



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Avaliação dos efeitos dos peptídeos derivados das moléculas Der p 2 e Der p 23 na
produção de óxido nítrico e IL-12 induzida por lipopolissacarídeos em macrófagos
RAW 264.7**

João Pedro Pereira Porto Rao

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal
de Uberlândia, para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Dezembro 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Avaliação dos efeitos dos peptídeos derivados das moléculas Der p 2 e Der p 23 na
produção de óxido nítrico e IL-12 induzida por lipopolissacarídeos em macrófagos
RAW 264.7**

João Pedro Pereira Porto Rao

Orientador: Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior

Coorientador: Karine Canuto Loureiro de Araújo

Uberlândia – MG

Dezembro 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Avaliação dos efeitos dos peptídeos derivados das moléculas Der p 2 e Der p 23 na
produção de óxido nítrico e IL-12 induzida por lipopolissacarídeos em macrófagos**

RAW 264.7

João Pedro Pereira Porto Rao

Orientador

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior

Coorientador

Karine Canuto Loureiro de Araújo

Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso de

Ciências Biológicas em __/__/__

Coordenador(a) do curso

Profª. Dra. Celine de Melo

Uberlândia-MG

Dezembro 2017

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus familiares por serem elementos intrínsecos ao meu ser, ao meu estimado professor e orientador Dr. Jair Pereira da Cunha Junior, por ter me aberto as portas e me aceitado em seus planos, à minha co-orientadora Karine Canuto, pela paciência infinita num momento em que precisava de muita, bem como à todos os integrantes do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica que, mesmo sem participarem diretamente desse projeto, participaram ativamente em manter um ótimo ambiente de trabalho. E à cada um dos meus amigos, por ajudarem a manter tudo no lugar.

Resumo

Ácaros *Dermatophagoide pteronyssinus* são muito comuns no meio doméstico, os alérgenos dessa espécie afetam grande parte da população. O objetivo deste estudo é analisar os efeitos dos peptídeos derivados das moléculas Der p 2 e Der p 23 na expressão de citocinas, tais como óxido nítrico (NO) e Interleucina 12 (IL-12), presentes nas reações alérgicas em macrófagos ativados e não por lipopolissacarídeos (LPS). Os resultados demonstraram que as moléculas não afetam a secreção de citocinas nos macrófagos, havendo uma expressão significativa apenas nos macrófagos ativados com LPS. Estudos posteriores devem ser realizados nesses mesmos parâmetros usando peptídeos derivados de outras regiões das moléculas de Der p 2 e Der p 23 para maiores esclarecimentos

Palavras chave: *Dermatophagoide pteronyssinus*, Der p 2, Der p 23, NO, IL-12.

Sumário

1. Introdução e Revisão.....	5
2. Justificativa	8
3. Hipótese.....	8
4. Objetivo Geral.....	9
4.1. Objetivos específicos.....	9
5. Materiais e métodos	9
5.1. Cultura de macrófagos	9
5.2. Ensaio de cultura de células	10
5.3. Dosagem de óxido nítrico	10
5.4. Dosagem de IL-12.....	10
6. Resultados	11
6.2. Expressão de IL-12.....	13
6.2.1. Der p 2.....	13
6.2.2. Der p 23.....	15
7. Discussão.....	17
9. Referências.....	20

Abreviaturas

BSA.....Albumina de Soro Bovino

CO ₂	Dióxido de Carbono
Der p.....	Dermatophagoide Pteronyssinus
IFN.....	Interferon
IL.....	Interleucina
NO.....	Óxido Nítrico
ecNOS.....	Óxido Nítrico Sintase constitutiva do endotélio
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
IE.....	Índice de Expressão
Ig;.....	Imunoglobulina
iNOS.....	Óxido Nítrico Sintase induzível
Jak.....	Janus Quinase
kDa.....	kiloDalton
LPS.....	Lipopolissacarídeo
M1.....	Macrófago do tipo 1
M2.....	Macrófago do tipo 2
Na.....	Sódio
Na ₂ NO ³	Nitrito
NK.....	Natural Killer
nNOS.....	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NOS.....	Óxido Nítrico Sintase
PBS.....	Tampão Fosfato Salino
RPM.....	Rotações por Minuto
RPML.....	Roswell Park Memorial Institute
SFB.....	Soro Fetal Bovino
STAT.....	Tradutor de Sinal e Ativador de Transcrição
Th.....	T helper
Tyk.....	Tirosina Quinase

1. Introdução e Revisão

Doenças alérgicas são um conjunto de circunstâncias causada pelas reações de hipersensibilidade do corpo humano a estímulos, muitas vezes inofensivos, presentes no meio ambiente. Normalmente causam efeitos menores na maioria das pessoas, como irritações na pele, espirros e vermelhidão nos olhos, mas também podem desencadear reações mais graves, e às vezes até fatais, como a anafilaxia. As alergias, porém, não devem ser tratadas como doença autoimune, pois as alergias são respostas normais do corpo à antígenos que são expostos, já as doença autoimune seriam o próprio sistema imunológico do organismo atacando os seus antígenos (MCCONNEL, 2007).

Indivíduos que sofrem com alergia podem ter a mesma provocada por diversas fontes de alérgenos, como determinados tipos de alimentos (EDWARDS, MARTINEZ, 2014, BEYER, 1997), grãos de pólen (RONDON et al., 2010, KLEINJAN ET AL 1997), e até mesmo os dejetos de outros seres vivos, como os ácaros (HUANG et al., 2006).

O ano de 1920 é atribuído como o da descoberta dos alérgenos da poeira doméstica, algo intrigante até então, pois a poeira não possui uma constituição padrão, logo o interesse por descobrir o motivo da poeira, constituída de variados materiais, sempre provocar reações padrões, como asma, rinites e dermatites, até descobrir que a poeira era comumente habitada por seres como os ácaros (SUNDELL, 2017, VOORHORST et al., 1967).

Ácaro, palavra derivada do grego *akares*, “pequeno”, são animais pertencentes a subclasse Acari, da classe Arachnida, subfilo Chelicerata, filo Arthropoda, Subreino Metazoa, Reino Animalia; que não atingem 1mm de comprimento, seu número de espécies se aproxima dos 55 mil exemplares descritos (KRANTZ, WALTER, 2009). Este subgênero possui grande notoriedade no quesito alergia por serem muito comuns no ambiente doméstico, e seu ciclo de vida está presente no cotidiano do ser humano desde o estabelecimento dos mesmos em casas. Sua influência na alergia se dá, principalmente, pela dispersão de seus excrementos pela poeira (OLIVIER et al., 2011).

