

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Fernando Roberto Machado Cunha

**Avaliação do efeito de repertórios de IgG de indivíduos Não atópicos
ou atópicos sobre linfócitos T CD4+ y CD8+ periféricos de doadores
não atópicos**

São Paulo

2024

Fernando Roberto Machado Cunha

Avaliação do efeito de repertórios de IgG de indivíduos não atópicos ou atópicos sobre linfócitos T CD4+ y CD8+ periféricos de doadores não atópicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro — UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Jefferson Russo Victor
Coorientadora: Dra. Carolina Nunes França

**SÃO PAULO
2024**

C977a

Cunha, Fernando Roberto Machado

Avaliação do efeito de repertórios de IgG de indivíduos não atópicos ou atópicos sobre linfócitos T CD4 + y CD8 + periféricos de doadores não atópicos / Fernando Roberto Machado Cunha. - 2024.

25 p.: P & B.

Orientador: Prof. O Dr. Jefferson Russo Victor.

Co-orientador: Profa. A Dra. Carolina Nunes França.

Dissertação. (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Santo Amaro, 2024.

Bibliografia incluída.

1. IgG. 2. Atópica. 3. Alergia. I. Victor, Jefferson Russo. II. França, Carolina Nunes. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

CDD 616.01

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho fraterno Arthur Hideki Morimoto neuro divergente e meu companheiro, por todo o apoio e pela ajuda, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

A minha família, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período em que me dediquei a este trabalho.

Ao professor Dr. Jefferson Russo Victor foi meu orientador e tenho desempenhado tal função com dedicação, amizade, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do curso.

A professora Dra. Carolina Nunes França, por ter sido minha Coorientadora por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

Aos professores, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

A todos os voluntários que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

A todos os alunos da minha turma, pelo ambiente amistoso no qual convivemos e solidificamos os nossos conhecimentos, o que foi fundamental na elaboração deste trabalho de conclusão de curso.

À instituição de ensino Universidade Federal de São Paulo (USP), pelo fornecimento de dados e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho.

À instituição de ensino Universidade de Santo Amaro (UNISA), essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendi ao longo dos anos do curso.

RESUMO

INTRODUÇÃO:

Os anticorpos IgG, mesmo na ausência de uma infecção ou alergia, desempenham um papel complexo e ainda pouco compreendido na regulação do sistema imune. Sabe-se que indivíduos atópicos, propensos a desenvolver alergias, apresentam um repertório de IgG diferenciado. Este estudo busca entender como a IgG de indivíduos atópicos e não atópicos influencia a função de células T, um tipo de célula fundamental para a resposta imune.

Objetivo: O objetivo principal deste trabalho foi avaliar se a IgG de indivíduos atópicos e não atópicos poderia modular características e a produção de citocinas em células T CD4+ e CD8+, células-chave na resposta imune. **Metodologia:** Para alcançar esse objetivo, células T de indivíduos saudáveis foram cultivadas em presença de IgG purificada obtida de indivíduos atópicos e não atópicos. Através da citometria de fluxo, foram analisados marcadores de superfície celular e a produção de diversas citocinas nessas células T. **Resultados:** Os resultados demonstraram que a IgG de indivíduos não atópicos induziu um perfil de células T CD4+ com maior capacidade de resposta, caracterizado pelo aumento de marcadores associados à memória imunológica e pela produção de IFN- γ , uma citocina com papel importante na defesa contra infecções. Em contraste, a IgG de indivíduos atópicos não promoveu os mesmos efeitos. Nas células T CD8+, observou-se um efeito mais limitado da IgG, com destaque para a indução da produção de IL-22.

Conclusão: Os resultados deste estudo sugerem que a composição do repertório de IgG pode influenciar significativamente a função das células T, modulando a resposta imune e potencialmente contribuindo para o desenvolvimento de doenças alérgicas. Esses achados ampliam o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais a IgG atua na regulação do sistema imune.

Palavras-chave: IgG, atopia, alergia, células T CD4+, células T CD8+, IFN- γ , IL-22, citometria de fluxo.

ABSTRACT

Introduction

IgG antibodies, even in the absence of infection or allergy, play a complex and still poorly understood role in immune regulation. Atopic individuals, who are predisposed to developing allergies, have been shown to exhibit a distinct IgG repertoire. This study aimed to investigate how IgG from atopic and non-atopic individuals influences T cell function, a critical cell type in the immune response.

Objective :The primary objective of this study was to assess whether IgG from atopic and non-atopic individuals could modulate the characteristics and cytokine production of CD4+ and CD8+ T cells, key players in the immune response. **Methodology:** To achieve this objective, T cells from healthy individuals were cultured in the presence of purified IgG obtained from atopic and non-atopic individuals. Flow cytometry was employed to analyze cell surface markers and the production of various cytokines in these T cells. **Results:** The results demonstrated that IgG from non-atopic individuals induced a CD4+ T cell profile with a greater capacity for response, characterized by an increase in markers associated with immunological memory and the production of IFN- γ , a cytokine with an important role in defense against infections. In contrast, IgG from atopic individuals did not promote the same effects. In CD8+ T cells, a more limited effect of IgG was observed, with a notable induction of IL-22 production. **Conclusion:** The findings of this study suggest that the composition of the IgG repertoire can significantly influence T cell function, modulating the immune response and potentially contributing to the development of allergic diseases. These results expand our understanding of the mechanisms by which IgG acts in immune regulation.

Keywords: IgG, atopy, allergy, CD4+ T cells, CD8+ T cells, IFN- γ , IL-22, flow cytometry.

Lista de Abreviaturas e Siglas

1. IgG: Imunoglobulina G: Um tipo de anticorpo presente no sangue que desempenha um papel crucial no sistema imunológico, incluindo a regulação de respostas alérgicas.
2. OVA: Ovalbumina - Uma proteína encontrada na clara de ovo usada como antígeno em modelos de imunização.
3. IL: Interleucina Uma classe de proteínas que desempenham um papel fundamental na comunicação entre células do sistema imunológico.
4. IFN: Interferon - Uma proteína que desencadeia a resposta antiviral do sistema imunológico.
5. PBMCs: Células Mononucleares do Sangue Periférico - Células sanguíneas que incluem linfócitos, monócitos e células natural killer, desempenhando um papel essencial na resposta imunológica.
6. HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana - O vírus que causa a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).
7. HTLV: Vírus Linfotrópico de Células T Humanas - Um retrovírus que pode causar certas doenças, incluindo leucemia de células T.
8. SPT: Teste de Puntura Cutânea - Um teste usado para diagnosticar alergias, onde pequenas quantidades de alérgenos são aplicadas na pele.
9. CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - Documento utilizado em pesquisas científicas para submissão em comitês de ética.
10. SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio - Uma técnica usada para separar proteínas em um gel de Poliacrilamida.
11. ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - Uma técnica laboratorial usada para detectar a presença de anticorpos ou antígenos em uma amostra.
12. FMO: Fluorochrome Minus One - Uma técnica usada em citometria de fluxo para controle de qualidade.
13. RPMI: Meio de Roswell Park Memorial Institute - Um meio de cultura utilizado para o crescimento de células em laboratório
14. N-AT – Não Atópicos.
15. AT- Atópico

