London, v. 10, p. 225, Apr. 2010.
- PAUL, W. E. **T-lymphocyte differentiation and biology**. Fundamental Immunology. 4^a ed. Lippincott-Raven, p. 367-409, 1999.
- PEAT, J. K. LI, J. Reversing the trend: reducing the prevalence of asthma. **J Allergy Clinical Immunol**, St. Louis, v. 103, p. 1-10, Jan. 1999.
- PEREIRA, E. A. et al. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 3, p. 401-406, Mar. 2005.
- PICCIRILLO, C. A. Regulatory T cells in health and disease. **Cytokine**, Philadelphia, v. 43, n. 3, p. 395-401, Sep. 2008.
- PISITKUN, T.; SHEN, R. F.; KNEPPER, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **Proc Nati Acad of Sci**, Washington, v. 101, p. 13368–13373, Sep. 2004.
- PRADO, N. et al. Exosomes from Bronchoalveolar Fluid of Tolerized Mice Prevent Allergic Reaction. **J Immunol**, Baltimore, v. 181, p. 1519- 1525, Jul. 2008.
- PROVOOST, S, et al. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. **Allergy**, Copenhagen, v. 64, n. 10, p. 1539-46, Oct. 2009.
- POSSA, S. S. et al. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. **Front Pharmacol**, Lausanne, v. 4, p. 46, Apr. 2013.
- PULENDRAN, B.; TANG, H.; MANICASSAMY, S. Evidence that DCs induce $\text{T}_{\text{H}}2$ responses, **Nat Immunol**, London, v. 10, p. 447, Jul. 2010.
- PULENDRAN, B.; ARTIS, D. New Paradigms in Type 2 Immunity, **Sci**, New York, v. 337, p. 431-445, Jul. 2012.

- RAK, J. Microparticles in cancer. **Semin Thromb Hemost**, New York, v. 36, p. 888–906, Nov. 2010.
- RAPOSO, G. et al. B lymphocytes secrete antigen presenting vesicles. **J Exp Med**, New York, v. 183, p. 1161–1172, Mar. 1996
- RAPOSO, G. et al. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. **Mol Biol Cell**, Bethesda, v. 8, p. 2631–2645, Dec. 1997.
- RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, New York, v. 200, n. 4, p. 373–383, Feb. 2013.
- RATAJCZAK, J. et al. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia**, Baltimore, v. 20, p. 1487–1495, Sep. 2006.
- REIS, A. P. Imunoterapia precoce. Considerações e ponto de vista. **Rev Bras Alergia Imunopatol**, v. 20, p. 223-227, 1997.
- REIS, A. P. Intervenção precoce nas doenças alérgicas. **Rev bras Alergia Imunopatol**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 226-232, Nov-Dec. 2003.
- RONQUIST, G.; BRODY, I. The prostasome: its secretion and function in man. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 822, p. 203–218, Sep. 1985.
- SAVINA, A. et al. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calciumdependent manner. **Traffic**, Copenhagen, v. 6, p. 131-143, Feb. 2005.
- SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of immunologic self-tolerance causes various autoimmune diseases in mice. **J Immunol**, Baltimore, v. 155, p. 1151-1164, Aug. 1995.
- SCHOREY, J. S.; BHATNAGAR, S. Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology. **Traffic**, Copenhagen, v. 9, p. 871-881, Jun. 2008.
- SCHMIDT-WEBER, C. B.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. TH17 cells in the big picture of immunology. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v: 120, p. 247–254, Aug. 2007.
- SEGURA et al. CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. **J Immunol**, Bethesda, v. 179, n. 3, p. 1489-1496, Aug. 2007.
- SELTZER, J. Biological contaminants. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v, 96, n. 2, p. 218 – 329, 1994.