Os ácaros da espécie *Dermatophagoide pteronyssinus* são de grande relevância, pois vários estudos realizados na cidade de São Paulo retrataram essa espécie como sendo uma das três mais abundantes na poeira doméstica (CARABALLO, 2016, CRUZ et al., 2006; ARRUDA et al., 1990). Essa espécie de ácaro produz importantes alérgenos, alguns desses com atividade proteolítica, conhecidos como Der p, cujas estruturas são homólogas às cisteínas proteases (CHRUSZCZ et al., 2009, SCHULZ, SEWELL, SHAKIB, 1998;).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula encontrada normalmente em pequenas quantidades na atmosfera, possui um radical livre que a confere uma alta reatividade. Uma das menores moléculas produzidas pelos mamíferos, cumpre importantes funções nos mesmos, executando a importante tarefa de ser um mensageiro intercelular, se valendo de receptores de membrana celular na célula alvo, que desencadeiam uma cascata de sinais intracelulares que resultarão em algum tipo de mudança na célula; e por possuir uma penetração celular sem intermediários membranosos, o óxido nítrico é utilizado em funções fisiológicas onde é necessária uma resposta rápida (LIMA et al., 2015; FLORA FILHO, ZILBERSTEIN, 2000). No sistema imunológico age oxidando as células-alvo de forma letal, por isso é produzido de forma significativa enquanto ocorre a resposta inflamatória por macrófagos ou por outras células do sistema imune. Sua forma de agir é liberando os íons metálicos das metalo-proteínas, contendo cobre e ferro, levando a formação de radicais hidroxila e oxigênio molecular, que possui considerável potencial oxidante (FERNANDES AC et al., 2013; BARRETO, CORREIA, 2005).

É considerada uma molécula de efeitos antagônicos devido a seu potencial tóxico e benéfico, dependendo da situação e concentração em que se encontra. É benéfica exercendo no corpo humano as funções citadas anteriormente, como modulador e auxiliando na resposta imune, e pode ser tóxica em caso do organismo apresentar um quadro de deficiência de sistemas anti-oxidantes, sob processo de geração de intermediários reativos de oxigênio, e em sistemas anti-oxidantes ineficientes, podendo se tornar uma molécula diretamente citotóxica. Por não ser uma molécula que o corpo humano armazena, o óxido nítrico só é produzido quando necessário no organismo. Ao invés de se ligar a específicos receptores de membrana plasmática, o óxido nítrico tem suas ações controladas pela difusão para o meio intracelular de seu alvo, e até hoje não é conhecido um mecanismo de desativação, por isso, no sistema nervoso, a molécula de óxido nítrico possui a função tanto de neurotransmissor, quanto de hormônio. Nesse sistema, o NO faz neurotransmissão classificada como não adrenérgico-não colinérgico em tecidos de contração e secreção (FORESI, 2017, BESSON-BARD et al., 2008; SCHMIDT, WALTER, 1994).

A molécula responsável pela catálise do óxido nítrico é a óxido nítrico sintase (NOS), uma hemoproteína da família citocromo p450-like, que possui uma família com três isoformas, que se definem de acordo com a sua caracterização molecular, são elas: neuronal (nNOS, NOS1), induzível (iNOS, NOS2) e a constitutiva do endotélio (ecNOS, NOS3). Respectivamente, seus pesos moleculares são aproximadamente 160 kDa, 130 kDa, e 135

kDa. Atualmente, compreende-se que as três isoformas de NOS são encontradas em uma vasta quantidade de tipos celulares e tecidos, além disso, descobriu-se, também, que uma mesma célula pode expressar mais de uma isoforma (GAO et al., 2017; WANG, MARSDEN, 1995).

O principal indutor da produção de NO no organismo é o interferon- γ (IFN), uma citocina que é comumente produzida pelas células T *helper*, que também é responsável pela produção de interleucinas. (CASTOLDI, 2016, BOGDAN et al., 2000).

Interleucinas (IL) são citocinas proteicas com várias funções no organismo, dentre as quais inclui-se a proliferação de células, maturação, migração e adesão. Estruturalmente, as interleucinas se dividem em duas classes: I e II, as de classe I apresentam uma estrutura composta por quatro hélices conhecida como *four-helix bundle*. As de classe II possuem um padrão similar, se diferenciando na quantidade de hélices, podendo conter seis, o até mesmo sete hélices (BROCKER et al., 2010).

Funcionalmente, as interleucinas são divididas em muitas famílias, e a interleucina 12 (IL-12) tem como principal função a regulação da resposta imune adaptativa mediada por células, além de auxiliar na diferenciação das células TH1 e age também como um fator antiangiogênico (DEL VECCHIO, et al., 2007). Estruturalmente, a IL-12 é considerada uma molécula heterodímera composta de duas cadeias, P40 e P35. O IL-12 é também um potente indutor de produção de interferon- γ por células T, NK, entre outros tipos, além de influenciar na diferenciação das células T *helper* 1 (Th1). Outra importante função da IL-12 é a sua função na defesa do organismo contra bactérias e infecções de parasitas intracelulares, graças a seu papel indutor da célula Th1 (DAMBUZA, 2017, TRINCHIERI ET AL, 2003). Devido à seu papel de aumentar a citotoxicidade de células NK, essa citocina é utilizada em tratamentos de câncer. Após tratamentos utilizando a IL-12 em ratos com tumores, foi notada uma regressão dos tumores (KATIYAR et al., 2017; BRUNDA, LUISTRO, WARRIER, et al., 1993). A transdução de sinal da IL-12 se dá quando há a ligação com o receptor de IL-12, que é um receptor heterodímero formado por IL-12R β 1 e IL-12R- β 2. O IL-12R β 2 é o responsável por ativar as células T e estimular as células Th1 a produzirem suas citocinas. Quando ocorre a ligação, o IL-12R- β 2 se torna tirosina fosforilado e oferece sítios de ligação para quinases as Tyk2 e Jak2. Essas quinases são importantes pois ativam as proteínas de transcrição, como as STAT4. Essa via é conhecida como a via JAK-STAT (WANG, FRANK, RITZ, 2000).

Devido a sua influência para com as funções das células Th1, a IL-12 está muito relacionada com a auto-imunidade, isso foi notado após tratamentos com IL-12 serem feitos

com pessoas que sofrem de doenças auto-imunes terem seu quadro piorado (TEMBLAY, et al., 2007). Dentre as células responsáveis pela síntese de interleucina, destaca-se o macrófago.

Os macrófagos são células cuja principal função é fagocitar microorganismos invasores, através da liberação de enzimas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de várias outras citocinas que atuam nas células que cobrem os vasos sanguíneos, estimulando o recrutamento de outros monócitos, que futuramente se diferenciarão em macrófagos, e outros leucócitos. Além disso, os macrófagos são responsáveis pela apresentação de antígenos, que ocorre após a fagocitose e exposição do antígeno na membrana do macrófago. Essa exposição ajuda as células T a reconhecerem os antígenos que possuem aquela mesma composição e recruta células próprias para o combate a ele (ABBAS, LICHTMAN, 2015). Devido a essas funções, os macrófagos são componentes fundamentais da resposta imune inata, a primeira linha de defesa do organismo, importante em casos de inflamação e da presença de patógenos (PAUWELS, 2016, AKIRA, 2006). A resposta imune inata é mediada por proteínas conhecidas como receptores de reconhecimento de padrões, que fazem o reconhecimento de componentes da membrana de certos organismos invasores, como as bactérias gram-negativas, que possuem uma grande quantidade de lipopolissacarídeos (LPS) em sua membrana (ROSADINI, 2017).