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	11
3. MÉTODOS	12
Amostras de Pacientes.....	12
4 RESULTADOS	17
5 DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS.....	24
ANEXO-A PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....	27

1. INTRODUÇÃO

O potencial dos anticorpos IgG para regular as alergias têm sido tema de discussão há várias décadas. No início da década de 1980, foram obtidas evidências conclusivas num modelo de imunização com ovalbumina murina (OVA), demonstrando que a IgG materna pode suprimir a produção de IgE na descendência¹. Estudos subsequentes revelaram que a transferência de alérgenos que reconhecem IgG materna, como pólen, epitélio de gato² ou antígenos dietéticos como OVA está associada à inibição da alergia em crianças durante os primeiros anos de vida. Além disso, verificou-se que a transferência passiva de IgG purificada durante a gravidez em ratos pode influenciar o fenótipo das células B da descendência³.

Os resultados dos estudos indicam variações no repertório de IgG transferido para a prole durante a gravidez entre indivíduos atópicos e não atópicos. As mães atópicas demonstraram a capacidade de transferir níveis mais elevados de IgG anti-Dermatophagoides pteronyssinus através do leite materno em comparação com mães não atópicas⁴. As crianças humanas atópicas também exibiram níveis séricos elevados de IgG anti alérgeno aos 2 anos de idade, em contraste com as crianças não atópicas⁵.

Numerosas investigações anteriores relataram que IgG purificada usada como terapia humana in vivo, especificamente imunoglobulina intravenosa (IVIg), pode modular a produção in vitro de citocinas, incluindo interferon (IFN)- γ , interleucina (IL)-10 e IL-12, por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e células do cordão umbilical⁶⁻⁸. As interações subjacentes responsáveis por este efeito modulador parecem estimular as células $\alpha\beta$ T periféricas através da ativação dos receptores de células T⁹. Descobertas recentes também demonstraram que a IgG humana pode permear diretamente a membrana celular de vários tipos de células, levando a interações intracelulares não completamente compreendidas¹⁰.

Esta evidência amplia os mecanismos potenciais de regulação mediada por IgG por meio de interações com células $\alpha\beta$ T. A hipótese imunológica recentemente proposta de “ganchos sem isca” sugere que os repertórios policlonais de IgG de diferentes grupos de doadores podem desempenhar papéis cruciais na modulação da função das células T e B do timo e periféricas¹¹.

Neste contexto, IgG policlonal de indivíduos com alergias, dermatite atópica, infecção por HIV e infecção por HTLV mostrou efeitos moduladores in vitro em vários linfócitos tímicos e periféricos, incluindo células T, células B, células $\gamma\delta$ T, células iNKT e células semelhantes a inatas. células (ILC) em humanos e camundongos ¹²⁻²⁰. Estes efeitos têm o potencial de influenciar a fisiopatologia destas doenças.

Considerando que estudos anteriores não exploraram um efeito comparável nas células T periféricas, a principal fonte de citocinas nos tecidos periféricos com potencial para governar o desenvolvimento e a gravidade das alergias mediadas por IgE, propomos uma avaliação abrangente. Esta avaliação visa determinar se IgG policlonal de doadores não atópicos e atópicos (alérgicos mediados por IgE) podem modular células T CD4 + y CD8 + periféricas. Estas investigações têm o potencial de fornecer insights sobre o desenvolvimento e regulação de ambas as condições.

2. OBJETIVO

Este estudo visa desvendar a complexa ação da IgG na ausência de antígeno, investigando como a IgG sérica de indivíduos atópicos e não atópicos influencia as características e a produção de citocinas em células T CD4 + e CD8+ de indivíduos saudáveis.

3. MÉTODOS

Amostras de Pacientes

De acordo com investigações anteriores realizadas pela nossa equipa de investigação^{17,21}, recrutamos dois grupos de voluntários: indivíduos não atópicos (nAT, n=17) e indivíduos atópicos (AT, n=21) com idades compreendidas entre os 19 e os 32 anos. Os critérios de inclusão para o grupo de controle nAT estipularam resultados negativos nos ensaios de imunoglobulina E (IgE) e nos testes cutâneos de puntura (SPT) para todos os alérgenos testados. Para o grupo AT, os critérios de inclusão incluíam níveis positivos de IgE, resultados positivos de SPT para pelo menos dois alérgenos testados e diagnósticos clínicos de manifestações alérgicas.

Os critérios de exclusão para os grupos nAT e AT incluíam eczema grave, dermatografismo e a utilização de quaisquer medicamentos que pudessem potencialmente influenciar os resultados dos SPTs.

Foram recolhidas amostras de sangue de todos os participantes no estudo, sendo os soros separados, agrupados e armazenados a -80°C. Além disso, obtivemos células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de doze indivíduos saudáveis não atópicos que não faziam parte do grupo de dadores de IgG não atópicos. Estas PBMCs foram utilizadas exclusivamente nas experiências de cultura para evitar a utilização de IgG-PBMCs autólogas. Antes do seu envolvimento, foi obtido o consentimento informado por escrito de cada participante. Além disso, nosso estudo recebeu aprovação ética do comitê local de revisão da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e da Universidade Sato Amaro, com os números de referência CAAE: 63361622.7.3001.0081.

3.2 Teste cutâneo de puntura (SPT)

Os testes cutâneos de puntura (SPT) foram realizados para categorizar os indivíduos nos grupos nAT e AT (grupos de controle), de acordo com as normas europeias^{21,22}. Utilizamos um painel adaptado de alergénios, incluindo o perfil de alergénios brasileiros, tais como *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides Pteronyssinus*, *Aspergillus fulmigatus*, *Penicillium notatum*, *Alternaria Alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Blatella germânica*, *Periplaneta americana*, *Amieiro*, *Bétula*, *Avelã*, *Centeio cultivado*, *Galinha*, *Canário*, *Gato* e *Cão*. Conforme descrito

anteriormente ¹⁶, foi aplicada uma única gota de cada extrato de alérgeno, histamina (utilizada como controle positivo) ou o diluente de alérgeno (controle negativo) do IPI ASAC no antebraço volar. Uma punção superficial da pele foi feita através de cada gota de alérgeno ou controlada usando uma agulha hipodérmica (Alko, Brasil) sem causar qualquer sangramento. Após um intervalo de 15 minutos, os resultados foram registrados através da medição do diâmetro transversal de cada ocorrência da pápula. Os resultados positivos foram definidos como pápulas com um diâmetro 3 mm superior ao do controle negativo.

3.3 Determinação de IgE anti- alérgenos no soro

Os anticorpos IgE específicos do soro foram avaliados seguindo as orientações do fabricante para classificar os indivíduos nos grupos nAT e AT (grupos controle). Esses anticorpos foram quantificados utilizando um ensaio de imunotransferência multiplex (EUROLINE Inhalation 2 - EUROIMMUN AG, Lubeck, Alemanha), método previamente descrito em nosso trabalho ^{23,24}. Os extratos testados incluíram *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides Pteronyssinus*, Gato, Cão, Cavalo, Porquinho-da-índia, Coelho, Hamster, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum*, *Alternaria Alternata*, *Cladosporium herbarum*, Timothy Grass, Centeio cultivado, Amieiro, Bétula, Avelã, Artemísia e Banana inglesa.

3.4 Purificação de IgG, avaliação de isótipo e rotulagem:

A purificação de IgG a partir de soros reunidos foi realizada conforme descrito anteriormente utilizando o Melon Gel IgG Spin Purification Kit (Thermo, EUA) ^{13, 15, 16, 21, 25}. O gel de purificação foi processado em coluna acoplada a tubo cônico de polipropileno e centrifugado. Após descartar o sobrenadante, o gel de purificação foi RE- suspenso em tampão de purificação suave a pH fisiológico. Uma amostra de soro de cada grupo (nAT e AT) foi misturada individualmente ao gel e homogeneizada.

A IgG purificada, que constitui o sobrenadante, foi recolhida, esterilizada e armazenada a -80°C para subseqüentes experiências de cultura celular. A concentração de IgG foi determinada utilizando Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce, EUA), e a pureza, verificada por SDS-PAGE, excedeu 95%. Embora este

método seja altamente eficaz em comparação com a utilização da proteína A, não podemos descartar a presença de outros isótipo de anticorpos em concentrações baixas ou indetetáveis como potenciais contaminantes. Os isótipo de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) em amostras de IgG purificadas foram determinados usando ELISA (IgG Subclasse Humana ELISA Kit, ThermoFisher, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Utilizamos o Zenon Humana IgG Labeling Kit (Invitrogen, EUA) para rotulagem de IgG, seguindo as instruções do fabricante. O fluoróforo Alexa-647, ligado a fragmentos Fab purificados por afinidade monovalente, reconheceu especificamente a porção FC da IgG humana. Esta técnica de marcação é imunosselativa, evitando a coloração de outras proteínas, incluindo anticorpos não IgG, garantindo marcação específica de IgG. Os timócitos foram incubados por 30 minutos com IgG marcada, ou como grupos controle, com marcação Zenon e reagentes bloqueadores na ausência de IgG purificada ou apenas com IgG não marcada. Para padronizar este método, confirmamos que a pré-incubação com a IgG purificada não marcada correspondente, específica para cada pool de IgG testado, bloqueia efetivamente a coloração fornecida pela IgG purificada marcada.

3.5 Cultura celular e citometria de fluxo:

As PBMC de doadores saudáveis foram suspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FC-III (HyClone, Logan, UT, EUA). A viabilidade celular e as contagens foram avaliadas utilizando uma câmara de Neubauer, com uma alíquota da suspensão celular diluída em azul de tripano (Sigma, EUA). Subsequentemente, 1×10^6 PBMCs viáveis foram cultivadas em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços (Costa, Glendale, AZ, EUA) e tratadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG purificada a partir de amostras de soro agrupadas representando cada doente ou grupo de controle.

Para a cultura, foi utilizado o meio RPMI 1640 com 10% de FC-III (HyClone, Logan, UT, EUA). Como controle, utilizamos uma condição simulada ou a adição de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG purificada comercialmente (IVIg). As placas de cultura foram incubadas por três dias, adicionando-se 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brefeldina A (Sigma, Israel) nas 12 horas finais, conforme padronizado anteriormente ^{15, 17, 19, 21}. A coloração das

células para análise citometria de fluxo foi efetuada para avaliar a marcação das células. A cultura de células e a citometria de fluxo foram efetuadas de acordo com os protocolos descritos no nosso trabalho anterior^{17-19, 26}. As PBMCs foram transferidas para tubos de ensaio para coloração extracelular, e as concentrações adequadas de anticorpos (determinadas por titulação) foram adicionadas às células, excluindo os tubos não marcados.

Após uma incubação de 30 minutos a 4°C no escuro, foram adicionados 500 µL de solução de PBS, seguidos de centrifugação e remoção do sobrenadante. Subsequentemente, foi adicionado PBS e as células foram fixadas em 200 µL de formaldeído a 1% durante pelo menos 10 minutos. Para a marcação intracelular, as PBMC foram coradas com anticorpos CD4, CD8, CD27, CD45RA e CD45R0 anti-humanos de ratinho ou anticorpos de controlo do isótipo (BD Pharmingen, NJ, EUA) nas concentrações ideais (determinadas através de experiências de titulação anteriores).

Após a fixação, foram adicionados 100 µL de PBS contendo 0,05% de saponina e os tubos foram armazenados a 4°C durante 30 minutos, protegidos da luz. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram eliminados e as células foram ressuspensas em 300 µL de solução de PBS.

As PBMCs foram coradas com anticorpos Anti IFN- γ , IL-14, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17 e IL-22 de ratinho ou com os correspondentes anticorpos de controlo do isótipo conjugados com fluorocromo (BD Pharmingen, Nova Jersey, EUA) em concentrações ótimas determinadas por titulação. Utilizando um citómetro de fluxo LSR Fortessa (BD Bio-Science, EUA), adquirimos 500 000 eventos por amostra no quadrante dos linfócitos com base nas características de tamanho/granularidade.

A compensação foi realizada utilizando microesferas adsorvidas (Com Beads, BD Bio-Science, EUA) tratadas com anticorpos de coloração extracelular e intracelular. O controle de isótipo específico guiou o controle de células para identificar células T e B e o controle de citocinas foi confirmado usando a configuração fluorocromo menos 1 (FMO), onde todos os anticorpos necessários para a marcação fenotípica foram adicionados, exceto a citocina específica.

Os linfócitos CD4⁺CD8⁻ foram identificados como células T CD4⁺ e os linfócitos CD8⁺CD4⁻ foram identificados como células T CD8⁺. Para análise de

viabilidade celular, as células foram incubadas com reagente fluorescente Live / Dead (PE-Texas red) (Thermo Fisher, EUA). Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

3.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Os dados de estudos in vitro foram obtidos a partir de cinco experiências separadas, cada uma envolvendo dois dadores de PBMC. As diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$, conforme determinado pelo teste t de Student e pelo teste U de Mann-Whitney para comparações entre dois grupos ou por um teste ANOVA com correção do teste de Tukey para comparações entre mais de duas condições devido à distribuição gaussiana de valores.

4 RESULTADOS

Padrão distinto de ativação de células T CD4 + e CD8 + e produção de citocinas entre nAT e AT IgG.

Inicialmente, conduzimos uma avaliação *in vitro* do impacto das formulações de IgG nas células T CD4 + não atópicas periféricas. Nenhuma das condições testadas influenciou a frequência de células T CD4 +. No entanto, é digno de nota que as formulações de IgG de fontes nAT e AT reduziram coletivamente a frequência da expressão de CD27 em células T CD4 +.

Ao examinar minuciosamente os fenótipos *naive* e de memória, observamos que a IgG derivada de doadores de AT diminuiu notavelmente a expressão da molécula CD45RA associada ao fenótipo ingênuo, induziu a expressão da molécula relacionada ao fenótipo de memória CD45R0. Este efeito específico não foi testemunhado em quaisquer outras condições de cultura.

Quando investigamos a produção intracelular de citocinas pelas células T CD4 +, descobrimos um perfil complexo de efeitos. Embora o nAT IgG tenha sido capaz de induzir a produção de IFN- γ em células T CD4+ em comparação com todas as outras condições, é essencial destacar que o nAT IgG também mediou a redução de células CD4+ produtoras de IL-4, IL-9 e IL-17. Células T em comparação com todas as outras condições, incluindo AT IgG. Ao comparar todas as condições, não foram observados efeitos discerníveis na produção de IL-10, IL-22 e IL-13.

Quando voltamos nossa atenção para as células T CD8 +, notamos que nenhuma das condições de cultura impactou a frequência das células T CD8 +. No entanto, em relação à expressão de CD27, era evidente que as formulações de nAT e AT IgG poderiam diminuir a sua expressão em comparação com células T CD8 + periféricas cultivadas sob todas as outras condições. Curiosamente, nenhuma formulação de IgG poderia modular a expressão da molécula associada ao fenótipo ingênuo e de memória comparando as condições de cultura.

Efeitos distintivos baixos surgiram em nossa avaliação da produção intracelular de citocinas entre células T CD8 +. A IgG exibiu um impacto único ao induzir um aumento na produção de IL-22 pelas células T CD8 + em comparação com outras condições de cultura. Notavelmente, não foram observados efeitos discerníveis em relação à produção de IL-4, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-17 por células T CD8+ ao comparar todas as condições de cultura

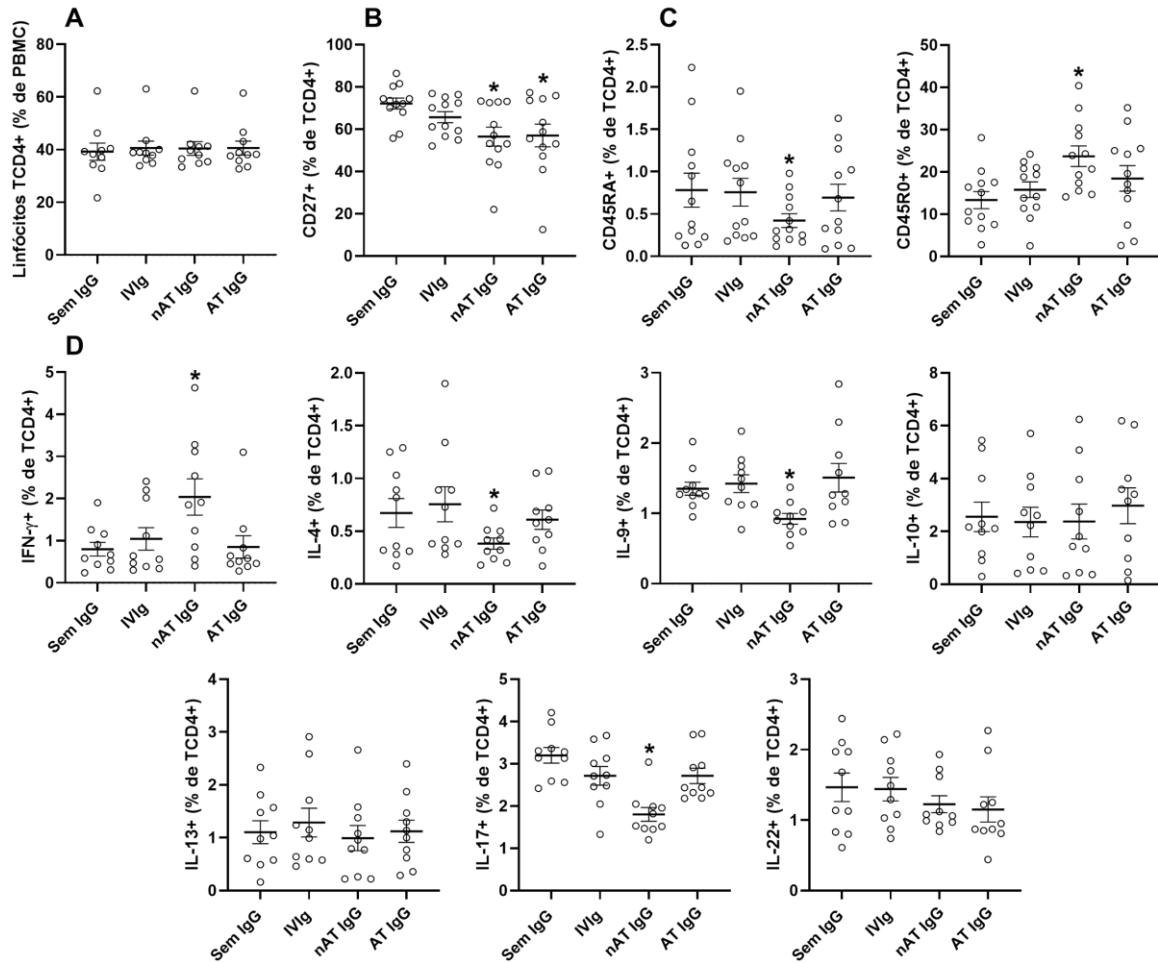


Figure 1: Influência moduladora da IgG de indivíduos não atópicos e atópicos em células T CD4 + periféricas não atópicas saudáveis. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) provenientes de doadores saudáveis (n=10 a 12) foram cultivadas em várias condições: na ausência de IgG, na presença de IgG utilizada para fins terapêuticos (IVIg) a uma concentração de 100µg/mL, IgG purificada de indivíduos não atópicos (nAT IgG) ou IgG derivada de indivíduos atópicos (AT). Após três dias de cultura, a citometria de fluxo foi utilizada para avaliar as células T CD4 + viáveis quanto à sua frequência (A) e à expressão de CD27 (B) e CD45RA/0 (C). Durante esse período de incubação, a produção intracelular de citocinas, incluindo IFN- γ , IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17 e IL-22, também foi avaliada (D). Os símbolos na figura representam pontos de dados individuais obtidos a partir de um mínimo de cinco experiências independentes, enquanto as linhas indicam os valores médios com erro padrão (SE). Os níveis de significância são indicados por * = $p < 0,05$ em comparação com as condições Mock e IVIg.

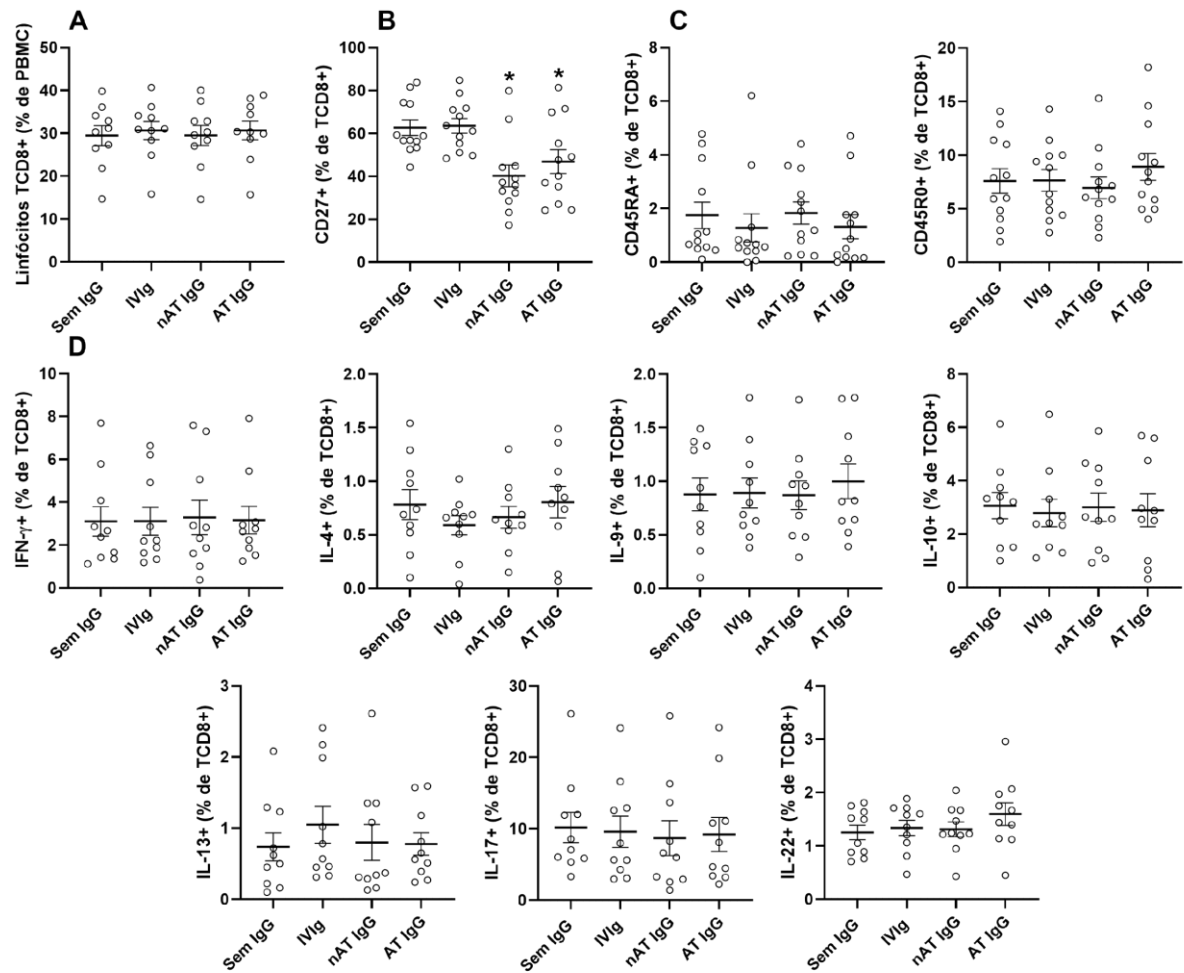


Figura 2: Influência moduladora da IgG de indivíduos não atópicos e atópicos em células T CD8 + periféricas não atópicas saudáveis. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) provenientes de doadores saudáveis (n=10 a 12) foram cultivadas em várias condições: na ausência de IgG (Mock), na presença de IgG utilizada para fins terapêuticos (IVIg) a uma concentração de 100µg/mL, IgG purificada de indivíduos não atópicos (nAT IgG) ou IgG derivada de indivíduos atópicos (AT). Após três dias de cultura, a citometria de fluxo foi utilizada para avaliar as células T CD8 + viáveis quanto à sua frequência (A) e à expressão de CD27 (B) e CD45RA/0 (C). Durante esse período de incubação, a produção intracelular de citocinas, incluindo IFN- γ , IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17 e IL-22, também foi avaliada (D). Os símbolos na figura representam pontos de dados individuais obtidos a partir de um mínimo de cinco experiências independentes, enquanto as linhas indicam os valores médios com erro padrão (SE). Os níveis de significância são indicados por * = $p < 0,05$ em comparação com as condições Mock e IVIg.

5 DISCUSSÃO

Observando vários estudos humanos e murinos que indicam um efeito modulador da IgG de acordo com seu repertório em alergias mediadas por IgE humana e murina,^{12, 13, 15, 16, 18, 19, 27}, infecção por HIV-1, HTLV-1 infecção¹⁴ e DA^{17, 20, 28}, levantamos a hipótese de que a IgG de pacientes com TA poderia ser eleita como um fator indutor biológico desenvolvido naturalmente por indivíduos propensos a desenvolver alergias mediadas por IgE e que esse efeito também poderia ser observado em células maduras não atópicas, uma vez que observações anteriores demonstraram os seus efeitos em células imaturas murinas e humanas (timócitos). Para testar esta hipóteses, utilizamos um protocolo padronizado de cultura periférica humana com IgG para investigar o efeito de um repertório AT IgG em células T CD4+ T e CD8+ periféricas não atópicas com foco em padrões representativos de produção de citocinas de células T e os comparamos com não-indivíduos atópicos^{28,29}. Nosso desenho experimental foi, em parte significativo, construído utilizando protocolos previamente padronizados do nosso grupo. Por esse motivo, avaliamos objetivamente os parâmetros celulares em uma concentração estabelecida de IgG.

Inicialmente, pudemos observar nos nossos resultados, de uma forma geral, que foi observado qualquer efeito diferencial em resposta à IVIg. Este perfil é possível devido ao facto de a Iglg ser um conjunto de anticorpos IgG humanos purificados obtidos de milhares de indivíduos saudáveis que não são controlados em termos de atópico³⁰, porque diferentes formulações de Iglg podem mediar efeitos diferentes³¹ e porque a concentração de IgG utilizada nas nossas experiências é relativamente baixa quando comparada com a maioria dos estudos em que os efeitos da Ig são descritos *in vitro*¹⁹.

Nossas descobertas revelaram que a IgG obtida de indivíduos não atópicos ou atópicos poderia influenciar a expressão avaliada de marcadores cruciais associados a fenótipos virgens e de memória em células T CD4 +, nomeadamente CD45RA e CD45R0, respetivamente. Nossos achados indicaram que a IgG de doadores não atópicos diminuiu seletivamente a expressão de CD45RA enquanto induzia simultaneamente uma superexpressão de CD45R0 em células T CD4 +. Isto sugere que a IgG de indivíduos não atópicos pode ativar células T CD4 + periféricas em indivíduos não atópicos, estimulando a aquisição de um fenótipo de memória. Tal efeito não foi observado em resposta à IgG de doadores atópicos. Notavelmente, a regulação da expressão de CD45R0 em células T CD4 + permanece um enigma³², e os nossos resultados podem indicar um mecanismo alternativo para a sua indução envolvendo a ativação mediada por IgG de células T CD4

+. No entanto, mais investigações são imperativas para comprovar este efeito potencial.

Embora este estudo não tenha se aprofundado na aquisição de um fenótipo de memória pelas células T CD4+, esse fenômeno tem implicações para as funções das células T CD4+, incluindo a produção de citocinas e o desenvolvimento de perfis imunomoduladores como Th1 (IFN- γ), Th2 (IL -4 e IL-13), Th9 (IL-9), Th17 (IL-17), Th22 (IL-22) e células T reguladoras induzidas tipo 1 (Tr1; IL-10). Consequentemente, decidimos avaliar a produção intracelular destas citocinas, pois podem ser relevantes para o controle ou desenvolvimento de alergias mediadas por IgE ^{29, 33}.

Curiosamente, foi observado um aumento na produção de IFN- γ em resposta à IgG de indivíduos não atópicos, mas estava ausente em resposta à IgG de indivíduos atópicos. Dado que o IFN- γ significa a indução de um perfil Th1 pelas células T CD4+ ⁴¹, em oposição ao perfil Th2, este achado indica que a IgG de indivíduos não atópicos pode ter a capacidade de induzir um perfil protetor de células T CD4+ contra o desenvolvimento de um padrão de alergia mediada por IgE (Th2) ⁴², que não foi observado com IgG de indivíduos atópicos, que foram selecionados especificamente pela sua propensão a desenvolver alergias mediadas por IgE.

Este contexto protetor, mediado por IgG de indivíduos não atópicos, é ainda reforçado pela nossa observação de que a IgG deste grupo também poderia diminuir a produção da principal citocina associada a um perfil Th2, IL-4 ³⁴, um efeito não atribuído ao grupo atópico.

Além disso, observamos que a IgG de indivíduos não atópicos podia induzir uma redução na produção de IL-9 pelas células T CD4 +. A indução e a regulação das células Th9 continuam a ser objeto de investigação, com evidências que sugerem uma ligação entre os perfis Th9 e as alergias mediadas por IgE, o que implica a necessidade de uma maior elucidação ³⁴. O nosso estudo propõe que a IgG pode participar deste mecanismo através da inibição dos perfis Th9 quando derivada de doadores não atópicos, justificando assim uma maior exploração.

Finalmente, as nossas avaliações revelaram que a IgG não atópica poderia reduzir a frequência de células T CD4 + produtoras de IL-17, indicando uma redução na frequência de células Th17. A produção de IL-17 pode levar a inflamação mediada por eosinófilos e neutrófilos ⁴⁵, indicando que a IgG não atópica também pode colaborar com uma regulação negativa do desenvolvimento da alergia, reduzindo a frequência de um perfil Th17.

Em contraste com as observações feitas em células T CD4 +, nossas avaliações de células T CD8 + revelaram um potencial regulador reduzido quando expostas a todas as formulações de IgG testadas em nosso estudo. Empregando os mesmos parâmetros empregados na avaliação de células T CD4 + observamos uma notável regulação negativa na expressão de CD27 induzida por IgG obtida de indivíduos não atópicos e atópicos. A expressão de CD27 em células T CD8+ está intimamente associada à sua secreção preferencial de IL-2 e proliferação, conforme documentado em pesquisas anteriores ²⁶ Isto implica que a IgG de indivíduos não atópicos e atópicos tem a capacidade de modular funções cruciais das células T CD8+ após a ativação, mas, entre todas as citocinas examinadas, qualquer influência poderia ser observa

Embora nosso estudo não forneça insights mecanísticos precisos sobre como as moléculas de IgG induzem esses efeitos, a literatura sugere desde 1975 que a IgG anti-idiotípica pode modular a imunidade das células T ³⁵. Anticorpos contra cadeias receptores de células T (TCR) foram detectados em IgG humana purificada reunida e demonstraram interagir diretamente com TCR β , modulando assim a ativação de células T ³⁶. Além disso, descobriu-se que os anticorpos anti-TCR β influenciam as respostas inflamatórias mediadas por Th1 ³⁷.

Revisões anteriores destacaram o envolvimento de interações idiotípicas entre células IgG e T nos efeitos imunomoduladores da IgG terapêutica ¹¹. Nosso estudo propõe que os padrões de interações idiotípicas mediadas por IgG podem ser influenciados pelo estado imunológico dos doadores, resultando em efeitos distintos dos repertórios de IgG em diferentes grupos de doadores, incluindo indivíduos não atópicos, atópicos, sem DA e com DA. Estes conjuntos únicos de IgG podem interagir com os seus respectivos conjuntos de receptores, incluindo TCRs, induzindo diversos efeitos em padrões que ainda não foram totalmente compreendidos, mas foram explorados no contexto de uma hipótese denominada "os anzois sem isca" ¹¹.

Em resumo, nossa investigação revela que a IgG obtida de indivíduos não atópicos ou atópicos pode modular principalmente células T CD4 + não atópicas periféricas, embora por meio de um mecanismo ainda a ser definido. Este mecanismo provavelmente envolve interações idiotípicas diretas entre moléculas de IgG e essas células T, subsequentemente provocando perfis de citocinas que podem estar associados à prevenção ou ao desenvolvimento de alergias mediadas por IgE. No entanto, o perfil de citocinas induzido pela IgG não atópica corrobora completamente com um perfil individual não alérgico, sugerindo que o repertório de IgG pode contribuir para o controle das características clínicas relacionadas às reações alérgicas mediadas por IgE.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que a IgG de doadores atópicos e não atópicos modula significativamente as células T CD4+ y CD8+ periféricas, indicando um possível fenótipo de memória e um perfil Th1 com redução da produção de citocinas Th2 com menor significância sobre linfócitos TCD8+.

7. REFERÊNCIAS

1. Jarrett EE, Hall E. IgE suppression by maternal IgG. *Immunology*. 1983;48(1):49-58.
2. Vance GH, Grimshaw KE, Briggs R, Lewis SA, Mullee MA, Thornton CA, et al. Serum ovalbumin-specific immunoglobulin G responses during pregnancy reflect maternal intake of dietary egg and relate to the development of allergy in early infancy. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(12):1855-61.
3. Victor JR, Muniz BP, Fusaro AE, de Brito CA, Taniguchi EF, Duarte AJ, et al. Maternal immunization with ovalbumin prevents neonatal allergy development and up-regulates inhibitory receptor Fc gamma RIIB expression on B cells. *BMC Immunol*. 2010; 11:11.
4. Macchiaverni P, Arslanian C, Frazão JB, Palmeira P, Russo M, Verhasselt V, et al. Mother to child transfer of IgG and IgA antibodies against *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Scand J Immunol*. 2011;74(6):619-27.
5. Kukkonen AK, Savilahti EM, Haahtela T, Savilahti E, Kuitunen M. Ovalbumin-specific immunoglobulins A and G levels at age 2 years are associated with the occurrence of atopic disorders. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(10):1414-21.
6. Sticherling M, Trawinski H. Effects of intravenous immunoglobulins on peripheral blood mononuclear cell activation in vitro. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1110:694-708.
7. Siedlar M, Strach M, Bukowska-Strakova K, Lenart M, Szaflarska A, Węglarczyk K, et al. Preparations of intravenous immunoglobulins diminish the number and proinflammatory response of CD14+CD16++ monocytes in common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin Immunol*. 2011;139(2):122-32.
8. Gille C, Drescher S, Spring B, Tárnok A, Bocsi J, Poets CF, et al. Differential modulation of cord blood and peripheral blood monocytes by intravenous immunoglobulin. *Cytometry B Clin Cytom*. 2012;82(1):26-34.
9. Tawfik DS, Cowan KR, Walsh AM, Hamilton WS, Goldman FD. Exogenous immunoglobulin downregulates T-cell receptor signaling and cytokine production. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012;23(1):88-95.
10. Sali AD, Karakasiliotis I, Evangelidou M, Avrameas S, Lymberi P. Immunological evidence and regulatory potential for cell-penetrating antibodies in intravenous immunoglobulin. *Clin Transl Immunology*. 2015;4(10): e42.
11. Victor JR. Do different IgG repertoires play a role in B- and T-cell functional modulation during ontogeny? The "hooks without bait" theory. *Immunol Cell Biol*. 2020;98(7):540-8.
12. Rodrigues de Sousa T, da Ressurreição Sgnotto F, Oliveira Fagundes B, Souza Santos L, da Silva Duarte AJ, Victor JR. IgG from atopic individuals can mediate non-atopic infant thymic and adult peripheral CD8. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2021;53(4):161-7.
13. Inoue AHS, Lira AAL, de-Oliveira MG, de Sousa TR, Sgnotto FDR, Duarte AJDS, et al. The Potential of IgG to Induce Murine and Human Thymic Maturation of IL-10+ B Cells (B10) Revealed in a Pilot Study. *Cells*. 2020;9(10).

14. da Ressurreição Sgnotto F, Souza Santos L, Rodrigues de Sousa T, Feitosa de Lima J, Mara da Silva Oliveira L, Saeed Sanabani S, et al. IgG From HIV-1-Exposed Seronegative and HIV-1-Infected Subjects Differently Modulates IFN- γ Production by Thymic T and B Cells. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2019;82(5):e 56-e 60.
15. de-Oliveira MG, Lira AAL, Sgnotto FR, Inoue AHS, Santos LS, Nakamatsu BY, et al. Maternal IgG impairs the maturation of offspring intrathymic IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells: Implications for murine and human allergies. *Clin Exp Allergy*. 2019;49(7):1000-12.
16. Santos LS, Sgnotto FDR, Inoue AHS, Padreca AF, Menghini RP, Duarte AJDS, et al. IgG from Non-atopic Individuals Induces In Vitro IFN- γ and IL-10 Production by Human Intrathymic $\gamma\delta$ T Cells: A Comparison with Atopic IgG and IVIg. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019;67(4):263-70.
17. Sgnotto FDR, de Oliveira MG, Lira AAL, Inoue AHS, Titz TO, Orfali RL, et al. IgG from atopic dermatitis patients induces IL-17 and IL-10 production in infant intrathymic TCD4 and TCD8 cells. *Int J Dermatol*. 2018;57(4):434-40.
18. de Oliveira MG, Oliveira LM, Lira AAL, Sgnotto FDR, Duarte AJDS, Sato MN, et al. Preconception allergen sensitization can induce B10 cells in offspring: a potential main role for maternal IgG. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2017;13:22.
19. Sgnotto FDR, Oliveira MG, Lira AAL, Bento-de-Souza L, Duarte AJDS, Victor JR. Low doses of IgG from atopic individuals can modulate in vitro IFN- γ production by human intra-thymic TCD4 and TCD8 cells: An IVIg comparative approach. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(7):1563-72.
20. Machado NR, Fagundes BO, Fernandes LA, de Oliveira ACP, Nukui Y, Casseb J, et al. Differential modulation of IL-4, IL-10, IL-17, and IFN- γ production mediated by IgG from Human T-lymphotropic virus-1 (HTLV-1) infected patients on healthy peripheral T (CD4+, CD8+, and $\gamma\delta$) and B cells. *Front Med (Lausanne)*. 2023; 10:1239706.
21. Santos LS, Sgnotto FDR, Sousa TR, Orfali RL, Aoki V, Duarte AJDS, et al. IgG from atopic dermatitis patients induces non-atopic infant thymic invariant natural killer T (iNKT) cells to produce IL-4, IL-17, and IL-10. *Int J Dermatol*. 2020;59(3):359-64.
22. Heinzerling L, Mari A, Bergmann KC, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, et al. The skin prick test - European standards. *Clin Transl Allergy*. 2013;3(1):3.
23. Nakamatsu BY, Fernandes AP, da Silva D, Santos LS, de Sousa TR, Victor JR. Suitable Interpretation of Skin Prick Test and Biomedical Guidance Leads to a Better Clinical State in Atopic Individuals with High Indoor Permanence: Possible Therapeutic Implications. *Biologics [Internet]*. 2021; 1(2):[222-30 pp.].
24. de Sousa TR, Sgnotto FDR, Fagundes BO, Duarte AJDS, Victor JR. Non-atopic Neonatal Thymic Innate Lymphoid Cell Subsets (ILC1, ILC2, and ILC3) Identification and the Modulatory Effect of IgG From Dermatophagoides Pteronyssinus (Derp)-Atopic Individuals. *Front Allergy*. 2021; 2:650235.
25. Bento-de-Souza L, Victor JR, Bento-de-Souza LC, Arrais-Santos M, Rangel-Santos AC, Pereira-Costa É, et al. Constitutive expression of genes encoding notch receptors and ligands in developing lymphocytes, nTreg cells and dendritic cells in the human thymus. *Results Immunol*. 2016; 6:15-20.

26. Belkadi A, Dietrich C, Machavoine F, Victor JR, Leite-de-Moraes M. $\gamma\delta$ T cells amplify *Blomia tropicalis*-induced allergic airway disease. *Allergy*. 2019;74(2):395-8.
27. Lira AAL, de-Oliveira MG, Inoue AHS, Beltrame GR, Duarte AJDS, Victor JR. Preconceptional allergen immunization can induce offspring IL-17 secreting B cells (B17): do they share similarities with regulatory B10 cells? *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2018;46(5):454-9.
28. de Sousa TR, Fagundes DO, Nascimento A, Fernandes LA, Sgnotto FDR, Orfali RL, et al. IgG from Adult Atopic Dermatitis (AD) Patients Induces Thymic IL-22 Production and CLA Expression on CD4 + T Cells: Possible Epigenetic Implications Mediated by miRNA. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12).
29. O'Gulur I, Pat Y, Ardicli O, Barletta E, Cevhertas L, Fernandez-Santamaria R, et al. Advances and highlights in biomarkers of allergic diseases. *Allergy*. 2021;76(12):3659-86.
30. Lemieux R, Bazin R, Néron S. Therapeutic intravenous immunoglobulins. *Molecular Immunology*. 2005;42(7):839-48.
31. Nielsen H. Immunoglobulin preparations for intravenous administration. A review of their biologic activities and comparison of various preparation methods. *Allergy*. 1994;49(2):69-73.
32. Dunlock VE, Arp AB, Singh SP, Charrin S, Nguyen V, Jansen E, et al. Tetraspanin CD53 controls T cell immunity through regulation of CD45RO stability, mobility, and function. *Cell Rep*. 2022;39(13):111006.
33. Renert-Yuval Y, Thyssen JP, Bissonnette R, Bieber T, Kabashima K, Hijnen D, et al. Biomarkers in atopic dermatitis-a review on behalf of the International Eczema Council. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(4):1174-90. e1.
34. Son A, Meylan F, Gomez-Rodriguez J, Kaul Z, Sylvester M, Falduto GH, et al. Dynamic chromatin accessibility licenses STAT5- and STAT6-dependent innate-like function of TH9 cells to promote allergic inflammation. *Nature Immunology*. 2023;24(6):1036-48.
35. Eichmann K, Rajewsky K. Induction of T and B cell immunity by anti-idiotypic antibody. *Eur J Immunol*. 1975;5(10):661-6.
36. Schluter SF, Adelman MK, Taneja V, David C, Yocum DE, Marchalonis JJ. Natural autoantibodies to TCR public idiotopes: potential roles in immunomodulation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2003;49(2):193-207.
37. Ballow M. Mechanisms of immune regulation by IVIG. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014;14(6):509-15.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Elucidação dos mecanismos envolvidos no efeito imunomodulador dos anticorpos IgG de pacientes com Dermatite Atópica (DA) sobre linfócitos Talfa-beta (TCD4 e TCD8) e Tgamma-delta tímicos

Pesquisador: Jefferson Russo Victor

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 63361622.7.3001.0081

Instituição Proponente: OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.421.002

Apresentação do Projeto:

EMENDA

Objetivo da Pesquisa:

EMENDA

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

EMENDA

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

EMENTA

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicito a inclusão dos seguintes assistentes ao Projeto:

Daniela Terra de Apoena Reche – CPF: 373.390.458-30

Fernando Machado – CPF: 201.767.868-64

Isabella Siuffi Bergamasco – CPF: 437.836.478-60

NICOLLE RAKANIDIS MACHADO – CPF: 396.274.308-11

Solicito a inclusão da seguinte Instituição Coparticipante ao Projeto:

OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ – CNPJ: 18.301.267/0001-84, na

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 6.421.002

qual o responsável pela instituição é o Jefferson Russo Victor, Pesquisador deste projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	EMENDA_ASSINADA.pdf	16/08/2023 21:10:46	Jefferson Russo Victor	Aceito
Parecer Anterior	EMENDA_PLATAFORMA_BRASIL.docx	27/06/2023 10:46:50	Jefferson Russo Victor	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_F_Detalhado_Beatriz.docx	13/03/2023 15:49:43	Jefferson Russo Victor	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CARTA_ANUENCIA_GUARDA_TIMOS. pdf	13/03/2023 15:42:36	Jefferson Russo Victor	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES_ATUALIZADO.pdf	13/03/2023 15:40:06	Jefferson Russo Victor	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLES_ATUALIZADO.pdf	13/03/2023 15:39:48	Jefferson Russo Victor	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Profª Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 6.421.002

SAO PAULO, 10 de Outubro de 2023

Assinado por:
Patrícia Colombo de Souza
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br