



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Avaliação dos níveis de anticorpos, citocinas e miRNAs em pacientes com rinite mediada e não mediada por anticorpos IgE

Juliana Silva Miranda

Uberlândia – MG
Julho – 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Avaliação dos níveis de anticorpos, citocinas e miRNAs em pacientes com rinite mediada e não mediada por anticorpos IgE

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Juliana Silva Miranda

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Orientador

Uberlândia - MG
Julho - 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Avaliação dos níveis de anticorpos, citocinas e miRNAs em pacientes com rinite mediada e não mediada por anticorpos IgE

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 28 de julho de 2015.

Banca examinadora:

Fátima Ferreira

Profa. Dra. Fátima Ferreira-Briza
SALZBURG/AUSTRIA

Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes
UFU/PATOS DE MINAS

K. C. de Almeida

Profa. Dra. Karine Cristine de Almeida
FM/UNIPAM

L. R. Goulart Filho

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
ICBIM/UFU

E. A. Taketomi

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

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

M672a Miranda, Juliana Silva, 1983-
2015 Avaliação dos níveis de anticorpos, citocinas e miRNAs em
pacientes com rinite mediada e não mediada por anticorpos IgE / Juliana
Silva Miranda. - 2015.
100 p. : 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. Dermatophagoides pteronyssinus - Teses.
3. Rinite alérgica - Teses. 4. Citocinas - Teses. I. Taketomi, Ernesto
Akio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

*Aos meus pais Euripedes e Maria Aparecida pelo exemplo de
simplicidade, valor e caráter.*

Agradecimentos

A DEUS por me conceder paciência e sabedoria, e assim poder acreditar nas minhas escolhas e ir caminhando passo a passo no sentido de realizá-las e com isto tornar possível meu crescimento pessoal e minha formação profissional;

Aos pacientes do consultório, ambulatório e a todos os outros voluntários pela atitude altruísta em aceitarem participar do estudo;

À minha família

Meus pais Maria Aparecida e Eurípedes, e meu irmão Rodrigo por me apoiarem com o amor e compreensão incondicionais que só encontramos no seio familiar;

Ao professor Dr. Ernesto Akio Taketomi pela orientação desde a iniciação científica até o doutorado, contribuindo com a minha formação acadêmica por meio dos ensinamentos transmitidos durante este período;

Ao professor Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, pela paciência e solicitude em atender todas as minhas dúvidas e preocupações no decorrer do doutorado;

À Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba que por vezes estava presente colaborando com o trabalho, tomando as minhas dúvidas e preocupações como se fossem suas e assim ajudando no esclarecimento e execução dos experimentos e análises;

Aos professores Dr. José Roberto Mineo, Dr. Sydnei Magno da Silva e Dr. Carlos Ueira Vieira pelas correções e comentários feitos no exame de qualificação, os quais colaboraram para melhorar o trabalho;

Aos professores Dr. Luiz Ricardo Goulart, Dra. Karine Cristine de Almeida, Dr. Matheus de Souza Gomes e Dra. Fátima Ferreira-Briza por disporem do seu tempo e terem aceitado compor a Banca Examinadora contribuindo para o aprimoramento do trabalho;

Aos professores responsáveis pelo Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos: Márcia Cristina Cury, Sydnei Magno da Silva e Michelle Ribeiro pela compreensão pela minha ausência por vezes necessárias para a realização dos experimentos;

À professora Dra. Neide Maria da Silva por ajudar e por possibilitar que seus alunos (Paulo Vitor e Karine) contribuissem em sanar as minhas várias dúvidas nos experimentos de biologia molecular;

Aos que já passaram e aos que ainda compõem o Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica (LALIC): Leandro Ynoue, Isabella Siman, Bia Acerbi, Bianca Uliana, Paula Fernandes, Greice e Isabella pelos momentos partilhados e também pela amizade e disponibilidade em auxiliar e a colaborar com a realização do trabalho;

Aos colegas de trabalho Marcelo, Elaine, Sheila e Maria do Rosário que me ajudaram nos momentos que precisei e acabaram por tornar a difícil tarefa de trabalhar e fazer doutorado mais branda;

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia e da Pós-graduação: Max, Marley, Zilda, Jorge, Lucileide e Lucélia pela atenção e auxílio de grande valia;

Às novas amizades que fiz e que espero que permanecem na minha vida mesmo sabendo que percorreremos caminhos diferentes: Daliane (Dali), Kelem (Kelem Maria), Mária Júlia (Fujuuba), Nathália (Naty), Marcela (Portinha), Camila (Crazy), Karen e Letícia (Lets);

Às amigas de longa data que têm percorrido junto comigo todos os passos até aqui, Betânia e Ana Luiza, pelas conversas e alegrias vividas e por serem sempre motivadoras em momentos nos quais achava a jornada difícil;

*A todos vocês deixo aqui os meus sinceros **AGRADECIMENTOS** pela ajuda, incentivo, amizade e generosidade a mim concedidos e assim me possibilitarem realizar mais esta etapa de grande enriquecimento pessoal e profissional.*

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

A rinite alérgica é uma doença com padrão de resposta clássico que apresenta sintomatologia e IgE (S-IgE+), caracterizada por inflamação das vias aéreas superiores regulada pelo perfil Th2. Contudo, existe outro quadro de rinite que também apresenta sintomatologia desencadeada por exposição a poeira domiciliar, mas sem a presença de IgE (S-IgE-) sistêmica, demonstrando um mecanismo independente de IgE envolvido e ainda não compreendido. Os objetivos do presente trabalho foram investigar a resposta anticórpica ao ácaro da poeira domiciliar *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), os níveis de citocinas e a expressão relativa do RNAm para citocinas e microRNAs (miRNAs) nos pacientes e indivíduos controle (CT). Os indivíduos foram divididos em três grupos S-IgE+ (n = 32), S-IgE- (n = 19) e CT (n = 31) por meio dos sintomas clínicos, teste cutâneo de puntura (TCP) e níveis séricos de IgE específica a Dp. Amostras de sangue foram coletadas e o soro utilizado para mensurar IgG1, IgG3, IgG4 e IgA específicas ao extrato alergênico bruto de Dp pelo imunoensaio enzimático (ELISA). Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos grupos (S-IgE+, 15; S-IgE-, 11; CT, 10) foram isoladas e estimuladas com mitógeno (fitohemaglutinina - PHA), extrato bruto de Dp e somente com meio para controle. O sobrenadante foi coletado depois de 4 dias para avaliar os níveis de citocinas, e as células foram utilizadas para extração de RNA para a avaliação da expressão relativa das citocinas e miRNAs por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Os níveis de IgE e IgG4 específicos a Dp apresentaram soropositividade显著mente maiores nos pacientes do grupo S-IgE+ comparados aos grupos S-IgE- e CT. A dosagem de IgG3 específica a Dp mostrou níveis significantemente maiores no grupo S-IgE+ somente quando comparada ao grupo CT. Níveis de IgA e IgG1 não apresentaram diferença significante entre os grupos. Se por um lado os níveis de IL-5 no sobrenadante de cultura foram maiores no grupo S-IgE+ e com diferença estatística quando comparados aos outros grupos, por outro lado não foi observada diferença significante nos níveis de IL-4, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ entre os grupos, assim como os níveis das citocinas dosadas no soro incluindo a IL-5. A expressão relativa de IL-5, IFN- γ , TGF- β e miRNA em PBMCs estimuladas com alérgenos de Dp mostrou valores significantes, com valores de IL-5 aumentados no grupo S-IgE+ quando comparados aos valores dos grupos S-IgE- e CT; IFN- γ apresentou valor maior e significante no grupo S-IgE+ apenas quando comparado ao grupo CT e TGF- β foi mais expressivo no grupo S-IgE-. A expressão relativa dos miRNAs (miR-21 e miR-126) não mostrou diferença significante. Nossos dados sugerem que houve maior similaridade nos níveis de anticorpos e citocinas no sobrenadante de cultura de células estimuladas com Dp e no soro entre os pacientes S-IgE- e o grupo CT do que com o grupo S-IgE+, apesar dos sintomas nos pacientes S-IgE- serem desencadeados depois da exposição a poeira domiciliar assim como nos pacientes S-IgE+, demonstrando que o mecanismo da resposta por anticorpos e citocinas é diferente entre os grupos S-IgE- e S-IgE+. Além disso, a expressão relativa das citocinas mostrou diferenças o que foi parcialmente visto na dosagem das citocinas, o que pode ser explicado pela diferença que ocorre entre a tradução e transcrição das proteínas. Não foi observada diferença na expressão relativa dos miRNAs, sendo que uma possível causa seria devido ao reduzido número de amostras testadas. Desta forma, nossos dados mostraram que os perfis de anticorpos, citocinas e miRNAs analisados neste estudo não foram capazes de discriminar estes grupos, assim estudos adicionais serão necessários para elucidar o real mecanismo imunopatogênico deste complexo grupo de pacientes do grupo S-IgE-.

Palavras chave: Anticorpos, citocinas, *Dermatophagoides pteronyssinus*, IgE, microRNA, rinite não alérgica.

ABSTRACT

Allergic rhinitis with symptomatology and IgE (S-IgE+) is a classical disease with a pattern of inflammation of the upper airways well characterized by Th2 pathway regulation. However, the rhinitis with symptomatology triggered by house dust exposure and no systemic IgE (S-IgE-) is involved by an unknown IgE- independent mechanism, which is not well understood yet. The aims of this study were to investigate antibody responses to house dust mite (HDM) *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), cytokine levels, relative expression of mRNA cytokines and microRNA (miRNA) in patients and control (CT) subjects. Three groups of subjects divided in S-IgE+ (n = 32), S-IgE- (n = 19), and CT (n = 31) by clinical symptoms, skin prick test (SPT) and levels of specific IgE to Dp were analyzed. Blood samples were collected and sera were used to measure IgG1, IgG3, IgG4, and IgA specific to crude Dp allergen extract by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from subjects (S-IgE+, 15; S-IgE-, 11; CT, 10) were isolated and stimulated with mitogen (phytohemagglutinin-PHA), crude Dp allergens extract, and medium alone for control. Supernatants were collected after 4 days to evaluate the cytokine levels, and cells were harvested for RNA extraction to assess the relative expression of cytokines and miRNA by reverse transcription PCR (RT-qPCR). Specific IgE and IgG4 anti-Dp showed seropositivity rate significantly higher in S-IgE+ than S-IgE- or CT subjects. Specific IgG3 to Dp showed significant higher levels in S-IgE+ than CT group. Levels of Dp-specific IgA and IgG1 showed no significant difference among the groups. The cytokine IL-5 was significantly higher in cell culture supernatants after Dp stimulation from S-IgE+ patients than S-IgE- or CT subjects. However, levels of IL-4, IL-10, IL-13, IL-17 and IFN- γ were not significantly different among groups, as well as the cytokine levels in sera, including IL-5. Relative expression of IL-5, IFN- γ and TGF- β in PBMCs stimulated with Dp allergens showed significant values, with higher levels of IL-5 in S-IgE+ compared to S-IgE- and CT groups; IFN- γ showed higher expression in S-IgE+ when compared to CT; and TGF- β presented higher expression in S-IgE- group. miRNAs relative expression was similar among groups. In the overall, our data suggested that S-IgE- patients showed serum antibodies, cytokines in the supernatant of the cell culture stimulated with Dp allergens and in sera more similar to CT individuals than to S-IgE+, although the symptoms in S-IgE- patients were triggered after house dust exposure like S-IgE+ patients, demonstrating that the mechanism of the antibody and cytokine responses are quite different between S-IgE- and S-IgE+ groups. In addition, the relative expression of IL-5, IFN- γ and TGF- β was quite different of seen in cytokine levels measure, explained by the difference between the relative expression of gene and its protein. For miRNA in PBMCs stimulated with Dp allergens were not significantly different among the three groups, and a reason could be the small sample tested. Our findings showed that antibody, cytokine and miRNAs profiles analyzed in this study were not able do discriminate these groups, additional studies will be needed for elucidation of the real immunopathogenic mechanisms of this complex S-IgE- group of patients.

Keywords: Antibodies, cytokines, *Dermatophagoides pteronyssinus*, IgE, microRNA, non-allergic rhinitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ilustração do processo de produção do miRNA. **Fonte:** AMERES, S. 32 L.; ZAMORE, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. **Nature reviews - Molecular Cell Biology**, v. 14. p. 475-488, 2013.

Figura 2. Fluxograma com os critérios discriminatórios dos grupos e sequência 40 metodológica do trabalho.

Figura 3. Esquema da forma e ação do *stem-loop* primer. **Fonte:** CHEN et al. 51 Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, **Nucleic acids research**, v. 33, 2005.

Figura 4. Níveis de anticorpos IgE, IgG4 e IgG3 específicos a 58 *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) expressos em índice ELISA (IE) em soros dos pacientes do grupo S-IgE+ (n = 32), pacientes do grupo S-IgE- (n = 19) e indivíduos controle (n = 31). (A) IgE; (B) IgG4; (C) IgG3. As medianas são indicadas por barras horizontais e o limiar de positividade (*cut off*) está representado pela linha tracejada (IE = 1,2). ***P < 0,0001, **P < 0,05 determinado pelo teste Kruskall-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Figura 5. Níveis de anticorpos IgG1 e IgA específicos a 59 *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) expressos em índice ELISA (IE) em soros dos pacientes do grupo S-IgE+ (n = 32), pacientes do grupo S-IgE- (n = 19) e indivíduos controle (n = 31). (A) IgG1 e (B) IgA. As medianas são indicadas por barras horizontais e o limiar de positividade (*cut off*) está representado pela linha tracejada (IE = 1,2). ***P < 0,0001, **P < 0,05 determinado pelo teste Kruskall-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Figura 6. Correlação entre os níveis de IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e IgA 60 específicos a Dp mensurados por ELISA no soro dos pacientes do grupo S-IgE+ (n=32), S-IgE- (n=19) e indivíduos controle CT (n=31). (A) IgE X IgG4 (S-IgE+); (B) IgE X IgA (S-IgE-); (C) IgG1 X IgG4 (S-IgE-) e (D) IgE X IgG3 (CT). As linhas tracejadas indicam os valores de *cut off* (IE = 1,2) determinantes da positividade no ELISA. As porcentagens (%) de duplo-positivo, duplo-negativo ou positivo a apenas um dos anticorpos estão indicadas nos respectivos quadrantes dos gráficos. O coeficiente de correlação (r) foi calculado por meio do teste de correlação de Spearman; P < 0,05.

Figura 7. Níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMCs de 36 indivíduos distribuídos em três grupos (S-IgE+ = 15, S-IgE- = 11 e CT = 10). Células foram estimuladas com PHA (5 µg/mL), Dp (10 µg/mL) e somente meio (*baseline*) por 4 dias. (A) IL-4; (B) IL-5; (C) IL-10; (D) IL-13; (E) IL-17; (F) IFN-γ. Os dados estão expressos em picogramas/mL obtidos para cada paciente e representados como mediana (barras representam mediana com intervalo interquartil). Letras diferentes (a, b) indicam diferença significante entre os grupos para cada estímulo e valores de *** P < 0,0001; ** P < 0,05 indicam níveis de significância em relação ao meio (*baseline*) para cada grupo de pacientes, dados estes determinados pelo teste Kruskall-Wallis com pós-

teste de comparação múltipla de Dunn.

Figura 8. Frequência (%) das citocinas no sobrenadante de cultura de PBMCs 63 sob estímulo de Dp de 36 indivíduos distribuídos em três grupos (S-IgE+ = 15; S-IgE- = 11; CT = 10). Os valores medianos das frequências foram plotados em ordem crescente de forma a demonstrar a predominância das citocinas nos diferentes grupos.

Figura 9. Níveis de citocinas no soro de 36 indivíduos distribuídos em três 63 grupos (S-IgE+ = 15, S-IgE- = 11 e CT = 10). Os dados das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ estão expressos em picogramas/mL obtidos para cada paciente e representados como mediana (barras representam mediana com intervalo interquartil). Os dados foram determinados pelo teste Kruskall-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Figura 10. Níveis de citocinas no soro e no sobrenadante de cultura (SC) de 64 36 indivíduos distribuídos em três grupos (**A**) S-IgE+ = 15, (**B**) S-IgE- = 11 e (**C**) CT = 10. Os dados das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ estão expressos em picogramas/mL obtidos para cada paciente e representados como mediana. Os valores medianos dos níveis de citocinas no soro e meio foram interpolados para comparação da secreção das citocinas pelas células e dos níveis presentes no soro.

Figura 11. Avaliação da integridade das amostras de RNA por eletroforese em 67 gel de agarose a 1%. As amostras representativas de cada grupo (**1**) S-IgE+, (**2**) S-IgE- e (**3**) CT obtidas de células de cultura sob estímulo Dp, foram carregadas no gel e submetidas à corrida eletroforética a 100 V por 50 min, ao final a imagem do gel foi digitalizada e demonstrou a presença das subunidades ribossomais 18S e 28S.

Figura 12. Níveis de expressão relativa das citocinas Th2 (IL-5), Th1 68 (IFN- γ) e Treg (TGF- β) em amostras extraídas de células da cultura de PBMCs sob estímulo de Dp dos três grupos (S-IgE+ n = 3, S-IgE- n = 3 e CT n = 3). Os dados foram determinados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como amostra referência o cDNA de células não estimuladas, e como controle endógeno actina. Os dados foram determinados pelo teste Mann-Whitney One-tailed, ** $P < 0,05$.

Figura 13. Quantificação relativa do miRNA-21 e miRNA-126 por RT-qPCR. 69 Amostras dos grupos (S-IgE+ (n=4), S-IgE- (n=4) e CT (n=4) obtidas de células de cultura de PBMCs sob estímulo Dp, foram normalizadas (com as respectivas amostras referência que foram células obtidas de cultura sem estímulo), e o gene endógeno RNU6B . Os dados foram determinados pelo teste Mann-Whitney One-tailed.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios seletivos utilizados para a amostragem dos pacientes a 39 serem incluídos no estudo.

Tabela 2. miRNAs com seus respectivos papéis funcionais na resposta imune 50 alérgica.

Tabela 3. Características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos no 55 estudo.

Tabela 4. Concentração de RNA extraído das amostras dos grupos S-IgE+ 66 (n = 7), S-IgE- (n = 7) e CT (n = 7) obtidas de cultura de PBMCs sob estímulo Dp; e de amostras obtidas de cultura sem estímulo (controle) dos grupos S-IgE+ (n = 7), S-IgE- (n = 7) e CT (n = 7) por 4 dias a 37°C e 5% de CO₂.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

χ^2	Teste estatístico Chi-quadrado
δ	Desvio-padrão
$\Delta\Delta Ct$	Cálculo do valor da quantificação relativa
%CG	Porcentagem de citosina e guanina
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3 etilbenzotiazolino-6 sulfônico
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
APC	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Soro albumina bovina
CD	Grupamento de diferenciação
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CO ₂	Gás carbônico
CT	Grupo de indivíduos controle
<i>cut off</i>	Limiar de positividade
DC	Célula dendrítica
Der p 1	Alérgeno do grupo 1 do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Der p 2	Alérgeno do grupo 2 do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
DGCR8	<i>Digeorge syndrome critical region 8</i>
DNAse	Ribonuclease que catalisa a degradação do DNA
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
D.O.	Densidade óptica
DOI	Média da densidade óptica da amostra testada
dsRNA	Fita dupla de RNA
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FcεR	Receptor de IgE de alta afinidade
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade do tipo I
FW	<i>Primer forward</i>

<i>g</i>	Aceleração da gravidade
GATA3	Fator de transcrição relacionado ao perfil Th2
GINA	Iniciativa Global contra a asma
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
HCl	Ácido clorídrico
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
HLA	Antígeno leucocitário humano
ICBIM	Instituto de Ciências Biomédicas
IE	Índice Elisa
IFN- γ	Interleucina Interferon γ
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgD	Imunoglobulina da classe D
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgM	Imunoglobulina da classe M
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da classe G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina da classe G subclasse 2
IgG3	Imunoglobulina da classe G subclasse 3
IgG4	Imunoglobulina da classe G subclasse 4
IL	Interleucina
IRAK1	Quinase associada ao receptor de interleucina 1
ISAAC	Estudo Internacional da Asma e Alergias na Infância
LALIC	Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica
LT	Leucotrieno
MBP	Proteína básica principal
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
miRNA	MicroRNA
MOPS	Ácido 4 morfolinopropansulfônico
N	Número de indivíduos
NA	Grupo de pacientes não atópicos a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
NaN ₃	Azida sódica
NK	Células natural killer

nm	Nanômetro
NPC2	Niemann-Pick C2
ns	Não significante
PAF	Fator ativador de plaquetas
pb	Pares de base
PBMC	Cultura de células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fostatos
PBS-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de leite desnatado em pó
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e leite desnatado em pó
PBS-T-SFB	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e soro fetal bovino
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fitohemaglutinina
PMSF	Fenilmetilsulfonil
PPD	Proteína purificada derivada
qPCR	Reação quantitativa em cadeia da polimerase
r	Coeficiente de correlação
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAse	Ribonuclease que catalisa a degradação do RNA
RNU6B	Pequeno RNA não codificante U6
ROR γ t	Fator de transcrição relacionado ao perfil Th17
RPMI	Meio de cultura
RQ	Quantificação relativa
RT-qPCR	Reação quantitativa em cadeia da polimerase com transcrição

	reversa
RT	Transcrição reversa
RV	<i>Primer reverse</i>
SC	Sobrenadante de cultura
shRNA	Pequeno RNA em forma de <i>hairpin</i>
shmiRNA	MiRNA em forma de <i>hairpin</i>
S-IgE+	Grupo de pacientes com sintomatologia e IgE
S-IgE-	Grupo de pacientes com sintomatologia e ausência de IgE
siRNA	Pequeno RNA de interferência
T.A.	Temperatura ambiente
Tbet	Fator de transcrição relacionado ao perfil Th1
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TCP	Teste cutâneo de puntura
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TGFR	Receptor de TGF
Th1	Linfócito T <i>helper 1</i>
Th2	Linfócito T <i>helper 2</i>
Th17	Linfócito T <i>helper 17</i>
TLR	Receptor do tipo <i>Toll like</i>
TMB	3,3',5,5' Tetrametilbenzidina
Tr1	Células T reguladoras do tipo 1
TRAF6	Receptor de TNF associado ao fator 6
Treg	Linfócito T regulador
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Hidroximetil-aminometano contendo HCl
Tween 20	Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano
U	Unidades
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UTRs	Regiões não traduzíveis do RNAm

CONTEÚDO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	11
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Doenças alérgicas	18
1.2 Alergia e atopia.....	20
1.3 Resposta alérgica	21
1.3.1 Alérgenos	21
1.3.2 Resposta da célula T <i>helper</i> na alergia	22
1.3.3 Resposta humoral na alergia	23
1.4 Doença respiratória crônica	25
1.4.1 Rinite alérgica	25
1.4.2 Rinite não alérgica.....	26
1.5 Mecanismos de regulação da resposta alérgica	28
1.5.1 Pequenos RNAs.....	29
1.5.2 miRNA: biogênese e mecanismo de ação.....	30
1.5.3 miRNA: regulação da resposta imune	33
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	37
2.1.1 Objetivos específicos.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Critérios éticos e seletivos	39
3.2 Desenho experimental	40
3.3 Teste Cutâneo de Puntura (TCP)	40
3.4 Coleta de sangue.....	41
3.5 Obtenção do extrato do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	42
3.6 Dosagem protéica	42
3.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	43

3.7.1 Dosagem dos alérgenos Der p 1 e Der p 2.....	43
3.7.2 Dosagem de IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e IgA específica a <i>D. pteronyssinus</i>	43
3.8 Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	45
3.9 Dosagem de citocinas	46
3.10 Processo de extração e quantificação do RNA	47
3.10.1 Extração do RNA	47
3.10.2 Quantificação e avaliação da qualidade do RNA.....	47
3.11 PCR em tempo real para citocinas	48
3.11.1 Transcrição reversa (RT)	48
3.11.2 qPCR	48
3.12 Predição de alvos dos miRNAs.....	49
3.13 PCR em tempo real para miRNAs	50
3.13.1 RT por <i>stem-loop</i> primer	50
3.13.2 qPCR	52
3.14 Análises estatísticas.....	53
3.15 Procedimentos de biossegurança.....	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Caracterização demográfica e clínica dos pacientes	55
4.2 Quantificação dos alérgenos	56
4.3 Níveis de IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e IgA ao extrato de Dp	56
4.4 Perfil de citocinas no sobrenadante de cultura e soro.....	61
4.5 Análise quantitativa e qualitativa do RNA	65
4.6 RT-qPCR para citocinas.....	67
4.7 RT-qPCR para miRNAs.....	69
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXOS.....	94
ANEXO A	95
ANEXO B.....	96
ANEXO C	98

1. Introdução

1.1 Doenças alérgicas

As diferentes respostas sintomáticas exacerbadas a antígenos ambientais normalmente inócuos podem ser manifestações clínicas de doenças alérgicas, como por exemplo, a dermatite atópica, asma, rinite, dentre outras. As doenças alérgicas diferem entre si tanto em relação ao mecanismo imunológico envolvido bem como em relação à fonte antigênica responsável pelo desencadeamento dos sintomas. Assim, muito se tem discutido a respeito das condições de exposição aos alérgenos para que haja o desencadeamento das respostas alérgicas, e como certos alérgenos têm a capacidade de levar a estas respostas e não um padrão de resposta imunológica tolerogênica, que se observa em indivíduos saudáveis (TRAIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009).

Pesquisadores no intuito de avaliar a exposição a alérgenos no desencadeamento de doenças alérgicas, demonstraram que exposição a potenciais alérgenos na primeira infância ou mesmo durante a gravidez tem um papel central no desenvolvimento de doenças alérgicas (HOLGATE; POLOSA, 2008). Contrário a isto, uma ação protetora foi identificada por diferentes estudos que sugerem que a exposição a agentes microbianos durante a primeira infância protege contra doenças alérgicas (STRACHAN, 1989 ; BRAUN-FAHRLANDER et al., 2002), resultando na conhecida hipótese da higiene. Diferentes pesquisas têm sido realizadas no sentido de desvendar possíveis mecanismos que levam à proteção dos indivíduos de forma que os mesmos não desenvolvam reações alérgicas, e revelaram que agentes microbianos ativam receptores da imunidade inata tais como os receptores do tipo Toll presentes nas células apresentadoras de抗ígenos durante a concomitante exposição aos alérgenos, induzindo respostas alérgeno-específicas do perfil de citocinas Th1 ou via respostas das células T reguladoras (Tregs) como fator adjuvante para proteger o hospedeiro da sensibilização alérgica e consequente desenvolvimento de doenças alérgicas (KAISHO; AKIRA, 2002).

É sabido que o microambiente e o estilo de vida contemporâneo contribuem significativamente para o desenvolvimento destas doenças, uma vez que a permanência das pessoas durante várias horas em ambientes domésticos, escolares ou ocupacionais, nos quais está presente a maioria dos potenciais alérgenos, implica

em maior sensibilização dos indivíduos geneticamente predispostos (HESSELMAR et al., 2005; PERFETTI et al., 2004; PLATTS-MILLS et al., 1997). Em adição, o uso frequente de antibióticos e corticosteróides tem contribuído para o aumento da prevalência das doenças alérgica (BLASER, 2011).

Diante disto, a alergia tem se tornado o principal problema de saúde em muitas sociedades modernas, onde sua prevalência aumentou em até 34% em crianças e 16,3% em adultos entre as décadas de 60 e 90 (CROISANT, 2014) . Neste sentido, as doenças alérgicas respiratórias, asma e rinite, têm assumindo papel de destaque devido à alta e crescente prevalência em vários países do mundo. Estudos apontam que nos últimos 20-30 anos as taxas de prevalência atingiram valores entre 5% a 30% em países industrializados (ASHER et al., 2006; HOLGATE; POLOSA, 2008; ISAAC, 1998; SLY, 1999), sendo que segundo o informe *Global Initiative for Asthma* (GINA) existem atualmente 300 milhões de pessoas com asma no mundo todo (CLARK et al., 2002), sendo que em grande porcentagem da asma pode estar associada à rinite. Outros estudos confirmaram estes dados e apontam que a prevalência da asma varia de 1% a 30% entre a população de diferentes países e a da rinite alérgica de 10% a 25% da população geral (BEASLEY et al., 2000; VON MUTIUS, 1998).

Estudos conduzidos no Brasil encontraram prevalência média de rinite entre 27% e 34% em grupos de crianças e adolescentes com 6-7 anos e 13-14 anos, respectivamente, com maior prevalência nos centros urbanos (SOLÉ et al., 2004). Corroborando estes dados, em outro trabalho que utilizou o questionário ISAAC - *International Study for Asthma and Allergy in Childhood* - validado no Brasil mostrou prevalência média de sintomas relacionados à rinite de 29,6% entre adolescentes e 25,7% entre escolares, estando o País no grupo daqueles com as maiores taxas mundiais de prevalência, tanto de asma quanto de rinite (SOLE et al., 2006). Em outra pesquisa, revelou-se que nos países Latino Americanos a prevalência média de rinite para esses dois grupos de indivíduos foi de 34,6% e 44,4% (SOLE et al., 2010). Embora a rinite alérgica seja uma doença de menor gravidade, está entre as dez razões mais frequentes de atendimento em Atenção Primária em Saúde, e além de afetar a qualidade de vida das pessoas, interfere também no desempenho escolar e na

produtividade no trabalho (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2002; SOLÉ et al., 2006).

Vários fatores têm contribuído para o aumento na prevalência das doenças alérgicas, em especial as respiratórias. Podemos destacar um conjunto de fatores que levam ao desenvolvimento e aumento da prevalência de doenças alérgicas, que podem ser resultado da interação de predisposição genética (atopia) e exposição aos alérgenos, e também a provável associação de alguns cofatores como influência psicossocial, diminuição da estimulação do sistema imune (hipótese da higiene), poluição ambiental, grande parte do tempo em ambientes fechados seja em casa ou no trabalho, além do emprego frequente de antibioticoterapia e corticoterapia, os quais podem contribuir de maneira relevante sensibilização alergênica e no desencadeamento dos sintomas alérgicos (BARNES; MARSH, 1998b; RING et al., 2001).

1.2 Alergia e atopia

A palavra alergia foi empregada inicialmente por Clemens von Pirquet juntamente com Béla Schick em 1906, os quais estudaram a doença do soro. Von Pirquet sugeriu o termo alergia de “*allos*” significando “outro” ou uma derivação do estado original e “*ergon*” que significa reação (SIMONS, 1994). O termo é empregado como sinônimo de hipersensibilidade imediata, e utilizado para designar uma reação desencadeada por mecanismos imunológicos mediados por anticorpos, particularmente o isotipo IgE, induzidos por células do perfil Th2 com produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, sendo assim responsáveis pelo desencadeamento das manifestações clínicas após a exposição a determinado estímulo alergênico concentração tolerada por indivíduos saudáveis (JOHANSSON et al., 2004).

A atopia, termo este provindo da palavra “*atopos*” de origem grega significando “estranho”, representa uma predisposição genética de certos indivíduos para a síntese de IgE específica a componentes protéicos de alérgenos ambientais normalmente inócuos (HOLGATE; POLOSA, 2008). Os indivíduos que respondem aos estímulos provocados pela exposição a diferentes alérgenos, por meio da

produção de altos níveis de IgE são designados atópicos (JOHANSSON et al., 2006).

1.3 Resposta alérgica

1.3.1 Alérgenos

Os alérgenos são designados como os抗ígenos que possuem a capacidade de induzir e reagir com anticorpos IgE específicos, os quais são representados principalmente por proteínas ou glicoproteínas (BOUSQUET et al., 2001; FOTISCH; VIETHS, 2001). No ambiente, seja externo ou intradomiciliar há a presença de muitos alérgenos transportados pelo ar, por isto é a eles atribuída a designação de aeroalérgenos. Diversas são as fontes dos quais os mesmos podem provir, contudo os principais aeroalérgenos caracterizados originam-se principalmente de ácaros da poeira domiciliar, animais domésticos (cães e gatos), baratas, fungos do ar, polens entre outros (SAVOLAINEN; VIANDER; KOIVIKKO, 1990).

A poeira domiciliar é constituída por diversas partículas em suspensão oriundas de fibras vegetais, carpetes, partículas de móveis estofados, areia, terra, peças do vestuário, escamações humana e de animais domésticos, restos alimentares, resíduos químicos, micro e macro-organismos. Dentre estes organismos, podem ser encontrados bactérias, vírus, algas, fungos, insetos e outros artrópodes como ácaros da poeira domiciliar (LEDFORD, 1994). Assim, tapetes, colchões e móveis estofados são os principais lugares de onde provêm os ácaros encontrados na poeira, devido à disponibilidade de alimento dos quais estes organismos necessitam para sobreviver (ARLIAN; MORGAN, 2003).

Ácaros da poeira domiciliar são reconhecidos como uma das causas mais comuns de alergia no mundo, aos quais mais de 50% dos pacientes alérgicos são sensibilizados (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001; PLATT-MILLS; WECK, 1989; TOVEY; CHAPMAN; PLATTS-MILLS, 1981). Dentre as famílias destacam-se Glycyphagidae, Acaridae, Pyroglyphidae e Echimyopodidae (ARLIAN; MORGAN, 2003; ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001; FERNANDEZ-CALDAS, 1997). Pesquisas anteriores revelam que a família Pyroglyphidae engloba as espécies mais

relevantes da poeira domiciliar, com destaque para as espécies *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* (ARRUDA; CHAPMAN, 1992; PLATTS-MILLS et al., 1992).

1.3.2 Resposta da célula T *helper* na alergia

A distinção dos perfis de resposta desencadeados pelos diferentes tipos celulares, especialmente T *helper* (Th1 e Th2) se caracteriza pela produção de diferentes citocinas que sustentam a manutenção da homeostase do sistema imune, e assim quando ocorre desregulação do balanço destes perfis há excessiva ativação de células Th1 ou Th2 que pode culminar no desenvolvimento de doenças autoimunes associadas com a exacerbão do desenvolvimento de células Th1 ou indução de doenças alérgicas devido a um desvio para o perfil Th2 (OBOKI et al., 2008).

A resposta alérgica com sintomatologia característica ocorre pela predominância do desenvolvimento de células do perfil Th2. A entrada de alérgenos por meio do tecido epitelial do trato respiratório como evento inicial da resposta é sucedido pelo processamento dos mesmos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais, com destaque para as células dendríticas (DCs), as quais apresentam os peptídeos via MHC classe II para as células T *naive*, direcionando assim para o desenvolvimento de células do perfil Th2, no qual o fator de transcrição GATA 3 medeia a produção e a secreção de citocinas (HOLGATE; POLOSA, 2008).

Além da apresentação dos peptídeos抗igenicos, é necessário a coestimulação das células T para que haja aumento na expressão dos genes codificados no cromossomo 5q31-33 ligados à codificação de IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), característicos do perfil Th2 (COUSINS; LEE; STAYNOV, 2002). Citocinas estas envolvidas diretamente na maturação de eosinófilos (IL-3, IL-5 e GM-CSF), basófilos (IL-3 e IL-4) e na troca de classe de anticorpo em células B para a síntese de IgE (IL-4 e IL-13) com a consequente ligação aos Fc ϵ R presente em mastócitos e basófilos, as quais são as principais células efetoras secretoras de mediadores da resposta alérgica (HOLGATE; POLOSA, 2008).

Recentemente um novo perfil de resposta da célula T helper tem sido relacionado às doenças alérgicas, designado de Th17, sendo que o desenvolvimento das células deste perfil está diretamente ligado à presença do fator de transcrição ROR γ t com consequente produção de um padrão de citocinas diferenciado (IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26), o que indica perfil de células T *helper* adicional aos já existentes e bem estudados Th1 e Th2 (SORBELLO et al., 2015). Este processo pode ser desencadeado pela interação da IL-1 mais IL-6 ou IL-1 mais IL-23 produzidas pelas APCs, que leva à ativação de mecanismos intracelulares em células T *naive* e produção das citocinas ligadas a este perfil (OBOKI et al., 2008). Estudos confirmam o aumento da IL-17 nos pulmões, escarro, lavado broncoalveolar e também no soro de indivíduos asmáticos, de forma a correlacionar os níveis de IL-17 com a gravidade da doença, corroborando na patogênese da asma, especialmente a IL-17F (VOCCA et al., 2015; WONG et al., 2001a). Assim, as doenças alérgicas graves têm sido associadas com o desenvolvimento de células do perfil Th17 acompanhado de neutrofilia induzida pela IL-8 e na ausência de elevação dos níveis de anticorpos IgE, em contraposição aos casos mais leves e moderados, nos quais se observou a associação do desenvolvimento de células do perfil Th2, com o consequente aumento dos níveis de anticorpos IgE e eosinofilia (AMIN et al., 2000; CIPRANDI et al., 2008).

A citocina IL-17F tem a capacidade de induzir várias citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão nas células epiteliais brônquicas, células endoteliais das veias, fibroblastos e eosinófilos. A IL-17F, derivada de vários tipos celulares como as células Th17, mastócitos e basófilos mostra um amplo padrão de expressão, sendo que estudos têm comprovado que a superexpressão do gene da IL-17F nas células das vias aéreas de camundongos está associada a neutrofilia nas vias aéreas, indução de citocinas, aumento na reatividade das vias aéreas e hipersecreção de muco. Frente a isto a IL-17F pode assumir papel crucial na inflamação alérgica das vias aéreas, e pode ser alvo terapêutico na asma e na rinite não mediadas por anticorpos IgE (KAWAGUCHI et al., 2009).

1.3.3 Resposta humoral na alergia

Em 1967 uma nova classe de imuglobulina responsável pela reação cutânea foi identificada pelo casal Ishizaka, chamando-a de globulina gama E, denominação esta oriunda da observação da indução de uma reação de eritema e portanto, conhecida como anticorpo reagínico (SIMONS, 1994). Desta forma, as classes de imunoglobulinas da espécie humana totalizaram cinco: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. A molécula IgE possui a mesma estrutura molecular apresentada pelas outras classes de anticorpos, com duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas também idênticas, diferindo apenas em relação à presença de um domínio a mais na cadeia pesada comparada à cadeia pesada da molécula de IgG (GOULD; SUTTON, 2008).

Os níveis séricos de IgE específica apresentam-se em baixas concentrações em indivíduos saudáveis, mas em indivíduos que apresentam alergia além dos mastócitos e eosinófilos apresentarem maior número de receptores para IgE, há aumento da produção de IgE pelas células B por meio da ação das citocinas IL-4 e IL-13 produzidas pelas células Th2. Com isto, mais moléculas de IgE se ligam aos receptores de IgE (Fc ϵ RI) presentes nos mastócitos e basófilos. Diante de novas exposições aos mesmos抗ígenos ocorre a ligação cruzada destes pelas moléculas de IgE previamente ligadas aos Fc ϵ RI, desencadeando a liberação de mediadores pré-formados como a histamina, triptase e de mediadores neoformados como leucotrienos, citocinas dentre outros, os quais são responsáveis, respectivamente, pelos sintomas da fase imediata e tardia características da alergia (RAVETCH; KINET, 1991).

A intensidade da resposta imune a alérgenos é decisiva no desenvolvimento de uma condição alérgica sabidamente mediada por IgE, ou de uma condição saudável. Outras classes de anticorpos têm sido analisadas frente a esta variação de resposta, como IgA e as subclasses de IgG (BATARD et al., 1993; BATARD et al., 2006; JACKOLA et al., 2002). O isotipo IgG apresenta subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) estabelecidas e nomeadas de acordo com a cronologia do descobrimento, sendo elas produto da duplicação do gene da imunoglobulina G, com destaque para a IgG1 a mais abundante (>50%) comparada às outras subclasses (AALBERSE et al., 2009; FLANAGAN; RABBITTS, 1982).

Em indivíduos saudáveis, a resposta de células B a alérgenos provenientes de

ácaros da poeira domiciliar varia entre ausência de resposta, ou produção predominantemente de anticorpos IgG alérgeno-específicos, IgG1 ou IgG4, na ausência ou na presença de baixas concentrações de IgE, já em indivíduos alérgicos além da detecção de altos níveis de IgE pode ser também detectados níveis de IgG, particularmente a subclasse IgG4, sendo que os níveis de IgG1 têm sido encontrados em níveis similares aos dos indivíduos saudáveis (AKDIS, 2006; KEMENY et al., 1989).

Pesquisas ressaltam que a presença de anticorpos da subclasse IgG1 é acentuada em respostas antimicrobianas geralmente resultantes do desenvolvimento de células do perfil Th1. Também, tem sido demonstrado que a produção de anticorpos IgG1 a antígenos associados a respostas alérgicas é resultante da estimulação de células B induzidas por um *milieu* de citocinas do perfil Th1, em especial IFN- γ (AALBERSE et al., 2009). Altas doses de alérgenos podem favorecer a indução de resposta do tipo Th1, e alguns estudos com aeroalérgenos sugerem que a exposição ao alérgeno pode favorecer tolerância imunológica (PERZANOWSKI et al., 2002; PLATTS-MILLS, T. A. E. et al., 2001; SECRIST; DEKRUYFF; UMETSU, 1995).

Dentre as funções desempenhadas pela subclasse IgG1 está a potencialidade de agir como anticorpo bloqueador via competição direta por compartilharem a mesma especificidade a epítocos ligantes de IgE (BOLUDA; DE LA CUADRA; BERRENS, 1996; DEVEY; WILSON; WHEELER, 1976).

1.4 Doença respiratória crônica

1.4.1 Rinite alérgica

A rinite alérgica é definida clinicamente como uma doença crônica das vias aéreas superiores induzida por inflamação mediada por IgE, posteriormente à exposição da membrana da mucosa nasal ao alérgeno (BOUSQUET et al., 2001). É caracterizada pela presença de rinorréia, obstrução nasal, espirros em salva e prurido nasal, sintomas estes reversíveis espontaneamente ou sob tratamento, e pode ser subdividida em intermitente e persistente leve, moderada ou grave (BOUSQUET et

al., 2001) A rinite é a doença alérgica mais comum no mundo, definida como inflamação da mucosa nasal e caracterizada por sintomas nasais, podendo também ser acompanhada de lacrimejamento, prurido conjuntival e fotofobia, characteristicamente ocorrendo a rinoconjuntivite alérgica (BOUSQUET et al., 2008; JOHANSSON et al., 2004; TERR, 1997).

A doença possui fisiopatologia inflamatória Th2 e é caracterizada por aumento específico dos níveis de IgE e infiltração da mucosa nasal por células de Langerhans, eosinófilos, basófilos e mastócitos (BOUSQUET et al., 2001). No entanto, pesquisadores mostraram que a proporção de casos de rinite que é atribuível à atopia é de 53%, o que indica que não é simples a conexão entre atopia e os sintomas de rinite (ZACHARASIEWICZ; DOUWES; PEARCE, 2003).

A maioria dos genes inicialmente encontrados e que estão associados com o desenvolvimento da asma e da rinite participam da síntese de IgE, inflamação alérgica e/ou hiper-reatividade das células e órgãos, o que evidencia a importância do fator genético no desenvolvimento de doenças alérgicas (OBER; HOFFJAN, 2006). Neste sentido, foi demonstrado que a presença de polimorfismos no gene RAD50, encontrado no cromossomo 5q31 está ligado a um risco aumentado para o desenvolvimento da alergia, sendo que o *locus* gênico FCER1A estaria relacionado com os níveis totais de IgE (WEIDINGER et al., 2008)

1.4.2 Rinite não alérgica

A rinite caracterizada como não alérgica acomete as vias aéreas superiores, sendo que estudos têm mostrado cada vez mais a existência de pacientes que apresentam quadro clínico compatível com a rinite alérgica (espirros em salva, coriza, prurido nasal, obstrução nasal) ou da rinoconjuntivite alérgica, contudo não apresentam atopia sistêmica e não tem etiologia IgE mediada (SALIB et al., 2008; VAN RIJSWIJK; BLOM; FOKKENS, 2005). Embora apresente sintomas e hiper-reatividade nasal semelhante à rinite atópica, este grupo de pacientes que tem sido cada vez mais estudado, é caracterizado não só pela similaridade dos sintomas com os da rinite alérgica clássica, mas também por apresentar teste cutâneo de puntura (TCP) negativo a alérgenos inalatórios e por não produzirem níveis elevados de IgE

quando expostos aos alérgenos que estimulam as respostas imunes. Isto sugere, que o padrão de resposta Th2 não é a única via para indução desse quadro clínico, e portanto há grande necessidade em estudar e analisar o perfil de resposta deste grupo de pacientes, com o intuito de esclarecer os mecanismos de indução dessa doença não mediada por anticorpos IgE, pelo menos sistematicamente (JOHANSSON et al., 2001; POWE et al., 2003)

A este tipo de rinite tem sido atribuída diferentes nomenclaturas e classificações, uma vez que é uma doença que pode apresentar quadro clínico com outros sintomas, além dos sintomas já bem estabelecidos e similares aos da rinite alérgica. Mas de forma geral, o termo rinite crônica não alérgica é mais utilizado, e sendo assim esta classificação empregada para pacientes que exibem sintomas crônicos de rinite quando expostos aos alérgenos da poeira domiciliar, porém na ausência de anticorpos IgE específicos a aeroalérgenos clinicamente relevante (LIEBERMAN; PATTANAIK, 2014). É importante ressaltar que este grupo de pacientes com rinite crônica não alérgica apresenta sintomas mediante à exposição da poeira domiciliar, não devendo ser confundido com o grupo de pacientes com rinite vasomotora, infecciosa ou medicamentosa (BERNSTEIN, 2009; LIEBERMAN; PATTANAIK, 2014).

Diferentes mecanismos têm sido propostos no sentido de desvendar as possíveis respostas envolvidas nessa doença, sendo um deles baseado no envolvimento da mucosa nasal e no *switch* de classe para o anticorpo IgE, já que foi identificada produção local (PAYNE; CHEN; BORISH, 2011). Também, o envolvimento de células inflamatórias foi encontrado em alguns trabalhos, sugerindo que pacientes que apresentavam rinite crônica não alérgica (ausência de anticorpos IgE específicos a ácaros da poeira domiciliar pelo TCP ou no soro), quando submetidos a testes de provação nasal com *Dermatophagoides pteronyssinus* apresentaram níveis de IgE local aumentados (JOE, 2012; PAYNE; CHEN; BORISH, 2011). Neste mesmo sentido, diferentes pesquisas vem sendo realizadas com o intuito de poder identificar possíveis mecanismos iniciadores e reguladores que poderiam contribuir para elucidar os fatores relacionados a esta doença de etiologia obscura e de difícil comprovação. Sendo assim, devido à dificuldade de estabelecer a relação causa-efeito nesta doença e consequentemente refletindo na dificuldade de se

instituir um tratamento adequado e específico, este grupo de pacientes tem apresentado respostas variáveis e muitas das vezes insatisfatória e frustrante para ambos, pacientes e médicos (JOE, 2012).

1.5 Mecanismos de regulação da resposta alérgica

Os diferentes mecanismos de regulação das respostas imunológicas atuam por vias diversas, mas com o único objetivo de normalizar as respostas imunológicas dos indivíduos ao estado homeostático. Vários estudos apontam que estes mecanismos atuam seja por meio da supressão de células Th1, Th2, da ação de células como basófilos, mastócitos e eosinófilos, ou mesmo pela supressão da síntese de IgE e indução de anticorpos IgG4 (AKDIS et al., 1998; JUTEL et al., 2003). Estes mecanismos têm sido observados na resposta imune normal quando indivíduos são expostos a alérgenos e também sob imunoterapia específica com alérgenos. Nestas situações já foi identificado que células T periféricas são induzidas a um estado de tolerância caracterizada pela indução de células T reguladoras 1 (Treg 1) e aumento da capacidade supressora das células Treg (CD4+CD25+) produtoras de IL-10, o que culmina com a elevação da síntese de IgG4 e a diminuição de IgE devido a inibição da ativação das células B (PLATTS-MILLS, T. et al., 2001).

Assim, tem sido demonstrado o papel que as células Treg alérgeno-específicas têm assumido na supressão dos efeitos proliferativos celulares, bem como das respostas de citocinas contra os principais alérgenos desencadeantes da resposta imunológica exacerbada (AKDIS et al., 1996). A tolerância apresentada por pacientes sob imunoterapia e também por indivíduos saudáveis pode ser caracterizada pela forma que as células Treg modulam a resposta alérgica. Desta forma, podemos perceber a importância de vários fatores, sejam eles celulares ou humorais, no controle da resposta aos alérgenos, reforçando assim a significância do conhecimento mais aprofundado destes mecanismos reguladores ligados à resposta alérgica.

No sentido de desvendar mecanismos reguladores ligados direta e indiretamente ao perfil de resposta associado a doenças alérgicas, estudos têm apontado na regulação gênica em diferentes níveis, mecanismos estes que impediriam a transcrição de RNAm de fatores chaves na cascata da resposta

imunológica. Dentre estes mecanismos, o estudo do RNA de interferência tem tido uma especial atenção nos últimos anos, pois pesquisas têm demonstrado a associação dos mesmos em diversas patologias, incluindo as doenças alérgicas.

1.5.1 Pequenos RNAs

Pequenos RNAs são RNAs não codificantes que são produzidos por diferentes tipos de organismos, inclusive mamíferos. Dentro desta classe, existe pelos menos três tipos de RNAs que podem regular a expressão gênica nos animais, são eles os piwi-RNAs (piRNAs) e dois tipos de RNA de interferência, os pequenos RNAs de interferência (siRNA) e os microRNAs (miRNAs) segundo Desvignes et al. (2015). Os RNAi são pequenas sequências de nucleotídeos de fita simples e agem por meio da ligação de forma complementar ao RNAm e assim desencadeiam mecanismos que impedem a tradução dos RNAm alvos (CHENG; HE, 2010). Existe diferenciação em relação aos RNAi quanto à origem e aos tipos. Quanto à origem, os RNAi podem ser de origem exógena natural, exógena artificial ou mesmo de origem endógena. A ocorrência de RNAi de origem exógena por meio natural ocorre, por exemplo, quando há a infecção do organismo por determinado vírus, o qual pode produzir RNAi com a finalidade de silenciar alguns genes que são de relevância na resposta imunológica do hospedeiro, conseguindo assim escapar de alguns mecanismos de defesa de forma a manter-se no hospedeiro, possibilitando então a sua replicação (PEDERSEN; DAVID, 2008).

Os de origem exógena artificial, podem ser utilizados em experimentos biológicos por meio do uso de RNAi sintéticos, baseado no princípio de ação do RNAi natural, com o objetivo de estudar a função dos genes, o que se constitui em poderosa ferramenta genética que pode ser utilizada de maneira reversível para analisar as funções dos genes ou mesmo de seus produtos tanto em cultura de tecidos quanto *in vivo* (PERRIMON; NI; PERKINS, 2010). Estudos dos efeitos deste silenciamento podem mostrar o papel fisiológico do produto do gene, e com o uso deste mecanismo pode-se conseguir uma grande diminuição na produção em cerca de 80% a 90% nos níveis da proteína correspondente (NAIR et al., 2005; VOORHOEVE; AGAMI, 2003). Os de origem endógena podem ser siRNAs e

miRNAs, e são uma classe de RNAi produzida pelo próprio organismo, e regula negativamente a expressão dos genes, levando assim a repressão tradicional e/ou a degradação do RNAm (AMBROS, 2004; LIM et al., 2003).

Desta forma, o estudo dos diferentes RNAi pode elucidar a importância dos mesmos na regulação da resposta imune, demonstrando assim a relevância dos diferentes tipos de RNAi no processo da regulação da resposta imune de forma geral.

1.5.2 miRNA: biogênese e mecanismo de ação

Os miRNAs são moléculas de RNA de fita simples compostos por 19-25 nucleotídeos, não codificadoras de proteínas, de origem endógena e ocorrência natural e com papel relevante na regulação global da expressão dos genes em plantas e animais, incluindo humanos, via repressão da tradução e/ou degradação do RNAm (WU et al., 2007). A regulação pós transcrecional da expressão do gene foi primeiramente identificada em *Caenorhabditis elegans* por Lee, Feinbaum e Ambros (1993). Em humanos, aproximadamente 2588 miRNAs já foram listados na base de dados <<http://microrna.sanger.ac.uk>> e predições utilizando ferramentas de bioinformática estimam que esse número seja bem maior, constituindo uma das maiores classes de reguladores (ASIRVATHAM; MAGNER; TOMASI, 2009; BEREZIKOV et al., 2005).

Os miRNAs exercem seu efeito regulador ligando-se à região 3' não traduzível (UTRs) de RNAm alvos. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis protéicos de seus genes alvos, raramente afetando o nível de expressão transcrecional (KIM, 2005). Apesar de não terem suas funções totalmente esclarecidas, a descoberta dos miRNAs atraiu a comunidade científica pelas evidências sugestivas de que estas moléculas apresentam papel fundamental em diversos processos biológicos. Em mamíferos, estes pequenos RNAs foram associados à regulação da proliferação, diferenciação, hematopoiese, apoptose, entre outras funções sendo que diversos estudos enfatizam a importância destas moléculas ao relatar alterações na expressão dos miRNAs em diferentes patologias humanas (BRENNECKE et al., 2003; ESAU et al., 2004).

A biogênese dos miRNAs ilustrada na Figura 1, inicia-se no núcleo da célula com a codificação e transcrição pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) contendo cap 5' e cauda poli A (LEE et al., 2003). O pri-miRNA apresenta uma estrutura *hairpin* em seu arcabouço que é clivada ainda no núcleo pela RNase III, Drosha, e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA com aproximadamente 70 nucleotídeos (LEE et al., 2003). Em seguida o mesmo é exportado para o citoplasma pela exportina-5 (Exp5), proteína de exportação nuclear que utiliza Ran-GTP como cofator (LUND et al., 2004). No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela RNase III, Dicer, gerando um miRNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos (BERNSTEIN et al., 2001). Esta é incorporada a um complexo multimérico denominado RISC (*RNA-induced silence complex*) que inclui as proteínas Argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas do miRNA de fita dupla permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes alvos (SCHWARZ et al., 2003).

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs de mamíferos geralmente ocorre após ligação complementar com pelo menos 5 a 8 nucleotídeos da região 5' da cadeia do miRNA conhecida como região *seed*, a qual possui complementaridade perfeita e define a especificidade do seu alvo, à região 3' UTR da cadeia do RNAm alvo, esta ligação leva à inibição da tradução do RNAm. Adicionalmente, a ligação da região 5' do miRNA à região 3' UTR do RNAm alvo dependendo do grau de complementaridade, pode levar a inibição tradicional ou degradação do RNAm. Em função dos miRNAs possuírem sequências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos RNAm alvos além de cooperarem no controle de um único RNAm (AMERES; ZAMORE, 2013; BRENNECKE et al., 2005).

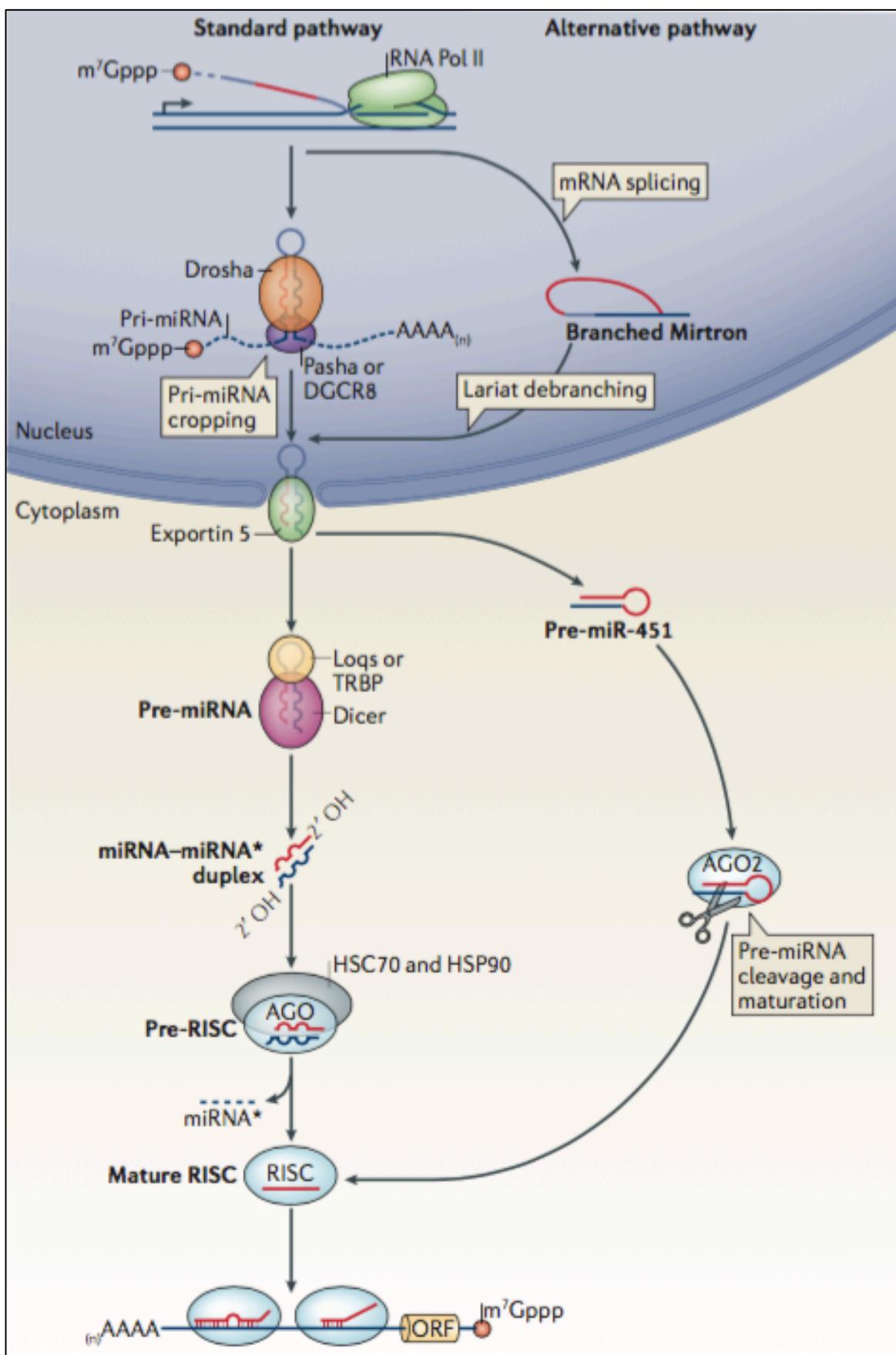


Figura 1. Ilustração do processo de produção do miRNA. **Fonte:** AMERES, S. L.; ZAMORE, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature reviews – Molecular Cell Biology*, v. 14. p. 475-488, 2013.

1.5.3 miRNA: regulação da resposta imune

Estudos recentes têm revelado que os miRNAs possuem papel em orquestrar a resposta imune por meio da sua regulação, incluindo ação direta no desenvolvimento e diferenciação das células T e B, proliferação de monócitos e neutrófilos, *switch* de classe de anticorpos, regulação da expressão dos genes das citocinas, liberação de mediadores inflamatórios dentre outras ações (ASIRVATHAM; MAGNER; TOMASI, 2009; LINDSAY, 2008). Estima-se que os miRNAs transcritos representam mais de 1% de todos os genes humanos, sendo que mais de 90% do genoma humano pode ser alvo dos miRNAs, o que sugere que numerosas redes genéticas podem ser afetadas pelos miRNAs possibilitando assim uma regulação global da expressão gênica celular e associação a diferentes funções (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005).

Com os recentes avanços nas pesquisas, vários miRNAs têm sido identificados e listados em bancos de dados (<http://www.mir2disease.org>; <http://www.microrna.org>), bem como as suas funções no processo regulatório. Dessa forma, tem-se questionado o papel dos mesmos miRNAs em diferentes patologias, como por exemplo nas doenças alérgicas, uma vez que a relação específica do papel dos miRNAs com a regulação das respostas Th2 induzidas por alérgenos é pouco conhecida.

Em trabalho anterior, utilizando a tecnologia do *microarray* e PCR em tempo real, pesquisadores avaliaram a expressão de miRNAs em modelos murinos de asma alérgica induzidos por IL-13, e revelaram a existência de um painel de 21 miRNAs. Estes autores demonstraram que o miRNA mais induzido foi o miR-21, o qual diminuiu a expressão de mIL-12p35, contribuindo assim provavelmente para uma polarização das células T helper para uma resposta do perfil Th2 (LU; MUNITZ; ROTHENBERG, 2009).

Outro estudo verificou a relação dos receptores do tipo *Toll like* (TLR), especialmente a ativação do TLR4 na resposta alérgica induzida por antígenos de ácaros da poeira domiciliar. Este processo foi associado com a expressão do miR-126, uma vez que o bloqueio seletivo do miR-126 suprimiu o fenótipo asmático por meio da diminuição da resposta Th2 (inflamação, hiper-reatividade das vias aéreas,

recrutamento de eosinófilos e hipersecreção de muco) via regulação negativa da expressão de GATA 3 (MATTES et al., 2009). Estes achados representam uma conexão funcional entre a expressão de miRNA e a patogênese da asma, sugerindo que a existência de determinado miRNA alvo poderia permitir a elaboração de uma estratégia terapêutica com efeitos anti-inflamatórios baseada em antagomiRs (antagonistas da ação dos miRNAs) para o manejo da asma alérgica.

O miR-146 é expresso em células do tipo Th1 e atua na regulação de moléculas de sinalização para produção de citocinas importantes, tais como a quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK1) e o fator associado ao receptor de TNF (TRAF6) em células da imunidade inata, o que sugere que a manipulação da expressão do miR-146 poderia afetar显著mente o balanço dos perfis de citocina Th1/Th2. Em adição, estudos têm revelado a alta expressão do miR-146 em células Tregs de forma induzida, bem como a expressão constitutiva de CD25, ressaltando assim a importância do miR-146 no papel regulador (BALTIMORE et al., 2008; LOVE; MOFFETT; NOVINA, 2008)

Em outro trabalho foi verificado que a região 3' UTR do HLA-G, molécula do HLA da classe I não clássica possui importantes propriedades imunomoduladoras, servindo como sítio alvo para o miRNA-148a, miRNA-148b e miRNA-152. Os genes desses três miRNAs estão localizados em regiões que têm sido associadas com asma ou com a produção de IgE, o que aumentaria a possibilidade de que a variação nos genes dos miRNAs podem contribuir para interferir com o risco de asma, talvez por meio da interação com o HLA-G (TAN et al., 2007).

Estudos sobre a ação do miR-155 revelam que o mesmo é necessário para a diferenciação da resposta ao antígeno e formação de anticorpos de alta afinidade. Em relação aos efeitos nas células T *helper*, alguns estudos apontam que a diminuição da expressão de miR-155 com antagomiRs pode levar ao desenvolvimento do perfil de citocinas Th2 e inibição da resposta das células Th1. Estes efeitos foram verificados em experimentos realizados em camundongos nocauteados para o miR-155, os quais demonstraram fenótipos similares aos observados na asma, com aumento da espessura das vias aéreas e invasão leucocitária concomitantemente à produção de citocinas do perfil Th2 (RODRIGUEZ et al., 2007; THAI et al., 2007). Interessantemente, o gene do miR-155 na espécie humana localiza-se dentro do *locus*

cromossômico associado a asma, corroborando assim na existência da relação entre o nível de expressão do miR-155 e o risco para o desenvolvimento da asma (LOVE; MOFFETT; NOVINA, 2008).

Podemos observar os avanços nas pesquisas em relação aos RNAs de interferência, em especial os miRNAs como demonstrado por alguns estudos. Trabalhos pioneiros indicam que a manipulação da expressão do miRNA tem potencial terapêutico (MATTES et al., 2009), contudo pesquisas que busquem revelar o papel dos miRNAs nas respostas imunológicas devem ser conduzidas para a melhor compreensão da função dos mesmos na modulação da resposta imune alérgica.

Desta forma, a relevância do trabalho está em buscar respostas relacionadas aos mecanismos de regulação da resposta imunológica em pacientes com rinite crônica não alérgica, seja por meio de mudanças no perfil de citocinas, padrão de expressão de diferentes RNAm de citocinas, anticorpos ou mesmo por diferenças em potenciais formas de regulação como os miRNAs, uma vez que os mesmos têm sido relacionados a diferentes doenças, inclusive rinite e asma. E com isto considerar que um outro tipo de resposta imunológica não relacionada ao perfil Th2 poderia desencadear a resposta imunológica de indivíduos alérgicos com ausência de IgE.

Sendo assim, esta ampla análise permitirá conhecer de forma mais abrangente o comportamento dos pacientes com rinite crônica não alérgica comparado aos pacientes com rinite alérgica e indivíduos controle, e assim indicar alternativas seja no diagnóstico ou tratamento destes pacientes.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar e comparar os níveis de anticorpos, citocinas e miRNAs de pacientes com rinite não mediada por anticorpos IgE frente aos pacientes com rinite mediada por IgE e indivíduos do grupo controle.

2.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a soropositividade para IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e IgA frente ao alérgeno de Dp nos diferentes grupos estudados;
- Dosar as citocinas do perfil Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), Th17 (IL-17) e Treg (IL-10) no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) estimulada com fitohemaglutinina (PHA) e alérgenos de Dp nos diferentes grupos;
- Dosar as citocinas do perfil Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), Th17 (IL-17) e Treg (IL-10) nas amostras de soros dos três grupos;
- Analisar os níveis de expressão gênica relativa de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-5) e Treg (TGF- β) e de miRNAs (miR-21 e miR-126) em PBMCs estimuladas com alérgenos de Dp nos três grupos.

3. Material e Métodos

3.1 Critérios éticos e seletivos

Os critérios éticos foram cumpridos por meio da submissão do projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), coordenado e subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), de maneira a assegurar a regulamentação ética necessária, sendo aprovado sem restrições sob o número de processo 178/11 (Anexo A).

Posteriormente à aprovação do projeto, foi feita a seleção dos pacientes que foram atendidos no Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), onde logo após o atendimento clínico foram questionados sobre a possibilidade de participarem do estudo. Os pacientes concordantes foram previamente esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e dos procedimentos que seriam realizados, sendo o aceite preenchido sob a forma de Termo de Consentimento livre e esclarecido (Anexo B) e a seleção feita tanto por meio do questionário clínico (Anexo C) elaborado segundo *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC, 1998), quanto pelo resultado do teste cutâneo de puntura (TCP) aos extratos de aeroalérgenos. No processo de seleção dos pacientes com rinite foram adotados os critérios de inclusão e exclusão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios seletivos utilizados para a amostragem dos pacientes a serem incluídos no estudo.

Critérios seletivos	
Inclusão	Exclusão
1 Aceite em participar do estudo (Termo de Consentimento)	1 Recusa em participar do estudo
2 Teste cutâneo de puntura (TCP) ao alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2 Idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos
3 História clínica de sintomas respiratórios associados à exposição a alérgenos da poeira domiciliar	3 Sob tratamento com anti-histamínicos ou corticosteróides por via oral ou tópica na semana anterior ao teste

A seleção possibilitou o recrutamento de cinquenta e um pacientes ($n = 51$) de ambos os gêneros, faixa etária entre 18 e 60 anos que apresentaram os critérios de

inclusão propostos no estudo. Os indivíduos controle ($n=31$) utilizados como controle foram selecionados no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica (LALIC) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU, também pertenciam à faixa etária de 18-60 anos com indivíduos de ambos os gêneros, e obedeciam aos critérios de inclusão 1 e 2. Todo o processo de seleção compreendido por anamnese, TCP e posteriormente coleta de sangue foi feito sob supervisão do médico alergologista responsável. Os indivíduos triados foram distribuídos em três grupos segundo o história clínica, TCP e níveis de IgE específica a Dp.

3.2 Desenho experimental

Posteriormente à seleção dos indivíduos foi então realizada a classificação e distribuição dos mesmos em três grupos conforme demonstrado na Figura 2, a qual também ilustra toda a parte experimental realizada no trabalho.

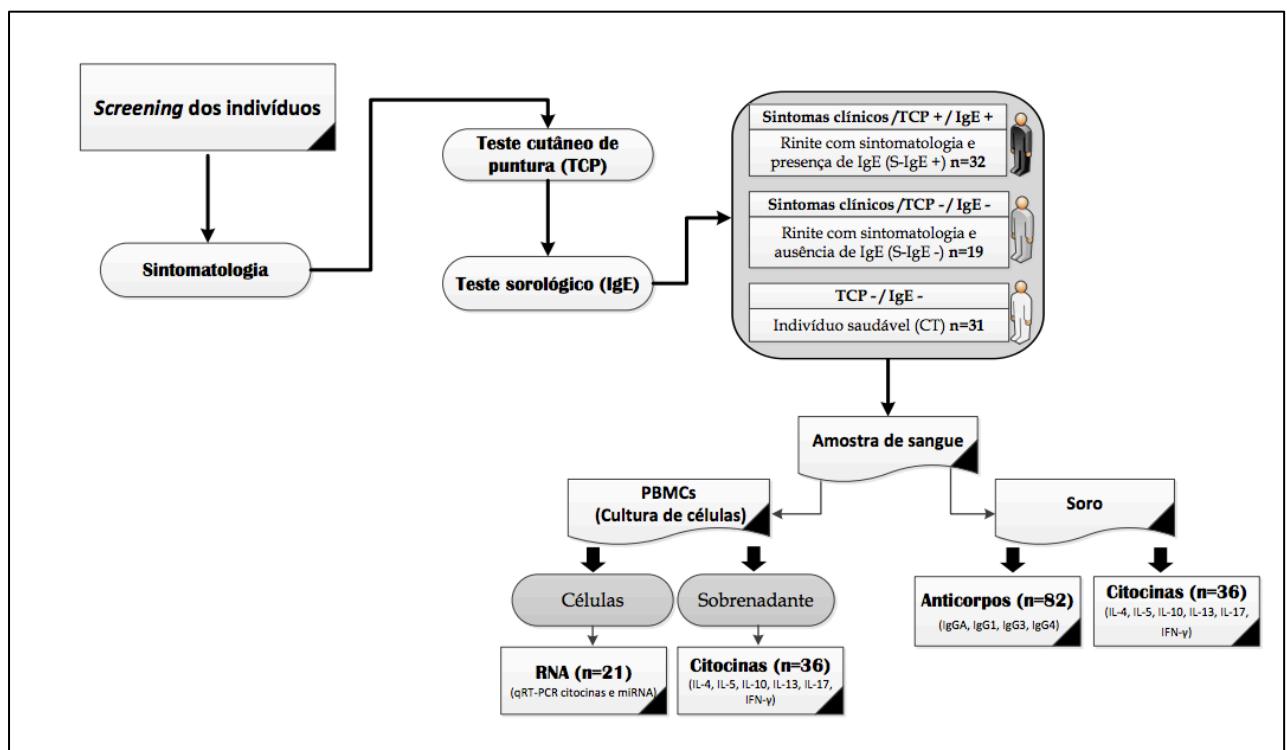


Figura 2. Fluxograma com os critérios discriminatórios dos grupos e sequência metodológica do trabalho.

3.3 Teste Cutâneo de Puntura (TCP)

A avaliação da reação de hipersensibilidade imediata foi feita por meio do TCP, no qual foram utilizados além dos controles os seguintes extratos alergênicos inaláveis, separadamente conforme a espécie:

- **Controle negativo:** solução salina fisiológica em fenol 0,4% e glicerina diluída a 50% (FDA Allergenic, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- **Ácaros:** *D. pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis* (FDA Allergenic);
- **Baratas:** *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* (FDA Allergenic);
- **Epitélio de animais domésticos:** *Canis familiaris*, *Felis domesticus* (FDA Allergenic);
- **Fungo:** *Alternaria alternata* (FDA Allergenic);
- **Controle positivo:** cloridrato de histamina a 10 mg/mL (FDA Allergenic).

Com o auxílio da lanceta (Puntores ALK-Abello, Horsholm, Frederiksborg, Dinamarca) foram feitas punturas na região anterior do antebraço, posteriormente à antisepsia com álcool 70%, onde foram depositadas as microgotas (aproximadamente 10 µL) de cada extrato alergênico. Após 15 min da realização da puntura, o tamanho das pápulas foi medido em milímetros nos seus dois diâmetros ortogonais. O resultado foi considerado positivo quando as pápulas apresentaram diâmetro médio maior ou igual a 3 mm em relação ao controle negativo.

3.4 Coleta de sangue

Em paralelo ao TCP, foram coletados 30 mL de sangue em tubos a vácuo (Becton Dickinson-BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) por meio de punção venosa na região do antebraço. Do total de 30 mL, 20 mL foram coletados em tubos heparinizados (BD) e os outros 10 mL em tubos sem anticoagulante (BD). Os tubos com anticoagulante heparina foram submetidos aos procedimentos necessários para

a separação de PBMCs e o tubo com sangue total foi centrifugado por 10 min a 3.000 × g para a obtenção das amostras de soro, as quais foram aliquotadas e armazenadas a -80°C para posterior análise sorológica.

3.5 Obtenção do extrato do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*

A extração das proteínas do ácaro *D. pteronyssinus* (Dp) foi realizada com 15 g do material peneirado do cultivo do ácaro (cedido pelo professor Federico Montealegre, Laboratório de Imunoquímica, Escola de Medicina de Ponce – Porto Rico, EUA), diluídos em salina tamponada com borato a 5 mM (pH 8,0) na presença de inibidor de proteases (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Indianapolis, IN, EUA). Posteriormente à diluição, foi feita a maceração em nitrogênio líquido, e então a mistura foi incubada sob agitação orbital durante 18 h a 4°C. Após este procedimento, foi realizada pré-centrifugação a 3.000 × g por 15 min a 4°C e o sobrenadante obtido foi coletado e novamente centrifugado por duas vezes a 30.000 × g por 30 min. O sobrenadante final foi coletado, concentrado e dialisado contra solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS) pH 7,2 em sistema Amicon (EMD Millipore Headquarters, Billerica, MA, EUA) e membrana com *cut off* de 10 kDa (YM-10, EMD Millipore), esta mistura foi designada de extrato protéico solúvel. O extrato de ácaro foi distribuído em alíquotas e armazenados a -80°C (PEREIRA et al., 2005).

3.6 Dosagem protéica

O valor da concentração protéica do extrato de Dp foi determinado de acordo com método anteriormente descrito por Lowry et al. (1951). A obtenção do valor da concentração protéica do extrato solúvel de Dp foi feita por meio da comparação do valor de densidade óptica (D.O.) do extrato a 650 nm, frente aos valores de D.O. dos valores obtidos para a curva padrão, constituída por diluição dupla seriada (500 a 15,6 µg/mL) de soroalbumina bovina (BSA, Sigma). O valor foi determinado por meio do programa Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad).

3.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

3.7.1 Dosagem dos alérgenos Der p 1 e Der p 2

A quantificação dos alérgenos do grupo 1 e 2 no extrato total de Dp foi realizada pelo imunoensaio ELISA. Previamente, placas de alta afinidade (Costar Corning Inc., Corning, NewYork, NY, EUA) foram sensibilizadas com volume de 50 µL de anticorpo monoclonal anti-Der p 1 (clone 5H8 – Indoor Biotechnologies Inc., Charlottesville, VA, EUA) ou anti grupo 2 (clone 1D8 – Indoor Biotechnologies) diluído (1:1000) em tampão carbonato-bicarbonato 60 mM (pH 9,6) por 18 h a 4°C. Passos de lavagem entre cada etapa foram realizados com tampão fosfato salino (PBS) adicionado de 0,05% de Tween (PBS-T) em lavadora de placa ELISA (Aquamax 3000 Microplate Washer, Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, EUA). Então, foi feito o bloqueio com PBS-T contendo 1% de BSA constituindo o PBS-T-BSA por 1 h a temperatura ambiente (T.A), com posterior adição das amostras e curva padrão. A adição dos anticorpos secundários biotinilados anti-grupo 1 (clone 4C1 – Indoor Biotechnologies) ou anti-grupo 2 (clone 7A1 – Indoor Biotechnologies) foi feita com posterior incubação por 1 h a T.A, seguido pela adição de estreptavidina-peroxidase (1:1000, Sigma) por 30 min a T.A. A revelação da reação foi feita com o kit ABTS Microwell Peroxidase Substrate (Kierkegaard and Perry Laboratories In., KPL, Gaithersburg, MD, EUA), com posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro a 405 nm (Epoch, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA). Os valores foram determinados por meio do programa Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad) e expressos em nanogramas por mililitro (ng/mL) com base na curva padrão realizada com Der p 1 ou grupo 2 (Indoor Biotechnologies), em diluição dupla seriada a partir de 500 ng/mL.

3.7.2 Dosagem de IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e IgA específica a *D. pteronyssinus*

Para a quantificação de IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e IgA específica a *D. pteronyssinus* foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA conforme estudo anterior (ALVES et al., 2008). Primeiramente, o extrato de Dp foi diluído em tampão

carbonato-bicarbonato 60 mM (pH 9,6) em concentração protéica de 30 µg/mL para a sensibilização das placas de microtitulação de alta afinidade (Costar Corning) em volume de 50 µL por poço a 4°C durante 18 h. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-T, sendo este ciclo de lavagem repetido entre as etapas subsequentes.

Em seguida, foi realizado o bloqueio dos sítios ativos das placas com PBS-T contendo BSA (Sigma) a 1% (PBS-T-BSA 1%) para IgE e IgG4 por 1 h a 37°C; PBS-T adicionado de 0,1% de BSA (PBS-T-BSA 0,1%) para IgG1 por 1 h a T.A; PBS com 5% de leite desnatado em pó (PBS-M) para IgA durante 2 h a 37°C; PBS-T com 2% de leite desnatado em pó (PBS-T-M) para IgG3 por 1 h a T.A. Após este período de bloqueio, as amostras de soro foram adicionadas em duplicata em volume de 50 µL/poço diluídas a 1:2 (IgE), 1:5 (IgG4, IgA) e 1:10 (IgG1, IgG3) por período de 2 h a 37°C para os anticorpos IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e por 1 h a 37°C para o anticorpo IgA. Três soros controle positivo e três soros controle negativo foram incluídos em cada placa, soros estes padrões pertencentes à soroteca. Após o ciclo de lavagem as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgE humana biotinilado diluído a 1:1000 (KPL), anti-IgA, -IgG1, -IgG3, -IgG4 diluído a 1:1000 (Sigma) em volume de 50 µL/poço a 37°C por 1 h. Ao final foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) em volume de 50 µL/poço diluído a 1:500 para IgE, IgG3, IgG4 (Sigma) ou 1:1000 para IgA e IgG1 (Sigma) por 30 min à T.A. A revelação da reação, bem como a leitura da absorbância foi realizada da mesma forma citada no Item 3.7.1. Os níveis de anticorpos foram expressos por meio do Índice ELISA (IE), segundo a fórmula:

$$IE = \frac{DO_i}{DO \text{ controle} + 3.\delta}$$

em que:

DO_i = média da densidade óptica da amostra testada;

DO controle = média das densidades ópticas de três amostras de soros controles negativos;

δ = desvio-padrão das densidades ópticas das amostras de soros controles negativos.

Com os valores obtidos por meio desta fórmula, os IE foram designados como positivos para valores de IE > 1,2.

3.8 Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos grupos com S-IgE+ (n=12), S-IgE- (n=9) e CT (n=11) foram isoladas por centrifugação em gradiente Ficoll-Hypaque ($d=1,077\text{ g/mL}$; Histopaque-1077, Sigma). Os 20 mL de sangue total heparinizado coletado foram diluídos (v/v) em PBS estéril a T.A, com posterior homogeneização. Cuidadosamente, o sangue diluído foi dispensado sobre Ficoll-Hypaque e submetido à centrifugação de $1000 \times g$ a 21°C por 20 min. Após a centrifugação, o plasma foi descartado e a nuvem celular de PBMCs foi coletada com pipeta *Pasteur* e transferida para tubo de 15 mL, de forma que o volume final fosse completado para 12 mL com PBS estéril gelado. A suspensão celular foi centrifugada a $300 \times g$ por 10 minutos a 4°C , e o *pellet* de células obtido foi novamente submetido a este processo de lavagem por mais duas vezes com PBS estéril gelado. Ao final, o sedimento celular foi ressuspenso em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) contendo gentamicina a $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ (Sigma) e soro fetal bovino a 5% (Gibco - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). A suspensão celular foi mantida em banho de gelo até a contagem das células viáveis, a qual foi realizada utilizando-se o corante azul de Tripan 0,4% (Gibco) em câmara hemocitométrica de Neubauer, e assim ao final a suspensão celular foi diluída em meio completo na concentração de 2×10^6 células/mL.

A suspensão celular obtida foi plaqueada em volume de $500\text{ }\mu\text{L}$ por poço em placas de 24 poços, aos quais foram também adicionados $400\text{ }\mu\text{L}$ de meio completo e $100\text{ }\mu\text{L}$ do mitógeno fitohemaglutinina (PHA, Sigma) a $50\text{ }\mu\text{g/mL}$, ou extrato alergênico de Dp a $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de forma que no volume final as concentrações nos poços ficassem $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ (PHA) e $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ (Dp), ou somente meio completo como controle da cultura. As células foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 durante 4 dias. Ao final do período de incubação o volume dos poços foi transferido em sua totalidade (sobrenadante e células) para tubos de polipropileno livres de

DNAse e RNAse e centrifugados, de forma que obtivéssemos o sobrenadante e o *pellet* de células. O sobrenadante da cultura foi coletado cuidadosamente e armazenado a -80°C, já os *pellets* de células foram submetidos ao processo de extração de RNA.

3.9 Dosagem de citocinas

Os níveis de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ) foram dosados no sobrenadante da cultura de células e também nas amostras de soro pelo imunoensaio ELISA sanduíche de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (BD; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Em resumo, placas de alta afinidade (Costar Corning) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IL-4 e IL-10 a 1:250 a 4°C por 18 h e anti-IL-5, -IL-10, -IL-13, -IL-17 e -IFN- γ diluídos a 1:180 a T.A por 18 h em volume de 50 μ L. Após a incubação, foi realizado o processo de lavagem das placas com PBS-T, sendo este procedimento realizado entre cada etapa. Posteriormente, foi realizado o bloqueio dos sítios ativos da placa com PBS-T adicionado de 10% de soro fetal bovino (PBS-T-SFB) para IL-4 e IL-10, já para IL-5, IL-13 e IL-17 foi utilizado PBS-BSA 1%, acrescido de NaN₃ a 0,05% para IFN- γ em volume de 150 μ L por 1 h a T.A. Em seguida, as amostras de sobrenadante de cultura ou soro, em paralelo com as diluições das curvas padrão foram adicionadas em volume de 50 μ L durante 2 h a T.A. No passo posterior, para as citocinas IL-4 e IL-10 foi adicionado o anticorpo de detecção a 1:1000 e 1:250, respectivamente. Sendo esta diluição acrescida de estreptavidina-peroxidase a 1:250 sob incubação de 1 h a T.A em volume de 50 μ L por poço. Anticorpos de detecção para as citocinas IL-5, IL-13, IL-17 e IFN- γ foram diluídos a 1:180 e então adicionados em volume de 50 μ L por 2 h a T.A. Ao final, foi colocada a estreptavidina-peroxidase diluída a 1:200 durante o período de 20 min a T.A. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com o kit TMB Substrate Reagent Set (BD), sendo a D.O. determinada em espectrofotômetro a 450 nm e 570 nm (filtro referência). Os valores obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão por meio do software Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad).

3.10 Processo de extração e quantificação do RNA

3.10.1 Extração do RNA

A extração de RNA ($n=21$, sendo 7 amostras de cada grupo) com enriquecimento de miRNA foi feita com o miRNeasy Mini kit (Qiagen Ltd., Manchester, UK, Inglaterra). O *pellet* de células obtido da cultura de PBMC foi submetido ao protocolo de extração de acordo com o proposto pelo fabricante. Resumidamente, foi adicionado ao *pellet* 600 μL de tampão de lise contendo 0,01% de β -Mercaptoetanol (Bio-Rad), mistura esta vortexada para auxiliar na lise celular. Seguidamente, foi colocado 600 μL de etanol 70% com homogeneização por pipetagem, e então esta mistura foi aplicada na coluna conectada ao tubo de coleta, para então ser submetida à centrifugação. O volume que passou pela coluna foi descartado, e foi adicionado à mesma 700 μL do tampão de lavagem 1, com posterior centrifugação. O volume eluído foi descartado e o processo de lavagem foi repetido com o tampão de lavagem 2 por duas vezes.

Ao final do processo a coluna foi transferida para novo tubo de coleta e então foi acrescentado 40 μL de água livre de RNase (fornecida pelo kit) diretamente na membrana da coluna, a qual foi centrifugada para a eluição do RNA.

3.10.2 Quantificação e avaliação da qualidade do RNA

A quantificação e avaliação da qualidade do RNA extraído foram realizadas por meio da espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose, respectivamente. Primeiramente, amostras de RNA foram utilizadas em volume de 1 μL no aparelho NanodropTM 1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, EUA) com leitura a 260 nm e 280 nm. O grau de pureza das amostras foi verificado pela razão destas duas absorbâncias a qual indica a pureza do RNA quando se encontra entre 1,8 e 2,0, valor este fornecido pelo equipamento, bem como o valor da concentração em ng/ μL .

A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% com adição da solução de formamida composta por ácido 4-morfolinopropanosulfônico (MOPS; Sigma), formamida (Sigma) e água. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra, o qual tem em sua composição formamida (Sigma), formaldeído (Vetec-Sigma), MOPS (Sigma) e azul de bromofenol (Bio-Rad), posteriormente foram aquecidas em banho seco a 60°C para aplicação no gel. O gel foi submetido à corrente elétrica de 100 V por 50 min, e ao final foi observado no fotodocumentador (ImageQuant 300, GE Life Sciences Healthcare, Buckinghamshire, UK, Inglaterra) de forma a visualizar e digitalizar a imagem do gel apresentando as bandas 18S e 28S, as quais definem a qualidade do RNA extraído.

3.11 PCR em tempo real para citocinas

3.11.1 Transcrição reversa (RT)

A reação de RT foi realizada em dois passos, primeiramente foi feito o mix composto por Random Hexamer Primer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), dNTPs a 10 mM (Thermo Fisher), RNA a 10 ng e água, mistura esta que foi colocada no termociclador (GenePro, Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Binjiang, Zhejiang, China) por 5 min a 65°C, conforme especificação do fabricante. Retirados os tubos do termociclador, foi então acrescentado o mix composto por MgCl₂ a 25 mM, transcriptase reversa (50U), tampão da transcriptase reversa 5x, inibidor de RNase (1U) e água livre de nuclease. Os tubos foram novamente colocados no termociclador (Bioer) sob programação de 10 min a 25°C, 1 h a 42°C e 10 min a 70°C. Finalizado este processo as amostras de cDNA foram estocadas a -20°C para serem utilizadas nas reações de qPCR (reação quantitativa em tempo real em cadeia da polimerase).

3.11.2 qPCR

As reações de qPCR tendo como alvos as citocinas foram realizadas com os primers (Gene ID listados abaixo) e sondas 6-carboxifluoresceína - FAM (MGB,

minor groove binder) do sistema inventoriado *Taqman Gene Expression Assay* (Applied Biosystems - Life Technologies Co., Carlsbad, CA, EUA):

- IL-5 (Hs00174200_m1): Gene ID - 3567, amplicon 87 pb
- IFN- γ (Hs00989291_m1): Gene ID - 3458, amplicon 73 pb
- TGF- β (Hs00610319_m1): Gene ID - 7046, amplicon 126 pb
- Actina (Hs03023943_g1): Gene ID - 60, amplicon 96 pb

Previamente, foram feitas curvas de eficiência para os alvos citados acima de maneira que obtivéssemos slope, R² e porcentagem de eficiência similar entre o alvos e o controle endógeno actina, bem como a definição da melhor concentração de cDNA a ser utilizada. Para tanto, foi adicionado ao *eppendorff* a mistura composta por *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), primer e sonda *Taqman Gene Expression Assay* (Applied Biosystems), amostra de cDNA em diferentes concentrações (20 ng a 0,3 ng) e água em volumes determinados pelo fabricante. As curvas foram compostas por 7 pontos de diluição e foram adicionadas em triplicata em placas de PCR de 96 poços (Applied Biosystems). A reação foi por fim realizada no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) sob condições padrão.

Desta forma, por meio das curvas de eficiência que apresentaram valores de slope, R² e porcentagem de eficiência dentro dos intervalos desejáveis, definimos que a melhor concentração de cDNA para utilizarmos foi o 4º ponto de diluição correspondente a 2,5 ng de cDNA. Assim, as amostras obtidas da cultura celular sob estímulo de Dp pertencentes aos grupos S-IgE+ (n=4), S-IgE- (n=4) e CT (n=4) foram submetidas à qPCR em triplicata, tendo como amostra referência o cDNA obtido das células não estimuladas, e como controle endógeno a actina, para que a quantificação relativa fosse calculada de acordo com o método 2^{-ΔΔCt} (BUSTIN et al., 2009).

3.12 Predição de alvos dos miRNAs

A literatura tem reportado o número crescente dos miRNAs descobertos, e o envolvimento dos mesmos em diferentes doenças. Assim, foi feito levantamento bibliográfico dos principais miRNAs envolvidos em doenças alérgicas típicas do perfil Th2, sendo levado em conta a metodologia que estes estudos realizaram, uma vez que queríamos um amplo *screening* de miRNAs para que pudéssemos escolher os que apresentassem expressão relativa alterada. Desta forma, os miRNAs mais citados no envolvimento com doenças alérgicas estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. miRNAs com seus respectivos papéis funcionais na resposta imune alérgica.

miRNA	Papel funcional	Referência
miR - 21	Aumento da expressão contribui com a polarização para o perfil Th2	(LU; MUNITZ; ROTHENBERG, 2009)
miR - 21	Aumento da expressão está associado positivamente à eosinofilia	(LU et al., 2013)
miR - 21	Regulação da produção de IgE via aumento do receptor para TGF-β	(CHEN et al., 2010)
miR - 126	Ação antagônica suprime a função efetora de células Th2 e o desenvolvimento de doença alérgica das vias aéreas via supressão do fator de transcrição GATA 3	(MATTES et al., 2009)
miR - 126	Expressão alterada em pacientes com asma ou rinite	(SUOJALEHTO et al., 2014)

Diante disto, fizemos a predição dos possíveis alvos dos miRNAs listados na Tabela 2 baseada no reconhecimento da sequência do miRNA com a sequência do RNA mensageiro dos possíveis alvos por meio do site <www.microrna.org> com o objetivo de certificar os potenciais alvos do miR-21 e do miR-126 que podem estar envolvidos na modulação da resposta alérgica.

3.13 PCR em tempo real para miRNAs

3.13.1 RT por *stem-loop* primer

Os miRNAs possuem pequeno tamanho, e desta forma precisam de algumas alterações na reação de RT para serem transcritos em cDNA, por isto os primers utilizados nesta reação possuem uma modificação chamada *stem-loop*, ilustrada na Figura 3.

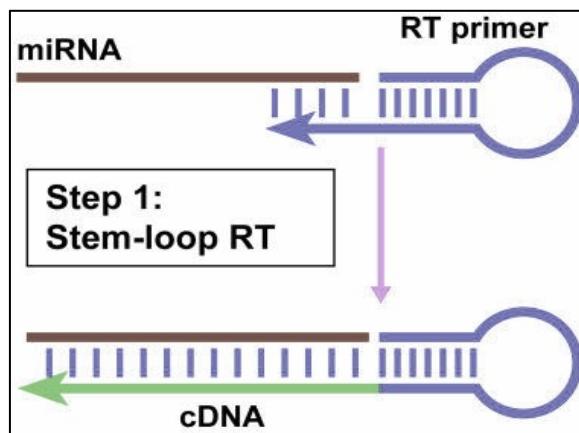


Figura 3. Esquema da forma e ação do *stem-loop* primer. **Fonte:** CHEN et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research*, v. 33, 2005.

A reação RT foi realizada com o *TaqMan MicroRNA Assay* (Applied Biosystems), kit este composto por mix de dNTPs, transcriptase reversa e inibidor de RNase. Estes reagentes foram combinados e ao fim foi adicionado água, RNA a 10 ng e o RT primer (*stem-loop* RT) específico para cada alvo, contido no kit *TaqMan Small RNA assay* (Applied Biosystems), como demonstrado abaixo:

- **Sequência do miR-21 *stem-loop*:**

UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGG
CAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGACA

- **Sequência do miR-126 *stem-loop*:**

CGCUGGCGACGGGACAUUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACU
UCAAACUCGUACCGUGAGUAUAUGCGCCGUCCACGGCA

- **Sequência do small nuclear U6 *stem-loop* (RNU6B):**

CGCAAGGATGACACGCAAATTCTGAAGCGTTCCATATTTT

Todos os constituintes da reação citados anteriormente foram adicionados em volumes e concentrações pré-determinados pelo fabricante. Foram então levados ao termociclador (Bioer) de acordo com a seguinte programação: 30 min a 16°C, 30 min a 42°C e 5 min a 85°C. Retirados os tubos do termociclador, as amostras foram então estocadas a -20°C para serem utilizadas nas reações de qPCR.

3.13.2 qPCR

Assim como na qPCR para citocinas, foram feitas curvas de eficiência para os miRNAs de forma que os valores de slope, R² e porcentagem de eficiência fossem próximos entre os miRNAs e o controle endógeno RNU6B. As curvas de eficiência foram relevantes também para determinarmos a concentração de cDNA a ser utilizada nas reações de qPCR das amostras alvo.

Logo que as curvas de eficiência foram padronizadas, procedemos às reações de qPCR, a qual foi realizada com *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), água, amostra de cDNA, primer e sonda *Taqman Small RNA Assay* (Applied Biosystems) específica para cada alvo em volumes e concentrações indicados pelo fabricante. Abaixo as sequências dos alvos e controle endógeno:

- hsa-miR-21-5p

miRBase Accession Number: MIMAT0000076

Sequência (Mature miRNA): UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

- hsa-miR-126-5p

miRBase Accession Number: MIMAT0000444

Sequência (Mature miRNA): CAUUAUUACUUUUGGUACGCG

- RNU6B

Accession Number: NR_002752

Sequência: CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTT

O mix e as amostras foram então plaqueados em triplicata e a reação foi realizada sob condições de tempo e temperatura padrão (7500 Real-Time PCR System - Applied Biosystems). Os valores de quantificação relativa foram calculados da mesma forma citada anteriormente (Item 3.11.2), a qual considerou as amostras referência (cDNA obtido de células não estimuladas) e o controle endógeno RNU6B na fórmula 2^{-ΔΔCt} (BUSTIN et al., 2009).

3.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças observadas em gênero, sintomas e positividade ao TCP foram avaliadas por meio do teste Chi-quadrado (χ^2). Já as diferenças na idade, tamanho médio de pápula e IgE específica foram avaliadas com o Teste Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn, o qual foi utilizado também para examinar todas as possíveis diferenças entre os grupos S-IgE+, S-IgE- e CT.

Para o gráfico da assinatura de citocinas identificamos o maior valor dentro dos grupos em relação à citocina, e então normalizamos os outros valores baseados neste valor. Desta forma a frequência (%) foi calculada baseada nestes dados normalizados. Valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.15 Procedimentos de biossegurança

A conduta pessoal adequada dentro de ambientes laboratoriais, foi posta em prática de forma a realizar todos os procedimentos de acordo com as normas exigidas para o manuseio de amostras biológicas fazendo o uso dos equipamentos de segurança individual e coletivo compatíveis (MINEO et al., 2005).

4. Resultados

4.1 Caracterização demográfica e clínica dos pacientes

Os oitenta e dois indivíduos selecionados para comporem o estudo que se enquadram nos critérios éticos e seletivos definidos em Material e Métodos (Item 3.1), foram distribuídos nos grupos rinite com sintomatologia e presença de (S-IgE+), rinite com sintomatologia e ausência de IgE (S-IgE-) e indivíduos controle (CT) segundo histórico clínico de sintomas quando expostos a ácaros da poeira domiciliar, TCP e IgE sérica específica. As características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos no estudo estão demonstradas na Tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos no estudo.

Parâmetro	Características demográficas			Valor de P
	S-IgE+	S-IgE-	CT	
N	32	19	31	
Gênero (%)				<0.0001 ^a
Homem	41	16	39	
Mulher	59	84	61	
Idade (intervalo)	24 (21-34)	41 (18-56)	25 (18-58)	Todos S-IgE+ X S-IgE- S-IgE+ X CT S-IgE- X CT
				<0.05 ^b <0.05 ^b ns <0.05 ^b
Características clínicas				
Parâmetro	S-IgE+	S-IgE-	CT	Valor de P
Sintomas ^c (%)	100	100	0	<0.0001 ^a
TCP (%)	100	0	0	<0.0001 ^a
Pápula (mediana, mm)	6	0	0	Todos S-IgE+ X S-IgE- S-IgE+ X CT S-IgE- X CT
				<0.0001 ^b <0.0001 ^b <0.0001 ^b ns ^b
IgE específica (IE)	2.8	0.7	0.9	Todos S-IgE+ X S-IgE- S-IgE+ X CT S-IgE- X CT
				<0.0001 ^b <0.0001 ^b <0.0001 ^b ns ^b

^aTeste Chi-quadrado;

^bKruskal-Wallis com Teste de Comparação múltipla de Dunn;

^cSintomas definido como qualquer manifestação clínica clássica de rinite quando exposto a ácaros da poeira domiciliar tais como espirros em salva, coriza, prurido nasal, obstrução nasal;

TCP, teste cutâneo de puntura; Dp, *Dermatophagoides pteronyssinus*; S-IgE+, rinite com sintomatologia e presença de IgE; S-IgE-, rinite com sintomatologia e ausência de IgE; CT, indivíduo saudável; ns, não significativo.

Podemos observar que pacientes do sexo feminino foram mais frequentes nos três grupos ($P < 0,0001$), com média de idade maior no grupo S-IgE- quando

comparado aos dois outros grupos ($P < 0,05$). A positividade do TCP, bem como a média de pápula foi maior e estatisticamente significante ($P < 0,0001$) no grupo S-IgE+ quando comparados aos grupos S-IgE- e CT, da mesma forma para a soropositividade de IgE específica para Dp, que apresentou valores significantes (mediana 2,8; $P < 0,0001$) comparado aos valores do grupo S-IgE- (mediana 0,7) e CT (mediana 0,9).

Em relação aos sintomas, houve diferença estatisticamente significante entre os grupos S-IgE+ e CT ($P < 0,0001$), bem como entre os grupos S-IgE- e CT ($P < 0,0001$), sendo esta análise baseada na presença de sintomas de rinite alérgica como espirros em salva, coriza, prurido nasal, obstrução nasal quando expostos a ácaros da poeira domiciliar ou na ausência dos mesmos.

4.2 Quantificação dos alérgenos

O extrato bruto de Dp foi analisado quanto à dosagem protéica, e também foi feita a quantificação dos dois principais grupos (Der p 1 e Der p 2) de alérgenos presentes no ácaro responsáveis pela sensibilização dos indivíduos. A dosagem protéica do extrato foi de 3 mg/mL. Já os alérgenos Der p 1, uma cisteína protease com peso molecular de 24 kDa (www.allergen.org) foi de 152 ng/mL, e Der p 2 da família da NPC2 (Niemann-Pick C2) que apresenta peso molecular de 15 kDa (www.allergen.org) foi de 127 ng/mL.

4.3 Níveis de IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e IgA ao extrato de Dp

No presente estudo foi investigado os níveis de IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e IgA específicos a Dp pelo imunoensaio ELISA nos grupos S-IgE+, S-IgE- e CT (Fig. 4 e 5). Os níveis e a soropositividade de IgE ao extrato de Dp foram significativamente maiores ($P < 0,0001$) no grupo S-IgE+ (mediana IE = 2,8; 100%) do que nos grupos S-IgE- (mediana IE = 0,7; 0%) e CT (mediana IE = 0,9; 0%) como mostrado na Figura 4A. Resultados similares foram encontrados para IgG4, para esta subclasse de IgG tanto os níveis do anticorpo quanto a soropositividade também foram maiores ($P < 0,0001$) nos indivíduos do grupo S-IgE+ (mediana IE = 1,3; 53%), quando comparados

aos outros grupos (S-IgE- mediana IE= 0,4; 16%; CT mediana IE = 0,6; 6%) ilustrado na Figura 4B. A dosagem do anticorpo IgG3 (Fig. 4C) demonstrou níveis significantemente maiores ($P < 0,05$) somente entre os grupos S-IgE+ (mediana IE = 1,8; 69%) e CT (mediana IE = 1,2; 52%). Já os níveis de IgG1 e IgA específicos a Dp não mostraram diferenças significantes entre os grupos. O anticorpo da subclasse I da IgG apresentou níveis medianos maiores que o valor estabelecido para o *cut off*, com soropositividade alta para todos os grupos (S-IgE+ mediana IE = 1,8; 72%, S-IgE- mediana IE = 1,9; 74%, CT mediana IE = 2,2; 68%) como mostrado na Figura 5A. A mensuração dos níveis de IgA revelou níveis médios bem elevados em todos os grupos assim como a soropositividade (S-IgE+ mediana IE = 5,4; 97%, S-IgE- mediana IE = 5,3; 100%, CT mediana IE = 5,1; 94%) ilustrado na Figura 5B.

As correlações entre os níveis de anticorpos específicos a Dp dentro dos grupos foram realizadas com o teste de correlação de Spearman. Nesta análise encontramos valores de correlação com significância ($P < 0,05$) nos três grupos (Fig. 6). No grupo S-IgE+ foi encontrada correlação ($r = 0,489; P < 0,05$) entre os índices de IgE e IgG4 (Fig. 6A). No grupo de indivíduos S-IgE- foram encontradas correlações entre os níveis de IgE e IgA ($r = 0,613 ; P < 0,05$) como mostrado na Figura 6B, e IgG1 e IgG4 ($r = 0,651; P < 0,05$) representados na Figura 6C. Nos indivíduos controle (CT), demonstramos correlação negativa entre IgE e IgG3 ($r = -0,501; P < 0,05$; Fig. 6D).

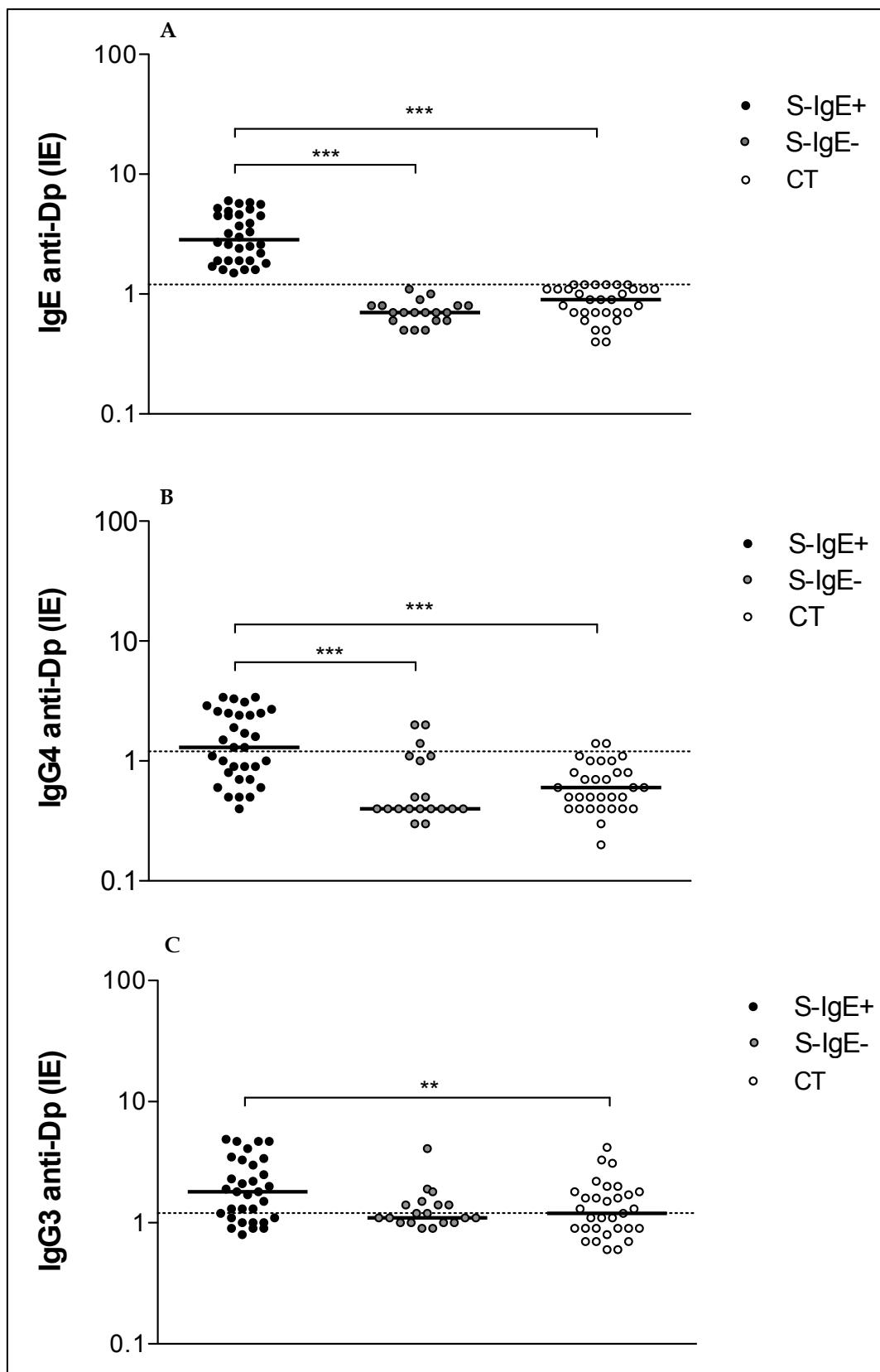


Figura 4. Níveis de anticorpos IgE, IgG4 e IgG3 específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) expressos em índice ELISA (IE) em soros dos pacientes do grupo S-IgE+ ($n = 32$), pacientes do grupo S-IgE- ($n = 19$) e indivíduos controle ($n = 31$). (A) IgE; (B) IgG4; (C) IgG3. As medianas são indicadas por barras horizontais e o limiar de positividade (cut off) está representado pela linha tracejada (IE = 1,2). *** $P < 0,0001$, ** $P < 0,05$ determinado pelo teste Kruskall-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

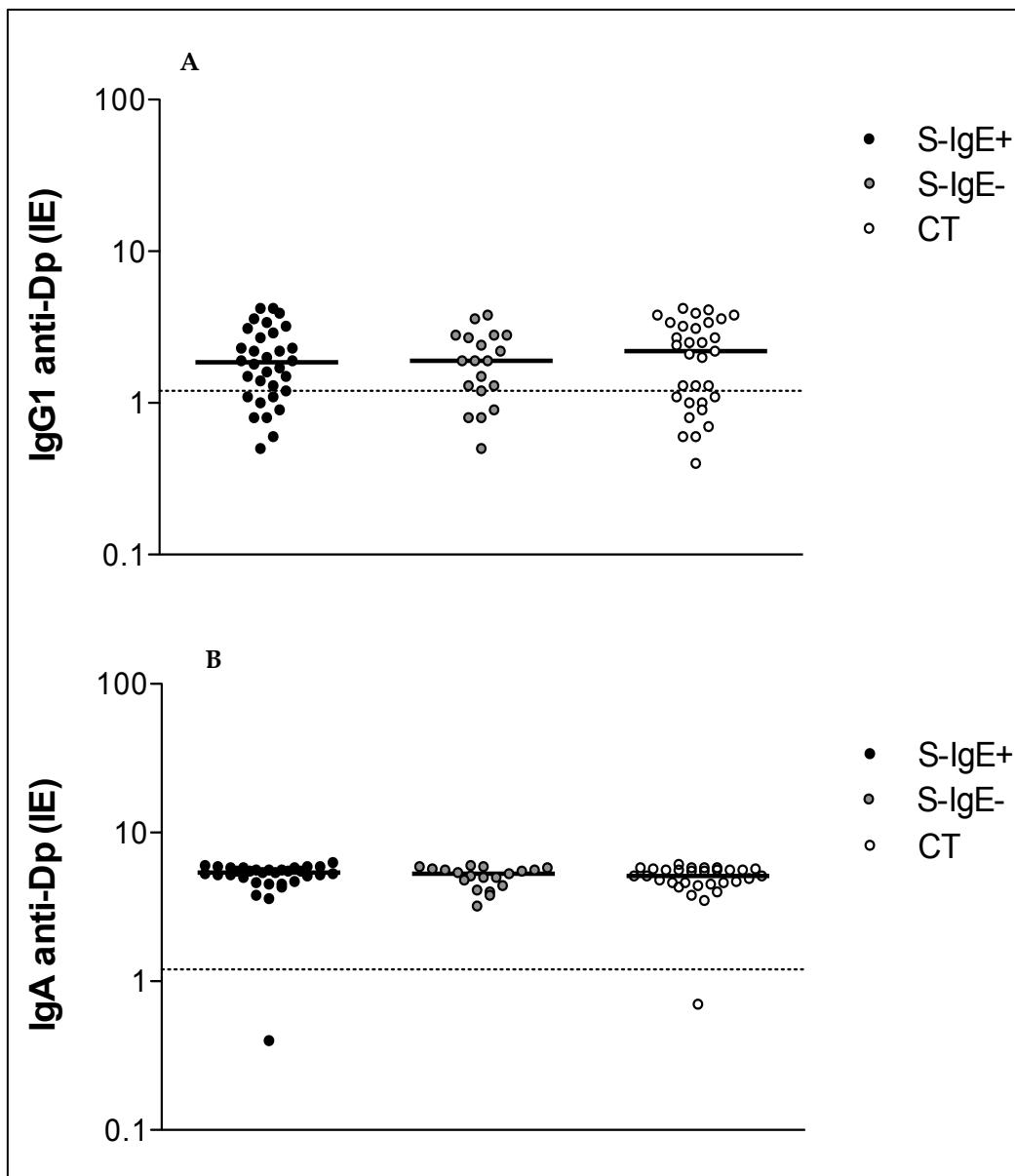


Figura 5. Níveis de anticorpos IgG1 e IgA específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) expressos em índice ELISA (IE) em soros dos pacientes do grupo S-IgE+ ($n = 32$), pacientes do grupo S-IgE- ($n = 19$) e indivíduos controle ($n = 31$). (A) IgG1 e (B) IgA. As medianas são indicadas por barras horizontais e o limiar de positividade (*cut off*) está representado pela linha tracejada (IE = 1,2). *** $P < 0,0001$, ** $P < 0,05$ determinado pelo teste Kruskall-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

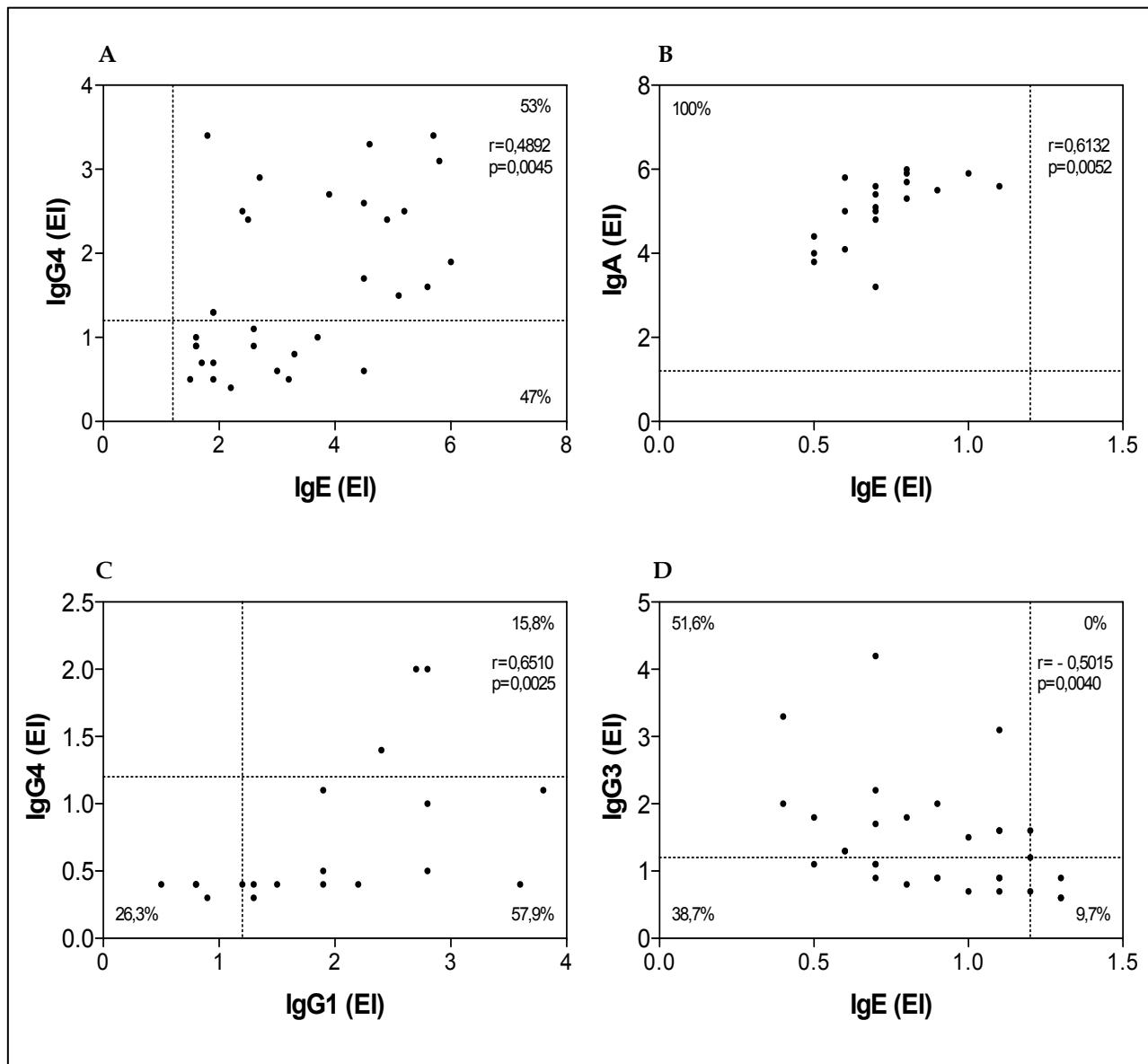


Figura 6. Correlação entre os níveis de IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e IgA específicos a Dp mensurados por ELISA no soro dos pacientes do grupo S-IgE+ (n=32), S-IgE- (n=19) e indivíduos controle CT (n=31). (A) IgE X IgG4 (S-IgE+); (B) IgE X IgA (S-IgE-); (C) IgG1 X IgG4 (S-IgE-) e (D) IgE x IgG3 (CT). As linhas tracejadas indicam os valores de cut off (IE = 1,2) determinantes da positividade no ELISA. As porcentagens (%) de duplo-positivo, duplo-negativo ou positivo a apenas um dos anticorpos estão indicadas nos respectivos quadrantes dos gráficos. O coeficiente de correlação (r) foi calculado por meio do teste de correlação de Spearman; $P < 0,05$.

4.4 Perfil de citocinas no sobrenadante de cultura e soro

Para melhor compreendermos os mecanismos envolvidos na sintomatologia dos pacientes do grupo S-IgE- mensuramos citocinas do perfil Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), Th17 (IL-17) e Treg (IL-10) tanto no sobrenadante de cultura de PBMCs sob diferentes estímulos (PHA e Dp) e meio (*baseline*) como ilustrado na Figura 7, quanto em amostras de soro dos mesmos indivíduos testados na cultura de células (Fig. 9). Nossos resultados para as dosagens no sobrenadante de cultura demonstraram não haver diferença entre os grupos para IL-4, mesmo sob o estímulo PHA (Fig. 7A). Entretanto, foi encontrado níveis significantemente maiores para IL-5 sob o estímulo Dp no grupo S-IgE+ (mediana 31, $P < 0,05$) quando comparado aos grupos S-IgE- (mediana 17) e CT (mediana 17), assim como em relação ao *baseline* (Fig. 7B). Baixos níveis de IL-10 foram observados sob o estímulo Dp em todos os grupos quando comparados ao meio, sendo que não foi observada significância nestes níveis, já sob o estímulo do mitógeno foram encontrados índices elevados para IL-10 ($P < 0,0001$) em todos os grupos quando comparados ao controle (Fig. 7C). A citocina IL-13 apresentou valores aumentados nos grupos somente quando as PBMCs foram estimuladas com PHA, particularmente os grupos S-IgE+ e CT, contudo quando o estímulo utilizado foi o Dp, não foi observada nenhuma diferença quando os valores foram comparados ao meio (Fig. 7D). Na dosagem de IL-17, foi notado valores estatisticamente significantes apenas quando utilizamos o mitógeno nos grupos S-IgE+ e S-IgE- ($P < 0,05$), mas não foi encontrada diferença no grupo CT quando estimulado com PHA e nem entre os grupos sob o estímulo Dp (Fig. 7E). Por fim, na dosagem de IFN- γ , os níveis foram mais elevados sob o estímulo PHA ($P < 0,0001$), diferente do estímulo Dp que apresentou níveis similares ao *baseline* (Fig. 7F).

As assinaturas das citocinas foram comparadas para caracterizar o padrão das citocinas secretadas para cada grupo (PINHEIRO et al., 2013). Brevemente, a análise comparativa da assinatura das citocinas secretadas por PBMCs foi feita com o valor da mediana global para cada citocina levando em consideração os dados de todos os grupos. A frequência ascendente das citocinas secretadas pelos indivíduos dos

grupos S-IgE+, S-IgE- e CT foi determinada, e valores acima de 50% foram considerados relevantes (Fig. 8).

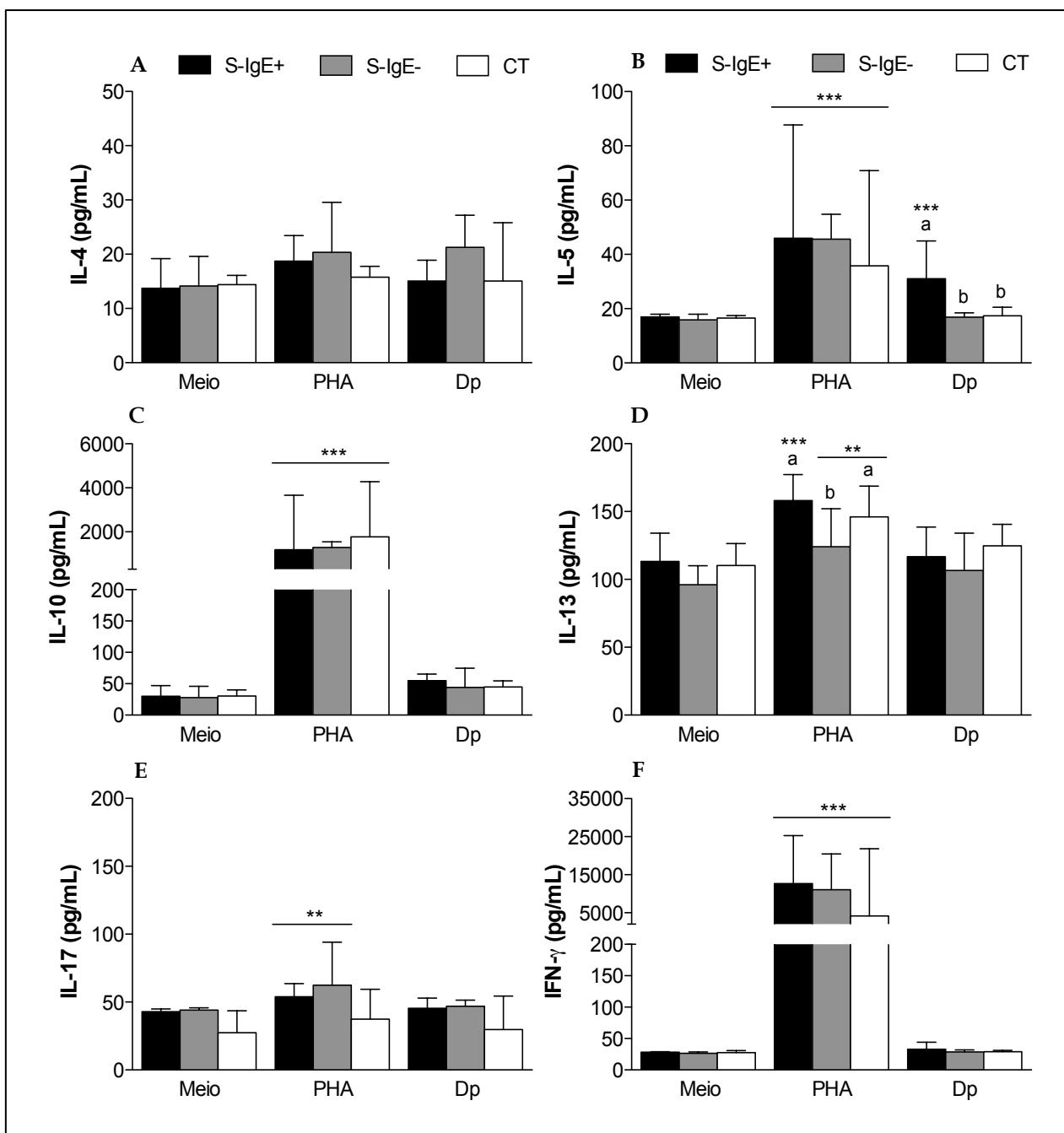


Figura 7. Níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMCs de 36 indivíduos distribuídos em três grupos (S-IgE+ = 15, S-IgE- = 11 e CT = 10). Células foram estimuladas com PHA (5 μ g/mL), Dp (10 μ g/mL) e somente meio (*baseline*) por 4 dias. (A) IL-4; (B) IL-5; (C) IL-10; (D) IL-13; (E) IL-17; (F) IFN- γ . Os dados estão expressos em picogramas/mL obtidos para cada paciente e representados como mediana (barras representam mediana com intervalo interquartil). Letras diferentes (a, b) indicam diferença significante entre os grupos para cada estímulo e valores de *** $P < 0,0001$; ** $P < 0,05$ indicam níveis de significância em relação ao meio (*baseline*) para cada grupo de pacientes, dados estes determinados pelo teste Kruskall-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

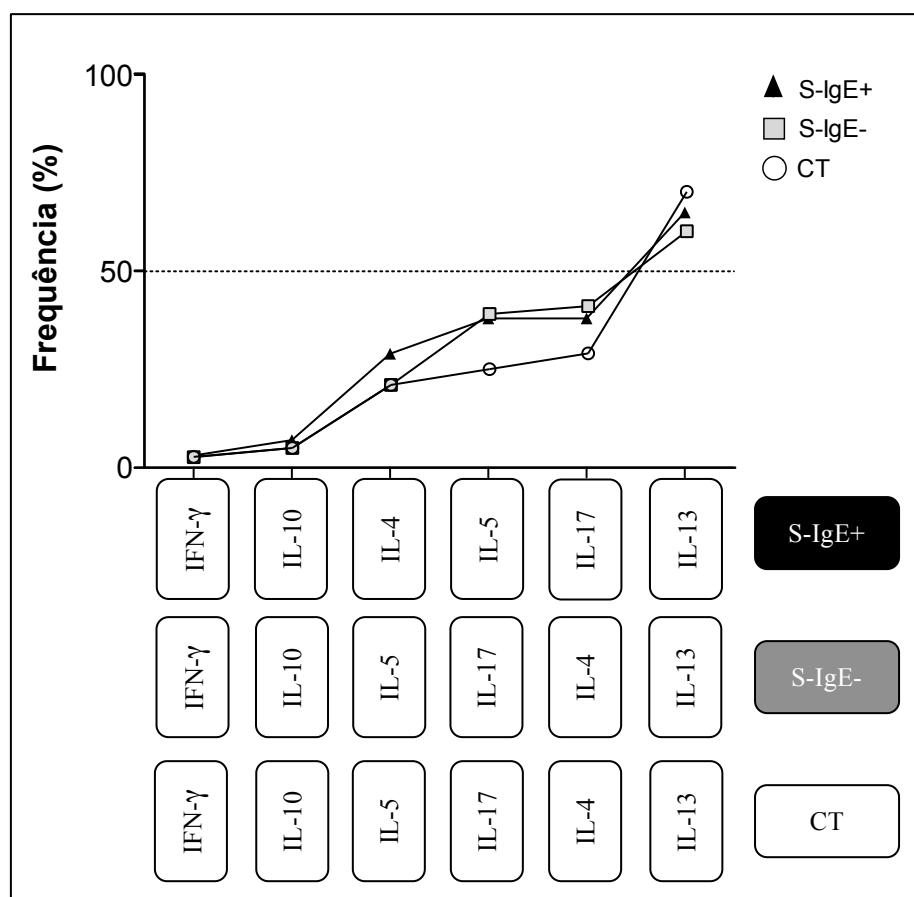


Figura 8. Frequência (%) das citocinas no sobrenadante de cultura de PBMCs sob estímulo de Dp de 36 indivíduos distribuídos em três grupos (S-IgE+ = 15; S-IgE- = 11; CT = 10). Os valores medianos das frequências foram plotados em ordem crescente de forma a demonstrar a predominância das citocinas nos diferentes grupos.

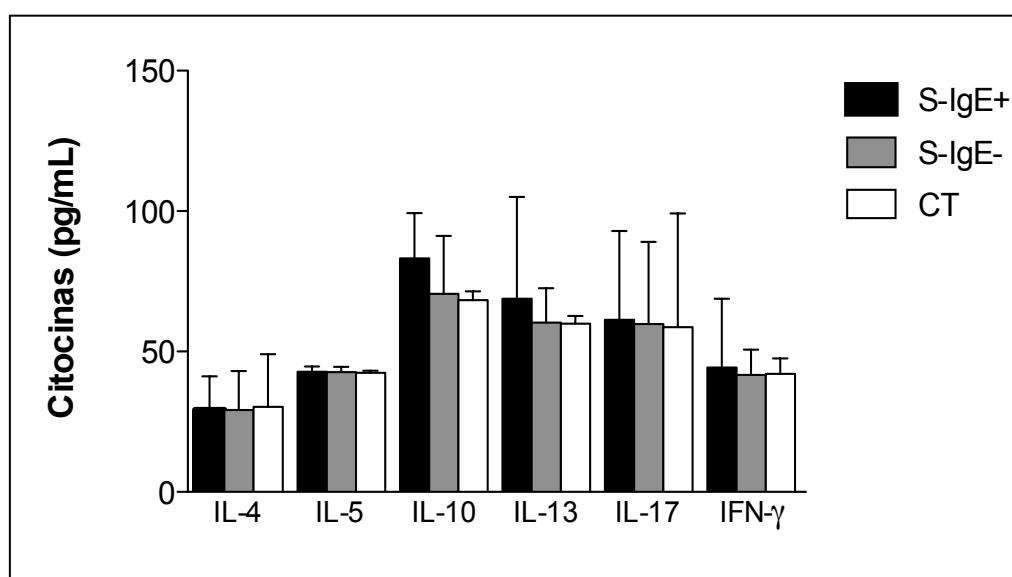
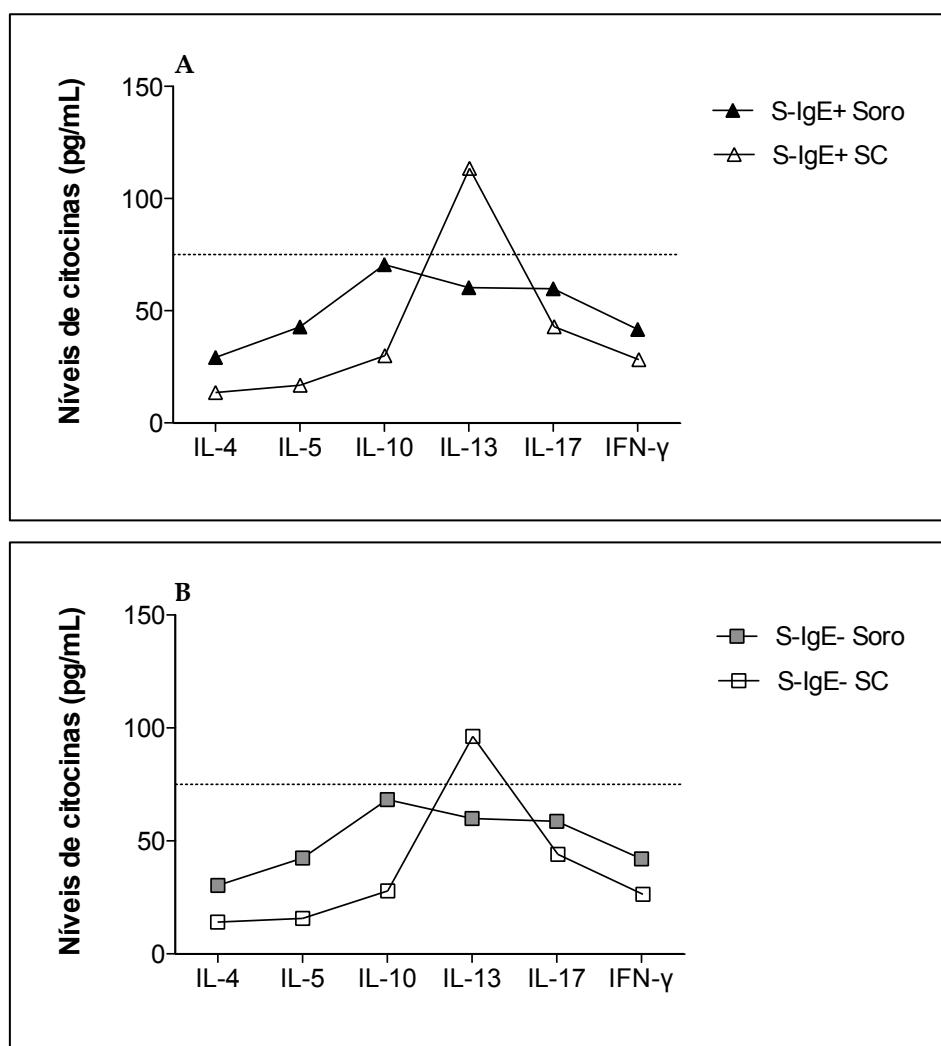


Figura 9. Níveis de citocinas no soro de 36 indivíduos distribuídos em três grupos (S-IgE+ = 15, S-IgE- = 11 e CT = 10). Os dados das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ estão expressos em picogramas/mL obtidos para cada paciente e representados como mediana (barras representam mediana com intervalo interquartil). Os dados foram determinados pelo teste Kruskall-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Os níveis de citocinas presentes no soro foram dosados de forma pareada às amostras da cultura celular. Foi demonstrado níveis baixos e similares entre os grupos, sendo que estes valores não demonstraram diferença estatisticamente significante para nenhuma citocina mensurada (Fig. 9).

A análise comparativa foi realizada entre os valores medianos dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMCs (sem estímulo) e soro dos indivíduos dos três grupos (Fig. 10). Foi possível constatar que os níveis das citocinas presentes no soro tiveram tendência a serem mais elevados do que os níveis presentes no sobrenadante de cultura de PBMCs nos grupos S-IgE+ (Fig. 10A), S-IgE- (Fig. 10B) e CT (Fig. 10C), com exceção da citocina IL-13 que apresentou tendência a ter o nível mais elevado no meio (S-IgE+ mediana = 113; S-IgE- mediana = 96 e CT mediana = 110) do que no soro (S-IgE+ mediana = 60; S-IgE- mediana = 60 e CT mediana = 69).



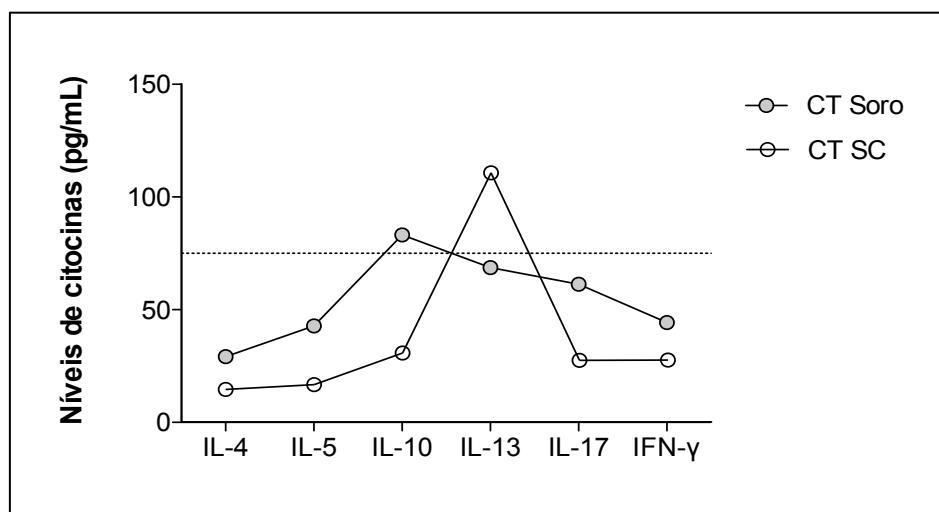


Figura 10. Níveis de citocinas no soro e no sobrenadante de cultura (SC) de 36 indivíduos distribuídos em três grupos (A) S-IgE+ = 15, (B) S-IgE- = 11 e (C) CT = 10. Os dados das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ estão expressos em picogramas/mL obtidos para cada paciente e representados como mediana. Os valores medianos dos níveis de citocinas no soro e meio foram interpolados para comparação da secreção das citocinas pelas células e dos níveis presentes no soro.

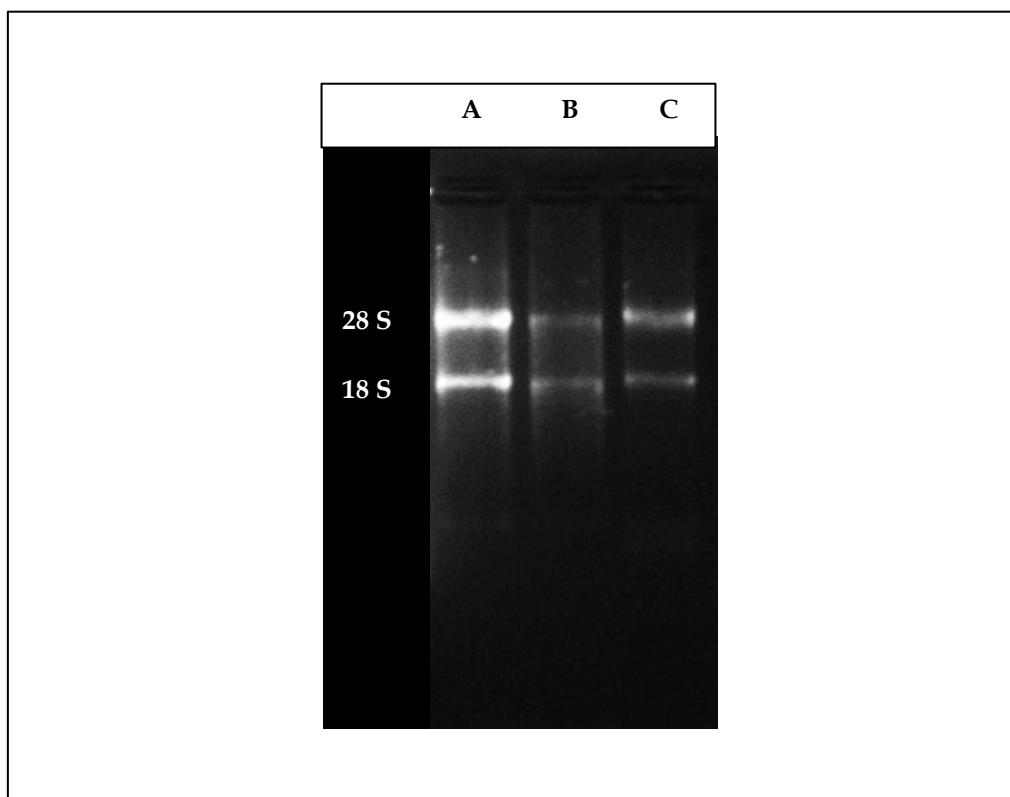
4.5 Análise quantitativa e qualitativa do RNA

O RNA extraído foi avaliado quantitativamente em relação à concentração, a qual apresentou valores entre 50 e 231 ng/ μ L, e também por meio da razão (260/280 nm), com valores entre 1,8 e 2,0 o que indica RNA de qualidade (Tabela 4).

Após a dosagem quantitativa do RNA, avaliamos também a qualidade do mesmo por meio da eletroforese em gel de agarose 1%, e desta forma validamos de maneira qualitativa os dados quantitativos obtidos. Na Figura 11 está presente as amostras representativas dos grupos S-IgE+ (Fig. 11A), S-IgE- (Fig. 11B) e CT (Fig. 11C) com a marcação das duas subunidades ribossomais, bandas mais intensas são observadas na coluna A uma vez que foi carregado no gel volume de 2 μ L, sendo que as concentrações são variáveis entre as amostras, e as mesmas não foram normalizadas previamente.

Tabela 4. Concentração de RNA extraído das amostras dos grupos S-IgE+ (n = 7), S-IgE- (n = 7) e CT (n = 7) obtidas de cultura de PBMCs sob estímulo Dp; e de amostras obtidas de cultura sem estímulo (controle) dos grupos S-IgE+ (n = 7), S-IgE- (n = 7) e CT (n = 7) por 4 dias a 37°C e 5% de CO₂.

Grupos	Amostras	[] ng/µL	Razão 260/280 nm
S-IgE+ (Dp)	1	54	1,9
	2	61	1,9
	3	150	2,0
	4	203	2,0
	5	155	2,0
	6	123	2,0
	7	180	2,0
S-IgE+ (Meio)	8	50	1,9
	9	88	1,9
	10	100	2,0
	11	155	2,0
	12	122	1,9
	13	147	2,0
	14	118	2,0
S-IgE- (Dp)	15	231	2,0
	16	91	2,0
	17	112	2,0
	18	99	2,0
	19	92	2,0
	20	143	2,0
	21	171	2,0
S-IgE- (Meio)	22	173	1,9
	23	157	2,0
	24	103	1,9
	25	89	2,0
	26	73	1,9
	27	113	2,0
	28	99	1,9
CT (Dp)	29	57	1,9
	30	61	1,8
	31	73	1,8
	32	126	2,0
	33	123	1,9
	34	135	2,0
	35	109	1,9
CT (Meio)	36	50	1,9
	37	45	1,9
	38	52	2,0
	39	93	2,0
	40	96	1,9
	41	70	1,9
	42	89	2,0

**Figura**

11. Avaliação da integridade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose a 1%.

As amostras representativas de cada grupo (A) S-IgE+, (B) S-IgE- e (C) CT obtidas de células de cultura sob estímulo Dp, foram carregadas no gel e submetidas à corrida eletroforética a 100 V por 50 min, ao final a imagem do gel foi digitalizada e demonstrou a presença das subunidades ribossomais 18S e 28S.

4.6 RT-qPCR para citocinas

Com a finalidade de analisarmos a quantificação relativa (RQ) das citocinas do perfil Th2 (IL-5), Th1 (IFN- γ) e Treg (TGF- β), realizamos a RT-qPCR com o intuito de detectarmos diferenças entre os grupos (Fig. 12). Assim, demonstramos que os níveis de expressão relativa da citocina IL-5 apresentou valores significativamente maiores ($P < 0,05$) no grupo S-IgE+ (mediana 14,7) tanto em relação ao grupo S-IgE- (mediana 3,0) quanto em relação ao grupo CT (mediana 1,6) representados na Figura 12A. Em relação à expressão da citocina IFN- γ , notamos que a significância na expressão ocorreu somente entre os grupos S-IgE+ e CT (Fig. 12B). Já a quantificação relativa de TGF- β representada na Figura 12C, nos mostra a significância ($P < 0,05$) no valor do grupo S-IgE- quando comparado aos grupos S-IgE+ e CT.

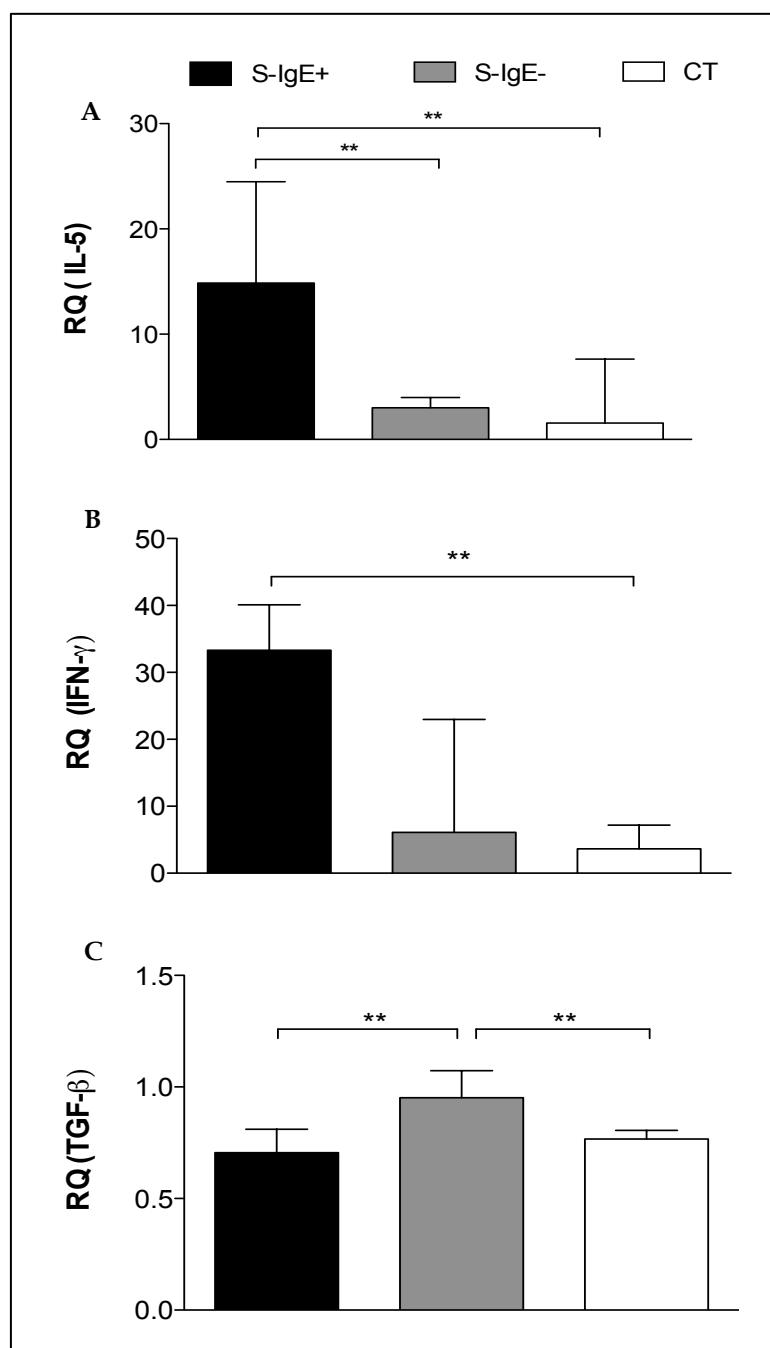


Figura 12. Níveis de expressão relativa das citocinas Th2 (IL-5), Th1 (IFN- γ) e Treg (TGF- β) em amostras extraídas de células da cultura de PBMCs sob estímulo de Dp dos três grupos (S-IgE+ n = 3, S-IgE- n = 3 e CT n = 3). Os dados foram determinados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como amostra referência o cDNA de células não estimuladas, e como controle endógeno actina. Os dados foram determinados pelo teste Mann-Whitney One-tailed, ** P < 0,05.

4.7 RT-qPCR para miRNAs

Observado a predição de vários possíveis alvos dos miRNAs (21 e 126) ligados à resposta imune alérgica, analisamos a expressão relativas dos miRNAs com objetivo de detectar possíveis diferenças na RQ dos grupos. Com a utilização da metodologia PCR em tempo real, foi possível analisar a quantificação relativa dos miRNAs 21 e 126, de forma que obtivéssemos os valores dos diferentes grupos. Nas amostras analisadas, não foi possível encontrarmos diferença significativa nos níveis de expressão do miR-21 e do miR-126 entre os grupos.

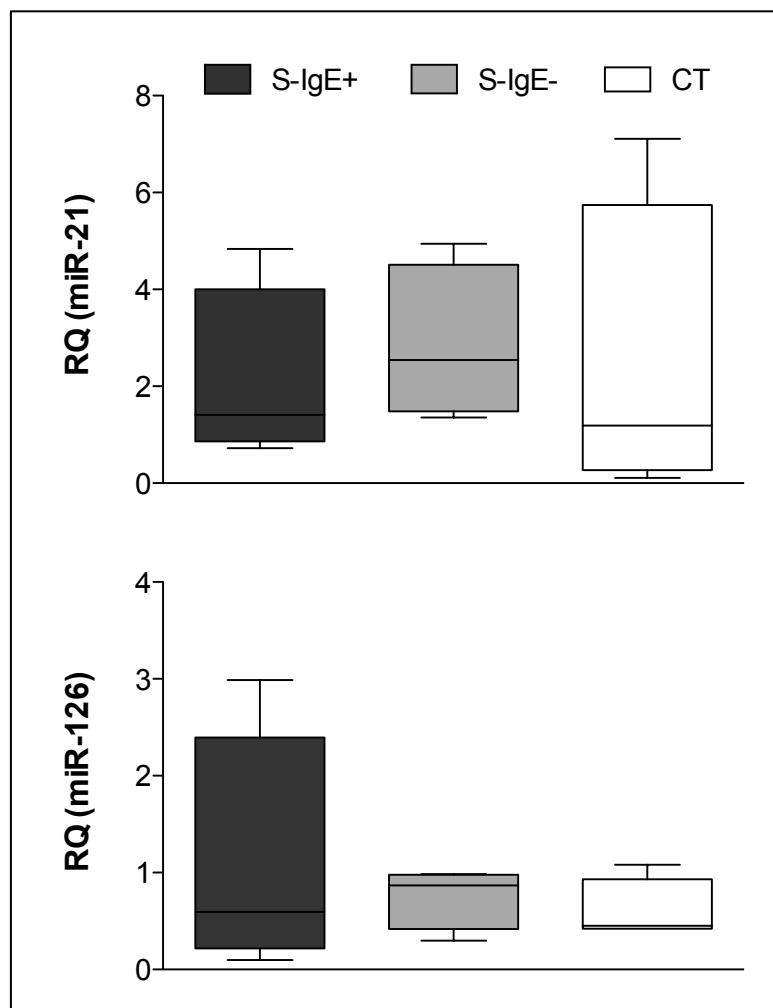


Figura 13. Quantificação relativa do miRNA-21 e miRNA-126 por RT-qPCR. Amostras dos grupos (S-IgE+ (n=4), S-IgE- (n=4) e CT (n=4) obtidas de células de cultura de PBMCs sob estímulo Dp, foram normalizadas (com as respectivas amostras referência que foram células obtidas de cultura sem estímulo), e o gene endógeno RNU6B . Os dados foram determinados pelo teste Mann-Whitney One-tailed.

5. Discussão

No presente estudo, investigamos as respostas imunológicas de pacientes dos grupos S-IgE+, S-IgE- e CT por meio da quantificação de anticorpos específicos (IgE, IgG1, IgG3, IgG4 e IgA), dos níveis de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), Th17 (IL-17) e Treg (IL-10), da expressão relativa do RNAm de citocinas (IFN- γ , IL-5 e TGF- β) e de miRNAs (21 e 126) em PBMCs estimulados com extrato bruto de *D. pteronyssinus*.

Os dados demográficos demonstraram diferença na média de idade dos grupos de pacientes S-IgE+ e CT, sendo os valores de ambos significativamente menores em relação aos pacientes S-IgE- (24 vs 41; 25 vs 41) com predominância do gênero feminino nos três grupos, o que foi também encontrado em trabalhos similares (DI LORENZO et al., 2011). Estudos demonstram que os sintomas da rinite podem ser agravados em resposta ao esforço das mulheres na realização de múltiplas tarefas, diante disto as queixas somáticas relatadas podem ser compatíveis com o seu papel multifuncional. Outro fator relevante é a maior suscetibilidade das mulheres a aspectos sociais dos sintomas da rinite, que interferem na rotina e assim a maior rapidez na tomada de ações no sentido de prevenir ou aliviar os sintomas (RYDEN; ANDERSSON; ANDERSSON, 2004).

A prevalência dos sintomas no trato respiratório superior apresentou valores significativamente maiores em pacientes do grupos S-IgE+ e S-IgE- comparados ao grupo CT, isto pode ser explicado pois a resposta clássica Th2 já bem caracterizada em pacientes S-IgE+ acarreta a indução da produção do anticorpo IgE por meio da exposição à alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, tornando-se um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias em indivíduos com predisposição genética, particularmente rinite e asma (BARNES; MARSH, 1998a). Entretanto, apesar dos pacientes S-IgE- exibirem sintomas respiratórios crônicos particularmente clássicos da rinite como espirros em salva, coriza, prurido nasal e obstrução nasal similares aos indivíduos do grupo S-IgE+, há ainda o questionamento do agente causal e da ausência de IgE específica com relevância clínica a aeroalérgenos, valores estes mensurados por meio de métodos de diagnóstico convencionais como TCP e testes sorológicos (LIEBERMAN; PATTANAIAK, 2014; RONDON et al., 2007). Portanto, é de grande importância

investigarmos outros mecanismos envolvidos na patogênese dos pacientes S-IgE-, além do mecanismos clássicos que estão presentes na resposta do perfil Th2.

Os dados obtidos do TCP em relação aos grupos S-IgE+, S-IgE- e CT indicaram medianas significativamente maiores das pápulas em pacientes pertencentes ao grupo S-IgE+ quando comparadas às dos grupos S-IgE- ou CT, contudo não houve diferença entre os grupos S-IgE- e CT. Estudos prévios mostraram que apesar de pacientes S-IgE- apresentarem testes cutâneos negativos e níveis de IgE total e específica baixos ou não detectáveis, eles podem desenvolver sintomas nasais em testes de provação nasal utilizando vários alérgenos, incluindo ácaros da poeira domiciliar (CARNEY et al., 2002; RONDON et al., 2007; SIN; TOGIAS, 2011). No entanto, a relevância dos alérgenos de Dp no desencadeamento destas respostas imunológicas, do possível envolvimento na produção de outras classes de anticorpos além de IgE, na produção e liberação de citocinas e regulação da expressão de miRNAs, ainda não está bem estabelecida nos pacientes S-IgE-.

Adicionalmente, foi realizada a avaliação da soropositividade a alérgenos de Dp pelo imunoensaio ELISA, o qual revelou níveis significantemente maiores de anticorpos IgE e IgG4 Dp-específicos em pacientes S-IgE+ comparados aos pacientes S-IgE- ou CT. Isto pode ser corroborado pela bem caracterizada resposta do tipo Th2 que desencadeia a produção tanto de anticorpos IgE quanto de anticorpos IgG especialmente IgG4, sendo que estudos já mencionaram a associação na produção de IgE e IgG na resposta imune atópica, especialmente no caso de alérgenos de ácaros e polens (AALBERSE, 2000). A análise do anticorpo da subclasse IgG3 demonstrou índices maiores com significância estatística no grupo S-IgE+ apenas quando comparado ao grupo CT, já a subclasse IgG1 apresentou alta soropositividade nos três grupos, com altos níveis de anticorpos. Estudo prévio realizado com o objetivo de elucidar o papel diferencial da IgG1 e IgG3 por meio dos receptores Fc γ R (Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII), demonstrou que estas subclasses sem ligam com maior avidez a estes receptores, e esta ligação promove diferentes respostas imunológicas, uma vez que estão presentes principalmente em células como macrófagos, granulócitos, monócitos, células B e NK e em algumas células T, desencadeando assim respostas como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e o *clearance*,

contribuindo assim para elaborar a resposta imune e neutralizar os diferentes抗ígenos (ROZSNYAY et al., 1989).

Os anticorpos IgA foram também dosados nos três grupos e os níveis encontrados foram altos em todos eles, não demonstrando diferença estatística significante. A imunoglobulina IgA, principalmente a secretora tem mostrado papel na mediação da desgranulação de eosinófilos *in vitro*, além disto o aumento da expressão dos receptores de IgA nos eosinófilos em indivíduos alérgicos tem sido relatado, sendo corroborado por estudos que apontam o papel da IgG ou IgA na inflamação das vias aéreas de asmáticos via eosinófilos (MONTEIRO et al., 1993). Contrário a isto, estudos demonstram que a presença de IgA específica a Dp no soro de pacientes com rinite alérgica pode estar relacionada a mecanismos imunoreguladores que agem na ativação de células T reguladoras (Treg) produtoras de TGF- β de forma a reduzir as reações alérgicas (JUTEL et al., 2003), o que vai ao encontro com nossos achados, que demonstraram altos níveis de IgA em todos os grupos estudados, revelando a importância da resposta imune de mucosa aos aeroalérgenos, a qual leva à produção de IgA secretória mesmo em indivíduos saudáveis, assim como em pacientes do grupo S-IgE-. Assim, esses dados reforçam que alérgenos de ácaros da poeira domiciliar inalados estimulam respostas imunes mediadas por IgE em pacientes alérgicos, mas podem também induzir a proliferação de células T e citocinas Th1/Th2 mesmo na ausência de sintomas, uma vez que indivíduos saudáveis são capazes de produzir anticorpos IgG alérgeno-específicos, mas não anticorpos IgE (HALES et al., 2006).

Estudos têm mostrado que a inflamação da mucosa nasal com um fenótipo leucócito-linfócito em pacientes com rinite alérgica persistente apresentou similaridades com pacientes com rinite não alérgica persistente, que demonstraram presença de IgE nasal específica e teste de provação nasal positivo utilizando alérgenos de Dp. Este fato levanta a hipótese de uma nova forma de manifestação alérgica localizada na ausência de atopía sistêmica (RONDON et al., 2007), já que é bem conhecido que IgE específica é uma importante classe de imunoglobulina na mucosa nasal para induzir inflamação alérgica e aparenta também ser produzida localmente (NAKAJIMA; GILLESPIE; GLEICH, 1975).

A comparação realizada entre todas as classes de anticorpos dentro dos

grupos, revelou quatro correlações com valores significativos. No grupo S-IgE+ foi observada a correlação positiva entre IgE e IgG4, a qual pode ser explicada pela resposta via Th2 que regula a produção de ambos os anticorpos via produção de IL-4, IL-13 e IL-10 (BLOEMEN et al., 2007), sendo que tem sido demonstrado para a IgG4 um papel anti-inflamatório importante, com a capacidade de neutralizar as atividades biológicas do anticorpo IgE (DE BOER; KRUIZE; YAZDANBAKHSH, 1998). No grupo S-IgE- foi demonstrada correlação entre os níveis de IgE e IgA, além de IgG1 com IgG4. Isto sugere que anticorpos como IgA e IgG1, que apresentam maiores índices podem estar envolvidos na resposta neste grupo, pois apesar da correlação positiva em ambas as análises o aumento de uma classe de anticorpo não representa aumento com a mesma relevância na outra classe, apesar de ambos aumentarem juntos por apresentarem correlação positiva, e desta forma foi encontrado baixos índices de anticorpos desencadeados pelo perfil Th2, como IgE e IgG4 no grupo S-IgE-. Para o grupo de indivíduos do grupo CT foi encontrada correlação negativa entre IgE e IgG3, tendo a imunoglobulina IgG3 papel importante em normalizar a resposta imune (ROZSNYAY et al., 1989).

A resposta alérgica é caracterizada pelo envolvimento de anticorpos, citocinas, quimiocinas dentre outros fatores necessários no intrincado arranjo da resposta imune com envolvimento também do componente celular. Desta forma, além do envolvimento de anticorpos na resposta alérgica também temos as citocinas com destaque para as pertencentes ao perfil Th2 como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33 e linfopoietina estromal tímica (WYNN, 2015). Contudo, outros tipos de resposta como Th1, caracterizada principalmente pela produção de IL-1, IFN- γ e IL-12; Th17, perfil este promovido especialmente pela produção de IL-17 e IL-22 e Treg (TGF- β e IL-10) podem também estar envolvidos na modulação da resposta imune alérgica seja para estimular ou inibir a resposta do perfil Th2 (BHAKTA; ERLE, 2014; MAGGI, 1998; MANTEL et al., 2007). Neste contexto, avaliamos os níveis de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ no sobrenadante de cultura de PBMCs estimuladas com alérgenos de Dp e encontramos nível estatisticamente significante de IL-5 no grupo S-IgE+ quando comparado aos grupos S-IgE- e CT. Estes dados podem ser explicados, já que sabemos da relevância da IL-5 no perfil de resposta Th2, e o papel dela em promover

o desenvolvimento e migração de eosinófilos e basófilos, além do envolvimento das outras citocinas características deste perfil como IL-4, IL-9 e IL-13. Desta forma, a ação destas citocinas acarretam os sintomas característicos da reação alérgica, e em especial a IL-5 que age no eosinófilo e estimula a liberação de leucotrienos (LT), proteína básica principal (MBP) e fator ativador de plaquetas (PAF) responsáveis pela sintomatologia crônica da alergia (KAY, 2001).

Em relação às citocinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ dosadas no sobrenadante de cultura sob estímulo de alérgenos de Dp nos três grupos, não detectamos diferença estatística. Estes achados podem ser parcialmente explicados pelo trabalho proposto por Mchugh et al. (1996), no qual foi avaliada a cinética de diferentes citocinas sob estímulos da proteína purificada derivada (PPD), mitógeno (PHA) e ácaro da poeira domiciliar. Neste estudo, foi detectado que das citocinas dosadas em nosso estudo em comum com as testadas por eles, tais como IL-4, IL-5, IFN- γ e IL-10, foi demonstrado que os picos das curvas de secreção sob estímulo do alérgeno de ácaro da poeira domiciliar ficaram entre 72-96 h para IL-4, 132-144 h para IL-5, 192-216 h para IL-10 e 144-180 h para IFN- γ diferente do observado para o mitógeno, que apresentou intervalos bem menores (24-84 h) para o pico de liberação das citocinas. Sendo assim, essa cinética diferenciada da produção de citocinas pode ser explicada, pois a síntese de cada citocina segue um padrão determinado pela sua propriedade funcional. Desta forma, como estabelecemos intervalo de 96 h (4 dias) para a coleta do sobrenadante da cultura de PBMCs sob estímulo de Dp, já que visávamos obter além do sobrenadante, células viáveis para a extração de RNA. Nesse sentido, podemos presumir que citocinas como IL-4 já tinham alcançado a concentração máxima e assim já estavam diminuídas no sobrenadante devido à sua ligação com os receptores e utilização (consumo) pelas células, além do fato da concentração desta citocina em cultura primária ser muito menor quando comparada à IL-5 (TILL et al., 1997). Já IFN- γ e IL-10 com picos de liberação em intervalos de tempo maiores, podem não ter sido detectadas devido a característica das mesmas de possuírem papel de contrabalancear a resposta Th2, sendo assim produzidas e secretadas mais tarde (MCHUGH et al., 1996). Associado a este fator, especialmente para a IL-10, há ainda estudos que apontam que a frequência de

células T reguladoras 1 (Tr1) que secretam IL-10 esteja diminuída em pacientes com rinite alérgica a ácaros da poeira domiciliar. Neste contexto, a detecção do aumento da produção de IL-10 secretada em cultura de PBMCs só foi possível quando pacientes passaram por 1 ano de imunoterapia específica com alérgenos de Dp, quando comparado ao pré-tratamento (HAN et al., 2010). Dados similares ao nosso para o níveis de IFN- γ foi encontrado em trabalho anterior, o qual dosou IFN- γ no sobrenadante de PBMCs de pacientes alérgicos e indivíduos controle, e indicou baixos níveis de IFN- γ tanto para os pacientes alérgicos, quanto para os indivíduos controle (LOU et al., 2012), denotando que não houve desenvolvimento importante de células Th1, apesar de que não haja também formação das células do perfil Th2 no grupo de pacientes S-IgE-.

Os níveis de IL-13 no sobrenadante da cultura de células quando submetida ao estímulo Dp não mostraram significância estatística. É sabido o papel da IL-13 na resposta do tipo Th2 em induzir a hiperreatividade das vias aéreas e inflamação (WONG et al., 2001b). Contudo, em trabalhos anteriores que dosaram IL-13 em pacientes com rinite alérgica e não alérgica, não foi detectada diferença nos níveis de IL-13, mesmo sendo a amostra analisada oriunda da secreção nasal (CIPRANDI et al., 2005; SCAVUZZO et al., 2003). As células Th17 podem ser importantes na patogênese de várias doenças, incluindo doenças alérgicas. Neste estudo, nós avaliamos os níveis de IL-17 no sobrenadante de cultura, e não detectamos diferença nestes níveis nos três grupos analisados, quando utilizado o estímulo Dp. Neste contexto, alguns pesquisadores têm demonstrado que a IL-17 é produzida por células T do sangue periférico depois da estimulação do TCR, mas a quantidade de IL-17 produzida não foi significante entre pacientes alérgicos e indivíduos controle (YAO et al., 1995). Entretanto, outro estudo encontrou níveis significantes de IL-17 em PBMCs estimuladas com extrato de *Dermatophagoides farinae* em pacientes asmáticos atópicos e asmáticos não atópicos, indicando que células T são capazes de produzir IL-17 em pacientes atópicos (HASHIMOTO et al., 2005).

As dosagens de citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ no soro não revelou diferenças significantes. Neste sentido, já foi descrito na literatura que a mensuração das citocinas produzidas naturalmente, por exemplo no soro ou plasma

pode indicar resultados não fidedignos, não revelando assim os níveis reais das respectivas citocinas. Isto porque, devido às intrincadas vias regulatórias e ao pleiotropismo de vários fatores relacionados à regulação das citocinas, a dosagem das mesmas com o intuito de evidenciar alguma diferença em determinada doença, como por exemplo rinite alérgica e rinite não alérgica, pode não ser a maneira mais eficiente de detectarmos diferenças entre nossos grupos S-IgE+, S-IgE- e CT, pois a diferença na produção de determinadas citocinas relacionadas a alguma doença pode não se tornar aparente no soro (TILL et al., 1997).

Os dados da quantificação relativa do RNAm da IL-5 extraído das células sob estímulo de Dp mostraram níveis aumentados nos pacientes do grupo S-IgE+ quando comparados aos grupos S-IgE- e CT, corroborando os dados da dosagem de IL-5 no sobrenadante de cultura sob estímulo de alérgenos de Dp. Os valores obtidos para a RQ do RNAm da citocina IFN- γ revelou diferença entre o grupo S-IgE+ e o grupo CT, contrário ao que foi encontrado nos níveis dosados no soro e no sobrenadante de cultura de células, isto porque a detecção do RNAm de determinado alvo nem sempre se correlaciona com o produto secretado, por isto a quantificação relativa pode ter apresentado níveis maiores e com significância (TILL et al., 1997). A análise da expressão de RNAm para TGF- β mostrou níveis aumentados no grupo S-IgE- quando comparados aos grupos S-IgE+ e CT, o que pode ser justificado pelo papel imunoregulador das células T produtoras de TGF- β na tentativa de reduzir a reação alérgica, explicando assim os níveis mais elevados encontrados neste grupo (JUTEL et al., 2003).

Assim, as análises das citocinas nos possibilitou conhecer a assinatura de citocinas do grupo de pacientes S-IgE- comparada aos grupos S-IgE+ e CT, uma vez que o mecanismo de resposta imune envolvido na rinite do grupo S-IgE- ainda não é bem estabelecido. E também, nós não identificamos um padrão diferente de citocinas no grupo S-IgE- quando comparado ao grupo S-IgE+, uma vez que os níveis das citocinas (IL-4, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ) foram similares entre os grupos, diferindo somente em relação à IL-5 que apresentou níveis mais elevados no grupo S-IgE+ quando a cultura de PBMCs foi estimulada com extrato de Dp.

A busca por outros mecanismos que podem estar envolvidos na regulação da resposta imune é de extrema importância para melhor compreendermos a fisiopatologia das doenças alérgicas. Neste sentido, nós investigamos a expressão relativa de uma classe de RNA de interferência, chamado de miRNA que tem tido papel importante na alergia (TOMANKOVA et al., 2011). A expressão relativa do miR-21 e miR-126 foi avaliada, já que vários estudos tem destacado a relevância destes miRNAs na rinite alérgica. Em estudo realizado previamente, foi mostrado que a expressão do miR-21 estava ligada a índices elevados de IgE e desenvolvimento de rinite alérgica (CHEN et al., 2010). Outro miRNA que tem sido ressaltado no contexto da alergia é o miR-126, sendo que tem sido proposto que este miRNA age como potente e específico ativador da resposta inflamatória alérgica regulada via Th2, e assim tê-lo como alvo no epitélio respiratório pode representar uma importante estratégia anti-inflamatória no tratamento da doença (MATTES et al., 2009). Diante disto, nós esperávamos encontrar expressões aumentadas do miR-21 e miR-126 no grupo S-IgE+ quando comparadas aos grupos S-IgE- e CT. Contudo, obtivemos dados que não apresentaram diferença estatística para ambos os miRNAs testados, apesar do miR-126 apresentar uma tendência a ter valores aumentados no grupo S-IgE+ frente aos grupo S-IgE- e CT, o que vem ao encontro dos dados de predição de alvos obtidos, uma vez que GATA 3 é um fator de transcrição alvo importante do miR-126 e está estritamente relacionado ao desenvolvimento do perfil Th2.

A resposta humoral e sistêmica representada pelos anticorpos e citocinas, dosadas tanto no soro quanto no sobrenadante de PBMCs foi muito similar entre os grupos S-IgE- e S-IgE+. Uma possível interpretação pode ser o envolvimento de mecanismos de resposta imune local, o qual pode desencadear sintomas nos pacientes S-IgE- quando expostos a ácaros da poeira domiciliar com consequente produção de IgE local, ou mesmo o envolvimento de outro mecanismo independente de IgE e ainda não elucidado. Neste contexto, outros estudos no sentido de caracterizar os mecanismos humorais, celulares e moleculares deste complexo grupo serão necessários para compreendermos melhor a resposta imune destes pacientes.

6. Conclusões

- Pacientes do grupo S-IgE- mostraram níveis de anticorpos IgG1, IgG3, IgG4 e IgA similares aos indivíduos saudáveis (grupo CT), diferindo dos pacientes do grupo S-IgE+;
- Os níveis de citocinas no sobrenadante de PBMCs estimuladas com Dp foram similares entre os grupos em praticamente todas as citocinas testadas (IL-4, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ), com exceção de IL-5 que apresentou índice mais elevado no grupo S-IgE+;
- A dosagem das citocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 e IFN- γ) no soro dos grupos S-IgE+, S-IgE- e CT não revelou nenhuma diferença expressiva;
- A quantificação relativa das citocinas revelou diferenças no grupo S-IgE+ para IL-5 em relação aos outros dois grupos, já IFN- γ somente apresentou diferença em relação ao grupo CT e a expressão relativa da citocina TGF- β apresentou diferenças quando comparada ao dois outros grupos;
- A expressão relativa dos miRNAs (21 e 126) não indicou diferença entre os grupos S-IgE+, S-IgE- e CT.

*Referências Bibliográficas**

*Referências estão de acordo com as normas da ABNT 2013.

AALBERSE, R. C. Specific IgE and IgG Responses in Atopic versus Nonatopic Subjects. **Am J Respir Crit Care Med**, 162, S124-S127,2000.

AALBERSE, R. C.; STAPEL, S. O.; SCHUURMAN, J.; RISPENS, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. **Clin Exp Allergy**, 39, 469-477,2009.

AKDIS, C. A.; AKDIS, M.; BLESKEN, T.; WYMAN, D.; ALKAN, S. S.; MULLER, U.; BLASER, K. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. **J Clin Invest**, 98, 1676-1683,1996.

AKDIS, C. A.; BLESKEN, T.; WYMAN, D.; AKDIS, M.; BLASER, K. Differential regulation of human T cell cytokine patterns and IgE and IgG4 responses by conformational antigen variants. **Eur J Immunol**, 28, 914-925,1998.

AKDIS, M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. **Curr Opin Immunol**, 18, 738-744,2006.

ALVES, R.; SILVA, D. A. O.; FERNANDES, J. F. C.; ALMEIDA, K. C.; YNOUE, L. H.; BERNARDES, C. T. V.; MOREIRA, P. F. S.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Humoral and cellular immune responses to Blomia tropicalis and concanavalin A-binding fractions in atopic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 41, 773-781,2008.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, 431, 350-355,2004.

AMERES, S. L.; ZAMORE, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 14, 475-488,2013.

AMIN, K.; LUDVIKSDOTTIR, D.; JANSON, C.; NETTELBLADT, O.; BJORNSSON, E.; ROOMANS, G. M.; BOMAN, G.; SEVEUS, L.; VENGE, P. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. **Am J Respir Crit Care Med**, 162, 2295-2301,2000.

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S. Biology, ecology, and prevalence of dust mites. **Immunol Allergy Clin North Am**, 23, 443-468,2003.

ARLIAN, L. G.; PLATTS-MILLS, T. A. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **J Allergy Clin Immunol**, 107, S406-413,2001.

ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D. A review of recent immunochemical studies of Blomia tropicalis and Euroglyphus maynei allergens. **Exp Appl Acarol**, 16, 129-140,1992.

ASHER, M. I.; MONTEFORT, S.; BJORKSTEN, B.; LAI, C. K.; STRACHAN, D. P.; WEILAND, S. K.; WILLIAMS, H.; GROUP, I. P. T. S. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in

childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **Lancet**, 368, 733-743,2006.

ASIRVATHAM, A. J.; MAGNER, W. J.; TOMASI, T. B. miRNA regulation of cytokine genes. **Cytokine**, 45, 58-69,2009.

BALTIMORE, D.; BOLDIN, M. P.; O'CONNELL, R. M.; RAO, D. S.; TAGANOV, K. D. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. **Nat Immunol**, 9, 839-845,2008.

BARNES, K. C.; MARSH, D. G. The genetics and complexity of allergy and asthma. **Immunol Today**, 19, 325-332,1998a.

BARNES, K. C.; MARSH, D. G. The genetics and complexity of allergy and asthma. **Immunol Today**, 19, 325-332,1998b.

BATARD, T.; BASUYAUX, B.; LAROZE, A.; LAMBIN, P.; BREMARD-OURY, C.; AUCOUTURIER, P.; HAMILTON, R. G.; DAVID, B.; PELTRE, G. Isotypic analysis of grass-pollen-specific immunoglobulins in human plasma. 2. Quantification of the IgE, IgM, IgA class and the IgG subclass antibodies. **Int Arch Allergy Immunol**, 102, 279-287,1993.

BATARD, T.; HRABINA, A.; BI, X. Z.; CHABRE, H.; LEMOINE, P.; COURET, M. N.; FACCENDA, D.; VILLET, B.; HARZIC, P.; ANDRE, F.; GOH, S. Y.; ANDRE, C.; CHEW, F. T.; MOINGEON, P. Production and proteomic characterization of pharmaceutical-grade *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* extracts for allergy vaccines. **Int Arch Allergy Immunol**, 140, 295-305,2006.

BEASLEY, R.; CRANE, J.; LAI, C. K.; PEARCE, N. Prevalence and etiology of asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 105, S466-472,2000.

BEREZIKOV, E.; GURYEV, V.; VAN DE BELT, J.; WIENHOLDS, E.; PLASTERK, R. H.; CUPPEN, E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. **Cell**, 120, 21-24,2005.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, 409, 363-366,2001.

BERNSTEIN, J. A. Characteristics of nonallergic vasomotor rhinitis. **World Allergy Organ J**, 2, 102-105,2009.

BHAKTA, N. R.; ERLE, D. J. IL-17 and "TH2-high" asthma: Adding fuel to the fire? **J Allergy Clin Immunol**, 134, 1187-1188,2014.

BLASER, M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. **Nature**, 476, 393-394,2011.

BLOEMEN, K.; VERSTRAELEN, S.; VAN DEN HEUVEL, R.; WITTERS, H.; NELISSEN, I.; SCHOETERS, G. The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. **Immunol Lett**, 113, 6-18,2007.

BOLUDA, L.; DE LA CUADRA, B.; BERRENS, L. Binding affinities of allergens from pollen, mites, and house dust for specific IgG subclass antibodies. **Allergy**, 51, 706-711,1996.

BOUSQUET, J.; KHALTAEV, N.; CRUZ, A. A.; DENBURG, J.; FOKKENS, W. J.; TOGIAS, A.; ZUBERBIER, T.; BAENA-CAGNANI, C. E.; CANONICA, G. W.; VAN WEEL, C.; AGACHE, I.; AIT-KHALED, N.; BACHERT, C.; BLAISS, M. S.; BONINI, S.; BOULET, L. P.; BOUSQUET, P. J.; CAMARGOS, P.; CARLSEN, K. H.; CHEN, Y.; CUSTOVIC, A.; DAHL, R.; DEMOLY, P.; DOUGUI, H.; DURHAM, S. R.; VAN WIJK, R. G.; KALAYCI, O.; KALINER, M. A.; KIM, Y. Y.; KOWALSKI, M. L.; KUNA, P.; LE, L. T.; LEMIERE, C.; LI, J.; LOCKEY, R. F.; MAVALE-MANUEL, S.; MELTZER, E. O.; MOHAMMAD, Y.; MULLOL, J.; NACLERIO, R.; O'HEHIR, R. E.; OHTA, K.; OUEDRAOGO, S.; PALKONEN, S.; PAPADOPOULOS, N.; PASSALACQUA, G.; PAWANKAR, R.; POPOV, T. A.; RABE, K. F.; ROSADO-PINTO, J.; SCADDING, G. K.; SIMONS, F. E.; TOSKALA, E.; VALOVIRTA, E.; VAN CAUWENBERGE, P.; WANG, D. Y.; WICKMAN, M.; YAWN, B. P.; YORGANCIOLU, A.; YUSUF, O. M.; ZAR, H.; ANNESI-MAESANO, I.; BATEMAN, E. D.; BEN KHEDER, A.; BOAKYE, D. A.; BOUCHARD, J.; BURNET, P.; BUSSE, W. W.; CHAN-YEUNG, M.; CHAVANNES, N. H.; CHUCHALIN, A.; DOLEN, W. K.; EMUZYTE, R.; GROUSE, L.; HUMBERT, M.; JACKSON, C.; JOHNSTON, S. L.; KEITH, P. K.; KEMP, J. P.; KLOSSEK, J. M.; LARENAS-LINNEMANN, D.; LIPWORTH, B.; MALO, J. L.; MARSHALL, G. D.; NASPITZ, C.; NEKAM, K.; NIGGEMANN, B.; NIZANKOWSKA-MOGILNICKA, E.; OKAMOTO, Y.; ORRU, M. P.; POTTER, P.; PRICE, D.; STOLOFF, S. W.; VANDENPLAS, O.; VIEGI, G.; WILLIAMS, D.; WORLD HEALTH, O.; GALEN; ALLERGEN. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). **Allergy**, 63 Suppl 86, 8-160,2008.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA). **Allergy**, 57, 841-855,2002.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N.; ARIA WORKSHOP, G.; WORLD HEALTH, O. Allergic rhinitis and its impact on asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 108, S147-334,2001.

BRAUN-FAHRLANDER, C.; RIEDLER, J.; HERZ, U.; EDER, W.; WASER, M.; GRIZE, L.; MAISCH, S.; CARR, D.; GERLACH, F.; BUFE, A.; LAUENER, R. P.; SCHIERL, R.; RENZ, H.; NOWAK, D.; MUTIUS, E. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. **N Engl J Med**, 347, 869-877,2002.

BRENNECKE, J.; HIPFNER, D. R.; STARK, A.; RUSSELL, R. B.; COHEN, S. M. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. **Cell**, 113, 25-36,2003.

BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R. B.; COHEN, S. M. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biol**, 3, e85,2005.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, 55, 611-622,2009.

CARNEY, A. S.; POWE, D. G.; HUSKISSON, R. S.; JONES, N. S. Atypical nasal challenges in patients with idiopathic rhinitis: more evidence for the existence of allergy in the absence of atopy? **Clin Exp Allergy**, 32, 1436-1440,2002.

CHEN, R. F.; HUANG, H. C.; OU, C. Y.; HSU, T. Y.; CHUANG, H.; CHANG, J. C.; WANG, L.; KUO, H. C.; YANG, K. D. MicroRNA-21 expression in neonatal blood associated with antenatal immunoglobulin E production and development of allergic rhinitis. **Clin Exp Allergy**, 40, 1482-1490,2010.

CHENG, F.; HE, S. RNA interference: a potent technology in studying and modulating of dendritic cells, and potential in clinical therapy. **Mol Biol Rep**, 37, 2635-2644,2010.

CIPRANDI, G.; FENOGLIO, D.; DE AMICI, M.; QUAGLINI, S.; NEGRINI, S.; FILACI, G. Serum IL-17 levels in patients with allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, 122, 650-651 e652,2008.

CIPRANDI, G.; VIZZACCARO, A.; CIRILLO, I.; TOSCA, M.; MASSOLO, A.; PASSALACQUA, G. Nasal eosinophils display the best correlation with symptoms, pulmonary function and inflammation in allergic rhinitis. **Int Arch Allergy Immunol**, 136, 266-272,2005.

CLARK, N. M.; BROWN, R.; JOSEPH, C. L. M.; ANDERSON, E. W.; LIU, M.; VALERIO, M.; GONG, M. Issues in identifying asthma and estimating prevalence in an urban school population. **J Clin Epidemiol**, 55, 870-881,2002.

COUSINS, D. J.; LEE, T. H.; STAYNOV, D. Z. Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines. **J Immunol**, 169, 2498-2506,2002.

CROISANT, S. Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease. **Adv Exp Med Biol**, 795, 17-29,2014.

DE BOER, B. A.; KRUIZE, Y. C.; YAZDANBAKHSH, M. In vitro production of IgG4 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC): the contribution of committed B cells. **Clin Exp Immunol**, 114, 252-257,1998.

DESVIGNES, T.; BATZEL, P.; BEREZIKOV, E.; EILBECK, K.; EPPIG, J. T.; MCANDREWS, M. S.; SINGER, A.; POSTLETHWAIT, J. H. miRNA Nomenclature: A

view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants. *Trends in Genet*, *in press*, 2015.

DEVEY, M. E.; WILSON, D. V.; WHEELER, A. W. The IgG subclasses of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensitization. *Clin Allergy*, 6, 227-236,1976.

DI LORENZO, G.; PACOR, M. L.; AMODIO, E.; LETO-BARONE, M. S.; LA PIANA, S.; D'ALCAMO, A.; DITTA, V.; MARTINELLI, N.; DI BONA, D. Differences and similarities between allergic and nonallergic rhinitis in a large sample of adult patients with rhinitis symptoms. *Int Arch Allergy Immunol*, 155, 263-270,2011.

ESAU, C.; KANG, X.; PERALTA, E.; HANSON, E.; MARCUSSON, E. G.; RAVICHANDRAN, L. V.; SUN, Y.; KOO, S.; PERERA, R. J.; JAIN, R.; DEAN, N. M.; FREIER, S. M.; BENNETT, C. F.; LOLLO, B.; GRIFFEY, R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 279, 52361-52365,2004.

FERNANDEZ-CALDAS, E. Mite species of allergologic importance in Europe. *Allergy*, 52, 383-387,1997.

FLANAGAN, J. G.; RABBITS, T. H. Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing gamma, epsilon and alpha genes. *Nature*, 300, 709-713,1982.

FOTISCH, K.; VIETHS, S. N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. *Glycoconj J*, 18, 373-390,2001.

GOULD, H. J.; SUTTON, B. J. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, 8, 205-217,2008.

HALES, B. J.; MARTIN, A. C.; PEARCE, L. J.; LAING, I. A.; HAYDEN, C. M.; GOLDBLATT, J.; LE SOUEF, P. N.; THOMAS, W. R. IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 118, 361-367,2006.

HAN, D.; WANG, C.; LOU, W.; GU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, L. Allergen-specific IL-10-secreting type I T regulatory cells, but not CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells, are decreased in peripheral blood of patients with persistent allergic rhinitis. *Clin Immunol*, 136, 292-301,2010.

HASHIMOTO, T.; AKIYAMA, K.; KOBAYASHI, N.; MORI, A. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int Arch Allergy Immunol*, 137 Suppl 1, 51-54,2005.

HESSELMAR, B.; ABERG, B.; ERIKSSON, B.; BJORKSTEN, B.; ABERG, N. Building characteristics affect the risk of allergy development. *Pediatr Allergy Immunol*, 16, 126-131,2005.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nat Rev Immunol**, 8, 218-230,2008.

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**, 351, 1225-1232,1998.

JACKOLA, D. R.; PIERSON-MULLANY, L. K.; LIEBELER, C. L.; BLUMENTHAL, M. N.; ROSENBERG, A. Variable binding affinities for allergen suggest a 'selective competition' among immunoglobulins in atopic and non-atopic humans. **Mol Immunol**, 39, 367-377,2002.

JOE, S. A. Nonallergic rhinitis. **Facial Plast Surg Clin North Am**, 20, 21-30,2012.

JOHANSSON, A. K.; SJOSTRAND, M.; TOMAKI, M.; SAMULESSON, A. M.; LOTVALL, J. Allergen stimulates bone marrow CD34(+) cells to release IL-5 in vitro; a mechanism involved in eosinophilic inflammation? **Allergy**, 59, 1080-1086,2004.

JOHANSSON, S. G.; CARDELL, L. O.; FOUCARD, T.; MONTAN, P.; ODEBACK, P.; PALMQVIST, M.; WAHLGREN, C. F. [Revised, global nomenclature for allergy. Unambiguous terms create clarity and prevent misunderstandings]. **Lakartidningen**, 103, 379-383,2006.

JOHANSSON, S. G.; HOURIHANE, J. O.; BOUSQUET, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; DREBORG, S.; HAAHTELA, T.; KOWALSKI, M. L.; MYGIND, N.; RING, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; WUTHRICH, B.; FORCE, E. N. T. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, 56, 813-824,2001.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; BUDAK, F.; AEBISCHER-CASAULTA, C.; WRZYSZCZ, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. **Eur J Immunol**, 33, 1205-1214,2003.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. **Biochim Biophys Acta**, 1589, 1-13,2002.

KAWAGUCHI, M.; KOKUBU, F.; FUJITA, J.; HUANG, S. K.; HIZAWA, N. Role of interleukin-17F in asthma. **Inflamm Allergy Drug Targets**, 8, 383-389,2009.

KAY, A. B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **N Engl J Med**, 344, 30-37,2001.

KEMENY, D. M.; URBANEK, R.; EWAN, P.; MCHUGH, S.; RICHARDS, D.; PATEL, S.; LESSOF, M. H. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. **Clin Exp Allergy**, 19, 545-549,1989.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 6, 376-385,2005.

LEDFORD, D. K. Indoor allergens. **J Allergy Clin Immunol**, 94, 327-334,1994.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, 75, 843-854, 1993.

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RADMARK, O.; KIM, S.; KIM, V. N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, 425, 415-419,2003.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, 120, 15-20,2005.

LIEBERMAN, P.; PATTANAIK, D. Nonallergic rhinitis. **Curr Allergy Asthma Rep**, 14, 439,2014.

LIM, L. P.; GLASNER, M. E.; YEKTA, S.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Vertebrate microRNA genes. **Science**, 299, 1540,2003.

LINDSAY, M. A. microRNAs and the immune response. **Trends Immunol**, 29, 343-351,2008.

LOVE, T. M.; MOFFETT, H. F.; NOVINA, C. D. Not miR-ly small RNAs: big potential for microRNAs in therapy. **J Allergy Clin Immunol**, 121, 309-319,2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FAAR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193, 265-275, 1951.

LU, T. X.; LIM, E. J.; ITSKOVICH, S.; BESSE, J. A.; PLASSARD, A. J.; MINGLER, M. K.; ROTHENBERG, J. A.; FULKERSON, P. C.; ARONOW, B. J.; ROTHENBERG, M. E. Targeted ablation of miR-21 decreases murine eosinophil progenitor cell growth. **PLoS One**, 8, e59397,2013.

LU, T. X.; MUNITZ, A.; ROTHENBERG, M. E. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. **J Immunol**, 182, 4994-5002,2009.

LUND, E.; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J. E.; KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, 303, 95-98,2004.

MAGGI, E. The TH1/TH2 paradigm in allergy. **Immunotechnology**, 3, 233-244,1998.

MANTEL, P. Y.; KUIPERS, H.; BOYMAN, O.; RHYNER, C.; OUAKED, N.; RUCKERT, B.; KARAGIANNIDIS, C.; LAMBRECHT, B. N.; HENDRIKS, R. W.;

- CRAMERI, R.; AKDIS, C. A.; BLASER, K.; SCHMIDT-WEBER, C. B. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. **PLoS Biol**, 5, e329,2007.
- MATTES, J.; COLLISON, A.; PLANK, M.; PHIPPS, S.; FOSTER, P. S. Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, 18704-18709,2009.
- MCHUGH, S.; DEIGHTON, J.; RIFKIN, I.; EWAN, P. Kinetics and functional implications of Th1and Th2 cytokine production following activation of peripheral blood mononuclear cells in primary culture. **Eur J Immunol**, 26, 1260-1265,1996.
- MONTEIRO, R. C.; HOSTOFFER, R. W.; COOPER, M. D.; BONNER, J. R.; GARTLAND, G. L.; KUBAGAWA, H. Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. **J Clin Invest**, 92, 1681-1685,1993.
- NAIR, M. P.; REYNOLDS, J. L.; MAHAJAN, S. D.; SCHWARTZ, S. A.; AALINKEEL, R.; BINDUKUMAR, B.; SYKES, D. RNAi-directed inhibition of DC-SIGN by dendritic cells: prospects for HIV-1 therapy. **AAPS J**, 7, E572-578,2005.
- NAKAJIMA, S.; GILLESPIE, D. N.; GLEICH, G. J. Differences between IgA and IgE as secretory proteins. **Clinical Experimental Immunology**, 21, 306-317,1975.
- OBER, C.; HOFFJAN, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. **Genes Immun**, 7, 95-100,2006.
- OBOKI, K.; OHNO, T.; SAITO, H.; NAKAE, S. Th17 and allergy. **Allergol Int**, 57, 121-134,2008.
- PAYNE, S. C.; CHEN, P. G.; BORISH, L. Local class switching in nonallergic rhinitis. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, 19, 193-198,2011.
- PEDERSEN, I.; DAVID, M. MicroRNAs in the immune response. **Cytokine**, 43, 391-394,2008.
- PEREIRA, E. A.; SILVA, D. A.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; ALMEIDA, K. C.; ALVES, R.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to Blomia tropicalis in atopic patients. **Allergy**, 60, 401-406,2005.
- PERFETTI, L.; FERRARI, M.; GALDI, E.; POZZI, V.; COTTICA, D.; GRIGNANI, E.; MINOIA, C.; MOSCATO, G. House dust mites (Der p 1, Der f 1), cat (Fel d 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in indoor work-places (offices and archives). **Sci Total Environ**, 328, 15-21,2004.
- PERRIMON, N.; NI, J. Q.; PERKINS, L. In vivo RNAi: today and tomorrow. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2, a003640,2010.

PERZANOWSKI, M. S.; RONMARK, E.; PLATTS-MILLS, T. A.; LUNDBACK, B. Effect of cat and dog ownership on sensitization and development of asthma among preteenage children. **Am J Respir Crit Care Med**, 166, 696-702,2002.

PINHEIRO, M. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; MOTA, A. P.; ALPOIM, P. N.; GODOI, L. C.; SILVEIRA, A. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GOMES, K. B.; DUSSE, L. M. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. **Cytokine**, 62, 165-173,2013.

PLATT-MILLS, T. A.; WECK, A. L. Dust mite allergens and asthma--a worldwide problem. **J Allergy Clin Immunol**, 83, 416-427,1989.

PLATTS-MILLS, T.; VAUGHAN, J.; SQUILLACE, S.; WOODFOLK, J.; SPORIK, R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. **Lancet**, 357, 752-756,2001.

PLATTS-MILLS, T. A.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; VERVLOET, D.; CHAPMAN, M. D. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. **J Allergy Clin Immunol**, 89, 1046-1060,1992.

PLATTS-MILLS, T. A.; VERVLOET, D.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; CHAPMAN, M. D. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **J Allergy Clin Immunol**, 100, S2-24,1997.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VAUGHAN, J. G.; BLUMENTHAL, K.; SQUILLACE, S. P.; SPORIK, R. B. Serum IgG and IgG4 antibodies to Fel d 1 among children exposed to 20 ug Fel d 1 at home: Relevance of a Nonallergic Modified Th2 respons. **Int Arch Allergy Immunol**, 124, 126-129,2001.

POWE, D. G.; JAGGER, C.; KLEINJAN, A.; CARNEY, A. S.; JENKINS, D.; JONES, N. S. 'Entopy': localized mucosal allergic disease in the absence of systemic responses for atopy. **Clin Exp Allergy**, 33, 1374-1379,2003.

RAVETCH, J. V.; KINET, J. P. Fc receptors. **Annu Rev Immunol**, 9, 457-492,1991.

RING, J.; KRAMER, U.; SCHAFER, T.; BEHRENDT, H. Why are allergies increasing? **Curr Opin Immunol**, 13, 701-708,2001.

RODRIGUEZ, A.; VIGORITO, E.; CLARE, S.; WARREN, M. V.; COUTTET, P.; SOOND, D. R.; VAN DONGEN, S.; GROCOCK, R. J.; DAS, P. P.; MISKA, E. A.; VETRIE, D.; OKKENHAUG, K.; ENRIGHT, A. J.; DOUGAN, G.; TURNER, M.; BRADLEY, A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. **Science**, 316, 608-611,2007.

RONDON, C.; ROMERO, J. J.; LOPEZ, S.; ANTUNEZ, C.; MARTIN-CASANEZ, E.; TORRES, M. J.; MAYORGA, C.; R, R. P.; BLANCA, M. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, 119, 899-905,2007.

ROZSNYAY, Z.; SÁRMAY, G.; WALKER, M.; MASLANKA, K.; VALASEK, Z.; JEFFERIS, R.; J., G. Distinctive role of IgG1 and IgG3 isotypes in Fc \square R-mediated functions. **Immunology**, 66, 491-498,1989.

RYDEN, O.; ANDERSSON, B.; ANDERSSON, M. Disease perception and social behaviour in persistent rhinitis: a comparison between patients with allergic and nonallergic rhinitis. **Allergy**, 59, 461-464,2004.

SALIB, R. J.; HARRIES, P. G.; NAIR, S. B.; HOWARTH, P. H. Mechanisms and mediators of nasal symptoms in non-allergic rhinitis. **Clin Exp Allergy**, 38, 393-404,2008.

SAVOLAINEN, J.; VIANDER, M.; KOIVIKKO, A. IgE-, IgA- and IgG-antibody responses to carbohydrate and protein antigens of *Candida albicans* in asthmatic children. **Allergy**, 45, 54-63,1990.

SCAVUZZO, M. C.; ROCCHI, V.; FATTORI, B.; AMBROGI, F.; CARPI, A.; RUFFOLI, R.; MANGANELLI, S.; GIANNESI, F. Cytokine secretion in nasal mucus of normal subjects and patients with allergic rhinitis. **Biomed Pharmacother**, 57, 366-371,2003.

SCHWARZ, D. S.; HUTVAGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P. D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, 115, 199-208,2003.

SECRIST, H.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. Interleukin 4 production by CD4+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type. **J Exp Med**, 181, 1081-1089,1995.

SIN, B.; TOGIAS, A. Pathophysiology of allergic and nonallergic rhinitis. **Proc Am Thorac Soc**, 8, 106-114,2011.

SLY, R. M. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. **Ann Allergy Asthma Immunol**, 82, 233-248; quiz 248-252,1999.

SOLÉ, D.; CAMELO-NUNES, I. C.; VANA, A. T.; YAMADA, E.; WERNECK, F.; SOLANO DE FREITAS, L.; SOLOGUREN, M. J.; BRITO, M.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; STEIN, R. T.; NASPITZ, C. K. Prevalence of rhinitis and related-symptoms in schoolchildren from different cities in Brazil. **Allergol Immunopathol (Madr)**, 32, 7-12,2004.

SOLE, D.; MALLOL, J.; CAMELO-NUNES, I. C.; WANDALSEN, G. F.; LATIN AMERICAN, I. S. G. Prevalence of rhinitis-related symptoms in Latin American children - results of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase three. **Pediatr Allergy Immunol**, 21, e127-136,2010.

SOLE, D.; WANDALSEN, G. F.; CAMELO-NUNES, I. C.; NASPITZ, C. K.; GROUP, I. B. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian

children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. **J Pediatr (Rio J)**, 82, 341-346,2006.

SOLÉ, D.; WANDALSEN, G. F.; CAMELO-NUNES, I. C.; NASPITZ, C. K.; GROUP, I. B. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. **J Pediatr (Rio J)**, 0, 2006.

SORBELLO, V.; CIPRANDI, G.; DI STEFANO, A.; MASSAGLIA, G. M.; FAVATA, G.; CONTICELLO, S.; MALERBA, M.; FOLKERTS, G.; PROFITA, M.; ROLLA, G.; RICCIARDOLO, F. L. Nasal IL-17F is related to bronchial IL-17F/neutrophilia and exacerbations in stable atopic severe asthma. **Allergy**, 70, 236-240,2015.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ Clinical Research**, 1989.

SUOJALEHTO, H.; LINDSTROM, I.; MAJURI, M. L.; MITTS, C.; KARJALAINEN, J.; WOLFF, H.; ALENIUS, H. Altered microRNA expression of nasal mucosa in long-term asthma and allergic rhinitis. **Int Arch Allergy Immunol**, 163, 168-178,2014.

TAN, Z.; RANDALL, G.; FAN, J.; CAMORETTI-MERCADO, B.; BROCKMAN-SCHNEIDER, R.; PAN, L.; SOLWAY, J.; GERN, J. E.; LEMANSKE, R. F.; NICOLAE, D.; OBER, C. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. **Am J Hum Genet**, 81, 829-834,2007.

TERR, A. I. Novel therapies in allergy: a clinician's perspective. **Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M**, 263-271,1997.

THAI, T. H.; CALADO, D. P.; CASOLA, S.; ANSEL, K. M.; XIAO, C.; XUE, Y.; MURPHY, A.; FRENDEWEY, D.; VALENZUELA, D.; KUTOK, J. L.; SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; RAJEWSKY, N.; YANCOPOULOS, G.; RAO, A.; RAJEWSKY, K. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. **Science**, 316, 604-608,2007.

TILL, S.; DURHAM, S.; DICKASON, R.; HUSTON, D.; BUNGRE, J.; WALKER, S.; ROBINSON, D.; KAY, A. B.; CORRIGAN, C. IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression. **Immunology**, 91, 53-57,1997.

TOMANKOVA, T.; PETREK, M.; GALLO, J.; KRIEGOVA, E. MicroRNAs: emerging regulators of immune-mediated diseases. **Scand J Immunol**, 2011.

TOVEY, E. R.; CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. Mite faeces are a major source of house dust allergens. **Nature**, 289, 592-593,1981.

TRAIDL-HOFFMANN, C.; JAKOB, T.; BEHRENDT, H. Determinants of allergenicity. **J Allergy Clin Immunol**, 123, 558-566,2009.

VAN RIJSWIJK, J. B.; BLOM, H. M.; FOKKENS, W. J. Idiopathic rhinitis, the ongoing quest. *Allergy*, 60, 1471-1481,2005.

VOCCA, L.; DI SANO, C.; UASUF, C. G.; SALA, A.; RICCOBONO, L.; GANGEMI, S.; ALBANO, G. D.; BONANNO, A.; GAGLIARDO, R.; PROFITA, M. IL-33/ST2 axis controls Th2/IL-31 and Th17 immune response in allergic airway diseases. *Immunobiology*, 2015.

VON MUTIUS, E. The rising trends in asthma and allergic disease. *Clin Exp Allergy*, 28 Suppl 5, 45-49; discussion 50-41,1998.

VOORHOEVE, P. M.; AGAMI, R. Knockdown stands up. *Trends Biotechnol*, 21, 2-4,2003.

WEIDINGER, S.; GIEGER, C.; RODRIGUEZ, E.; BAURECHT, H.; MEMPEL, M.; KLOPP, N.; GOHLKE, H.; WAGENPFEIL, S.; OLLERT, M.; RING, J.; BEHRENDT, H.; HEINRICH, J.; NOVAK, N.; BIEBER, T.; KRAMER, U.; BERDEL, D.; VON BERG, A.; BAUER, C. P.; HERBARTH, O.; KOLETZKO, S.; PROKISCH, H.; MEHTA, D.; MEITINGER, T.; DEPNER, M.; VON MUTIUS, E.; LIANG, L.; MOFFATT, M.; COOKSON, W.; KABESCH, M.; WICHMANN, H. E.; ILLIG, T. Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. *PLoS Genet*, 4, e1000166,2008.

WONG, C. K.; HO, C. Y.; KO, F. W.; CHAN, C. H.; HO, A. S.; HUI, D. S.; LAM, C. W. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol*, 125, 177-183,2001a.

WONG, C. K.; HO, C. Y.; KO, F. W. S.; CHAN, C. H. S.; HO, A. S. S.; HUI, D. S. C.; LAM, C. W. K. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-g, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical Experimental Immunology*, 125, 177-183,2001b.

WU, H.; NEILSON, J. R.; KUMAR, P.; MANOCHA, M.; SHANKAR, P.; SHARP, P. A.; MANJUNATH, N. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One*, 2, e1020,2007.

WYNN, T. A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol*, 15, 271-282,2015.

YAO, Z.; PAINTER, S. L.; FANSLOW, W. C.; ULRICH, D.; MACDUFF, B. M.; SPRIGGS, M. K.; ARMITAGE, R. J. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol*, 155, 5483-5486,1995.

ZACHARASIEWICZ, A.; DOUWES, J.; PEARCE, N. What proportion of rhinitis symptoms is attributable to atopy? *J Clin Epidemiol*, 56, 385-390,2003.

Anexos

ANEXO A



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. Júlio Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco A – sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3239-4131

ANÁLISE FINAL Nº. 504/11 DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
 178/11

Projeto Pesquisa: "Papel dos microRNAs na modulação da resposta imunológica de pacientes com rinite".

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo 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 dos relatórios Parciais: **agosto de 2012; agosto de 2013**

Data de entrega do relatório Final: **agosto de 2014**

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

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

Uberlândia, 12 de agosto de 2011.

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

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica

Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902 Telefone: 034-3218-2394

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada **“Papel dos microRNAs na modulação da resposta imunológica de pacientes com rinite”**, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dr. Ernesto Akio Taketomi, MSc. Juliana Silva Miranda, Dr. Carlos Ueira-Vieira, BSc. Isabella Lima Siman, Dra. Karine Cristine de Almeida, Dr. Fernando Lourenço Pereira, MSc. Núbia da Silva Araújo, BSc. Bárbara Godoi Melo Ávila.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender qual o papel dos microRNAs (pequenas estruturas presentes nas células) na regulação da resposta imunológica em pacientes com rinite alérgica e rinite não mediada por IgE.

O termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora MSc. Juliana Silva Miranda.

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 um dos seus braços , 09 (nove) pequenas gotas de substâncias tiradas de ácaros (animais microscópicos presentes geralmente na poeira doméstica), baratas, cão, gato e fungos para sabermos se você é alérgico a estas substâncias ou não. Para passar por este teste, você não poderá ter usado medicamentos antialérgicos nos últimos 7 dias. 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 deverão ser maiores que 3 mm (três milímetros) de diâmetro. Será coletado também 30 mL de seu sangue (veia do braço) que passará por uma série de centrifugações (movimentos de rotações muito rápidos) para isolarmos os miRNAs (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, como aumento da coriza (nariz escorrendo), coceira no nariz e olhos. Nestes casos usamos medicamentos antialérgicos e acompanhamos a melhora no quadro clínico. Este teste cutâneo é feito sob a orientação do médico alergologista, coordenador deste projeto de pesquisa, Dr. Ernesto Akio Taketomi. Quanto à coleta de sangue, você não corre nenhum risco, todo o material usado é descartável.

MSc. Juliana Silva Miranda

Orientador: Dr. Ernesto Akio Taketomi

Assinatura do Participante

Quanto aos benefícios, você participa de um projeto de pesquisa que poderá contribuir para a melhora da qualidade de vida dos pacientes alérgicos.

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

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o(a) senhor(a).

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa o senhor poderá entrar em contato com:
Pesquisadores: Dr. Ernesto Akio Taketomi
MSc. Juliana Silva Miranda

Endereço para contato:

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
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFU
Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A sala 224
Campus Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP: 38.408.100
Fone: 34 3239 4131

Uberlândia, _____ de _____ de 2014000.

MSc. Juliana Silva Miranda

Orientador: Dr. Ernesto Akio Taketomi

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

Uberlândia, _____ de ____ de 2013.

Assinatura do Participante

ANEXO C



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica

Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902 Telefone: 034-3218-2394

QUESTIONÁRIO CLÍNICO

Nome: _____

Data: ____ / ____ / ____

Idade: _____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Sexo: () Masculino

() Feminino

Grau de escolaridade:

() Primeiro grau () Segundo grau () Faculdade () Pós-Graduação

Nível sócio-econômico (renda familiar):

() até 1 salário mínimo () de 5 a 10 salários mínimos

() de 1 a 2 salários mínimos () mais de 10 salários mínimos

() de 2 a 5 salários mínimos

Questionário 1 (Módulo Asma)

1) Alguma vez na vida você teve sibilos (chiado no peito)?

() Sim () Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6.

2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito)?

() Sim () Não

3) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?

Nenhuma crise ()

1 a 3 crises ()

4 a 12 crises ()

mais de 12 crises ()

4) Nos últimos 12 (doze) meses, com que freqüência 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) Alguma vez na vida você teve asma?

() Sim () Não

7) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?

() Sim () Não

8) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?

() Sim () Não

Questionário 2 (Módulo Rinite)

Todas as perguntas 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 gripado ou resfriado?
 Sim Não
- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?
 Sim Não
- 3) Nos últimos 12 (doze) meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?
 Sim Não
- 4) Em qual dos últimos 12 (doze) meses este problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu).

<input type="checkbox"/> Janeiro	<input type="checkbox"/> Maio	<input type="checkbox"/> Setembro
<input type="checkbox"/> Fevereiro	<input type="checkbox"/> Junho	<input type="checkbox"/> Outubro
<input type="checkbox"/> Março	<input type="checkbox"/> Julho	<input type="checkbox"/> Novembro
<input type="checkbox"/> Abril	<input type="checkbox"/> Agosto	<input type="checkbox"/> Dezembro
- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal?

Nada	<input type="checkbox"/>
Pouco	<input type="checkbox"/>
Moderado	<input type="checkbox"/>
Muito	<input type="checkbox"/>
- 6) Alguma vez na vida você teve rinite?
 Sim Não

Questionário 3 (Módulo Eczema)

1) Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses?

() Sim () Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6

2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve essas manchas na pele (eczema)?

() Sim () Não

3) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?

() Sim () Não

4) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) desapareceram completamente nos últimos doze meses?

() Sim () Não

5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa dessa coceira na pele?

Nunca nos últimos 12 (doze)meses ()

Menos de uma noite por semana ()

Uma ou mais noites por semana ()

6) Alguma vez na vida você teve eczema?

() Sim () Não