Os LPS são de grande importância em testes de resposta imune para novos compostos, pois eles são integrantes fundamentais da membrana de bactérias gram-negativas (TARTEY, 2017, TAKEUCHI et al., 1999), além de induzir a adesão de moléculas em células endoteliais, o que permite a aderência de monócitos (QUINTAR, 2017, CUSHING et al. 1990), e pode estimular a liberação de agentes quimiotáticos de monócitos por macrófagos e células endoteliais (MINA-OSORIO, 2017, FUNK et al., 1993).

2. Justificativa

O ácaro *D. pteronyssinus* é considerado cosmopolita, logo está presente em praticamente todo lugar do mundo que apresente poeira. Alguns estudos mostram que grande parte da população possui condições de sofrer uma sensibilização a ponto de desenvolver uma alergia, portanto, existe interesse em desenvolver um estudo sobre as suas influências de seus peptídeos derivados, Der p 2 e Der p 23, em macrófagos.

3. Hipótese

Os peptídeos derivados das moléculas Der p 2 e Der p 23 influenciam na produção de citocinas importantes na resposta imune, como o óxido nítrico e a IL-12.

4. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de peptídeos derivados das moléculas de Der p 2 e Der p 23 na produção de citocinas relevantes na reação alérgica, por macrófagos Raw 264.7 induzidos por lipopolissacarídeos.

4.1. Objetivos específicos

1. Cultivar os macrófagos Raw 264.7.
2. Inocular os macrófagos Raw 264.7 com Der p 23 e realizar a dosagem de NO.
3. Inocular os macrófagos Raw 264.7 com Der p 2 e Der p 23 e dosar a IL-12.

5. Materiais e métodos

5.1. Cultura de macrófagos

Os macrófagos utilizados neste experimento são da linhagem RAW 264.7 de camundongos, estes obtidos anteriormente da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). As células foram preservadas em nitrogênio líquido, processo conhecido como criopreservação, em solução de congelamento composta por meio DMEM suplementado com 10% Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro bovino fetal (SBF). O processo de estimulação *in vitro* consiste nas células sendo descongeladas à temperatura ambiente, e posteriormente sendo expandidas em duas garrafas de cultura celular de 750cm² (Corning Glass Workers – New York – USA) em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), estes mantidos em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ à 37°C.

Em seguida, o meio RPMI das garrafas foi descartado, devido a formação de uma monocamada de células. Posteriormente, foram adicionados 15ml de RPMI, e as células que continuaram aderidas à superfície dos frascos foram destacadas através de raspagem com suporte plástico (Cell Scraper – Corning Glass Workers – New York – USA). O meio contendo as células foi realocado em dois tubos esterilizados de 50ml. Os frascos passaram em seguida pelo processo de centrifugação à 15000 rpm por 10 minutos, visando separar as

células do meio. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 10ml de RPMI em cada um dos tubos contendo as células.

5.2. Ensaio de cultura de células

Nos ensaios para detecção de citocinas induzidas por Der p 2 e Der p 23, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem RAW264.7, obtidos comercialmente da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). As células foram cultivadas na presença de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (DMEM-10% SFB) e mantidas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

Células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços (1x 10⁵ células / 200 µL / poço) em meio completo e incubadas a 37°C / 5% de CO₂. Após 24 horas, os estímulos foram adicionados na cultura de células nas seguintes condições: Der p 2 (1,0; 5,0 e 10,0 µg / mL); Der p 23 (1,0; 5,0 e 10,0 µg / mL); Der p 2 (1,0; 5,0 e 10,0 µg / mL) com LPS 10 µg / mL; e Der p 23 (1,0; 5,0 e 10,0 µg / mL) com LPS (10 µg / mL) BSA (5,0; 10,0 µg / mL) com LPS (10 µg / mL); e BSA (5,0; 10,0 µg / mL). Após 72 horas de incubação, o sobrenadante das células foi coletado para quantificação de óxido nítrico (NO) e IL-12.

5.3. Dosagem de óxido nítrico

Na dosagem de NO, foi necessário o uso da curva padrão, confeccionada com diferentes concentrações de nitrato de sódio (Na₂NO₃). A curva se iniciou em 200µM de Na₂NO₃ e foi feita dupla diluição seriada utilizando o próprio meio de cultura. Em seguida, 50µL de cada amostra e da curva foram colocadas em placas de 96 poços, que foram adicionadas, seguidamente, de 50µL de Reagente de Griess (Sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 2,5% e NEED A 0,1% em H₃PO₄ a 2,5%) junto das amostras. A leitura das amostras foi realizada à 570nm, e após obtenção dos valores da densidade óptica, a concentração de cada amostra foi obtida utilizando esses dados por meio do software *Microplate Manager*. Os valores de absorbância serão convertidos em concentração de NO com base na curva padrão.

5.4. Dosagem de IL-12

Uma placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de captura para IL-12 numa solução com tampão de fosfato de sódio a 0,2M (pH=6,5), e a proporção anticorpo de captura utilizada foi de 1/250. Cada poço utilizado recebeu 50µL e foi feita incubação na placa "overnight" à temperatura de 4°C. Após a sensibilização da placa, a mesma foi ser lavada por três vezes utilizando PBS-Tween (0,05%) e bloqueada com soro fetal bovino - SFB 10%.

Para efeito de comparação, foi feita uma curva se iniciando à 2000 pg/mL em diluição dupla seriada, onde cada ponto foi adicionado à placa junto das amostras e de cada ponto da curva, com cada poço recebendo 50µL. A incubação foi feita por duas horas à temperatura ambiente, e passadas as duas horas, cada poço foi lavado, novamente, com PBS-T por cinco vezes.

Após a lavagem, foi adicionado o anticorpo de detecção numa proporção 1:1000, com estreptavidina – peroxidase numa proporção 1:250 em PBS + SFB 10%, e cada poço recebeu 50µL, e a incubação realizou-se no escuro por uma hora à temperatura ambiente, a lavagem foi feita por sete vezes, também utilizando PBS-T.

Cada poço, em seguida, recebeu 50µL de TMB, que foi incubado por meia hora, também a temperatura ambiente, e também no escuro. Posteriormente, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico (2N), com 25µL por poço.

A leitura da placa foi feita em dois comprimentos de ondas diferentes, à 450nm e 570nm, e para obter a concentração, um valor foi subtraído do outro.

6. Resultados

6.1. Expressão de NO por Der p 23.

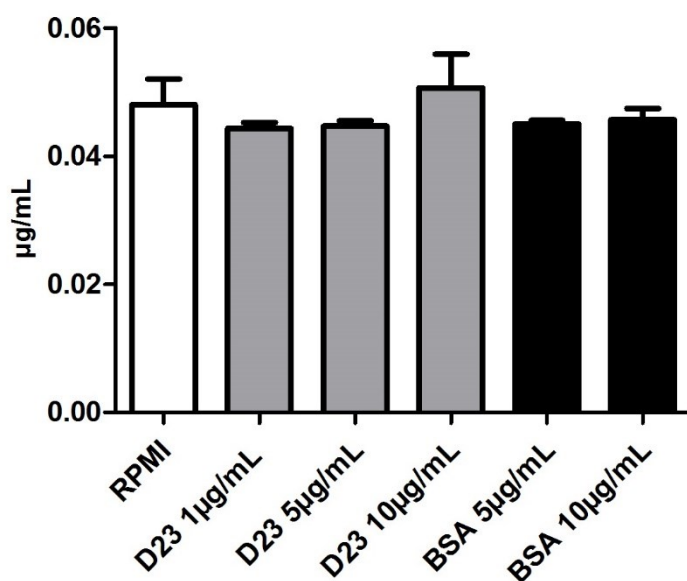


Figura 1. - Produção de NO nos grupos contendo os peptídeos e a BSA

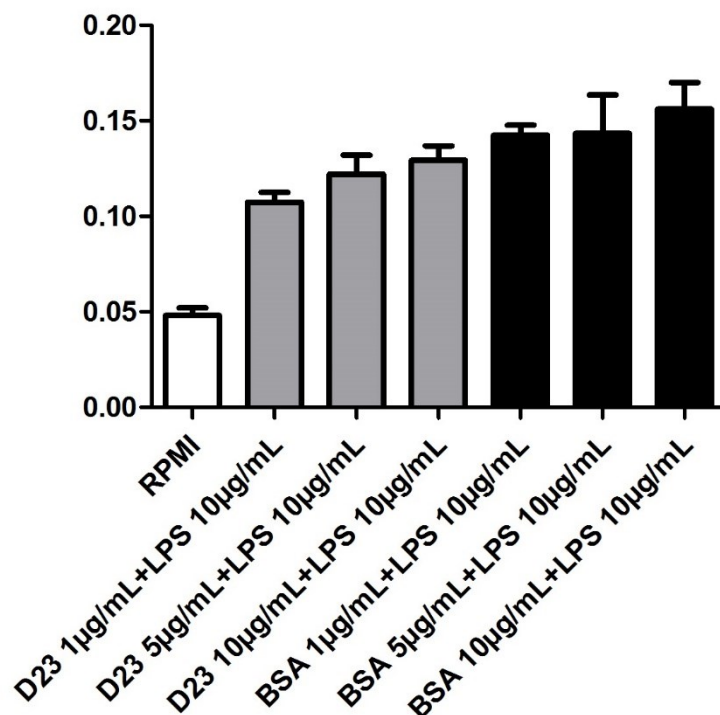


Figura 2 - Produção de NO das amostras ativadas por LPS

De acordo com as figuras 1 e 2, é possível observar que as amostras contendo apenas os peptídeos da Der p 23 nas diluições de 1µg/mL e 5µg/µL não apresentaram uma expressão significativa de óxido nítrico, assim como a amostra contendo apenas RPMI, o controle negativo. Na amostra contendo, também, apenas a Der p 23, porém na diluição de 10µg/ml, detectou-se uma pequena expressão de óxido nítrico, apresentando uma média das amostras em triplicata totalizando 0,05 µg/µL, a primeira concentração significativa dentre as amostras. Seguidamente, houve um aumento considerável na expressão de óxido nítrico nas amostras que continham LPS junto das diluições do peptídeo. A primeira amostra, contendo o peptídeo na proporção de 1µg/mL juntamente com LPS na concentração de 10µg/mL, apresentou uma média de concentração de 0,107µg/ml. A amostra contendo os peptídeos derivados da Der p 23 à 5µg/mL em adição com o LPS à 10µg/mg, apresentou uma média de expressão de óxido nítrico de 0,122µg/mL. A amostra que continha a Der p 23 à 10µg/mL conjugada com LPS à 10µg/mL, apresentou uma média de 0,129µg/mL. O próximo conjunto de amostras não continham a Der p 23, dessas vez foram conjugados o BSA (soro albumina bovina) em concentrações crescentes, juntamente com LPS em concentrações fixas de 10µg/mL. A primeira desse conjunto de amostras continha BSA à 1µg/mL juntamente com a amostra de

LPS à 10µg/mL, e apresentou a concentração média de 0,142µg/mL. A amostra seguinte continha BSA à 5µg/mL conjugada com 10µg/mL de LPS, e apresentou uma média de 0,143µg/mL na expressão de óxido nítrico. A amostra seguinte continha BSA concentrada em 10µg/mL e LPS também a 10µg/mL, e expressou uma média de 0,156µg/mL. As duas últimas amostras continham apenas BSA concentrada em 5µg/mL e 10µg/mL, e não apresentaram concentrações significativas de óxido nítrico.

6.2. Expressão de IL-12

6.2.1. Der p 2

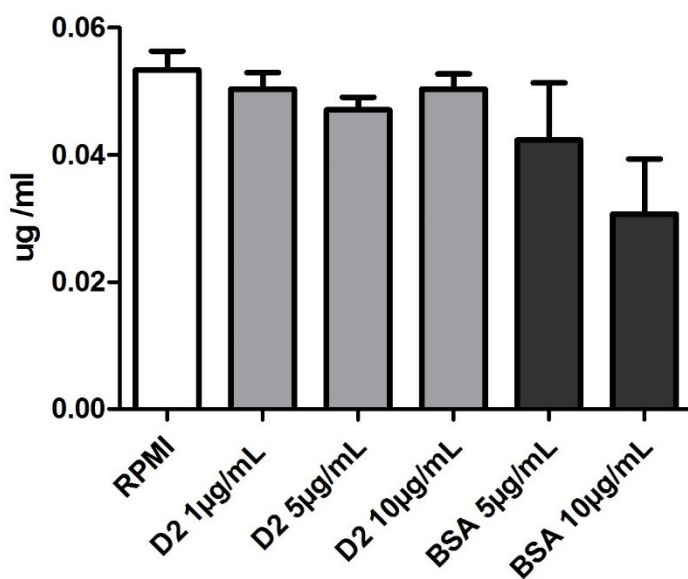


Figura 3 - Produção de IL-12 nas amostras sem a ativação por LPS

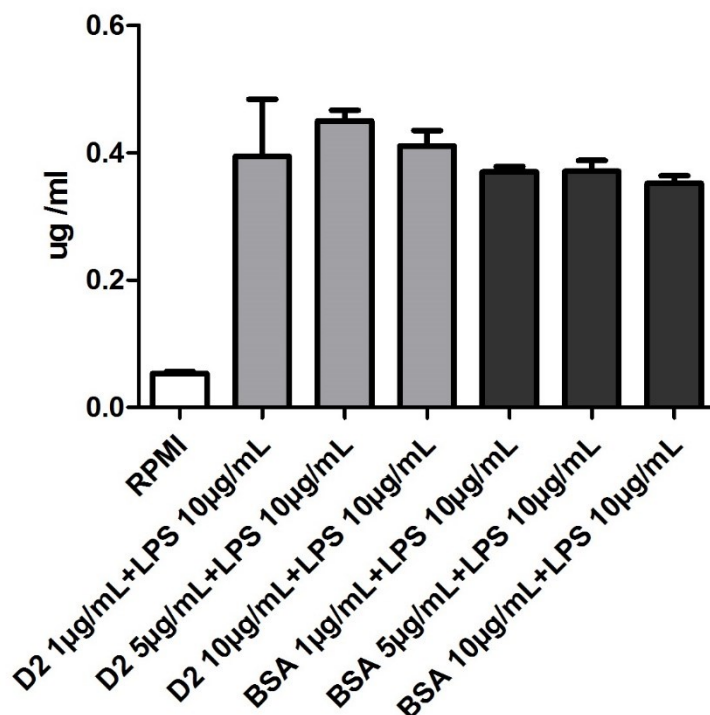


Figura 4 - Produção de IL-12 em macrófagos ativados por LPS

Interpreta-se nas figuras 3 e 4 que as leituras de concentrações das amostras foram feitas em dois comprimentos de onda distintos: 570 nm e 450 nm, em seguida foram subtraídos os resultados de ambas as leituras, e feita uma média entre as amostras em triplicata. As amostras contendo apenas os peptídeos da Der p 2 nas concentrações de 1µg/µL, 5µg/µL e 10µg/µL não apresentaram nenhum tipo de expressão significativa de de IL-12, bem como o controle negativo, que continha apenas RPMI. Os resultados começaram a ser notáveis a partir das amostras conjugadas com LPS numa concentração fixa de 10µg/mL e a própria Der p 2 em diluições crescentes. A amostra contendo 1µg/mL conjugada com 10µg/mL de LPS apresentou uma média de concentração de 0,394 µg/mL. A concentração da amostra seguinte era de 5 µg/mL de Der p 2 com 10 µg/mL de LPS, e apresentou uma concentração média de 0,449 µg/L. A amostra contendo 10 µg/µL combinada com 10 µg/µL de LPS apresentou uma concentração média de 0,411 µg/µL.

O conjunto de amostras seguintes continham BSA em concentrações crescentes, conjugados com LPS em concentração fixa de 10 µg/µL. A primeira amostra, contendo 1 µg/µL de BSA e 10 µg/µL de LPS. A amostra seguinte continha 5 µg/µL de BSA conjugada

com 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de LPS, e apresentou uma expressão de IL-12 quase idêntica a primeira, também apresentou uma média de 0,370 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A última amostra desse conjunto, apresentava uma concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA e 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de LPS.

As amostras contendo BSA nas concentrações de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ conjugadas juntamente com LPS fixo à 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, não expressaram nenhuma concentração significativa de IL-12.

6.2.2. Der p 23

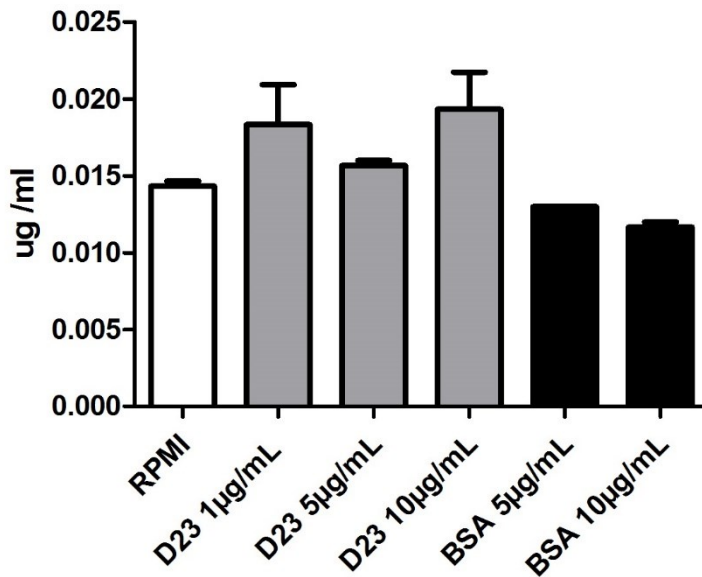


Figura 5 - Produção de IL-12 em macrófagos não ativados por LPS

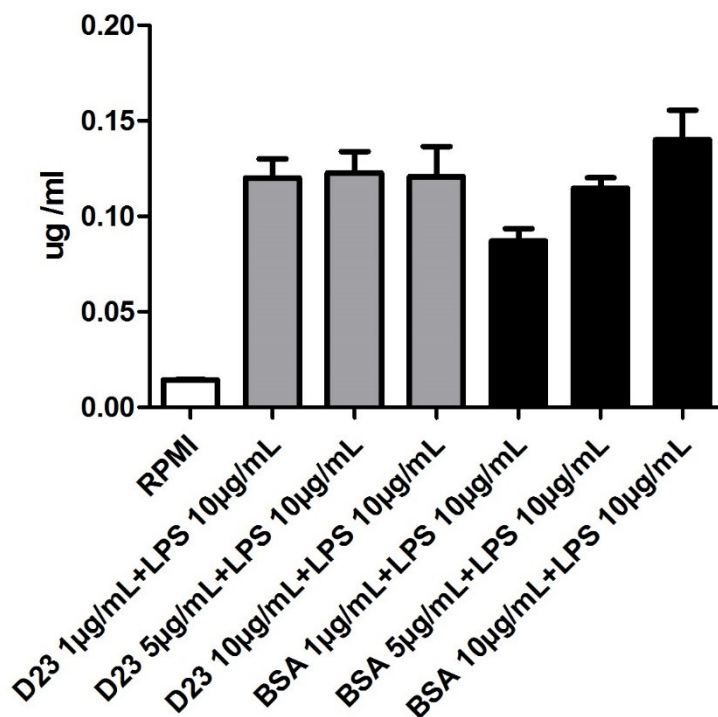


Figura 6 - Produção de IL-12 em macrófagos ativados por LPS

Seguindo o mesmo padrão de interpretação de resultados das amostras do experimento anterior, esse conjunto de amostras (figuras 5 e 6) começou com a Der p 23 em concentrações crescentes de 1 µg/µL, 5 µg/µL e 10 µg/µL, e não apresentaram nenhum valor significativo, juntamente com seu controle negativo, contendo apenas RPMI. O próximo conjunto de amostras continha, novamente, concentrações crescentes de Der p 23, conjugadas com LPS em concentração fixa de 10 µg/µL. A primeira amostra do conjunto, contendo 1 µg/µL juntamente com o LPS a 10 µg/µL, apresentou uma média de 0,120 µg/µL. Seguidamente, a amostra contendo a Der p 23 à 5 µg/µL conjugada com 10 µg/µL de LPS, apresentou uma média de 0,122 µg/µL. A amostra contendo 10µg/µL de Der p 23 e 10 µg/µL de LPS expressou na concentração média de 0,120 µg/µL.

O próximo conjunto de amostras continha BSA em concentrações de 1µg/µL, 5 µg/µL e 10 µg/µL, conjugadas com LPS à 10 µg/µL. A primeira amostra, contendo 1 µg/µL de BSA e LPS a 10 µg/µL apresentou média de 0,087 µg/µL. A segunda amostra do conjunto, contendo BSA diluída à 5 µg/µL e LPS à 10 µg/µL, apresentou uma concentração média de 0,114 µg/µL. A última amostra do conjunto, contendo BSA diluída à 10 µg/µL e LPS também à 10 µg/µL, expressou uma concentração média de 0,140 µg/µL.

O último conjunto, contendo BSA em concentrações de 5 µg/µL e 10 µg/µL, conjugados com LPS à 10 µg/µL, não apresentou nenhuma expressão significativa de IL-12.

7. Discussão

Macrófagos são células consideradas heterogêneas devido à suas diferentes formas de adaptação para cada tipo de estímulo recebido, polarizando-se em macrófagos do tipo 1 (M1) e macrófagos do tipo 2 (M2) (SALIBA, 2016, BENOIT et al., 2008).

Os macrófagos do tipo M1, ou macrófagos inflamatórios, são induzidos por IFN γ , ou combinados com estímulo de micróbios ou citocinas. Em geral, possuem fenótipo IL-12^{high}, IL-23^{high}, IL10^{high}, são grandes produtoras de moléculas efetoras, como intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, NO, NOS2 e citocinas inflamatórias. Contribuem como células indutoras e efetoras em respostas Th1 polarizadas, e mediam resistência contra tumores e parasitas celulares. Outra importante função dos macrófagos M1 é a alta produção de proteínas envolvidas no armazenamento de ferro, tal como a ferritina, e baixos níveis de expressão de proteínas como a ferroportina, uma proteína envolvida na exportação de ferro pra outras regiões do corpo (MANTOVANI et al., 2013).

Os macrófagos do tipo M2, ou desativados, possuem fenótipo IL-12^{low}, IL-23^{low} e IL-10^{high}, com variável potencial de produção de citocinas inflamatórias, catecolaminas, que são proteínas que regulam a termogênese adaptativa, quimiocinas do tipo CCL17, CCL22 e CCL24; e diferentemente do fenótipo M1, não expressam NO, porém expressam altos níveis de arginase 1, que é um importante catalisador da produção de poliaminas, que participam da síntese de colágeno, proliferação de células e fibrose. Esse fenótipo possui altos níveis de receptores de manose, galactose e *scavenger-type*. Também participam na resposta Th2 polarizada, e na depuração de parasitas, na redução da inflamação, imunoregulação, e promoção da remodelagem de tecidos. Essas funções demandam um suprimento de energia contínua, e essa demanda é conquistada através do metabolismo oxidativo de glucose. Contrastando com o macrófago M1, os macrófagos M2 produzem baixos níveis de ferritina e altos níveis de ferroportina (MANTOVANI et al., 2013). Uma das principais células a estimular o fenótipo M2 do macrófago é a célula T *helper*, especificamente a do tipo 2, através da produção das citocinas IL-4 e IL-13, que são muito importantes no desencadeamento de reações alérgicas (HUANG, 2017, SCOTT et al., 1988).

A alergia é caracterizada pela resposta dos anticorpos IgE após a exposição à antígenos ingeridos, inalados ou injetados. Em condições naturais, a exposição a doses

consideravelmente baixas, pessoas com alergias atópicas se valem do anticorpo IgE para responder a diversos alérgenos presentes em componentes do cotidiano, como grãos de pólen, esporos de fungos, pêlos de animal, entre outros, e essa exposição direta a esses antígenos favorece ao sistema imune, pois há o contato direto entre o antígeno com as células B, produtoras de IgE, localizadas no trato respiratório superior, imunizando o corpo naturalmente (ZHU, 2017, MARSH et al., 1981). As alergias atópicas, dentre elas incluem-se a asma e a dermatite atópica (AD) são as duas mais incidentes e comuns desordens crônicas (BHADOURIYA, 2017, SANDFORD, 1993).

Os alérgenos originados dos ácaros domésticos compreendem uma das mais importantes variedades de todas, aproximadamente 50% da população possui sensibilidade a esse tipo (VRTALA et al., 2015).

O ácaro *D. pteronyssinus* é uma das mais comuns fontes de alérgenos aéreos, induzindo reação alérgica em aproximadamente 20% da população de países industriais (GREGORY, LLOYD, 2006), tendo como um de seus derivados mais importantes a Der p 2 (figura 7), por ser considerada um dos alérgenos mais potentes, no que se diz respeito a sensibilização de pacientes (MOINGEON, 2014), juntamente com a Der p 23 (figura 8), um alérgeno que recentemente adquiriu grande relevância. Na Europa, 74% dos pacientes testados desenvolveram sensibilidade a Der p 23 (WEGHOFER, 2013).

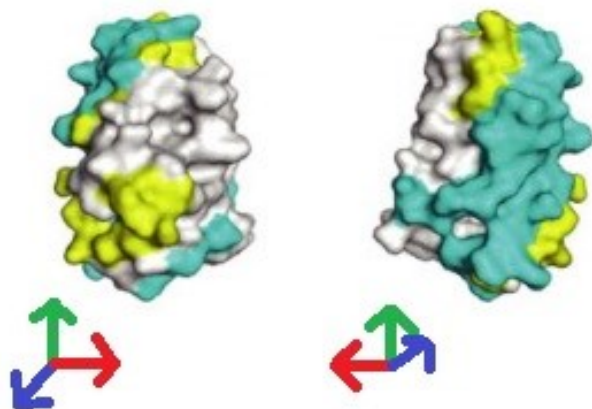


Figura 7- Estrutura Der p 2 - setas indicam as posições da molécula (Adaptado de: Chen et al., 2012. Disponível em DOI:10.1111/j.1398-9995.2012.02794.x)

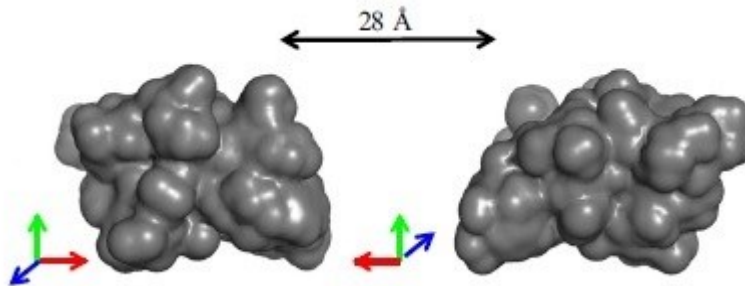


Figura 8- Estrutura Der p 23 - setas indicam as posições da molécula (adaptado de: Mueller et al., 2016. Disponível em doi: 10.1111/cea.12680)

Devido a vasta disposição desses alérgenos, e seu grande impacto em desenvolver sensibilidade em grande parte de quem acaba se expondo a eles, o estudo foi desenvolvido embasado em peptídeos derivados dessas moléculas, levando em conta seus níveis de expressão de óxido nítrico e interleucina 12 em macrófagos estimulados com LPS.

Outros estudos já foram realizados nesses mesmos parâmetros, utilizando outros estímulos. A pneumolisina, uma toxina da família “tiol-ativada”, é um importante fator de virulência de *Streptococcus pneumoniae*, e foi utilizada por BRAUN et al. (1999) para estimular macrófagos e analisar sua expressão de óxido nítrico, e demonstrou que a pneumolisina pode induzir iNOS, resultando na produção de NO. Essa indução foi feita através da ausência de IFN- γ exógeno em macrófagos murinos RAW 264.7. Chegando à conclusão de que a pneumolisina é a principal indutora de expressão de NO em macrófagos.

Neste contexto, um estudo foi realizado (MACÊDO JÚNIOR, 2010) com macrófagos, também murinos, analisou sua resposta imune à proteína de superfície SAG2A recombinante do parasita *Toxoplasma gondii*, e demonstrou que a produção de IL-12 e NO foi reduzida significativamente.

Os resultados deste estudo evidenciaram que os peptídeos derivados das moléculas Der p 2 e Der p 23, por si só, não influenciaram significativamente a secreção dessas citocinas, bem como as amostras contendo apenas soro albumina bovina, que foram utilizadas como controle negativo. Entretanto, os níveis de óxido nítrico e interleucina 12 foram detectados em níveis expressivamente maiores em amostras onde havia a presença de LPS. O estudo realizado por MACÊDO JUNIOR (2010) envolvendo as proteínas recombinantes de *T. gondii* tiveram importância comparativa com esse trabalho, pois ilustrou como funciona um controle de expressão de macrófago onde há redução na produção de citocinas citocinas na presença de determinado agente estimulante. Em contrapartida, o trabalho realizado por BRAUN et al. (1999) demonstrou como a expressão dessas mesmas citocinas podem aumentar caso haja um indutor específico.

8. Conclusão

Futuros estudos envolvendo peptídeos derivados de outras partes da Der p 2 e da Der p 23 devem ser realizados para uma melhor compreensão dos efeitos dessas moléculas tão importantes no quesito da sensibilidade.

9. Referências

ABBAS AK, LICHTMAN AH; **Imunologia Celular e Molecular** – 8ª Edição, página 62 – 478, 2015.

AKIRA, SHIZUO, ET AL. “Pathogen Recognition and Innate Immunity”. **Cell**, vol. 124, no 4, fevereiro de 2006, p. 783–801.

ARRUDA LK, RIZZO MC, CHAPMAN MD, et al.. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental allergy**, v. 21, p. 433-439, 1991.

BARRETO RL, CORREIA CR, MUSCARÁ MN. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, p. 1046-1054, 2005.

BENOIT M, DESNUES B, MEGE JL. Macrophage polarization in bacterial infections. **The Journal of immunology**. v. 181, p. 3733-3739, 2008.

BERLINER JA, TERRITO MC, SEVANIAN A, et al.. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions, **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 1260-1266, 1990.

BESSON-BARD A, PUGIN A, WENDEHENNE D. New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59 p. 21-39, 2008.

BEYER K, NIGGEMANN B, NASERTA S. Severe allergic reactions to foods are predicted by increases of CD4+CD45RO+ T cells and loss of L-selectin expression, **The Journal of allergy and Clinical Immunology**, v. 99, p. 552-529, 1997.

BHADOURIYA, SUNIL KUMAR SINGH, ET AL. “Comparative clinical evaluation of effect of topical verses systemic anti -allergic drug in allergic rhinitis: a prospective study”. **International Journal of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery**, vol. 4, P. 141, 2017.

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. & DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**. V. 173 p. 17-26, 2000.

BRAUN JS, RODGER N, GAO G, et al.. Pneumolysin, a Protein Toxin of *Streptococcus pneumoniae*, Induces Nitric Oxide Production from Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 67 p. 3750-3756, 1999.

BROCKER C, THOMPSON D, MATSUMOTO A, et al.. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. **Human Genomics**, v.5, p. 30-55, 2010.

BRUNDA MJ, LUISTRO L, WARRIER RR, Et al.. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 1223-1230, 1993.

CASTOLDI, ANGELA, ET AL. “The Macrophage Switch in Obesity Development”. **Frontiers in Immunology**, vol. 6, 2016.

CARABALLO, LUIS, ET AL. “Particularities of Allergy in the Tropics”. **World Allergy Organization Journal**, vol. 9, no 1, dezembro de 2016.

CHEN KW, FOCKE-TEJKL M, BLATT K, et al.. Carrier-bound nonallergenic Der p 2 peptides induce Ig antibodies blocking allergen-induced basophil activation in allergic patients. **Allergy**. 2012.

CHRUSZCZ M, CHAPMAN MD, VAILES LD et al.. Crystal Structures of Mite Allergens Der f 1 and Der p 1 Reveal Differences in Surface-Exposed Residues that May Influence Antibody Binding. **The Journal of Molecular Biology**. V 386, p. 520-530, 2009.

CRUZ AA, CAMPOS CA, JACOB CM, et al.. II CONSENSO BRASILEIRO RINITES. **Revista Brasileira de alergia e imunopatologia**. v. 29, p.29-58, 2006

CUSHING SD, BERLINER JA, VAIENTE AJ, et al.. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 87, p. 5134-5138, 1990.

DAMBUZA, IVY M., ET AL. “IL-12p35 Induces Expansion of IL-10 and IL-35-Expressing Regulatory B Cells and Ameliorates Autoimmune Disease”. **Nature Communications**, vol. 8, no 1, p 719, 2017.

DEL VECCHIO M, BAJETTA E, CANOVA S, et al.. Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. **Clinical Cancer Resolutions**, v. 13 p. 4677-4685, 2007.

FERNANDES AC, PINTO ML, ANTUNES F, PIRES J. Clay based materials for storage and therapeutic release of nitric oxide. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, p. 3287-3294, 2013.

FORESI, NOELIA, ET AL. “Synthesis, Actions, and Perspectives of Nitric Oxide in Photosynthetic Organisms”. **Nitric Oxide, Elsevier**, 2017, p. 125–36, 2017.

FLORA FILHO R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265-271, 2000.

FUNK JL, FEINGOLD KR, MOSER AH, GRUNFELD C. Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation. **Atherosclerosis**, v. 98, p. 67-82, 1993.

GAO J, WANG M, WEI L, et al.. The Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism is Associated with the Susceptibility to Immunoglobulin a Nephropathy in Chinese Population. **Kidney & Blood Pressure Research**, v. 42, p. 608-616, 2017.

GREGORY LG, LLOYD CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. **Trends in Immunology**, v. 32, p. 402–411, 2011.

HUANG, EMILY, ET AL. “Calcium Mobilizing Treatment Acts as a Co-Signal for TLR-Mediated Induction of Interleukin-12 (IL-12p70) Secretion by Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells”. **Cellular Immunology**, vol. 314, P. 26-35, 2017.

HUANG HW, LUE KH, WONG RH, et al.. Distribution of allergens in children with different atopic disorders in central Taiwan. **Acta Paediatrica Taiwanica**, v 47, p 126-134, 2006.

KATIYAR SK, PAL HC, PRASAD R. Dietary proanthocyanidins prevent ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer through enhanced repair of damaged DNA-dependent activation of immune sensitivity. **Seminars in Cancer Biology**, v. 46, p. 138-145, 2017.

KLEINJAN A, GODTHELP T, TOORNENENBERGEN AW, FOKKENS WJ. Allergen binding to specific IgE in the nasalmucosa of allergic patients. **Journal of allergies**, v. 99, p. 515-521, 1997.

KRANTZ GW, WALTER DE. A Manual of acarology. 3a ed. P. 235, 2009.

LIMA FF, MAZZOTI DR, TUFIK S, BITTENCOURT L. The role of inflammatory response genes in obstructive sleep apnea syndrome: a review. **Sleep breath**, v. 20, p. 331-338, 2015.

MARSH DG, MEYERS DA, BIAS WB. The Epidemiology and genetics of atopic allergy. **The New England Journal of Medicine**, v. 305, p. 1551-1559, 1981.

MACEDO JUNIOR AG, CUNHA-JÚNIOR JP, CARDOSO THS, et al.. SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. **Parasites & Vectors**, v. 6, 2013.

MCCONNELL, THOMAS H. (2007). The Nature of Disease: Pathology for the Health Professions. Baltimore, Mar.: Lippincott Williams & Wilkins. p. 159.

MINA-OSORIO, PAOLA,. Next-Generation Therapies and Technologies for Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Springer International Publishing**, 2017.

MOINGEON P. Progress in the development of specific immunotherapies for house dust mite allergies. **Expert Review of Vaccines** v. 13 p. 1463–1473, 2014.

MUELLER GA, RANDALL TA, GLESNER J et al.. Serological, genomic and structural analyses of the major mite allergen Der p 23. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 46, p. 365-376, 2016.

OLIVIER CE, LIMA RP, SANTOS RA. Imunorreatividade tardia não mediada IgE a ácaros da poeira doméstica demonstrada por teste de inibição da aderência do leucócito e por prova de provocação nasal. **Revista Multidisciplinar da Saúde**. v. 5 p. 79-88, 2011.

PAUWELS, ANNE-MARIE, ET AL. “Patterns, Receptors, and Signals: Regulation of Phagosome Maturation”. **Trends in Immunology**, vol. 38, no 6, junho de 2017, p. 407–22.

QUINTAR, AMADO, ET AL. “Endothelial Protective Monocyte Patrolling in Large Arteries Intensified by Western Diet and Atherosclerosis Novelty and Significance”. **Circulation Research**, vol. 120, no 11, maio de 2017, p. 1789–99.

RONDON C, CANTO G, BLANCA M. Local allergic rhinitis: a new entity, characterization and further studies. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**. V. 10, p. 1-7, 2010

ROSADINI, CHARLES V., E JONATHAN C. KAGAN. “Early Innate Immune Responses to Bacterial LPS”. **Current Opinion in Immunology**, vol. 44, fevereiro de 2017, p. 14–19.

SALIBA, ANTOINE-EMMANUEL, ET AL. “Single-Cell RNA-Seq Ties Macrophage Polarization to Growth Rate of Intracellular Salmonella”. **Nature Microbiology**, vol. 2, no 2, fevereiro de 2017. Crossref, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.206.

SANDFORD AJ, SHIRIKAWA T, MOFFAT MF, et al.. Localization of atopy beta subunit of high affinity IgR receptor (FceR1) on chromosome 11q. **Lancet** 1993, v. 341 p. 332-334, 1993.

SCHMIDT HW, WALTER U. NO at work. **Cell** v. 78 p. 919-925, 1994.

SCHULZ O, SEWELL HF, SHAKIB F. A sensitive fluorescent assay for measuring the cysteine protease activity of Der p 1, a major allergen from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology** v. 51 p. 222-231, 1998.

SCOTT P, NATOVITZ P, COFFMAN RL, et al.. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis: T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 168 p. 1675-1684, 1988.

SOH WT, MIGNON ML, SURATANNON N, SATITSUKSANO P, et al.. The House Dust Mite Major Allergen Der p 23 Displays O-Glycan-Independent IgE Reactivities but No Chitin-Binding Activity. **International Archives of Allergy and Immunology** v. 168 p. 150-160, 2015.

SUNDELL, J. “Reflections on the History of Indoor Air Science, Focusing on the Last 50 Years”. **Indoor Air**, vol. 27, no 4, p. 708–24, 2017.

TAKEUCHI O, HOSHINO K, KAWAI T, et al.. Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-positive Bacterial Cell Wall Components. **Immunity**, v. 11, p. 443-451, 1999.

TARTEY, SARANG, E OSAMU TAKEUCHI. "Pathogen Recognition and Toll-like Receptor Targeted Therapeutics in Innate Immune Cells". **International Reviews of Immunology**, vol. 36, no 2, p 57-73, 2017.

TEMBLAY JN, BERTELLI E, ARQUES JL, et al. 2007). Production of IL-12 by Peyer patch-dendritic cells is critical for the resistance to food allergy". **Journal of Allergy Clinical Immunology**. v. 120 p. 659–65, 2007.

TRINCHIERI G, PFLANZ S, KASTELEIN RA. The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses. **Immunity**, v.19, p. 641-644, 2003.

VOORHORST K, SPIEKSMATA FT, VAREKAMP H, et al.. The house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces. Identity with the house-dust allergen. **The Journal of Allergy**, v. 39 p. 325-339, 1967.

VRTALA S, HUBER H, THOMAS WR. Recombinant House Dust Mite Allergens. **Methods** v. 66 p. 67-74, 2014.

WANG KS, FRANK DA, RITZ J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. **Blood**.v. 95 p. 3183–3190, 2000.

WANG Y, MARSDEN, PA. Nitric oxide synthases: Biochemical and molecular regulation. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 4, p. 12-22, 1995.

WEGHOFER M, GROTE M, RESCH Y, et al.. Identification of Der p 23, a Peritrophin-like Protein, as a New Major *Dermatophagoides pteronyssinus* Allergen Associated with the Peritrophic Matrix of Mite Fecal Pellets. **The Journal of Immunology**, v. 190, p. 3059-3067, 2013.

ZHU, ZHAOZHONG, ET AL. "A Genome-Wide Cross-Trait Analysis from UK Biobank Highlights the Shared Genetic Architecture of Asthma and Allergic Diseases". **Nature Genetics**, vol. 50, no 6, p. 857–64, 2018.