- SHIFRIN DA, J. R. et al. Enterocyte microvillus-derived vesicles detoxify bacterial products and regulate epithelial-microbial interactions. **Curr Biol**, Cambridge, v. 22, p. 627–631, Apr. 2012.
- SHIN, T. et al. Extracellular vesicles are key intercellular mediators in the development of immune dysfunction to allergens in the airways. **Allergy**, Copenhagen, v. 65, p. 256–1265, Oct. 2010.
- SHEN, Y. et al. Allergen induced Treg response in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with nasal polyposis. **Asian Pac J Immunol**, Bangkok, v. 32, p. 300–307, Dec. 2014.
- SHOENWETTER, W. F. Allergic Rhinitis: epidemiology and natural history. **Allergy Asthma Proci**, Minneapolis, v. 21, p. 1-6, Jan-Feb. 2000.
- SIMONS, E. (Ed): Ancestors of Allergy. New York: New York Global Medical Communication Ltd., 1994.
- SIMONS, M.; RAPOSO, G. Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. **Cur Opin Cell Biol**, London, v. 21, p. 575–581, Aug. 2009.
- SKRINDO, I. et al. Depletion of CD4+CD25+CD127lo regulatory T cells does not increase allergen-driven T cell activation. **Clin Exp Allergy**, Oxford, v. 38, n. 11, p. 1752-1759, Nov. 2008.
- SKOG, J.; S. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol**, London, v. 10, p. 1470–1476, Dec. 2008.
- SKOKOS, D. et al. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. **J Immunol**, Baltimore, v. 170, p. 3037-30455, Mar. 2003.
- SLUNT, J. B. et al. The immune response to *Trichophyton tonsurans*: distinct T cell cytokine profiles to a single protein among subjects with immediate and delayed hypersensitivity. **J Immunol**, Baltimore, v. 157, n. 11, p. 5192-5197, Dec, 1996.
- SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Annal Biochem**, New York, v. 150, n. 1, p. 76-85, Oct. 1985.
- SOARES, F. et al. Perfil de sensibilização a alérgenos domiciliares em pacientes ambulatoriais. **Rev Associação Med Brasil**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 25-28, 2007.
- SOARES, R. et al. Humoral and cellular immune response to *Blomia tropicalis* and concanavalin A-binding fractions in atopic patients. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 41, p. 773-781, Sep. 2000.
- SOPELETE, M. C., et al. *Dermatophagoides farinae* (Der f 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) allergen exposure among subjects living in Uberlândia, Brazil. **Int Arch Allergy Immunol**, New York, v. 122, p. 257-263, Aug. 2000.

- STEGMAYR, B.; RONQUIST, G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. **Urol Res**, Berlin, v. 10, p. 253–257, Aug. 1982.
- SUBRA, C. et al. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. **Biochim J**, Paris, v. 89, p. 205–212, Feb. 2007.
- SYROVY, L.; HODNY, Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. **J Chromatog**, Amsterdam, v. 569, p. 175-196, Sep. 1991.
- TAAMS, L. S. et al. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. **Immunol**, Oxford, v. 118, n. 1, p. 1-9, May 2006.
- TAMAY, Z. et al. Prevalence of allergic rhinitis and risk factors in 6- to 7-yearold children in İstanbul, Turkey. **Turk J Pediatr**, Ankara, v. 56, n. 01, p. 31-40, Jan-Feb. 2014.
- TETTA, C. et al. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. **Endocrine**, Hounds mills, vol. 44, p. 11-19, Aug. 2013.
- THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. **Nat Rev Immunol**, London, v. 2, p. 569-579, Aug. 2002.
- THÉRY, C. et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Cur Protoc Cell Biol**, New York, v. 3, p. 22, Apr. 2006.
- THÉRY, C.; M. OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol**, London, v. 9, p. 581–593, Aug. 2009.
- THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: Composition, three decades and into the future. **J Cell Biol**, New York, v. 200, p. 367–371, Feb. 2013.
- THUNBERG S. et al. Immune regulation by CD4+CD25+ T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls. **Clin Exp Allergy**, Oxford, v. 37, p. 1127-1136, Aug. 2007.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, I. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceee Nati Acad Sci USA**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4352, Sep. 1979.
- TRAMS, E. G. et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 645, p. 63–70, Jul. 1981.
- ULLRICH, D. Hygiene hypothesis: Are we too “clean” for our own good? **Newsgroups Derkeiler**, Wisconsin, v. 29, n. 32, p. 15-6, Apr. 2004.
- VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol**, London, v. 9, p. 654–659, Jun. 2007.

