

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**

**Mestrado em Ciências da Saúde**

**Avaliação do efeito modulador de anticorpos IgG de  
pacientes alérgicos ao ácaro *Dermatophagoides  
pteronyssinus* sobre linfócitos B tímicos e periféricos  
humanos**

São Paulo  
2024

**Daniela Terra de Apoena Reche**

**Avaliação do efeito modulador de anticorpos IgG de pacientes alérgicos ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* sobre linfócitos B tímicos e periféricos humanos.**

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  
Co-orientadora: Dra. Carolina Nunes França

São Paulo  
2024

R245a

Reche, Daniela Terra de Apoena

Avaliação do efeito modulador de anticorpos IgG de pacientes alérgicos ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* sobre linfócitos B tímicos e periféricos humanos / Daniela Terra de Apoena Reche. – São Paulo, 2024.

34 p. : il., P&B.

Orientador: Prof.Dr. Jefferson Russo Victor.

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

Bibliografia incluída.

1. IgG. 2. *Dermatophagoides pteronyssinus*. 3. Células B. I. Victor, Jefferson Russo. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 618.9297

**Daniela Terra de Apoena Reche**

**Avaliação do efeito modulador de anticorpos IgG de pacientes alérgicos ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* sobre linfócitos B tímicos e periféricos humanos.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Russo Victor

São Paulo, 29 de Novembro de 2024

**Banca examinadora**

Prof. Dr. Gabriel Costa de Carvalho

Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

Conceito Final.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Jefferson Russo Victor, que me ensina desde a graduação, por ter sido meu orientador nesse projeto e ter 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.

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:** Estudos sobre células B do timo são escassos na literatura, mas foi sugerido que elas podem exercer funções modulatórias e reguladoras do sistema imunológico. As células B do timo podem desempenhar algum papel na regulação do quadro alérgico mais frequente em todo o mundo, a atopia induzida pelo ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*). **Objetivo:** Avaliar se o repertório de IgG policlonal produzido por indivíduos *Der p*-atópicos pode influenciar a migração e o perfil de citocinas do B tímico humano derivado de crianças não atópicas com menos de sete dias de idade. **Métodos:** Produzimos formulações de IgG policlonais e cultivamos timócitos humanos na sua presença. Também avaliamos as subclasses de IgG e a interação direta da IgG com as membranas das células B do timo. **Resultados:** Podemos demonstrar que *Der p*-atópica IgG não poderia reduzir a expressão da molécula de migração  $\alpha 4\beta 7$  como observado em resposta às outras formulações de IgG e poderia reduzir a frequência de células B tímicas produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-9 em comparação com o condição simulada. *Der p*-atópica IgG também poderia bloquear uma redução de células B do timo produtoras de IL-13, como foi observado em resposta a outras formulações de IgG. Todas as formulações de IgG apresentaram níveis semelhantes de subclasses de IgG e interagiram diretamente com as membranas das células B do timo. Finalmente, realizamos experimentos utilizando células B periféricas não atópicas onde não foram observados efeitos de IgG. **Conclusão:** Nossa observação demonstra que a IgG induzida em indivíduos alérgicos pode modular células B tímicas não atópicas, potencialmente gerando células B tímicas propensas ao desenvolvimento de alergias, o que parece não ocorrer em células B maduras.

**Palavras-chave:** IgG, *Dermatophagoides pteronyssinus*, células B, IFN- $\gamma$ , IL-9, IL-22, alfa-4, beta-7

## ABSTRACT

**Introduction:** Studies on thymic B cells are scarce in the literature, but it has been suggested that they may exert modulatory and regulatory functions of the immune system. Thymic B cells may play a role in the regulation of the most common allergic condition worldwide, atopy induced by the mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p). **Objective:** To evaluate whether the polyclonal IgG repertoire produced by Der p-atopic individuals can influence the migration and cytokine profile of human thymic B cells derived from non-atopic infants under seven days of age. **Methods:** We produced polyclonal IgG formulations and cultured human thymocytes in their presence. We also evaluated IgG subclasses and the direct interaction of IgG with thymic B cell membranes. **Results:** We demonstrated that Der p-atopic IgG could not reduce the expression of the  $\alpha 4\beta 7$  migration molecule as observed in response to other IgG formulations and could reduce the frequency of IFN- $\gamma$  and IL-9-producing thymic B cells compared to the sham condition. Der p-atopic IgG could also block a reduction of IL-13-producing thymic B cells, as observed in response to other IgG formulations. All IgG formulations presented similar levels of IgG subclasses and interacted directly with thymic B cell membranes. Finally, we performed experiments using non-atopic peripheral B cells where no IgG effects were observed. **Conclusion:** Our observation demonstrates that IgG induced in allergic individuals can modulate non-atopic thymic B cells, potentially generating thymic B cells prone to allergy development, which does not seem to occur in mature B cells..

**KeyWords:** IgG, *Dermatophagoides pteronyssinus*, B cell, IFN- $\gamma$ , IL-9, IL-22, alfa-4, beta-7

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

APD - ÁCAROS DA POEIRA DOMÉSTICA

AT *Der p* - ATÓPICOS AO *DER P*

AT nr - ATÓPICOS NÃO RELACIONADOS AO *DER P*

CLA - ANTÍGENO ASSOCIADO A LINFÓCITOS CUTÂNEOS

CO<sub>2</sub> - GÁS CARBÔNICO

*Der p* - *Dermatophagoides pteronyssinus*

FBS - SORO FETAL BOVINO

HCOR - HOSPITAL DO CORAÇÃO

HIV - VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

HTLV - VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T

IFN - INTERFERON

IG - IMUNOGLOBULINA

IL - INTERLEUCINA

ILC - CÉLULAS SEMELHANTES A INATOS

N-AT - NÃO ATÓPICOS

NKT - CÉLULAS T NATURAL KILLER

PBMC - CÉLULA MONONUCLEAR DO SANGUE PERIFÉRICO

PS - FOSFATIDILSERINA

SPT - TESTE CUTÂNEO DE PICADA

TH - CÉLULAS T HELPER

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  - ALFA

$\beta$  - BETA

$\delta$  - DELTA

$\gamma$  - GAMA

g - GRAMA

L - LITRO

$\pm$  - MAIS/MENOS

$\leq$  - MENOR IGUAL

$\mu$  - MICRO

% - PORCENTAGEM

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	11
Resposta imune Th2 e produção de IgE.....	11
Complexidade da regulação imune.....	12
Células b e sua origem.....	12
Papel do CLA (antígeno associado a linfócitos cutâneos) .....	12
Migração das células b para a mucosa intestinal .....	12
Produção de citocinas pelas células b efectoras .....	12
2. OBJETIVO .....	14
Geral:.....	14
Específico .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Testes de sensibilização a alérgenos .....	16
3.2 Formulações policlonais de IgG .....	17
3.3 Dissociação do tecido tímico e isolamento celular .....	18
3.4 Cultura de célula .....	19
3.5 Análises de citometria de fluxo em amostras de timócitos e PBMC.....	19
3.6 Análise estatística .....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1 IgG policlonal de indivíduos atópicos ao Der p modula a expressão de $\alpha 4\beta 7$ e a produção de IFN- $\gamma$ , IL-9 e IL-13. ....	21
4.2 Os efeitos da IgG não estão relacionados às frequências da subclasse IgG e estão possivelmente relacionados à interação direta da IgG com a membrana celular sem induzir apoptose.....	23
4.3 Os efeitos da IgG policlonal não são induzidos nas células B periféricas. ....	25
5. DISCUSSÃO .....	26
6. CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS .....	30
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

A atopia pode ser caracterizada como um estado imunológico no qual os indivíduos podem desenvolver respostas imunes mediadas por IgE, comumente referidas como alergias, em reação a antígenos inofensivos conhecidos como alérgenos. As doenças atópicas afetam principalmente órgãos como o nariz, olhos, pele e pulmões. Entre essas condições, destacam-se a conjuntivite alérgica, dermatite atópica e doenças pulmonares alérgicas, como a asma alérgica. A rinite alérgica e as reações alérgicas a picadas de insetos venenosos também fazem parte desse conjunto de doenças. <sup>1</sup>. Essas reações podem ser desencadeadas por vários grupos de alérgenos, que estimula a liberação de histamina dos grânulos intracelulares dessas células. A histamina atua como o principal mediador da inflamação nas manifestações clínicas da atopia, favorecendo a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células inflamatórias para o local da reação alérgica, resultando em uma série de sintomas clínicos, e surgem devido a uma complexa interação de fatores imunológicos, genéticos e ambientais.<sup>2,3</sup>. Os ácaros da poeira doméstica (APD) são a fonte predominante de alérgenos em todo o mundo <sup>4</sup> e são responsáveis por sintomas clínicos em aproximadamente 50% dos pacientes com asma em todo o mundo <sup>5</sup>. Entre as espécies de APD, *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*) é responsável por cerca de 80% da reatividade de anticorpos IgE específicos em indivíduos atópicos <sup>5</sup>. É por isso que nosso estudo se concentra especificamente em indivíduos com alergias relacionadas ao *Der p*.

### **Resposta Imune Th2 e Produção de IgE**

A resposta imune Th2 está associada à produção de anticorpos IgE específicos, que são os principais responsáveis por desencadear reações alérgicas. Esses anticorpos, quando ligados a alérgenos, ativam mastócitos e basófilos, resultando na liberação de mediadores inflamatórios e na manifestação de sintomas alérgicos. <sup>6</sup>.

## **Complexidade da Regulação Imune**

A regulação das respostas imunes Th2 e da produção de IgE é complexa e envolve diferentes populações de células imunes, incluindo linfócitos T e B. Recentes estudos sugerem que, além de suas funções clássicas na produção de anticorpos, as células B podem desempenhar papéis reguladores ou moduladores no desenvolvimento de condições alérgicas. <sup>7</sup>.

## **Células B e sua Origem**

Tradicionalmente, a maturação das células B humanas foi atribuída à medula óssea. No entanto, descobertas do início dos anos 2000 revelaram que o timo também contribui para o conjunto periférico de células B. <sup>6</sup> Estima-se que cerca de  $3 \times 10^4$  células B migram do timo diariamente, incluindo populações de células pró-B e pré-B. <sup>8</sup>.

Entender o fenótipo e a capacidade de produção de citocinas pelas células B do timo é essencial para compreender suas potenciais funções moduladoras no sistema imunológico.

## **Papel do CLA (Antígeno Associado a Linfócitos Cutâneos)**

O CLA, conhecido por ser a principal molécula de localização da pele expressa por células T, também é encontrado nas células B. <sup>7</sup> Esta molécula facilita o direcionamento das células B para a pele ao interagir com a E-selectina vascular presente nas vênulas da mucosa oral e pele, mas não no trato intestinal. <sup>9, 10</sup>.

## **Migração das Células B para a Mucosa Intestinal**

A indução da expressão da integrina  $\alpha 4\beta 7$  nas células B foi relacionada à sua migração para a mucosa intestinal, demonstrada em estudos com humanos <sup>11, 12</sup>.

## **Produção de Citocinas pelas Células B Efetoras**

As células B efetoras produzem uma variedade de citocinas,

desempenhando um papel crucial na modulação da imunidade. Elas influenciam as respostas imunológicas, em particular ao interagir com as células T efetoras, que podem induzir respostas imunes Th1 (mediada por IFN- $\gamma$ ) ou Th2 (mediada por IL-4 e IL-13).<sup>14</sup>

Além disso, as células B humanas podem produzir IL-17, potencialmente influenciando o desenvolvimento da asma<sup>15</sup>, e as células B murinas podem produzir IL-9, desempenhando um papel crucial nas respostas humorais<sup>16</sup>. Recentemente, a hipótese imunológica dos "anzóis sem isca" propôs que repertórios de IgG policlonais de diferentes grupos de doadores podem desempenhar papéis essenciais na modulação da função de células T e B tímicas e periféricas<sup>17</sup>. Neste contexto, IgG policlonal de indivíduos com alergias, dermatite atópica, infecção por HIV e infecção por HTLV demonstrou efeitos moduladores *in vitro* em vários linfócitos tímicos e periféricos, incluindo células T, células B, células T  $\gamma\delta$ , células iNKT e células semelhantes a inatas (ILC) em humanos e camundongos<sup>18-26</sup>. Estes efeitos têm o potencial de modular a fisiopatologia destas doenças.

## 2. OBJETIVO

### **Geral:**

O presente estudo tem como objetivo identificar células B do timo humano e avaliar o potencial da IgG purificada de indivíduos *Der p* - atópicos na modulação de seus perfis de migração e produção de citocinas. Esta investigação piloto também explora a interação entre as membranas das células B e IgG e se estende às células B periféricas.

### **Específico:**

Avaliar, após cultura celular de Linfócitos B tímicos e periféricos com IgG purificada extraída de diferentes grupos de doadores:

- A expressão de moléculas de migração (CLA,  $\alpha 4\beta 7$ ) e citocinas com potencial imunomodulador (IL-4, IL-9, IL-13, IL-17 e IL-22)
- Se a IgG purificada pode interagir diretamente com a membrana e induzir apoptose

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Tecidos de timo foram coletados de 12 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca corretiva no Hospital do Coração (HCor) em São Paulo, Brasil.

A retirada do timo durante cirurgias cardíacas em recém-nascidos, chamada de timectomia, é frequentemente realizada devido à necessidade de acesso adequado ao coração e aos grandes vasos sanguíneos. A anatomia do timo e sua localização no mediastino anterior (região central do tórax, entre os pulmões) tornam sua remoção necessária para facilitar a execução dessas cirurgias complexas. Em cirurgias cardíacas, como correções de defeitos congênitos (ex.: defeito septal ventricular, transposição dos grandes vasos, tetralogia de Fallot), o timo, devido à sua posição, bloqueia o acesso aos vasos sanguíneos e ao coração. Sua remoção ou retração é, portanto, necessária para que o cirurgião tenha uma visão clara e possa realizar a operação com precisão. Após a correção de certos defeitos cardíacos, o coração pode se expandir um pouco devido ao aumento da eficiência da circulação. A remoção do timo cria espaço adicional no mediastino, permitindo que o coração funcione adequadamente após a cirurgia.

Embora o timo seja importante para o desenvolvimento imunológico, estudos mostram que a timectomia parcial ou total em recém-nascidos geralmente não causa deficiências imunológicas significativas, especialmente quando realizada precocemente na vida. Isso ocorre porque uma parte substancial da maturação dos linfócitos T já pode ocorrer no timo antes da cirurgia, e o corpo tem outros mecanismos para compensar a perda do timo, como a expansão de linfócitos T já formados.

Os critérios de inclusão para os voluntários desse projeto abrangeram:

- ausência de imunodeficiência,
- síndromes genéticas ou reações alérgicas e
- idade inferior a sete dias (idade média dos pacientes  $\pm$  erro padrão:  $3,4 \pm 0,54$  dias).

Os antecedentes alérgicos dos pais foram avaliados e apenas crianças com mães não atópicas foram incluídas. Amostras de soro foram obtidas de doadores de sangue masculinos e femininos e categorizadas em três grupos com base em seus perfis atópicos para produção de formulações de IgG policlonal. Esses grupos foram denominados indivíduos não atópicos (**n-AT**; n=17), indivíduos atópicos não relacionados ao *Der p* (**AT-nr**; n=16) e indivíduos atópicos ao *Der p* (**AT-Der p**; n=18). Os critérios de inclusão para cada grupo de doadores de IgG foram os seguintes:

- **n-AT**: Confirmado clinicamente através de consulta médica, sem títulos específicos de IgE significativos detectados para quaisquer alérgenos testados em um ensaio de imunoblot e sem reatividade a quaisquer alérgenos testados em um teste cutâneo de picada (SPT).

- **AT-nr**: Clinicamente alérgico, confirmado por consulta médica, com títulos de IgE específicos detectados para pelo menos dois alérgenos não testados para APD e reatividade a pelo menos dois alérgenos não testados para APD em um SPT.

- **AT-Der p**: Clinicamente alérgico ao ácaro *Der p*, confirmado por consulta médica, com títulos de IgE específicos detectados para o alérgeno *Der p* e reatividade ao alérgeno *Der p* em um SPT.

Participantes com eczema grave, dermografismo ou uso recente de anti-histamínicos, glicocorticosteroides ou outros medicamentos sistêmicos que pudessem influenciar os resultados do SPT nos últimos 15 dias foram excluídos. Cada amostra de timo ou PBMC veio de um doador diferente, e os comitês de ética do HCor e da Faculdade de Medicina da USP aprovaram o estudo (número do parecer 6.680.790). O consentimento por escrito foi obtido de participantes adultos (doadores de amostras de sangue) ou pais quando os participantes eram menores (doadores de timo).

### 3.1 Testes de sensibilização a alérgenos

No teste de puntura cutânea (SPT), um alérgeno é introduzido na pele por meio de uma lanceta, levando à desgranulação dos mastócitos devido à

ligação cruzada da imunoglobulina E (IgE) específica para o alérgeno aos seus receptores de membrana. Esse processo de desgranulação resulta na liberação imediata de histamina e outros mediadores inflamatórios, induzindo uma resposta cutânea, clinicamente observável como uma pápula. O tamanho da pápula é diretamente proporcional ao grau de sensibilidade cutânea do indivíduo.

Uma gota de cada extrato de alérgeno, utilizando um painel de alérgenos que incluía *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum*, *Alternaria alternata*, *Canis familiaris*, *Felis domesticus* e *Cladosporium herbarum*, juntamente com histamina (como controle positivo) e diluentes de alérgenos (como controle negativo) fornecidos pelo Instituto de Pesquisa e Inovação em Alergia, foi aplicada no antebraço volar dos voluntários. Uma punção superficial da pele foi realizada sobre cada gota de alérgeno ou controle, utilizando uma lanceta de metal de cabeça única, sem induzir sangramento. Após 15 minutos, os resultados foram avaliados por meio da medição do diâmetro transversal de cada pápula resultante. Apenas voluntários que apresentaram um diâmetro de pápula no controle positivo superior a 5 mm foram considerados para este estudo.

Os níveis séricos de IgE antialérgeno foram determinados usando um ensaio de imunoblot multiplex (EUROLINE Inhalation 2 - EUROIMMUN AG, Lubeck, Alemanha) com o mesmo painel de alérgenos usado no SPT.<sup>27</sup>,

### **3.2 Formulações policlonais de IgG**

A IgG foi purificada a partir de amostras de soro reunidas dos grupos n-AT, AT-nr e AT-Der p, usando o protocolo Melon Gel IgG Spin Purification Kit (Thermo, EUA). A pureza da IgG, conforme confirmado anteriormente pelo nosso grupo<sup>19, 21, 23-25, 28</sup> ultrapassou 95%. A IgG policlonal purificada foi esterilizada utilizando filtros de 0,20 micron (Corning, Alemanha) e armazenada a -80°C. As concentrações de IgG foram determinadas usando o Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce, EUA) e os isotipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) foram determinados por ELISA (IgG Subclass Human

ELISA Kit, ThermoFisher, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Todas as etapas técnicas foram realizadas em condições estéreis e a contaminação por endotoxinas estava ausente, conforme confirmado pelo kit de quantificação de endotoxinas cromogênicas Pierce LAL (ThermoFisher, EUA). As formulações de IgG policlonal foram coradas usando o Zenon Human IgG Labeling Kit (Invitrogen, EUA) para ensaios de interação IgG-membrana, seguindo as instruções do fabricante. Este método de marcação é imunossesletivo, excluindo outras proteínas, incluindo anticorpos não-IgG, resultando em coloração específica de IgG através do bloqueio das porções Fc de IgG. Os timócitos foram incubados durante 30 minutos com IgG marcada com Zenon ou com marcação Zenon e reagentes de bloqueio sem IgG ou IgG não marcada como controles. Este método foi padronizado com 100 µg /mL de IgG, concentração ideal determinada pelos resultados do experimento de cultura.

O método da membrana IgG foi validado por incubação prévia com a respectiva IgG purificada não marcada na mesma concentração, confirmando o bloqueio completo da coloração fornecida pela IgG marcada com Zenon.

### **3.3 Dissociação do tecido tímico e isolamento celular**

A dissociação de timócitos e o isolamento celular usando dissociação enzimática foram previamente delineados pelo nosso grupo <sup>20-22, 25, 29</sup>. Cada timo foi cortado em pequenos fragmentos e exposto a uma solução enzimática composta por meio RPMI, colagenase A, DNase I e soro fetal bovino (FBS). Após exposição enzimática, os fragmentos foram homogeneizados e filtrados. As suspensões celulares foram lavadas e as células sedimentadas foram ressuspensas em PBS frio com EDTA e FBS. A fração de baixa densidade (timócitos) foi coletada utilizando Ficoll-Paque e os timócitos foram armazenados em nitrogênio líquido. Os timócitos descongelados foram utilizados para experiências apenas se a sua viabilidade excedesse 75%.

### 3.4 Cultura de célula

Foram cultivados  $1 \times 10^6$  timócitos viáveis em cada poço de uma placa de cultura de 48 poços, juntamente com as amostras de IgG purificadas mencionadas anteriormente na concentração de 100 µg. As culturas foram mantidas em meio RPMI 1640 contendo 10% de FBS a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 dias. A Brefeldina A foi adicionada nas últimas 24 horas apenas nos poços que avaliaram a produção intracelular de citocinas. As suspensões de timócitos foram submetidas a lavagens e, em seguida, ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FC-III) (HyClone, Logan, UT, EUA). Para avaliar a viabilidade celular e o número de células, uma alíquota da suspensão celular foi diluída em azul de tripano (Sigma, EUA) e contada utilizando uma câmara de Neubauer. Em seguida,  $1 \times 10^6$  timócitos viáveis foram alocados em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços (Costar, Cambridge, MA, EUA) e cultivados em meio RPMI 1640 contendo 10% de FC-III, acrescido de 100 µg/mL de IgG purificada proveniente de amostras de soro de indivíduos atópicos ou não atópicos. Para controle, utilizou-se uma condição simulada ou a adição de 100 µg/mL de IgG purificada comercialmente (IVIg) (22, 23, 25). Controles positivos (Phorbol 12-miristato 13-acetato – PMA) e negativos (condição simulada) foram utilizados para padronização.

### 3.5 Análises de citometria de fluxo em amostras de timócitos e PBMC

Para avaliação da viabilidade, as células foram incubadas com 0,04 µL de LIVE/DEAD® Fixable Red Dead Cell Stain da ThermoFisher (EUA), diluído em 1 mL de 1X PBS. Esta incubação ocorreu à temperatura ambiente durante 30 minutos garantindo proteção da luz. Posteriormente, as células foram suavemente lavadas e ressuspensas em 250 µL de 1X PBS. Posteriormente, todas as avaliações extracelulares foram realizadas exclusivamente em células viáveis. Para coloração extracelular, uma concentração específica de anticorpos, determinada através de titulação para cada anticorpo utilizado, foi adicionada às amostras.

A coloração celular foi realizada para a avaliação da marcação celular por meio de citometria de fluxo. Para a análise de viabilidade celular, as células

foram incubadas com um reagente fluorescente Live/Dead (PE-Texas red) (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA). Todas as análises extracelulares e intracelulares foram conduzidas utilizando células viáveis. Para a coloração extracelular,  $0,5 \times 10^6$  células/mL de timócitos foram incubadas com 1  $\mu$ g de cada anticorpo, durante 30 minutos a 4°C.

Após esta incubação, as amostras foram cuidadosamente lavadas com PBS e o sobrenadante foi cuidadosamente removido. As células e os anticorpos foram posteriormente fixados com solução de formaldeído a 1% durante 10 minutos. As células cultivadas na presença de Brefeldina A foram submetidas ao mesmo protocolo de coloração extracelular para avaliar a produção intracelular de citocinas. Após a fixação, foram adicionados anticorpos monoclonais corados em concentrações específicas, determinadas por titulação. Todos os anticorpos utilizados para coloração, bem como os controles de isotipos, foram fornecidos pela BD Biosciences (EUA). Um total de 500.000 eventos por amostra foram adquiridos no quadrante de linfócitos, determinados pelo seu tamanho relativo e granularidade, utilizando um citômetro de fluxo LSR II Fortessa da BD Biosciences (EUA). A compensação foi realizada utilizando microesferas adsorvidas (CompBeads, BD Biosciences, EUA) e anticorpos idênticos que foram empregados para coloração extracelular e intracelular.

### **3.6 Análise estatística**

A análise estatística foi feita utilizando GraphPad Prism 5.0, desenvolvido pela GraphPad Software Inc. em La Jolla, CA. Os dados obtidos de estudos in vitro foram derivados de um total de 6 experiências independentes, cada uma composta de uma a duas amostras. A significância foi determinada no nível  $P \leq 0,05$ , empregando ANOVA unidirecional com teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas entre todos os grupos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 IgG policlonal de indivíduos atópicos ao *Der p* modula a expressão de $\alpha 4\beta 7$ e a produção de IFN- $\gamma$ , IL-9 e IL-13.

Primeiro, avaliamos se a IgG policlonal obtida de indivíduos atópicos ao *Der p* poderia modular diferencialmente a expressão de moléculas de migração e a produção de citocinas pelas células B do timo, em comparação com a IgG policlonal de doadores individuais atópicos não relacionados e não atópicos. Realizando experimentos in vitro com timócitos de crianças não atópicas (menores de sete dias) cultivados na ausência de IgG (condição simulada) ou na presença de IgG policlonal de diferentes grupos de doadores, pudemos observar que qualquer condição testada poderia influenciar a frequência ou expressão do marcador de maturação CD196 nas células B do timo (Figura 1a). Além disso, pudemos observar que a IgG de doadores não atópicos e atópicos não relacionados poderia reduzir a frequência da expressão da molécula de migração da integrina  $\alpha 4\beta 7$  nas células B do timo, o que não foi observado em resposta a IgG de AT-*Der p* (Figura 1b). Nenhuma influência foi observada na expressão do CLA. Quando avaliamos a produção de citocinas nas mesmas condições de cultura, observamos que IgG de doadores atópicos (atópicos não relacionados e *Der p*-atópicos) poderia reduzir a produção de IFN- $\gamma$  em comparação com condições não atópicas e simuladas (Figura 1c). Ao avaliar a produção de IL-9, pudemos observar que IgGs não atópicas e *Der p*-atópicas poderiam reduzir a produção desta citocina pelas células B não atópicas do timo, em comparação com a condição simulada, que não foi mantida em resposta IgG atópica não relacionada (Figura 1c). Finalmente, também pudemos observar que a IgG de indivíduos não atópicos e atópicos não relacionados poderia reduzir a produção de IL-13 pelas células B do timo em comparação com a condição simulada, um efeito que a IgG de AT-*Der p* não poderia induzir (Figura 1c). Não foram observados efeitos na produção de IL-4 e IL-17 ao comparar todas as condições de cultura (Figura 1c).

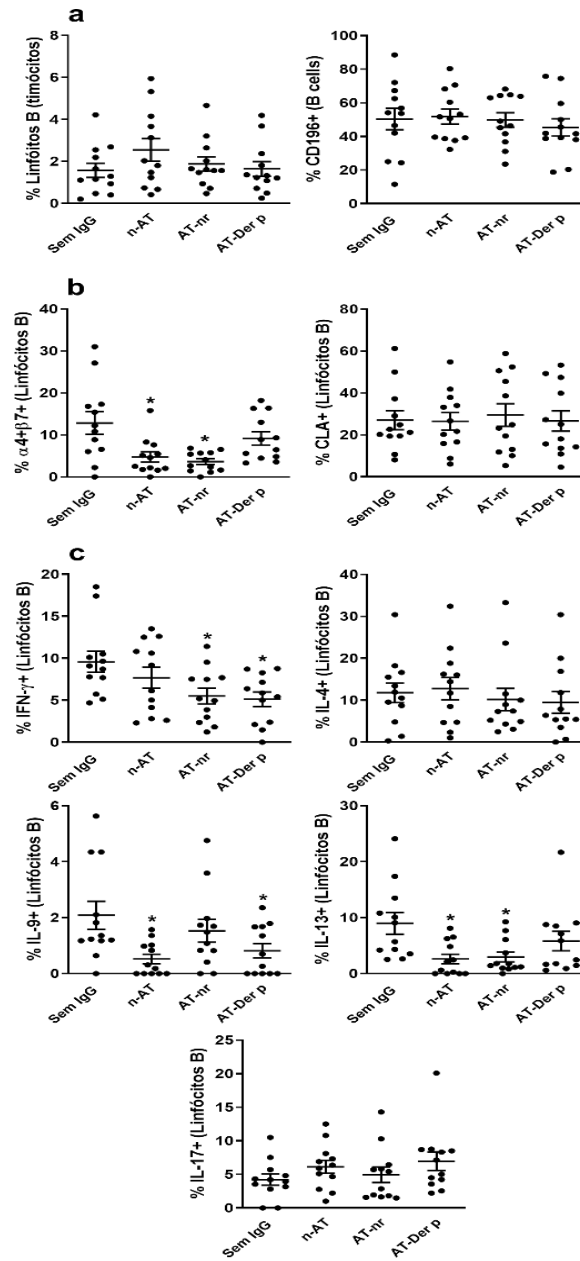


Figura 1: Efeito modulador de IgG de diferentes doadores em células B tímicas não atópicas. Timócitos de doadores não atópicos (n=12) foram cultivados na ausência de IgG policlonal (simulado) ou na presença de 100 $\mu$ g/mL de IgG policlonal de indivíduos não atópicos (n-AT), pacientes alérgicos com atopia a alérgenos não relacionados ao ácaro Der p (AT-nr), e pacientes alérgicos com atopia ao ácaro Der p (AT-Der p). Após três dias de cultura, as células B viáveis foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à frequência e expressão de CD196 (a), quanto à expressão das moléculas de migração  $\alpha 4\beta 7$  e CLA (b), e quanto à produção intracelular de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-9, IL-13 e IL-17 (c). Os símbolos representam valores individuais obtidos em cinco experimentos e as linhas representam média  $\pm$  SE. \* = p<0,05 comparado à condição sem IgG.

#### **4.2 Os efeitos da IgG não estão relacionados às frequências da subclasse IgG e estão possivelmente relacionados à interação direta da IgG com a membrana celular sem induzir apoptose.**

Com o objetivo de elucidar se os efeitos observados nos perfis de migração e citocinas poderiam ser induzidos como consequência de alterações na frequência das subclasses de IgG, avaliamos a frequência das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em todas as formulações policlonais de IgG. Conforme observado na Figura 2a, todas as formulações apresentaram frequências semelhantes das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Em seguida, avaliamos se a IgG policlonal poderia interagir diretamente com as membranas das células B do timo. Para tanto, coramos IgG policlonal de diferentes grupos de doadores com região Fc anti-IgG de alta especificidade e avaliamos a frequência e intensidade das interações com células B do timo. Pudemos observar que aproximadamente 10% das células B do timo puderam ser reconhecidas pela IgG policlonal de todos os grupos avaliados, e a intensidade dessas interações também foi semelhante em todas as formulações testadas (Figura 2b). Além disso, avaliamos se a interação direta da IgG com a membrana das células B do timo poderia iniciar o processo de apoptose. Para isso, avaliamos a expressão da fosfatidilserina (PS) utilizando a molécula de Anexina V, e qualquer formulação testada poderia influenciar a expressão desta molécula, indicando níveis semelhantes de indução precoce de apoptose (Figura 2c).



### 4.3 Os efeitos da IgG policlonal não são induzidos nas células B periféricas.

Finalmente, avaliamos se os efeitos moduladores da IgG policlonal de diferentes doadores também poderiam ser observados nos mesmos parâmetros nas células B periféricas. Com esse propósito, realizamos os mesmos experimentos de cultura, trocando células B tímicas não atópicas por células B periféricas não atópicas, e avaliamos a produção intracelular de IFN- $\gamma$ , IL-9 e IL-13 onde não pudemos observar quaisquer efeitos modulatórios de todos os IgG policlonais testados (Figura 3a-b). Por fim também avaliamos a expressão de moléculas CD148 relacionadas a células B ativadas e de memória e pudemos observar que IgG policlonal de doadores não atópicos e *Der p*-atópicos está relacionada a uma menor frequência de células B periféricas CD148+ em comparação com condições simuladas e condições atópicas não relacionadas (Figura 3c).

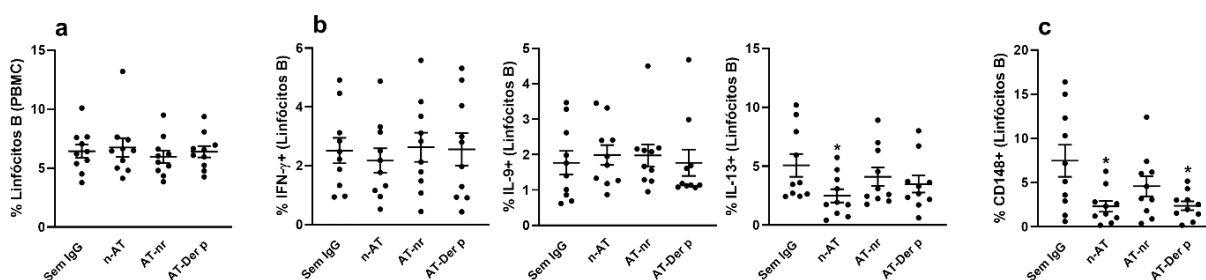


Figura 3: Efeito modulador de IgG de diferentes doadores em células B periféricas não atópicas. PBMCs de doadores não atópicos ( $n=10$ ) foram cultivadas na ausência de IgG policlonal (simulado) ou na presença de  $100\mu\text{g/mL}$  de IgG policlonal de indivíduos não atópicos (n-AT), pacientes alérgicos com atopia a alérgenos não relacionados ao ácaro *Der p* (AT-nr), e pacientes alérgicos com atopia ao ácaro *Der p* (AT-*Der p*). Após três dias de cultura, as células B viáveis foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à frequência (a), à produção intracelular de IFN- $\gamma$ , IL-9 e IL-13 (b) e à expressão da molécula de ativação CD148 (c). Os símbolos representam valores individuais obtidos em cinco experimentos e as linhas representam média  $\pm$  SE. \* =  $p < 0,05$  comparado à condição sem IgG.

## 5. DISCUSSÃO

O estudo das células B do timo humano apresenta desafios contínuos devido à descoberta relativamente recente de sua presença no timo e às limitações práticas associadas às baixas frequências das células B e à obtenção de amostras <sup>7</sup>. Anteriormente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o timo humano pode gerar células B reguladoras produtoras de IL-10 (B10) em resposta à estimulação com IgG policlonal de indivíduos com alergias <sup>19</sup>. Nos últimos anos, os efeitos imunomoduladores da IgG policlonal foram observados tanto *in vitro* <sup>30-34</sup> e *in vivo* <sup>35-38</sup>, focando principalmente em populações de células T em sistemas murinos e humanos.

Este estudo enfoca um aspecto crítico da sensibilização a alérgenos humanos, o ácaro *Der p*, e uma faceta relativamente inexplorada da biologia humana, as células B do timo. Também nos aprofundamos na imunomodulação mediada por IgG policlonal, uma área disruptiva na literatura. Geramos formulações de IgG policlonais de doadores categorizados como não atópicos, atópicos a não- APD ou indivíduos *Der p*-atópicos para conseguir isso. Avaliamos então o impacto dessas formulações nas células B do timo humano.

Nossas descobertas revelaram que a IgG policlonal de doadores *Der p*-atópicos não reduziu a expressão de  $\alpha 4\beta 7$  nas células B do timo. Isto sugere que a IgG de indivíduos atópicos por *Der p* pode facilitar a migração de células B do timo para tecidos onde as manifestações clínicas induzidas por *Der p* são mais prováveis de ocorrer <sup>39, 40</sup>. Considerando que a expressão da integrina  $\alpha 4\beta 7$  está associada à migração de linfócitos para tecidos mucosos <sup>41</sup>, esta observação merece destaque.

Também examinamos o efeito das IgGs policlonais nas principais citocinas relacionadas às respostas alérgicas. Ambas as formulações de IgG policlonal derivadas de atópicos pareceram reduzir a produção de IFN- $\gamma$ . Esta redução pode levar a uma mudança para um perfil imunitário dominante Th2, uma vez que as células B produtoras de IFN- $\gamma$  têm o potencial de influenciar o equilíbrio Th1/Th2 <sup>14, 42</sup>.

Curiosamente, observamos modulação diferencial da produção de IL-9 entre as duas formulações de IgG derivadas de atópicos. Embora a IgG *Der-p*-atópica e a IgG não atópica tenham reduzido a produção de IL-9 em comparação com a IgG simulada, a IgG atópica não relacionada, não induziu esta redução. Isto sugere uma regulação complexa e distinta por diferentes formulações de IgG policlonais na produção de IL-9 em células B do timo, aspecto ainda não totalmente compreendido na literatura <sup>43</sup>.

Além disso, notamos que nenhum efeito foi observado na produção de IL-4, e apenas a IgG policlonal *Der p*-atópica não conseguiu reduzir a produção de IL-13, ambos intimamente associados ao perfil imunológico Th2 <sup>44, 45</sup>. Estes resultados sugerem que a IgG não induz mecanismos relacionados com o eixo Th2 para influenciar o desenvolvimento de alergias.

Vários aspectos foram cruciais à medida que explorávamos os possíveis mecanismos subjacentes à interação entre IgG e células B e os efeitos observados. Investigamos possíveis diferenças na frequência de subclasses de IgG, especificamente IgG4, fortemente ligadas à sensibilização a alérgenos inalantes como *Der p* <sup>46</sup>. No entanto, nenhuma diferença significativa foi detectada.

Além disso, exploramos se as moléculas policlonais de IgG poderiam interagir diretamente com a membrana das células B do timo, uma demonstração sem precedentes na literatura. Notavelmente, todas as formulações interagiram com aproximadamente 10% das células B do timo humano. Notavelmente, as moléculas de IgG utilizadas neste ensaio foram coradas utilizando fragmentos Fab da porção Fc anti-IgG altamente específicos conjugados com um fluorógeno. Isto bloqueou os locais de interação das moléculas de IgG coradas com os receptores de IgG (FcγRs) <sup>47, 48</sup> indicando que as interações idiotípicas podem mediar essas interações entre IgGs policlonais e receptores clonais ou conservados expressos na membrana das células B do timo. Isto se alinha com hipóteses imunológicas que sugerem que interações idiotípicas poderiam ser responsáveis por efeitos diferenciais induzidos por IgG policlonal de indivíduos com origens imunológicas variadas<sup>17</sup>.

Finalmente, avaliamos se essas interações observadas entre membrana IgG induziram apoptose em células B do timo. Nossos resultados indicam que nenhuma das IgGs policlonais testadas influenciou a frequência de células B do timo submetidas a apoptose. Isto sugere que as interações detectadas não induziram a apoptose seletiva como mecanismo responsável pelos efeitos modulatórios observados.

## **6. CONCLUSÕES**

Em conclusão, nosso estudo esclarece o papel dos anticorpos IgG policlonais na interação com membranas de células B do timo humano e na modulação da produção de citocinas. Estas interações podem influenciar o desenvolvimento de um perfil alérgico, mas aparecem menos pronunciadas nas células B maduras periféricas. Mais investigações são necessárias para elucidar completamente os mecanismos e implicações dessas descobertas.

## REFERÊNCIAS

1. Coca AF, Cooke RA. Sobre a Classificação dos Fenômenos de Hipersensibilidade. *J Immunol* 1923. p. 163-82.
2. Fernandez J. Visão Geral dos distúrbios alérgicos e atópicos <https://www.msmanuals.com/2022> [Available from: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/immunologia-dist%C3%BArbios-al%C3%A9rgicos/dist%C3%BArbios-al%C3%A9rgicos,-autoimunes-e-outras-rea%C3%A7%C3%B5es-de-hipersensibilidade/vis%C3%A3o-geral-dos-dist%C3%BArbios-al%C3%A9rgicos-e-at%C3%B3picos>].
3. Falcon RMG, Caoili SEC. Immunologic, genetic, and ecological interplay of factors involved in allergic diseases. *Front Allergy*. 2023;4:1215616.
4. Yang L, Zhu R. Immunotherapy of house dust mite allergy. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(10):2390-6.
5. Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, De Blay F, Hernandez Fernandez de Rojas D, Virchow JC, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(1):38-48.
6. Satitsuksanoa P, Iwasaki S, Boersma J, Imam MB, Schneider SR, Chang I, et al. B cells: The many facets of B cells in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2023;152(3):567-81.
7. Akashi K, Richie LI, Miyamoto T, Carr WH, Weissman IL. B lymphopoiesis in the thymus. *J Immunol*. 2000;164(10):5221-6.
8. Yoshino T, Okano M, Chen HL, Tsuchiyama J, Kondo E, Nishiuchi R, et al. Cutaneous lymphocyte antigen is expressed on memory/effector B cells in the peripheral blood and monocytoïd B cells in the lymphoid tissues. *Cell Immunol*. 1999;197(1):39-45.
9. Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, et al. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1991;174(6):1461-6.
10. Moughal NA, Adonogianaki E, Thornhill MH, Kinane DF. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis. *J Periodontal Res*. 1992;27(6):623-30.
11. Butcher EC, Williams M, Youngman K, Rott L, Briskin M. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol*. 1999;72:209-53.

12. Gonzalez AM, Jaimes MC, Cajiao I, Rojas OL, Cohen J, Pothier P, et al. Rotavirus-specific B cells induced by recent infection in adults and children predominantly express the intestinal homing receptor  $\alpha 4\beta 7$ . *Virology*. 2003;305(1):93-105.
13. Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):332-8.
14. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol*. 2000;1(6):475-82.
15. De Vooght V, Carlier V, Devos FC, Haenen S, Verbeken E, Nemery B, et al. B-lymphocytes as key players in chemical-induced asthma. *PLoS One*. 2013;8(12):e83228.
16. Takatsuka S, Yamada H, Haniuda K, Saruwatari H, Ichihashi M, Renauld JC, et al. IL-9 receptor signaling in memory B cells regulates humoral recall responses. *Nat Immunol*. 2018;19(9):1025-34.
17. 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.
18. Rodrigues de Sousa T, da Ressureição 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.
19. 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).
20. Da Ressureição 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- $\gamma$  Production by Thymic T and B Cells. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2019;82(5):e56-e60.
21. 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.
22. Santos LS, Sgnotto FDR, Inoue AHS, Padreca AF, Menghini RP, Duarte AJDS, et al. IgG from Non-atopic Individuals Induces In Vitro IFN- $\gamma$  and IL-10 Production by Human Intra-thymic  $\gamma\delta$ T Cells: A Comparison with Atopic IgG and IVIg. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019;67(4):263-70.

23. 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.
24. 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.
25. 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- $\gamma$  production by human intra-thymic TCD4 and TCD8 cells: An IVIg comparative approach. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(7):1563-72.
26. 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- $\gamma$  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.
27. Nakamatsu BY, Fernandes AP, Silva Dd, Santos LS, Sousa TRd, 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*: 1; 2021. p. 222-30.
28. 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.
29. 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.
30. Fagundes BO, de Sousa TR, Nascimento A, Fernandes LA, Sgnotto FDR, Orfali RL, et al. IgG from Adult Atopic Dermatitis (AD) Patients Induces Nonatopic Neonatal Thymic Gamma-Delta T Cells ( $\gamma\delta$ T) to Acquire IL-22/IL-17 Secretion Profile with Skin-Homing Properties and Epigenetic Implications Mediated by miRNA. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12).
31. De Sousa TR, Fagundes BO, 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).
32. 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.

33. Sousa TRd, Sgnotto FdR, Fagundes BO, Santos LS, Duarte AJdS, Victor JR. IgG from atopic individuals can mediate non-atopic infant thymic and adult peripheral CD8 + TC2 skewing without influence on TC17 or TC22 cells. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2020. p. 161-7.
34. 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.
35. Kwon B, Yang SJ, Cho SM, Kim ME, Nahm DH. Intramuscular administration of autologous total immunoglobulin G induces immunomodulatory effects on T cells in healthy human subjects: An open-labeled prospective single-arm trial. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(22):e29486.
36. Nahm DH, Ye YM, Shin YS, Park HS, Kim ME, Kwon B, et al. Efficacy, Safety, and Immunomodulatory Effect of the Intramuscular Administration of Autologous Total Immunoglobulin G for Atopic Dermatitis: A Randomized Clinical Trial. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2020;12(6):949-63.
37. Cho SM, Kim ME, Kwon B, Nahm DH. Immunomodulatory effects induced by intramuscular administration of autologous total immunoglobulin G in patients with atopic dermatitis. *Int Immunopharmacol*. 2017;52:1-6.
38. Nahm DH, Ahn A, Kim ME, Cho SM, Park MJ. Autologous Immunoglobulin Therapy in Patients With Severe Recalcitrant Atopic Dermatitis: Long-Term Changes of Clinical Severity and Laboratory Parameters. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016;8(4):375-82.
39. Salo PM, Arbes SJ, Jaramillo R, Calatroni A, Weir CH, Sever ML, et al. Prevalence of allergic sensitization in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(2):350-9.
40. Zock JP, Heinrich J, Jarvis D, Verlato G, Norbäck D, Plana E, et al. Distribution and determinants of house dust mite allergens in Europe: the European Community Respiratory Health Survey II. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(3):682-90.
41. Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, Wilson J, et al. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol*. 1997;151(1):97-110.
42. Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *J Immunol*. 2005;174(11):6781-90.
43. Bordon Y. JAKs drive innate-like T. *Nat Rev Immunol*. 2023;23(6):344.

44. Suhrkamp I, Scheffold A, Heine G. T-cell subsets in allergy and tolerance induction. *Eur J Immunol.* 2023;53(10):e2249983.
45. Johansson-Lindbom B, Borrebaeck CA. Germinal center B cells constitute a predominant physiological source of IL-4: implication for Th2 development in vivo. *J Immunol.* 2002;168(7):3165-72.
46. Smoldovskaya O, Feyzkhanova G, Voloshin S, Arefieva A, Chubarova A, Pavlushkina L, et al. Allergen-specific IgE and IgG4 patterns among patients with different allergic diseases. *World Allergy Organ J.* 2018;11(1):35.
47. Sirk SJ, Olafsen T, Barat B, Bauer KB, Wu AM. Site-specific, thiol-mediated conjugation of fluorescent probes to cysteine-modified diabodies targeting CD20 or HER2. *Bioconjug Chem.* 2008;19(12):2527-34.
48. Sanchez AB, Nguyen T, Dema-Ala R, Kummel AC, Kipps TJ, Messmer BT. A general process for the development of peptide-based immunoassays for monoclonal antibodies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66(5):919-25.

## ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SANTO  
AMARO - UNISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Mapeamento do reconhecimento de proteínas humanas por anticorpos IgG de pacientes com Dermatite Atópica: abordagens funcionais em linfócitos T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2 com possível implicação terapêutica

**Pesquisador:** Jefferson Russo Victor

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 70823623.0.3001.0081

**Instituição Proponente:** OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.680.790

#### Apresentação do Projeto:

pacientes com DA através da administração intravenosa de IgG de doadores saudáveis, a IVIg (Intravenous immunoglobulin), o que mostrou relação com melhora clínica, porém, os mecanismos imunoreguladores mediados pela administração IVIg bem como a participação do repertório IgG dos pacientes com DA na patogênese da doença ainda precisa ser elucidado.

Recentemente nosso grupo propôs a teoria imunológica dos "anzóis sem isca" onde o conjunto de idiotipos de IgG de diferentes grupos de doadores classificados por características imunológicas relacionadas à atopia ou doenças crônicas, poderia modular diferencialmente linfócitos T durante o processo de maturação ou na fase madura. Com base nesta teoria, pretendemos investigar o efeito dos anticorpos IgG de pacientes com DA sobre linfócitos T (TCD4 e TCD8) e T através de culturas celulares de timócitos ou células mononucleares do sangue periférico, elucidando eventuais interações IgG-linfócitos e mapeando as prováveis moléculas "alvo" considerando todo o proteoma humano.

#### Objetivo da Pesquisa:

Identificar interações moleculares e seus efeitos com grau de precisão suficiente para colaborar com a elucidação do desenvolvimento da DA bem como eventualmente propor alvos terapêuticos.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco e Benefícios somente descritos no TCLE.

**Endereço:** Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

**Bairro:** Jardim das Imbuías

**CEP:** 04.829-300

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2141-8687

**E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO  
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 6.680.790

**Risco** - Com a sua participação, existe o risco de vazamento de dados pessoais e possíveis desconfortos como a presença de roxos (hematomas) no local do furo onde foi feita a coleta de sangue.

**Benefícios** - Esta pesquisa não possui benefício direto a você, mas sua participação ajuda no avanço das pesquisas para novos tratamentos para pessoas com Dermatite Atópica.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Voluntários frequentadores do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, serão avaliados clinicamente quanto ao desenvolvimento de sintomas de alergias. Posteriormente serão submetidos a um teste cutâneo de puntura (Skin Prick Test - SPT) para confirmação de seu estado atópico sendo classificados como indivíduos atópicos não relacionados a dermatite atópica (At-nDA - clinicamente alérgicos e reativos a ao menos um dos alérgenos testados) e indivíduos n-At (n=15, sem quaisquer sintomas de alergia e não reativos aos alérgenos testados no teste cutâneo).

Em colaboração com o ambulatório de DA do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP), serão obtidas amostras de sangue de pacientes atópicos portadores de DA (n=15) em grau leve ao grave de acordo com o critério de Hanifin e Rajka seguindo o índice de gravidade por área de eczema (EASI) (98). Como critério de inclusão os pacientes devem exibir as características clínicas da DA por mais de 25 anos.

Além disso, serão utilizados tecidos tímicos restantes de um estudo retrospectivo que estão sob a guarda do Dr. Jefferson Russo Victor sem onerar o serviço e que foram obtidos de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca corretiva no Hospital do Coração (HCor - ASS), São Paulo, Brasil.

Como critério de inclusão, as amostras utilizadas são advindas de indivíduos com até 7 dias de idade (n=20), ou com idade entre 6 e 7 meses (n=12), de mães não-atópicas e que não apresentem sinais de imunodeficiência.

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

Emenda com a seguinte descrição:

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

Beatriz Oliveira Fagundes – CPF: 467.544.788-02

**Endereço:** Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

**Bairro:** Jardim das Imbuías

**CEP:** 04.829-300

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2141-8687

**E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO  
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 6.680.790

Solicito a inclusão da seguinte Instituição Coparticipante ao Projeto:  
OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ – CNPJ: 18.301.267/0001-84, na qual o responsável pela instituição é o Jefferson Russo Victor, Pesquisador deste projeto.

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

Aprovado Emenda.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Carta_Resposta_Etica_Nic.doc	16/11/2023 12:19:08	Jefferson Russo Victor	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proj_Nic_ME.pdf	16/11/2023 12:18:36	Jefferson Russo Victor	Aceito
Outros	EMENDA_PLATAFORMA_BRASIL_NIC OLLE.pdf	23/08/2023 05:55:03	Jefferson Russo Victor	Aceito
Outros	Carta_Resposta.doc	18/07/2023 14:00:55	Jefferson Russo Victor	Aceito
Outros	Parecer_Uso_de_dados_digitais.pdf	22/05/2023 16:06:56	Jefferson Russo Victor	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado.pdf	22/05/2023 16:06:10	Jefferson Russo Victor	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Biorrepositorio.doc	22/05/2023 15:54:38	Jefferson Russo Victor	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES.pdf	22/05/2023 15:51:16	Jefferson Russo Victor	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLADO.pdf	22/05/2023 15:50:54	Jefferson Russo Victor	Aceito

**Situação do Parecer:**

**Endereço:** Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340  
**Bairro:** Jardim das Imbuías **CEP:** 04.829-300  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2141-8687 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO  
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 6.680.790

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 02 de Março de 2024

---

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

**Endereço:** Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340  
**Bairro:** Jardim das Imbuías **CEP:** 04.829-300  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2141-8687 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br