- VALENTA, R.; NIEDERBERGER, V. Recombinant allergens for immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol**, St. Louis, v. 119, p. 826-30, Apr. 2007.
- VAN NIEL, G. et al. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 121, p. 337-349, Aug. 2001.
- VAN NIEL, G. et al. Exosomes: a common pathway for a specialized function. **J Biochem**, Tokio, v. 140, p. 13-21, Jul. 2006.
- VELLA, L. J. et al. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. **J Pathol**, London, v. 211, p. 582-590, Apr. 2007.
- VIDAL, M. et al. Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during *in vitro* maturation of guinea pig reticulocytes: Evidence precluding a role for "aminophospholipid translocase". **J Cell Physiol**, New York, v. 140, p. 455-462, Sep. 1989.
- WANG, Y.; LIU, Y. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. **Curr Opin Immunol**, London, v. 20, n. 6, p. 697-702, Dec. 2008.
- WANG, L. H. et al. Insufficient increment of CD4+CD25+ regulatory T cells after stimulation *in vitro* with allergen in allergic asthma. **Int Arch Allergy Immunol**, New York, v. 148, p. 199-210, Oct. 2009.
- WIEDERMANN, U. Prophylaxis and therapy of allergy by mucosal tolerance induction with recombinant allergens or allergen constructs. **Curr Drug targets Inflamm Allergy**, San Francisco, v. 4, p. 577-583, Oct. 2005.
- WILSON, H. L. et al. Secretion of intracellular IL-1 receptor antagonist (type 1) is dependent on P2X7 receptor activation. **J Immunol**, Baltimore, v. 173, p. 1202-1208, Jul. 2004.
- WONG, C. K. et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. **Clin Exp Immunol**, Oxford, v. 125, p. 177-183, Aug. 2001.
- WUBBOLTS, R. et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 278, p. 10963-10972, Mar. 2003.
- ZAC, R. I. et al. Associação entre alergia prévia, infertilidade e abortamento. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 177-80, May-Jun. 2005.
- ZHANG, H. G.; GRIZZLE, W. E. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 17, p. 959-964, Mar. 2011.
- ZITVOGEL, L. A. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nature**, London, v. 4, p. 594-560, Dec. 19.

Anexo 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131
e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 383/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU 136/09

Projeto Pesquisa: Influência no direcionamento da resposta imune em indivíduos alérgicos.

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de entrega do relatório final: dezembro de 2009.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 21 de agosto de 2009.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista.

Anexo 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica

Tel: (34) 3218-2394 Telefax: (34) 3218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar do Projeto de Pesquisa: “**Modulação da produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico de pacientes atópicos por vesículas extracelulares oriundas de células mononucleares de sangue periférico de pacientes não atópicos**” sob a responsabilidade da doutoranda Helena Maria Caleiro Acerbi Penha e do orientador Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender se vesículas extracelulares (estruturas muito pequenas liberadas por várias células, tecidos e órgãos), serão capazes de alterar a resposta imunológica em pacientes com alergia respiratória.

A obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é de responsabilidade da doutoranda Helena Maria Caleiro Acerbi Penha.

Na sua participação como voluntário(a), você responderá a algumas perguntas para sabermos se você tem alguns sintomas típicos de alergia, passará por um Teste Cutâneo de Puntura, isto é; será aplicado em seu braço, 03 (três) pequenas gotas de substâncias, uma como controle negativo, outra como controle positivo e outra de ácaro (animais microscópicos presentes geralmente na poeira doméstica) para saber se você é alérgico a esta substância ou não. Este teste demora no máximo 20 minutos e a resposta é obtida de acordo com a presença ou não de uma pápula (carocinho) e um eritema (vermelhidão no local). Para ser considerado positivo, tanto a pápula quanto o eritema devem ser maiores que 3mm (três milímetros) de diâmetro. Será coletado também 20 mL de seu sangue (veia do braço) que passará por uma série de centrifugações (movimentos de rotação muito rápidos) para que nós possamos extrair os exossomos, estruturas muito pequenas que são o objeto de estudo deste projeto de pesquisa.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Você não corre risco ao participar deste projeto. O máximo que pode acontecer é uma resposta local mais exagerada, isto é; presença de coceira mais intensa, com vermelhidão no local do teste cutâneo. Estes sintomas melhoram após algumas horas. São raríssimos os casos de resposta exagerada aos testes. Quanto à

coleta de sangue, você não corre nenhum risco, todo o material usado é descartável. Quanto aos benefícios, nós esperamos que estas estruturas presentes no sangue dos indivíduos não atópicos possam ser usadas para alterar a resposta imunológica dos indivíduos alérgicos, melhorando a qualidade de vida dos pacientes alérgicos.

Você é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor(a). Qualquer dúvida a respeito da pesquisa o senhor poderá entrar em contato com os pesquisadores: Helena Maria Caleiro Acerbi Penha e Dr. Ernesto Akio Taketomi, no endereço abaixo:

Av. Pará 1720 - Bloco 4C - Campus Umuarama,
Caixa Postal: 593 - Bairro: Jardim Umuarama,
38.400.902 - Uberlândia, MG
Fone: 34 3218 2394
Fax: 34 3232 8620
CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J,
Campus Santa Mônica – Uberlândia, MG, CEP: 38.408.100;
Fone: 34 3239 4531

Uberlândia, _____ de _____ de 2011.

Doutoranda: Helena Maria Caleiro Acerbi Penha

Orientador: Dr. Ernesto Akio Taketomi

Eu, _____ aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Uberlândia, _____ de _____ de 2011.

Assinatura do Participante

Anexo 3

“Modulação da produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico de pacientes atópicos por vesículas extracelulares oriundas de células mononucleares de sangue periférico de pacientes não atópicos”

Nome:	Idade:
Sexo:	Escolaridade:

Asma	
1. Alguma vez na vida você teve sibilos (chiado no peito)? Sim ()	Não ()
Se não, passe para a questão de no. 7	
2. Nos últimos 12 meses você teve sibilos (chiado no peito)? Sim ()	Não ()
3. Nestes últimos 12 meses, quantas crises de sibilo você teve? Nenhuma crise () 1 a 3 crises () 4 a 12 crises () mais de 12 crises ()	
4. Nos últimos 12 meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito? Nunca acordou com chiado () Menos de uma noite por semana () Uma ou mais noites por semana ()	
5. Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração? Sim () Não ()	
6. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos? Sim () Não ()	
7. Nos últimos 12 meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória? Sim () Não ()	
8. Alguma vez na vida já teve asma? Sim () Não ()	

Rinite

(Todas as perguntas deste módulo são sobre problemas que ocorreram quando você não estava gripado ou resfriado)

1. Alguma vez na vida você teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava resfriado ou gripado?

Sim Não

2. Nos últimos 12 meses, você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou com resfriado? Sim Não

3. Nos últimos 12 meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?

Sim Não

4. Em qual dos últimos 12 meses este problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu). Janeiro Fevereiro Março Abril Maio Junho Julho Agosto Setembro Outubro Novembro Dezembro

5. Nos últimos 12 meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal?

Nada Pouco Moderado Muito

Anexo 4

TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA

No.	Extrato	Pápula (mm)	Eritema (mm)
1.	Controle Negativo		
2.	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
3.	Epitélio de cão		
4.	<i>Dermatophagoides farinae</i>		
5.	Epitélio de gato		
6.	<i>Blomia tropicalis</i>		
7.	<i>Periplaneta americana</i>		
8.	<i>Lolium multiflorum</i>		
9.	<i>Alternaria alternata</i>		
10.	Controle Positivo		

Valores de referência:

Negativo : diâmetros ortogonais menores do que 3 mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.

Positivo : diâmetros ortogonais maiores ou iguais a 3 mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Responsável Técnico: