



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



*Isolamento e purificação de exossomos
de indivíduos não-atópicos e sua influência no
perfil de citocinas secretadas in vitro por
leucócitos de indivíduos atópicos*

Helena Maria Caleiro Acerbí

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
(Orientador)

Dra. Danielle dos Reis Napolitano
(Co-orientadora)

UBERLÂNDIA
Maio 2010



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



*Isolamento e purificação de exossomos
de indivíduos não-atópicos e sua influência no
perfil de citocinas secretadas in vitro por
leucócitos de indivíduos atópicos*

Projeto de Pesquisa submetido ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Uberlândia, 07 de Maio de 2010

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho – UFBA

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi – ICBIM/UFU

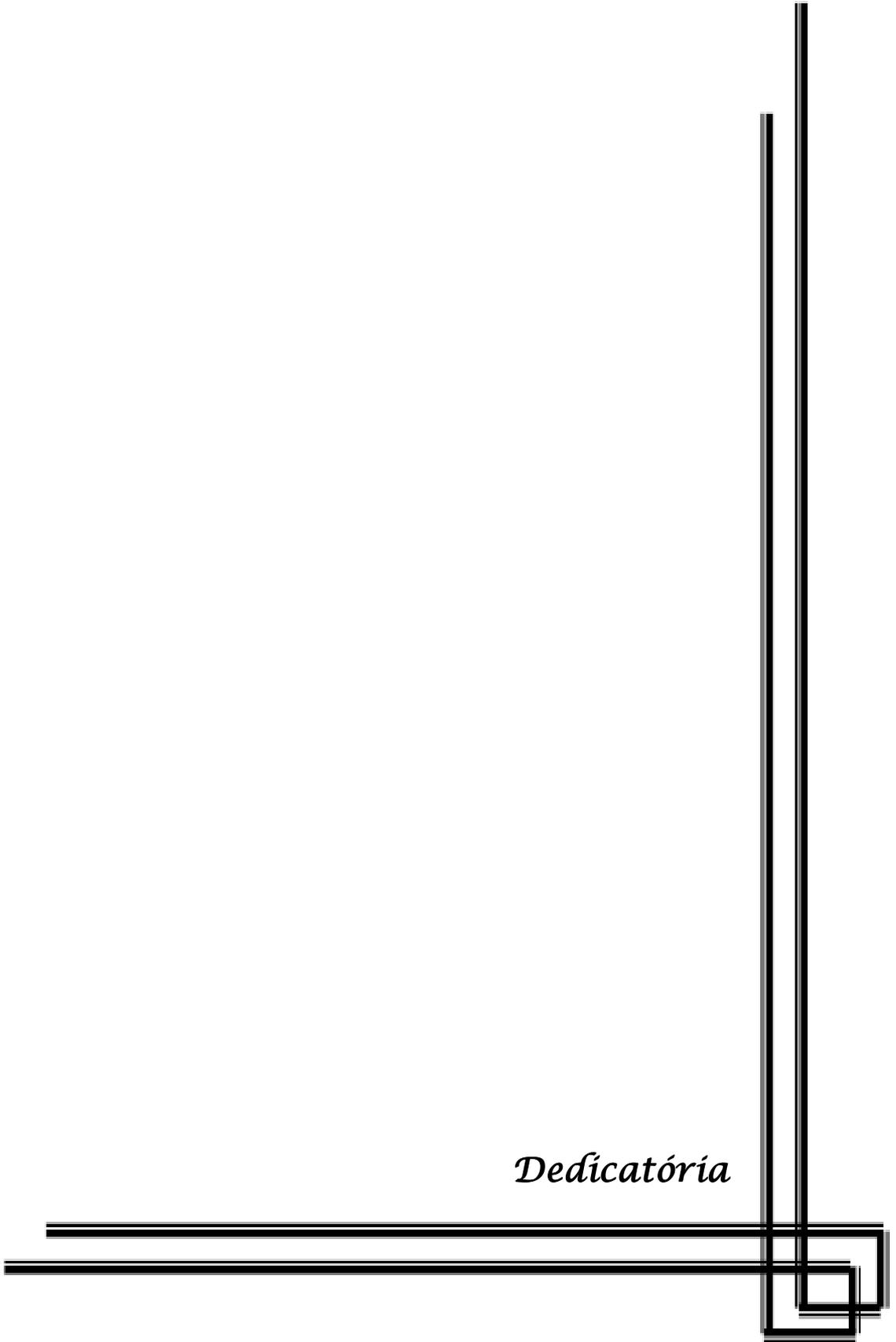
“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e mais alegre ainda, no meio da tristeza!”

Grande Sertão: Veredas

Guimarães Rosa¹

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

Dedicatória



Aos meus amores incondicionais:

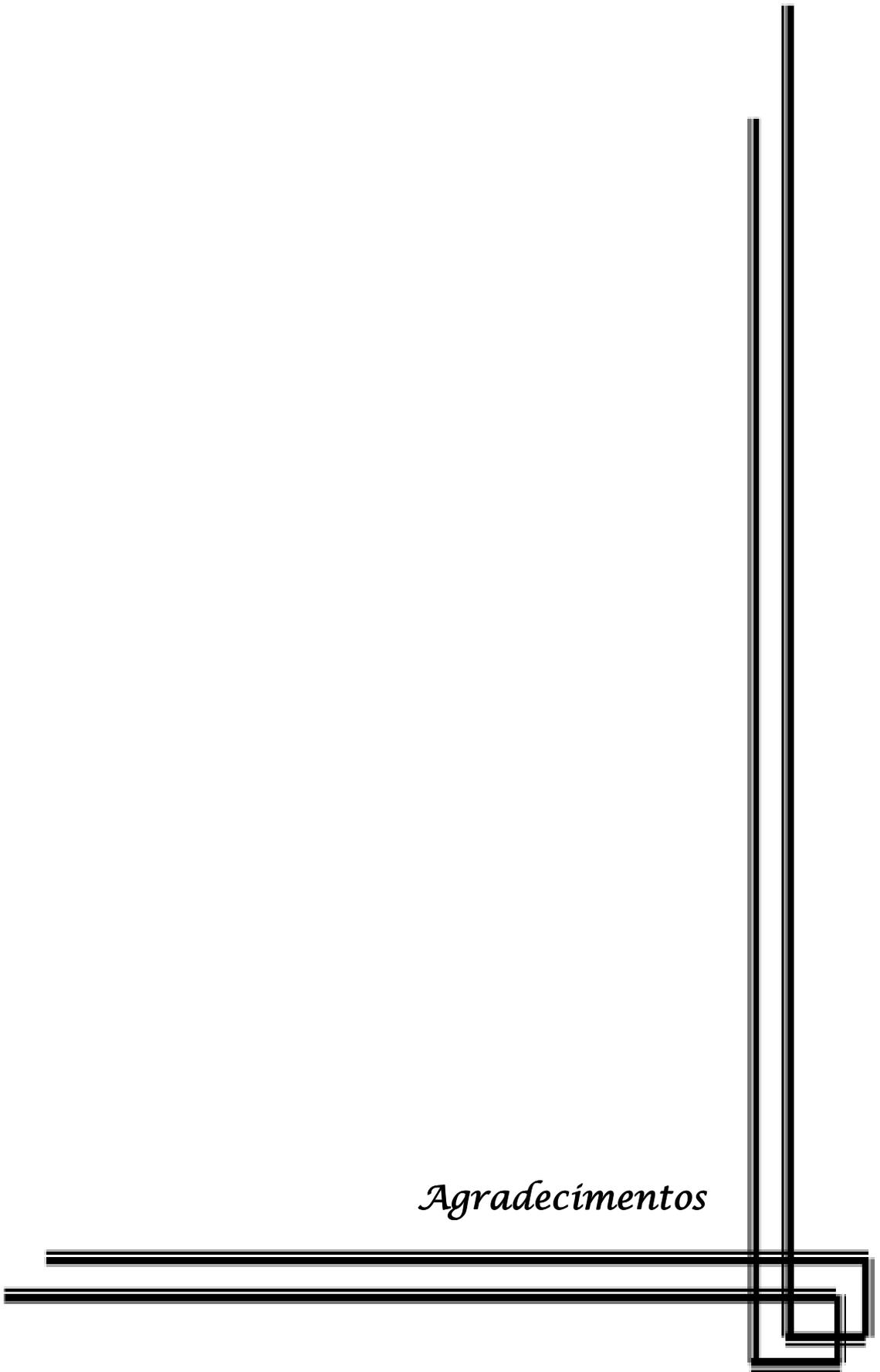
*Joaquim e Marly, meus pais, pela
sabedoria, acolhida e carinho: meus
exemplos de fé e perseverança;*

*Cesar, meu marido, pelo apoio
logístico e financeiro;*

*Cesar Jr., Giovanna e Fabianna, meus
filhos, por serem o meu mais
importante e mais perfeito projeto de
vida;*

*Joaquim Mário, Múcio Ricardo, Túlio
Augusto, Luísa Maria, Raíssa Maria,
Estêvão Márcio e Paulo Sânzio, meus
irmãos, por serem os melhores:
divertidos, guerreiros e amigos de
todas as horas.*

Agradecimientos



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

Ao Prof. Dr. *Ernesto Akio Taketomi*, por me receber como orientanda, por confiar em mim e no meu trabalho, e mais ainda, por me oferecer a oportunidade de pesquisar sobre exossomos - um privilégio;

À *Dra. Danielle dos Reis Napolitano*, pelo apoio durante a mudança no projeto de pesquisa e pelo suporte técnico no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica;

À Profa. Dra. *Deise Aparecida de Oliveira Silva*, por sua competência, disponibilidade e dedicação frente às minhas dúvidas e problemas - não teria conseguido sem ela;

À Profa. Dra. *Neide Maria da Silva*, pela compreensão, pela colaboração com este projeto de pesquisa, na realização da Microscopia Eletrônica, e também por ter partilhado seu conhecimento, me proporcionado crescimento intelectual e profissional;

Aos amigos, participantes do projeto como voluntários e sempre presentes companheiros do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica: *Daniela, Laura, Isabella, Ana Carolina, Priscila, Carolina, Juliana, Leandro, Carolina, Boscolli, Karine, Lucas, Bárbara, Núbia e Danielle*, pela ajuda, pelos ensinamentos, pelo carinho, pelos momentos de descontração e principalmente pela acolhida;

Aos amigos, alguns participantes do projeto como voluntários do Laboratório de Imunoparasitologia: Prof. Dr. *Jair Jr.*, Prof. Dr. *Thiago Mineo, Julianne, Arlindo, Mariana, Ana Cláudia, Hercílio, Carolina, Silas, Murilo, Willian*, pela ajuda e pela força;

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia, Profa. Dra. *Eloísa, Juliana, Loyane, Rosiane, Mariana, Esther, Diego, Lorena, Angélica, Belisa*, pelos seminários regados a muita imunologia, riso e algum cansaço;

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

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

Ao *Marcelo Arantes Levenhagen* pela ajuda com a Microscopia Eletrônica, pela simpatia e sorriso com que sempre me recebeu;

Aos amigos que partilharam sonhos e as disciplinas durante o mestrado: *Loyane, Daiane, Guilherme, Rosiane, Juliana, Julianne, Paula, Jaqueline, Luiz Fernando, Arlindo, Nayane, Lorena, Juliana, Marcília, Nágila e Glaucio*;

Especialmente à *Julianne*, por sua ajuda, pelo seu carinho e atenção. Você fez toda a diferença. Não vou me esquecer de suas palavras encorajadoras;

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia, *Márley, Max, Edilge, Zilda*, pela gentileza e sorrisos com que sempre me brindaram;

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

Aos ilustres professores que compuseram minha Banca de Qualificação de Mestrado: Profa. Dra. *Eloísa Amália Vieira Ferro*, Profa. Dra. *Julia Maria Costa Cruz* e Prof. Dr. *Jair da Cunha Junior*, pela ajuda na elaboração do meu artigo científico;

Aos Profs. *Dr. Edgar de Carvalho Filho* e *Dr. Claudio Vieira da Silva* convidados da Banca de Defesa de Mestrado: pela honra de suas presenças.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BSA	Soro albumina bovina
C1q	Subunidade q do complexo C1 do Sistema Complemento
CCL5	Quimiocina
CD	Marcador do tipo <i>Cluster of Differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CpG	Dinucleotídeo citosina fosfato guanina
CTA	Comissão de Terminologia Acadêmica
DO	Densidade Óptica
D ₂ O	Óxido de deutério de sacarose
DAB	3, 3'-diaminobenzina
Df	Extrato bruto de <i>Dermatophagoides farinae</i>
EAACI	<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i> (Academia Européia de alergia e Imunologia Clínica)
E-FABP	Proteína Epidérmica Ligadora de Ácidos Graxos
ELISA	<i>Enzyme Linked immunosorbent assay</i> (ensaio Imunoenzimático)
FasL	Ligante do Tipo Fas
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade do Tipo I
FcεRII	Receptor de IgE de alta afinidade do Tipo II
Gp91	Subunidade do citocromo b558 da NAD(P)H oxidase
HCP	<i>Heat Shock Protein Cognate</i> (Proteínas de Choque Térmico Cognata)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)

HSP	<i>Heat Shock Protein</i> (Proteínas de Choque Térmico)
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgD	Imunoglobulina de classe D
IgE	Imunoglobulina de classe E
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
IL	Interleucina (Interleucina)
iNOS	Sintetase de óxido nítrico
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i> (Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância)
JAK	Tirosina quinase
LTC	Leucotrienos
Mr	Massa molecular relativa
MRBP	Fator Inibidor da Migração Ligado às Proteínas
MyD88	Molécula adaptadora
	Nacional de Informação Tecnológica)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCBI	<i>The National Center for Biotechnology Information</i> (Centro
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa-B
NK	<i>Natural Killer cell</i> (Células Matadoras Naturais)
OVA	Ovalbumina
PAI	Enzima ativadora de plasminogênio
PAMP	<i>Pattern Associate Molecular patogen</i> (Padrão molecular associado a patógeno)
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	PBS adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	PBS adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-L	PBS adicionada de Tween 20 e leite em pó desnatado
PCR	<i>Polymerase Reaction Chain</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)

PGD	Prostaglandina do tipo D
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i> (Fitohemaglutinina)
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl</i> (Fenilametilsulfonil)
RANTES	Ativação normal de célula T expressa e secretada
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucléico)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Polycramide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel)
SNC	Sistema nervoso central
TMB	Tetrametilbenzedina
TCP	Teste Cutâneo de Puntura
TfR2	<i>Transferrin Receptor 2</i> (Receptor Transferrina 2)
TGF	<i>Transformin Growth Factor</i> (Fator de transformação de Crescimento)
Th1	Linfócito T <i>helper 1</i>
Th2	Linfócito T <i>helper 2</i>
TLR	Receptores do tipo <i>toll like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulador
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Solução de Tris adicionada de HCl
Tween 20	<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i> (Monolaurato de
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Células produtoras de exossomos com respectivas referências bibliográficas. 36
- Tabela 2.** Características das proteínas Receptor de Transferrina 2 (TfR2) e as tetraspaninas (CD63 e CD81) usadas como marcadores de exossomos neste trabalho. 46
- Tabela 3.** Concentração de proteínas dos exossomos isolados das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos não-atópicos, avaliadas pelo Método de Bradford. 79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção e liberação de exossomos por célula apresentadora de antígenos. Os antígenos exógenos são endocitados por meio da membrana plasmática e transformados em endossomos iniciais ou primários antes de atingir os compartimentos do complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe II (MIIC), onde ocorre o carregamento de peptídeos. Nesses compartimentos, os exossomos são formados por invaginação interna da membrana limitante MIIC. Eles carregam complexos MHC II/peptídeos em sua superfície. MIIC pode ser direcionado para o compartimento de degradação nos lisossomos ou poderão fundir-se com a membrana plasmática para liberar os exossomos para o meio extracelular. 40
- Figura 2.** Cromossomos humanos 7, 12 e 11 respectivamente, com a localização dos genes para a expressão das proteínas Receptor Transferrina 2 (TfR2) e as tetraspaninas CD63 e CD81 presentes na maioria dos exossomos (*The National Center for Biotechnology Information - NCBI*). 47
- Figura 3.** Condições experimentais nas quais foram expostas as PBMC de indivíduos alérgicos para análise da produção de citocinas *in vitro*. 75
- Figura 4.** Esquema simplificado do isolamento de exossomos a partir de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos não-atópicos. 78
- Figura 5.** Perfil eletroforético das proteínas do *pool* de exossomos provenientes de PBMC de indivíduos não-atópicos estimuladas com Meio de Cultura Completo (ExoA), com o mitógeno PHA (ExoB) e com o alérgeno Df (ExoC) em SDS-PAGE, a 12%, corado com Comassie Coloidal Azul. Mr: Padrão de massa molecular relativa é mostrado à 80

esquerda em kDa (kiloDalton).

Figura 6. Caracterização dos exossomos isolados das PBMC de indivíduos não-atópicos. Um pool de exossomos (10 mg de proteína total) isolado das PBMC de indivíduos não-atópicos sob ação de estímulos vários estímulos *in vitro*: Meio (ExoA) ou fitohemaglutinina - PHA (ExoB) ou extrato de alérgeno *Dermatophagoides farinae* - Df (ExoC) foram separados em 12% SDS-PAGE e eletroforéticamente transferidos para membranas de nitrocelulose. As marcações foram feitas com anticorpos anti-CD63 (60 kDa), anti-CD81 (26 kDa) e anti-Tfr2 (19 kDa) e reveladas com diaminobenzidina (DAB). As fitas C representam o controle da reação (ausência dos respectivos anticorpos primários). Os marcadores de massa molecular (M) são mostrados à esquerda em KDa (kiloDalton).

81

Figura 7. Imunomarcção dos exossomos. Os exossomos isolados das PBMC de indivíduos não-atópicos sob ação de vários estímulos *in vitro*: Meio (ExoA) ou fitohemaglutinina - PHA (ExoB) ou extrato de alérgeno *Dermatophagoides farinae* - Df (ExoC) e o controle negativo (fragmentos celulares), foram testadas com o anticorpo primário monoclonal de camundongo - anti-TFR2, posteriormente, foi usado como anticorpo secundário o anti-IgG de camundongo conjugado com partículas de ouro (10 nm), seguido de coloração com acetato de uranila e análise em microscopia eletrônica. As partículas de ouro estão indicadas por setas. As barras indicam 100 nm de diâmetro.

82

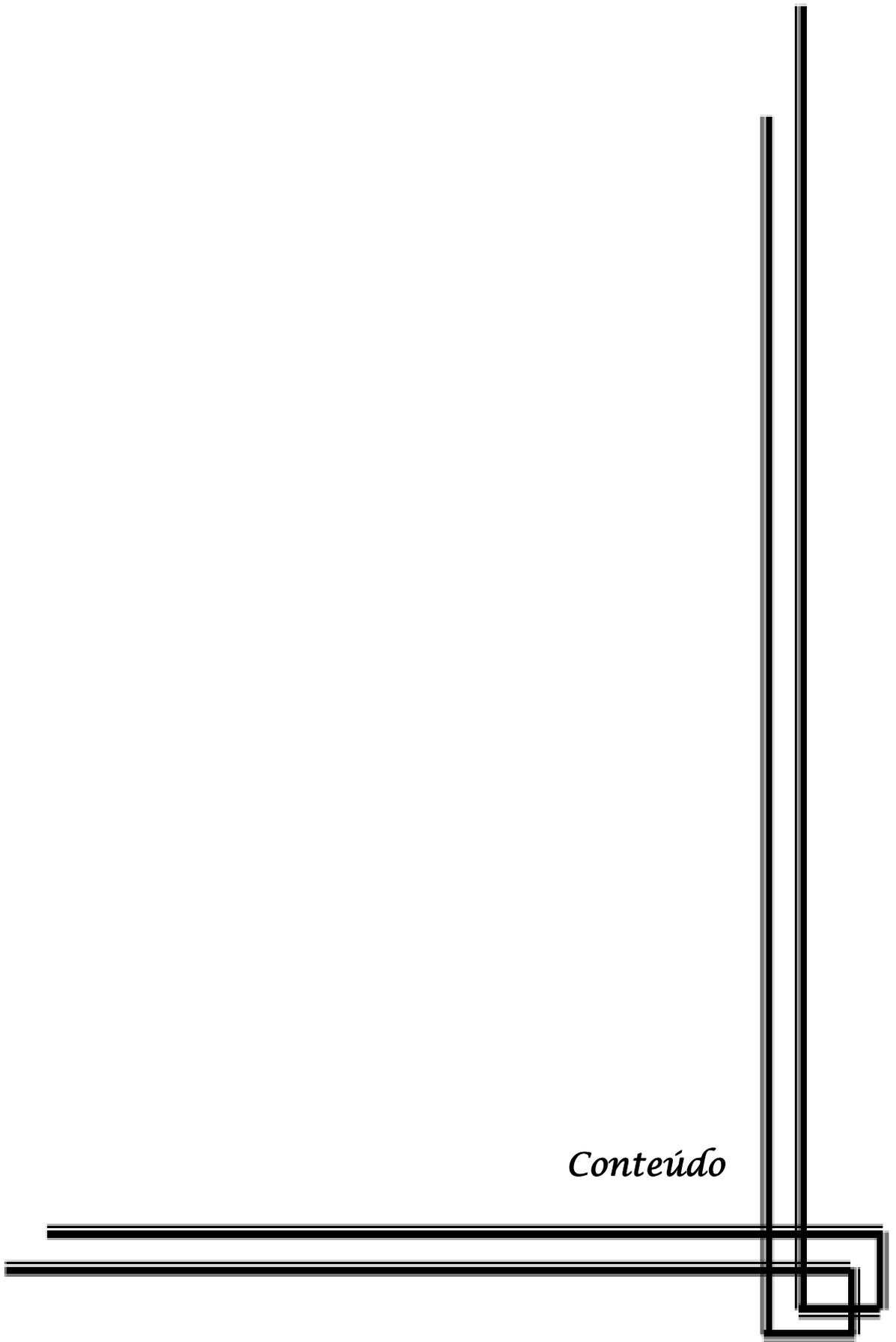
Figura 8. As PBMC de indivíduos alérgicos foram analisadas quanto à produção de citocinas após estímulos *in vitro* com: Meio (ExoA) ou fitohemaglutinina - PHA (ExoB) ou extrato de alérgeno *Dermatophagoides farinae* - Df (ExoC). Os níveis de citocinas foram medidos pelo método ELISA nos sobrenadantes após 72 horas de cultura, nas quatro condições

84

experimentais: IFN- γ (A), IL-17 (B), IL-5, (C), IL-13 (D), IL-10 (E) e TGF- β (F). Os grupos experimentais estão detalhados na seção sobre Material e Métodos e no esquema da Figura 3. Os dados estão expressos em Média \pm com desvio padrão (SD).

* Estatisticamente significativo em relação à média (barras brancas) para cada condição experimental; # estatisticamente significativo em relação ao estímulo com PHA (condição I), conforme determinado pela análise de variância e teste de comparação múltipla de Bonferroni ($P < 0,05$).

Conteúdo



Lista de Abreviaturas e Siglas.....	9
Lista de Tabelas.....	12
Lista de Figuras.....	16
Resumo.....	20
Abstract	22
1. Introdução	
1.1 Alergia.....	24
1.2 Resposta imune na Alergia.....	31
1.3 Exossomos ou nanovesículas.....	34
1.4 Biogênese.....	36
1.5 Composição.....	40
1.5 Função.....	47
1.6 Exossomos na Alergia.....	56
2. Objetivos.....	61
3. Material e Métodos	
3.1 Procedimento Ético.....	63
3.2 Locais de Estudo.....	63
3.3 Participantes.....	64
3. 4 Preparação do Extrato antigênico de <i>Dermatophagoides farinae</i>	65
3. 5 Extrato antigênico de ácaros para Teste Cutâneo de Puntura.....	66
3. 6 Teste Cutâneo de Puntura.....	67
3.7 Amostras de Sangue.....	67
3.8 Cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	68

3.9 Isolamento de Exossomos.....	69
3.10 Perfil eletroforético das proteínas exossomais.....	70
3.11 <i>Immunoblotting</i>	71
3.12 Análise Ultraestrutural e Imunomarcção.....	72
3.13 Análise de Citocinas.....	73
3.14 Análise Estatística.....	76
3.15 Biossegurança.....	76
4. Resultados	
4.1 Caracterização dos Exossomos.....	78
4.2 Efeito do estímulo com exossomos sobre o perfil de citocinas.....	82
5. Discussão.....	88
6. Referências Bibliográficas.....	95
7. Anexos	
7.1 Anexo 1.....	117
7.2 Anexo 2.....	118
7.3 Anexo 3.....	121
7.4 Anexo 4.....	123

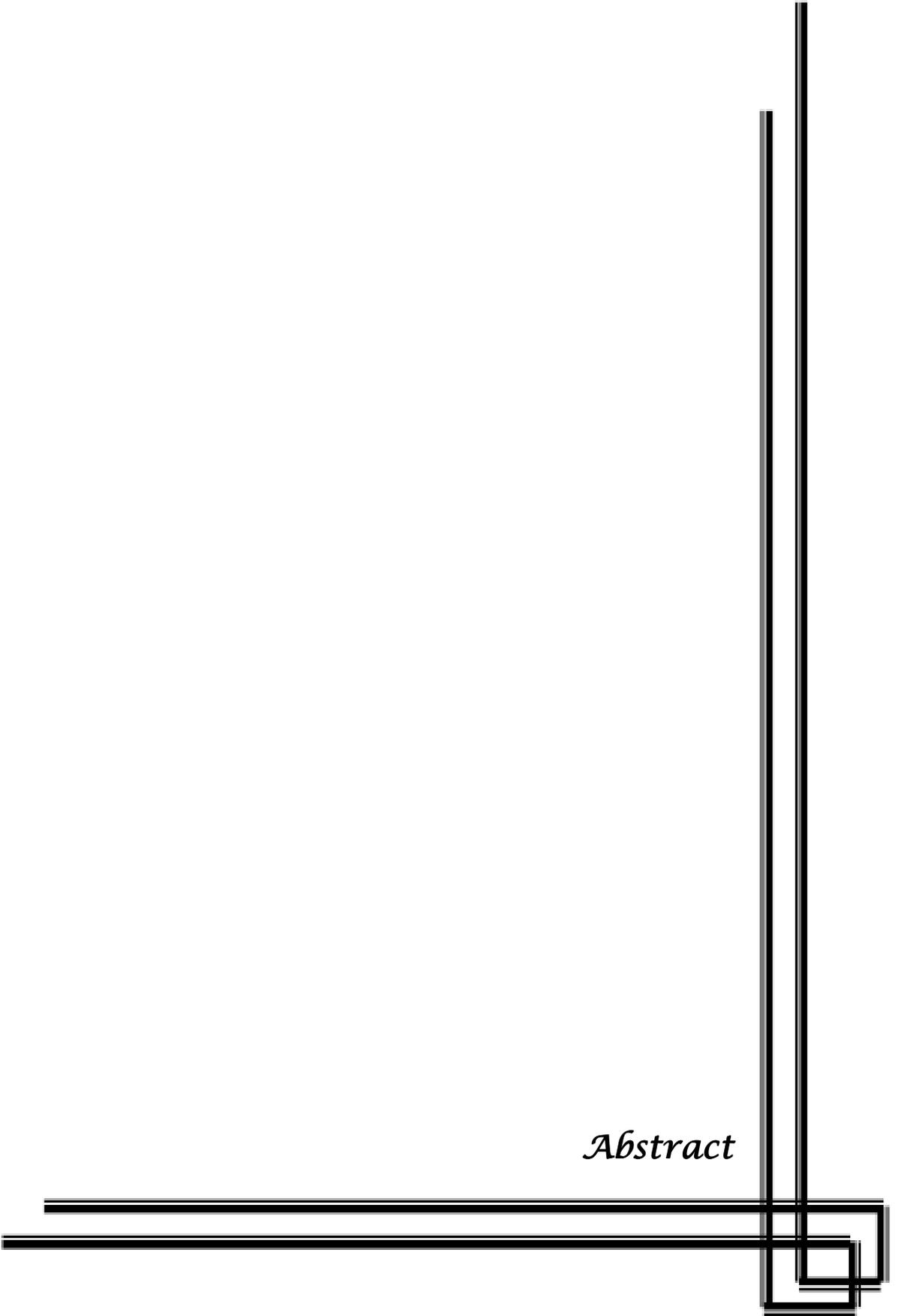
Resumo

A alergia é um problema de saúde pública que afeta a qualidade de vida de milhões de crianças e adultos. Sua prevalência tem aumentado drasticamente em muitos países. Atualmente, muitos estudos têm mostrado que nanovesículas membranosas, chamadas exossomos são secretadas por um grande número de células implicadas na alergia, incluindo mastócitos, células dendríticas, linfócitos T e B. Os exossomos têm origem endossomal, são produzidos em condições fisiológicas e nas patologias, sua secreção mostra-se aumentada. O objetivo deste estudo foi isolar exossomos de indivíduos não-atópicos e avaliar a sua influência no perfil de citocinas produzidas *in vitro* por leucócitos de indivíduos atópicos. Os exossomos foram isolados a partir de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos não-atópicos e caracterizados pelo perfil eletroforético de suas proteínas, pela marcação com proteínas específicas - Receptor transferrina 2 (TFR2), CD63, CD81 e pela análise ultraestrutural. Estes exossomos foram então usados para estimular *in vitro* as células mononucleares do sangue periférico de indivíduos atópicos. Foi feita análise quantitativa da produção de citocinas no sobrenadante de cultura celular por ensaio enzimático.

Os exossomos foram capazes de modular negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-17, porém não foram capazes de inibir as respostas imunes de perfil Th2. A resposta imune obtida a partir do estímulo com exossomos mostrou-se imunomoduladora ao invés de imunossupressora como era esperado.

Palavras-chave:Exossomos.Alergia.Citocinas. Efeito imunomodulador.

Abstract



Allergy is a public health problem that affects children and adults. Its prevalence has increased dramatically in many countries. Nowadays, many studies have shown that nanovesicles membranous, called exosomes, are secreted by a large number of cells implicated in allergy, including mast cells, dendritic cells, T and B lymphocyte. These nanovesicles have endosomal origin, are produced under physiological and pathological conditions, when the secretion appears to be increased. The aim of this study was to isolate exosomes from healthy subjects, non-atopic, and to evaluate their influence in cytokine profile secreted *in vitro* by leukocytes of atopic subjects. Exosomes were isolated from peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects and characterized by protein electrophoretic profile by staining with specific proteins (transferin receptor 2 - TFR2, CD63 and CD81) and by ultrastructural analysis. These exosomes were then used to stimulate *in vitro* peripheral blood mononuclear cells of atopic subjects. Quantitative analysis was made of the production of cytokines in culture supernatants. The exosomes were able to modulate negatively the production of proinflammatory cytokines such as IFN- γ and IL-17 by peripheral blood mononuclear cells, but were not able to inhibit Th2 immune responses. The immune response obtained from stimulation with exosomes was shown immunomodulatory effect rather than immunosuppressive effect, as expected.

Key words: Exosomes. Allergy. Cytokines. Immunomodulatory effects.

1. Introdução

1.1 ALERGIA

As doenças alérgicas representam um problema mundial de saúde e a prevalência destas condições alérgicas, como a rinite, é crescente. Além de ter um efeito negativo sobre os doentes em suas atividades diárias e qualidade de vida, as doenças alérgicas estão associadas a consideráveis encargos econômicos (SCHOENWETTER et al., 2004).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado o aumento da prevalência de doenças alérgicas em várias partes do mundo, afetando milhões de crianças e adultos. As doenças alérgicas são caracterizadas por manifestações clínicas exageradas desencadeadas pelo contato com substâncias estimulantes, os alérgenos, que para maioria é tolerável, pois para essas pessoas apresenta efeito inócuo. Os alérgenos são proteínas que podem conter uma cadeia lateral de carboidrato ou então esta mesma molécula de carboidrato pode ser o próprio alérgeno e em raros casos, alguns compostos inorgânicos, podem também atuar como haptenos (REZENDE, 2006). Essas manifestações clínicas são chamadas de hipersensibilidade e a alergia, uma destas manifestações, é marcada pela presença de mecanismos imunológicos mediados por células e por anticorpos, como a Imunoglobulina do tipo E (IgE). Quando os indivíduos alérgicos apresentam uma tendência pessoal ou familiar, de origem genética, principalmente quanto à produção de IgE, estes são chamados atópicos (JOHANSSON et al., 2004).

As imunoglobulinas são glicoproteínas presentes no soro e fluidos teciduais de todos os mamíferos. Apresentam uma região de sua molécula que

se liga ao antígeno e outra que age como efetora da resposta imune, fixando-se aos tecidos do hospedeiro e às várias células do sistema imune - incluindo as células fagocitárias - e ao elemento C1q da via clássica do sistema complemento. A estrutura básica de todas as imunoglobulinas consiste de uma unidade com duas cadeias polipeptídicas leves idênticas, e duas pesadas, unidas por pontes dissulfeto. As classes e subclasses de uma molécula de imunoglobulina são determinadas por suas cadeias pesadas (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2002) e são conhecidas, até o momento, cinco classes em mamíferos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

A IgE é o isotipo de anticorpo que contém a cadeia pesada epsilon (ϵ). Circula como um anticorpo bivalente e está normalmente presente no plasma em concentração inferior a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em condições patológicas, tais como as infecções helmínticas e na alergia, esse nível pode subir para mais de 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ABBAS; LICHTMAN; 2007). A ligação da IgE, bem como de qualquer anticorpo ao antígeno se dá pela formação de múltiplas ligações não-covalentes entre o antígeno e os aminoácidos do anticorpo. Embora as forças de atração (especialmente, pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas, ligações de Van der Waals e hidrofóbicas) envolvidas nestas uniões sejam individualmente fracas em comparação com as ligações covalentes, a multiplicidade das ligações resulta em uma energia de ligação suficientemente forte (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2005).

As doenças mediadas pela IgE, afetam 25% das crianças em países industrializados (ASHER, 2006). São exemplos das manifestações clínicas das

alergias: rinite, asma, desarranjos gastrointestinais, eczema atópico, os quais agem localmente nos órgãos-alvos, e a anafilaxia sistêmica, onde a reação alérgica é potencialmente fatal, com vasodilatação dos músculos lisos dos vasos sanguíneos, juntamente com a vasodilatação do endotélio vascular, podendo acarretar perda severa de fluido, produzindo choque (DOAN, MELVOLD, WALTENBAUGH, 2006, p. 124). A asma alérgica é caracterizada por uma reação imunológica, sob a forma de inflamação do sistema respiratório inferior, induzindo a um quadro de hiperreatividade brônquica e, conseqüentemente, episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse (LEMANSKE-JUNIOR; BUSSE, 2003).

Durante os últimos 10 anos ficou demonstrado que a asma e rinite são dois aspectos clínicos de um único transtorno envolvendo o trato respiratório (PASSALACQUA et al., 2006). Em indivíduos atópicos, existe uma progressão clínica da doença, geralmente começando com dermatite atópica e alergia alimentar na infância, culminando com rinite e asma (MAROGNA et al., 2006). Essa progressão geralmente é chamada de “Marcha Alérgica” do inglês *Allergic March* (SPERGEL, et al., 2003). Em adultos, as características clínicas da doença alérgica também podem mudar ao longo do tempo. Por exemplo, foi demonstrado que paciente alérgicos tendem a desenvolver novas sensibilizações de pele (PANGINO et al., 2004), e que uma evolução de rinite para asma pode ocorrer (LOMBARDI, et al., 2001; SPERGEL, 2005).

Pacientes em todos os países, de todos os grupos étnicos, de todas as idades, por exemplo, sofrem com rinite alérgica. Diversas formas de doenças

alérgicas têm sido descritas desde a antiguidade, mas a “febre-do-feno”, resposta alérgica ao pólen da erva-de-santiago, hoje conhecida como rinite, surpreendentemente é contemporânea, acometendo cerca de 15 a 20% da população dos Estados Unidos.

Alguns textos islâmicos do século IX e alguns outros da Europa do século XIV, descrevem alguns sintomas e reações, que hoje reconhecidos como sintomas e reações alérgicas. Somente no início do século XIX é que a doença alérgica, especificamente a rinite, foi descrita mais cuidadosamente (BOSTOCK, 1819).

No Brasil, as prevalências de diagnóstico médico de asma, rinite alérgica e eczema atópico, determinados pela primeira vez como parte de um estudo internacional, revelaram ser em média 12%, 39% e 8%, respectivamente (SOLÉ et al., 2001; WILLIAM, SIEGEL, PORTNOY, 2001). A presença e produção aumentada de anticorpos específicos da classe das IgE a antígenos usuais, são características comuns às doenças alérgicas e servem como importantes parâmetros para a confirmação diagnóstica (EAACI, 2001). A história clínica de um indivíduo alérgico ou atópico é importante na medida em que por meio dela é possível verificar a doença em questão, seus fatores desencadeantes, seus agravantes e de porte destas informações, uma terapêutica adequada pode ser iniciada (NASPITZ, 2004).

Estudos recentes têm apontado índices de falso-positivos de até 22,6% quando se utilizam apenas dados da história clínica do paciente para o diagnóstico de doenças alérgicas (KAM, HSIEH, 1994; WILLIAMS, SIEGEL,

PORTNOY, 2001). As manifestações clínicas das doenças alérgicas, muitas vezes são comuns às outras doenças, o que dificulta o seu diagnóstico. Por esse motivo, vários exames diagnósticos têm sido usados para convalidar o diagnóstico de doença alérgica (NASPITZ, 2004). Pesquisadores têm usado novas descobertas para tornar mais eficientes os métodos diagnósticos atualmente utilizados e melhorar a eficácia dos medicamentos e conseqüentemente a vida do indivíduo acometido de doenças alérgicas.

Análises de amostras de pacientes e de modelos animais com doenças alérgicas, têm demonstrado, que as células T *helpers* - do tipo 2 (Th2) e suas citocinas, como as interleucinas 3, 5 e 13 (IL-4, IL-5 e IL-13, respectivamente) estão implicadas na resposta imune alérgica. A fração efetora desta resposta inclui a produção de IgE, infiltração de eosinófilos, ativação de mastócitos e liberação de mediadores pré-formados, como a histamina e derivados lipídicos, pós-formados, como leucotrienos e prostaglandinas. Estudos atuais demonstram que é possível que as doenças alérgicas crônicas, como a asma, apresentem também células T com perfil diferente de Th2 (SOROON, DOHERTY, 2009).

Recentemente, foi apresentada uma nova população de célula T, diferente de Th2, conhecida por "Th9", que produz interleucina-9 (IL-9) em grande quantidade. A IL-9 está envolvida com a asma, uma doença alérgica crônica e com a proteção contra infecções causadas por nematóides (VELDHOEN et al., 2008, DARDALHON et al.; 2008). É uma citocina multifuncional, secretada por muitos tipos celulares, como linfócitos,

mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (UYTTENHOVE, SIMPSON, VAN SNICK, 1988; RENAULD et al., 1995). Estudos *in vivo* têm demonstrado que a IL-9 é uma citocina preferencialmente produzida pelos linfócitos Th2 e sempre foi classificada como uma citocina membro da família de citocinas Th2, porém, trabalhos *in vitro*, têm mostrado que a produção de IL-9 em resposta a antígenos protéicos é significativamente reduzida na ausência de células T CD4, indicando com isso que as células T são as maiores produtoras de IL-9. Durante a resposta alérgica *in vivo*, ainda não se pode distinguir se a IL-9 foi secretada pelas células Th2 ou se as células Th2 se reprogramaram em células Th9 (SOROOH, DOHERTY, 2009).

Além das células Th2 e Th9, as células Th17 (descritas em 2005) e suas citocinas têm sido implicadas na inflamação alérgica. Essa nova família de citocinas IL-17 também está envolvida na migração e ativação das células inflamatórias nas vias aéreas, resultado na inflamação típica da asma (KAWAGUCHI et al., 2004; KOLIS e LINDEN 2004; HARRINGTON et al., 2005, PARK et al., 2005).

As razões pelas quais algumas pessoas desenvolvem alergias e outras não, não são totalmente conhecidas, mas sabe-se que diferentes fatores genéticos e ambientais são importantes (ADMYRE, 2007), como a exposição às substâncias químicas, infecções, medicamentos, alimentos, radiação ultravioleta, dentre outros. Muitos genes para a susceptibilidade têm sido reportados (LAITINEN, 2004; ASHER et al., 2006), bem como diferentes estilos de vida também podem influenciar estas respostas alérgicas (ALM, 1999;

ALFVEN et al., 2006). A gestação e a infância também representam importantes momentos para o início das sensibilizações. Pesquisas envolvendo alergia na infância têm avaliado o papel da amamentação no desenvolvimento da alergia. Admyre et al. (2007), relatam que existem resultados conflitantes quanto ao efeito da amamentação sobre a alergia, com alguns estudos mostrando que o aleitamento materno pode aumentar o risco de sensibilização (WETZIG, et. Al., 2000; SEARS, et al., 2002), enquanto que outros indicam um efeito protetor do leite materno contra o desenvolvimento da alergia (ODDY, et al., 1999; KULL, et al., 2005). O desenvolvimento da atopia a partir da amamentação, depende de fatores genéticos (SILTANEN et al. 2003). A maioria dos estudos, porém, indica o efeito protetor do leite materno no desenvolvimento da hipersensibilidade do tipo I ou imediata (VAN ODIJK, et al., 2003) e a amamentação deve ser recomendada também pelo seu efeito benéfico global (ADMYERE, 2007).

Algumas diferenças na composição do leite materno produzido por mães alérgicas em relação às mães saudáveis podem ser mensuráveis, por exemplo, as concentrações de IL-4, IL-8 e a regulação sobre a ativação normal de célula T expressa e secretada (RANTES), foram maiores no leite de mães alérgicas em comparação com as de não-alérgicas (BOTTCHEER, et al., 2000) e a citocina imunossupressora fator de crescimento (TGF- β) foi encontrada em menor concentração no leite de mães alérgicas (LAIKO, et al., 2003), porém não se sabe ao certo se estas diferenças têm algum impacto sobre o sistema imunológico da criança (ADMYERE, 2007).

As predisposições genéticas às alergias podem ser frequentemente mascaradas por fatores ambientais, que são considerados de maior relevância. Por exemplo, a rinite é rara no Japão, mas comum em descendentes de japoneses que vivem nos Estados Unidos (DOAN, MELVOLD, WALTENBAUGH, 2006, p. 124).

Alguns estudos propõem a exposição aos patógenos no início da vida, para proteção contra doenças alérgicas (WEISS, 2002), embora já se saiba que a evolução destas doenças alérgicas é dependente especialmente da infância, genética, lactação, fumo materno, infecções, microflora intestinal e outros (KALLAIOMAKI, 2002). A resposta imune específica é iniciada pela apresentação de antígenos, do próprio indivíduo ou de outros, e está vinculada às moléculas do sistema HLA dos linfócitos T. Os genes HLA estão localizados no braço curto do cromossomo 6, que representa a região mais polimórfica do genoma humano. Mais de 100 doenças estão associadas aos genes do MHC de classe I e II e estão presentes neste cromossomo.

1.2. RESPOSTA IMUNE NA ALERGIA

A sensibilização para um alérgeno envolve a apresentação deste alérgeno para as células T alérgeno-específicas pelas células apresentadoras de antígenos, induzindo a uma resposta Th2, com a produção de citocinas IL-4 e IL-13, as quais são capazes de mudar a classe de anticorpos produzidos pelas células B, para IgE. As IgE podem então se ligar aos receptores de alta afinidade

(FC ϵ RI) presentes na superfície dos mastócitos e basófilos. Quando o complexo IgE/FC ϵ RI é ligado pelo alérgeno, os granulócitos liberam mediadores que dirigem a resposta imune (ADMYRE et al., 2007)

As citocinas IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13 direcionam a resposta imune a um perfil Th2, a citocina IL-9 também está relacionada com a indução da produção de IgE e está aumentada na asma. As IgE também podem ligar os FC ϵ RI nas células dendríticas e nos monócitos, bem como os FC ϵ RII na superfície das células B. Este mecanismo facilita o reconhecimento do alérgeno pelas células apresentadoras de antígeno e potencia a apresentação dos peptídeos derivados do alérgeno para as células T, as quais dirigem a fase tardia da reação alérgica, que é caracterizada pelo recrutamento das células efetoras como as Th2, eosinófilos, basófilos e mastócitos para o sítio da inflamação (DEVOS et al., 2006).

Nos mastócitos, o resultado desta ativação é a geração de mediadores lipídicos, como as prostaglandinas D2 (PGD₂) ou leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) e a exocitose de grânulos secretores, como a histamina, por exemplo. A histamina causa um aumento da circulação sangüínea local e da permeabilidade dos vasos sanguíneos, causando vasodilatação, edema e contração dos músculos lisos. As enzimas, como a triptase e quinase liberadas também pelos mastócitos, ativam as metaloproteínas que causam destruição tecidual e esses fenômenos são responsáveis pelas manifestações clínicas preliminares das reações alérgicas, ocorrendo nos primeiros 30 minutos seguidos à exposição alérgica (ABBAS, LICHTMAN, 2007).

Muitas moléculas podem ser reconhecidas por suas propriedades em induzir a liberação de mediadores envolvidos na resposta alérgica. Antígenos polivalentes usualmente exercem um melhor desempenho frente aos monovalentes, que são incapazes de promover a ligação cruzada da IgE aos seus receptores, ou seja, a valência destas moléculas é um dos fatores essenciais para a iniciação desse processo de resposta imune (RAFAEL, 2006). Os trabalhos realizados por Elgavish e Shaanan (1998), comprovaram que a natureza dos epítomos relacionados a esses antígenos não é necessariamente peptídica, pois muitos deles podem apresentar origem glicídica, outros ainda, podem apresentar origem glicoprotéica (VARGHESE et al., 1992).

As glicoproteínas são proteínas que apresentam cadeias de carboidrato em sua composição. Essas cadeias, que podem apresentar tamanho variável, são responsáveis por importantes características, como por exemplo, a determinação da hidrofobicidade e resistência a choques térmicos (HELENIUS; AEBI, 2001; TROMBETTA; PARODI, 2001).

Atualmente, juntamente com os subgrupos de células T e suas respectivas citocinas e vias de sinalização, novos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da alergia têm sido estudados e descritos, como por exemplo, os mecanismos que demonstram que as nanovesículas, estruturas celulares ainda pouco estudadas, chamadas exossomos, derivadas de células B, podem estimular a proliferação das células T com perfil Th2, bem como a secreção de citocinas IL-5 e IL-13, sugerindo que os exossomos podem ser considerados

como vesículas imunoestimulatórias nas reações alérgicas (ADMYRE et al., 2007)

Isolar e purificar os exossomos, e observar o comportamento *in vitro* das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos alérgicos sob estímulo de exossomos derivados de indivíduos não-atópicos, é o principal objetivo deste trabalho.

1.3. EXOSSOMOS OU NANOVESÍCULAS

O termo exossomo foi originalmente usado para descrever uma pequena vesícula membranosa de aproximadamente 30 a 100nm de diâmetro por microscopia eletrônica (ESCOLA et al., 1998), liberada pelos reticulócitos na medula óssea vermelha, durante seus estágios finais de desenvolvimento, como mecanismo para eliminação de proteínas não necessárias para a maturação da função eritrocítica, como o fator transferrina (TfR) (PAN E JOHNSTONE 1983; HARDING, HEUSER, STAHL 1984; JOHNSTONE et al., 1987) ou acetilcolina esterase (Pan et al., 1985).

Os exossomos são nanovesículas de origem endossomal, cujas membranas são formadas por duplas camadas lipídicas que expressam receptores de células T do tipo β (TCR β) e *cluster differentiation 3* (CD3), dentre outros (BLANCHARD, 2002). São secretados pela maioria das células em cultura, mas também estão presentes no soro (COPPIETERS et al., 2009). Estas

vesículas são os mais novos membros da família das vesículas bioativas, que se comportam, dentre outras funções, como promotoras de comunicação intracelular (SCHOREY E BHATNAGAR, 2008).

Estas nanovesículas não são formadas a partir da membrana plasmática, mas sim de compartimentos chamados corpos ou corpúsculos multivesiculares. Pequenas vesículas presentes no lúmen dos corpos multivesiculares provavelmente brotam a partir da face interna dos mesmos, limitando-se com a membrana externa (TROWBRIDGE et al., 1993; VAN DEURS et al., 1993), gerando vesículas com a face citosólica da membrana dentro da própria vesícula por fusão direta dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática, de onde serão liberadas para o meio extracelular como exossomos (PAN et al., 1985).

Os exossomos podem ser secretados por uma grande variedade de células, incluindo mastócitos, (RAPOSO et al., 1997), células dendríticas (THERY et al., 1999), células tumorais (MEARS et al., 2004), células epiteliais intestinais (VAN NIEL et al., 2001), células B (RAPOSO et al., 1996) e células neurais (FAURE et al., 2006) (TABELA 1).

Por muitos anos acreditou-se que os exossomos funcionassem apenas como um caminho para eliminação de proteínas indesejadas (PAN e JOHNSTONE 1983). Até 1996 não se conhecia a função imunológica dos exossomos, porém RAPOSO et al., (1996), demonstraram que linfócitos B secretam exossomos e que estes apresentam moléculas de superfície do complexo MHC II e são capazes de apresentar antígenos para linfócitos CD4+.

Isso aumentou o interesse sobre estas estruturas. Atualmente, os exossomos já foram isolados em vários líquidos corporais humanos, incluindo o plasma sangüíneo (CABY et al., 2005), urina (PISITKUN et al., 2004), leite materno (ADMYRE et al., 2007), fluido brônquioalveolar (ADMYRE et al., 2003), líquido amniótico (KELLER et al., 2007) e em efusões malignas (ANDRE et al., 2002b), ou seja, são encontrados em condições fisiológicas e estão aumentados em uma grande variedade de doenças.

Tabela 1: Células produtoras de exossomos

Células	Referências
Linfócitos B	ESCOLA et al., 1998, RAPOSO et al., 1996
Linfócitos T	PETERS et al., 1989, PETERS et al., 1991
Plaquetas	HEIJNEN et al., 1999, JANISZEWSK et al. 2004
Células Dendríticas	THÉRY et al., 1999, THÉRY et al., 2001
Células Intestinais	VAN NIEL et al., 2001, KARSSON et al., 2001
Mastócitos	RAPOSO et al., 1997, SKOKOS et al., 2001b
Macrófagos	DENZER et al., 2000
Reticulócitos	JOHNSTON et al., 1987, RIEU et al., 2001

1. 4. BIOGÊNESE

As células eucarióticas eliminam proteínas produzidas via biossíntese por meio de mecanismos de exocitose de vesículas secretoras ou

pela liberação de grânulos de secreção após estímulo adequado (SCHOREY, BHATNAGAR, 2008). A eliminação de proteínas via exossomos tem sido considerada uma via alternativa de secreção celular (ANDRE et al., 2001). Os exossomos se originam de vesículas intraluminares de endossomos tardios - os corpos multivesiculares, que se formam após a endocitose de proteínas da superfície celular. Os corpos multivesiculares fazem parte do sistema endossomal pleiomórfico, que é composto por vesículas primárias endocíticas, endossomos iniciais, endossomos tardios e lisossomos (MELLMAN, 1996; GAUZE, 1996).

Inicialmente, as vesículas endocíticas se apresentam sob a forma de endossomos iniciais, que após ação de enzimas têm seus receptores separados de seus ligantes, em meio levemente ácido (pH: 6,2). Algumas proteínas voltam para a membrana plasmática e outras vão compor os endossomos secundários ou tardios, agora em meio ácido (pH: 5,0 - 5,5). Estes se apresentam com a forma esférica. Nestes endossomos tardios as proteínas são ordenadas dentro de vesículas intraluminares (EKSTROM et al. 2007).

As vesículas intraluminares são formadas pelo brotamento interno da membrana endossomal e contêm o citosol das células. Os corpos multivesiculares são envolvidos por proteínas transportadoras por degradação nos lisossomos. Alternativamente, estes corpos multivesiculares podem fundir-se com a membrana plasmática, orientando a liberação das vesículas intraluminares, os exossomos, para o meio extracelular (RAPOSO et al., 1996; PAN et al., 1985). Proteínas e lipídios são ordenados até o limite da membrana

endossomal durante a formação das vesículas intraluminares e como conseqüência, os exossomos contêm moléculas que refletem suas origens, ou seja, dos endossomos secundários nos quais foram formados (KLEIJMEER, et al., 2001).

A proteína transmembrana, *Tumor Suppressor Activated Pathway -6* - TSAP6, está envolvida na regulação da produção dos exossomos (AMAZALLAG et al., 2004). A TSAP6 foi identificada como uma ferriredutase, uma proteína responsável pela eficiência na absorção do ferro pelos eritrócitos, mediada pela transferrina. Esta enzima também atua como uma redutase de cobre, estimulando a absorção do mesmo (OHGAMI et al., 2005; OHGAMI et al. 2006). O mecanismo responsável pela ordenação das proteínas nas vesículas intraluminares foi recentemente identificado e chamado de *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* - ESCRT (DE GASSART et al., 2004), é um mecanismo composto por quatro complexos protéicos: ESCRT 0, I, II e III. Acredita-se que estes complexos reconheçam proteínas ubíquas transmembranas e induzam suas inclusões dentro dos domínios das membranas que geram as vesículas intraluminares dos corpos multivesiculares (DE GASSART et al., 2003). Por exemplo, proteínas ubíquas são encontradas pelo complexo ESCRT 0, o qual recruta a proteína *Tumor Susceptibility Gene* - TSG 101, também conhecida como TSGS 101, que por sua vez aciona o complexo ESCRT II via ESCRT III. Estes complexos protéicos agem conjuntamente para sequestrar proteínas para dentro dos corpúsculos multivesiculares (DE GASSART et al., 2004; VAN NIEL et al., 2006) (FIGURA 1).

Lipídios transportadores também parecem estar envolvidos com a ordenação das proteínas dentro das vesículas intraluminares e componentes celulares típicos de transporte, têm sido identificados nos exossomos, como os glicolipídios e o colesterol (DE GASSART et al., 2003; MOBIUS et al., 2003). O número de corpos multivesiculares e o número de vesículas internas dentro deles são regulados independentemente (WHITE et al., 2006). Como estes corpos discriminam entre as proteínas, aquelas que serão destinadas à secreção exossomal ou as que serão degradadas nos lisossomos, ainda não foi determinado (ADMYRE, 2007).

Nas células apresentadoras de antígenos, os antígenos MHC de classe II acumulam-se nos corpos multivesiculares, que passam a se chamar Complexo Principal II (MIIC). Estes MIIC são os principais locais de carregamento de peptídeos e subseqüentemente os exossomos produzidos nessas células apresentadoras de antígenos expressam MHC em suas superfícies (ADMYRE, 2007). Além disso, os exossomos não expressam somente moléculas de superfície para a apresentação de antígenos peptídicos, como o complexo MHC, mas também as moléculas como as do Grupo de Diferenciação (CD), CD1a, b, c e d, as quais estão envolvidas na apresentação de antígenos lipídicos (LAMPARSKI, 2002).

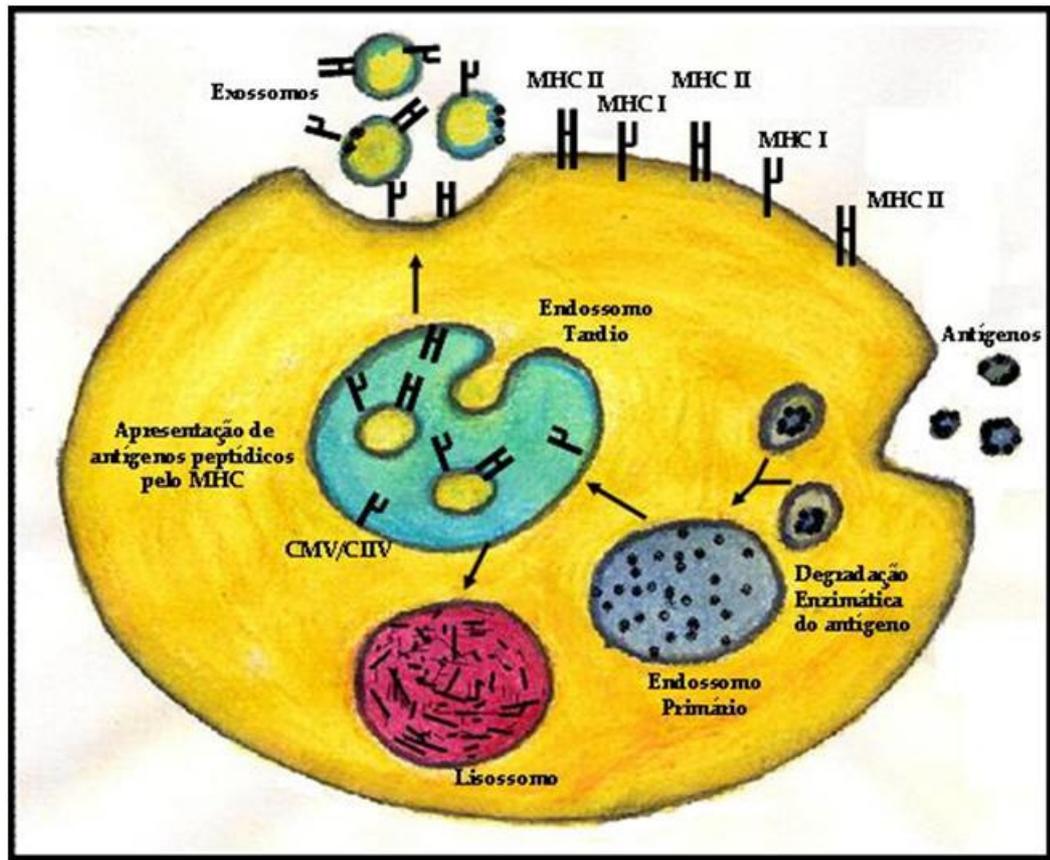


Figura 1. Desenho esquemático da formação de exossomos por uma célula apresentadora de antígenos nos endossomos secundários. CMV: Corpos Multivesiculares CIIV: Complexo Principal (Modificado de Admyre et al., 2007).

1.5. COMPOSIÇÃO

A composição molecular dos exossomos reflete o tipo de célula que os secretou e suas origens endossomais, em termos de proteínas, carboidratos e lipídios, porque contêm um espectro de moléculas de superfície que estabelecem um mecanismo de engate simultâneo para diferentes receptores celulares e para trocas entre as células (SCHORET, BHATNAGAR, 2008). Por exemplo; exossomos secretados pelas células apresentadoras de antígenos expressam moléculas coestimulatórias como as CD54, também

conhecidas como moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1), as CD80 e CD86 (ESCOLA, et al., 1998; LAMPARSKI et al., 2002), exossomos das células epiteliais intestinais expressam marcadores específicos do tipo A33 (VAN NIEL, 2001), exossomos formados nas células T expressam CD35 (BLANCHARD et al., 2002), os de reticulócitos contêm receptores transferrina (JOHNSTONE et al., 1987) e subunidades de receptor glutamato são encontrados em exossomos provenientes dos neurônios (FAURE et al., 2006). Os exossomos secretados por células B expressam integrinas funcionais, que são capazes, de mediar a adesão entre componentes da matriz extracelular e os fibroblastos ativados. Essa adesão é tão forte que resulta em um aumento do cálcio intracelular (AL-NEDAWI et al., 2005).

As nanovesículas também expressam moléculas comuns a outras células, como as proteínas da família Tetraspanina, um grupo de proteínas presentes na membrana plasmática de muitos tipos celulares, mas que também são encontradas nos compartimentos endossomais (ESCOLA et al., 1998). Estas proteínas apresentam quatro domínios transmembranas e dois extracelulares, de diferentes tamanhos, os quais são definidos pelos vários aminoácidos conservados nos domínios transmembranas (THÉRY, ZITVOGEL, AMIGORENA, 2002). As Tetraspaninas, segundo alguns estudos, estão envolvidas nos processos de adesão, ativação e proliferação celulares e na apresentação de antígenos. Elas formam complexos com outras moléculas, como as do MHC classe II (HEMLER, 2005). São exemplos de proteínas da família Tetraspanina, entre outras, CD9, CD63 e CD81.

Uma descoberta descrita por Calzolari et al. 2006 e que precisa ser melhor estudada, descreve a proteína CD81 associada à proteína receptora de transferrina 2 (TfR2) na membrana plasmática, demonstrando que esta colocalização seria possivelmente usada como uma via comum para a liberação de exossomos por meio da formação de um suporte lipídico na membrana plasmática. Este suporte lipídico conta também com outras proteínas da família das tetraspaninas, como CD9 e CD63 (THÉRY et al., 2002).

Em linhas gerais, as proteínas TfR2 e CD81 estão colocalizados em microdomínios da membrana plasmática, que fornecem uma estrutura para a transmissão de estímulos exógenos a complexos de sinalização intracelular. O TfR2 é um novo membro da família de proteínas cuja principal função parece estar ligada a regulação da homeostase de íons ferro (HEMLER, 2003). Neste trabalho usamos como marcadores exossomais as proteínas CD63, CD81 e TfR2 (TABELA 2).

As Proteínas de Choque Térmico (*Heat Shock Protein* - HSP) presentes nos exossomos, como as HSP70, HSC70, HSC73 e HSP90 (THERY, et al., 1999, CLAYTON et al., 2005), fazem parte de uma família de proteínas que agem como chaperonas, facilitando o desdobramento de proteínas intracelulares que podem ser secretadas e então serem utilizadas em diferentes funções extracelulares, como por exemplo na regulação imunológica. Estas proteínas também podem ser constitutivamente expressas ou induzidas pelo estresse celular. Células estressadas pelo calor apresentam-se com um aumento na expressão de HSP em seus exossomos (CLAYTON, 2005). A HSP70, membro

da família *Heat Shock Protein Cognate 3* - HSC73, é uma potente proteína indutora de resposta imune antitumoral *in vivo*, sugerindo que estas nanovesículas poderiam ser utilizadas com ação antitumoral (ZITVOGEL et al., 1998). A presença da HSC73 é interessante em relação a dois aspectos da biologia dos exossomos: sua biogênese e seu efeito biológico *in vivo*. Uma significativa fração de HSC73 está associada a compartimentos endossomais, porém outras HSP, como a GP96 ou GPR96 e a HSP84 ou HSP90) não estão associadas aos endossomos nem aos lisossomos e não se acumulam nos exossomos. (THÉRY et al., 1990).

Os exossomos apresentam citoesqueleto protéico formado pela actina, uma das proteínas intracelulares mais abundantes dos eucariontes, pela miosina, proteína ligada ao movimento, pela cofilina, proteína que apresenta um importante papel na regulação da polimerização e despolimerização dos filamentos de actina, e pela tubulina, proteína globular que compõe os microtúbulos, que por sua vez, são estruturas protéicas presentes no citoesqueleto (VAN NIEL, HEYMAN 2002). Ou seja, os exossomos apresentam as mesmas proteínas que compõem o citoesqueleto celular.

Outras proteínas já foram isoladas como parte integrante dos exossomos, como as que fazem parte da família Rab, que são GTPases, enzimas que hidrolisam guanosina trifosfato e que estão sempre associadas às membranas (THÉRY, ZITVOGEL, AMIGORENA, 2002), fazendo a transdução de sinais dos receptores transmembrana para o domínio intracelular e também, importante salientar: transportam vesículas dentro das células. Estas proteínas

da família Rab, juntamente com o cálcio (Ca^{++}), são importantes para a ancoragem e fusão dos corpúsculos multivesiculares com a membrana plasmática (SAVINA et al., 2005). Diferentes proteínas Rab estão associadas a diferentes compartimentos intracelulares, por exemplo, a Rab5 está associada aos endossomos primários, a Rab7 aos endossomos secundários (THÉRY, ZITVOGEL, AMIGORENA, 2002). A Rab11, proteína ancorada na face citosólica das membranas intracelulares, regula ainda a formação, a movimentação de vesículas e a fusão destas com a membrana plasmática (STENMARK, OLKKONEN, 2001).

Outras proteínas isoladas como parte dos exossomos, são as proteínas que constituem a família das Anexinas, proteínas citosólicas que apresentam domínio de ligação de fosfolipídios e que estão associadas às membranas intracelulares por meio da regulação de cálcio (Ca^{++}). Muitas destas Anexinas estão envolvidas com os eventos de fusão entre os compartimentos intracelulares (RINTALA-DEMPSEY, REZVANPOUR, 2008).

Os exossomos também expressam moléculas como as CD55 e CD59, proteínas que apresentam função protetora contra a lise pelo complemento (CLAYTON et al., 2003), sugerindo que estas proteínas são estáveis *in vivo*. Laulagnier et al. (2005), mostraram que uma linhagem de mastócito - RBL-2H3, produz diferentes populações de nanovesículas enriquecidas com vários fosfolipídios e proteínas. Duas destas principais populações foram encontradas, ambas ricas em fosfolipídios, uma delas, secretada por granulócitos, expressa MHC II e a outra, originada no complexo

golgiense, expressa proteínas do tipo CD63 e CD81, que fazem parte da família das Tetraspaninas. Os exossomos que contêm CD63, MHC II e CD81 representam 47%, 32% e 21%, respectivamente do total dos exossomos.

A proteína exossomal mais abundante nos exossomos, a *Milk Fat Globule-EGF Factor VIII* (MFG-E8), liga-se às integrinas ($\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$) expressas por células dendríticas e macrófagos e em muitas situações, pode ser o alvo de exossomos derivados de outras células apresentadoras de antígenos (ZITVOGEL et al. 1998).

Os sedimentos contendo exossomos podem requerer purificação, dependendo do objetivo do estudo. Estas nanovesículas podem ser isoladas e diferenciadas de acordo com tamanho, densidade e propriedades bioquímicas. O método mais comum de purificação envolve uma série de ultracentrifugações, que permitem a separação de células e fragmentos (THÉRY et al., 2002a), em alguns casos, pode ser usado processo de filtração.

Muitas proteínas podem contaminar o sedimento, exigindo, portanto, nova ultracentrifugação. Como os exossomos têm uma densidade específica, podem também ser purificados por meio de flotação em gradiente de sacarose ou pelo óxido de deutério de sacarose (D_2O) (THÉRY et al., 2006). Muitos pesquisadores, como Taylor et al., (2006), utilizaram a cromatografia.

Outros protocolos para purificação dos exossomos são baseados nas propriedades de suas membranas. Pérolas conjugadas com anticorpos contra uma proteína conhecida dos exossomos ficam aderidas a eles após a depleção celular (CLAYTON et al., 2001).

Tabela 2. Características das proteínas usadas como marcadores de exossomos neste trabalho:

	Cromossomo/ Sequência longa	Proteína	Peso Molecular (kDa)	Função	Domínio	Componente Celular
TfR2	7 (7q22) 801 aa	Receptor Transferrina	19	Homeostase de íon Ferro celular	Superfície	Citoplasma Membrana Plasmática
CD63	12 (12q12-q13) 238 aa	CD63	30-60	Transdução de sinal Ativação, Crescimento, Mobilidade celular	Superfície	Membrana Plasmática Endossomos Lisossomos Membrana
CD81	11 (11p15.5) 236 aa	CD81	26	Proteína ligadora em vários processos celulares	Trans- membrana	Citoplasma Membrana Plasmática

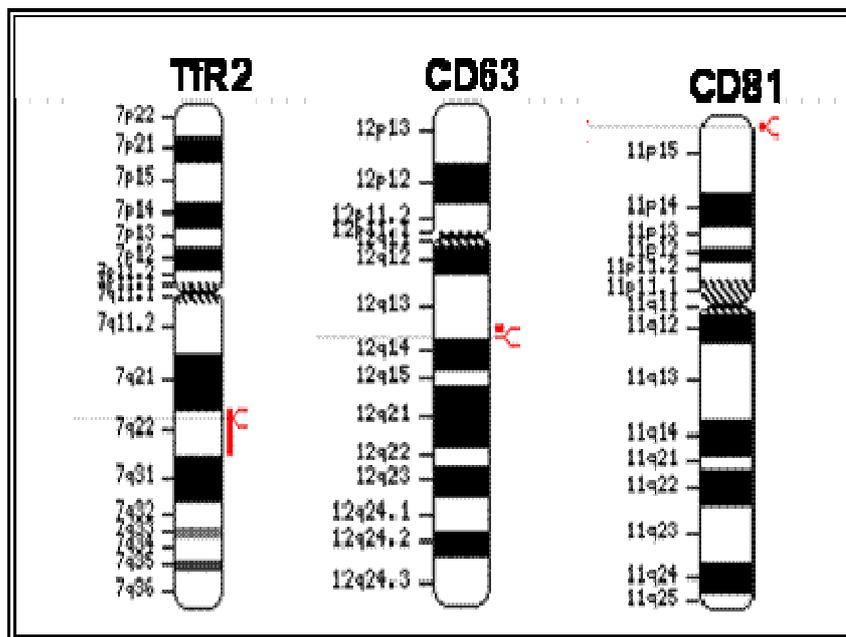


Figura 2. Cromossomos humanos 7, 12 e 11 respectivamente, com a localização dos genes para a expressão de proteínas de exossomos utilizadas nesta pesquisa (The National Center for Biotechnology Information – NCBI).

1. 6. FUNÇÃO

A função dos exossomos depende de sua origem e do tipo de proteína que expressam (ADMYRE, 2007). Muitas das funções dessas vesículas ainda não foram descritas embora a versatilidade já demonstrada em inúmeras pesquisas indique que muito ainda se tem para descobrir.

Os exossomos liberados pelas células apresentadoras de antígenos, estão envolvidos com a estimulação das células T, tanto *in vitro* (RAPOSO et al., 1996; VINCENT-SCHNEIDER, et al., 2002; HWANG, SHEN, SPRENT, 2003) quanto *in vivo* (THERY, 2002^a, SEGURA et al., 2005), mas a

maneira como esta estimulação ocorre tem sido debatida, mas alguns estudos têm mostrado que exossomos podem estimular diretamente as células T na ausência de APC (RAPOSO et al., 1996; HWANG, SHEN, SPRENT, 2003), enquanto que outras pesquisas demonstram ainda que exossomos necessitam de células apresentadoras de antígenos para exercerem suas funções de estimuladores (VINCENT-SCHNEIDER, et al., 2002; THERY, 2002a).

Estas diferenças podem ser devido ao fenótipo dos exossomos, das células que serão estimuladas, da afinidade com os antígenos ou a dose de exossomos usados nas pesquisas. Por exemplo, células T virgens exigem para serem estimuladas exossomos que expressem CD54 e MHC de classe II (SEGURA et al., 2005). Outro grupo demonstrou que os exossomos precisam expressar as moléculas CD54 e B7, juntamente com MHC II para serem fortemente imunogênicos (HWANG, SHEN, SPRENT, 2003).

Os exossomos de células dendríticas maduras são mais potentes na indução da ativação antígeno-específico de células T do que exossomos de células dendríticas imaturas (UTSUGI-KOBUKAI et al., 2003; SEGURA et al., 2005), possivelmente devido as suas expressões aumentadas para estas moléculas. Exossomos de monócitos derivados de células dendríticas podem sustentar a sobrevivência de células virgens por meio da ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B), o qual é induzido pela interação do antígeno leucocitário humano (HLA-DR) e o receptor de célula T (MATSUMOTO et al.; 2004).

Estas nanovesículas podem agir como transportadoras de moléculas entre as células, podendo transferir o complexo MHC/antígeno entre as células dendríticas, tornando-as aptas para ativarem eficientemente células antígeno-específicas (HSU et al., 2003, ANDRE et al., 2004) e podem ser transportados entre os órgãos por meio da corrente sanguínea (CABY et al., 2005).

Os exossomos derivados de mastócitos, uma das células responsáveis pelas manifestações clínicas nas alergias, são capazes de gerar resposta imune, induzindo a maturação das células dendríticas, aumentando a regulação da expressão de MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86 (SHOKOS et al., 2003). Estas mesmas vesículas quando estimuladas com IL-4, são capazes de induzir a ativação e a proliferação de linfócitos, bem como a produção de IL-2 e IFN- γ , que indica a participação dos exossomos nas inflamações alérgicas e na indução de uma resposta pró-inflamatória. A ativação de linfócitos também foi constatada *in vivo*, quando células provenientes do baço e linfonodos foram tratadas com exossomos de mastócitos estimulados (SHOKOS et al. 2001a). Esses exossomos liberados pelos mastócitos também são capazes de estimular as células endoteliais a secretar uma enzima ativadora e inibidora de plasminogênio do tipo I (PAI - 1) que é pró-coagulante e está aumentada nas reações inflamatórias (CLAYTON et al., 2004).

Em comparação com a função imunoestimulatória, os exossomos das células epiteliais intestinais, são tolerogênicos e são chamados tolerossomos (KARLSSON et al., 2001). Tolerossomos de ovalbumina (OVA) de linhagens de

células epiteliais intestinais pulsadas e de soro depois do estímulo antigênico, o OVA, mantiveram a capacidade de induzir tolerância antígeno-específica em ratos receptores (KARLSSON et al., 2001). A indução dessa tolerância neste experimento é dependente da expressão de MHC de classe II e das células epiteliais intestinais e é funcional apenas em receptores singênicos (OSTMAN, TAUBE, TELEMO, 2005). Este talvez seja um importante mecanismo para a indução da tolerância oral. Contraditoriamente, alguns resultados têm sido citados por que demonstraram que a capacidade dos exossomos derivados de células epiteliais intestinais induzem mais a uma resposta imunogênica do que à tolerância (VAN NIEL et al., 2003).

Muitas doenças, como as renais, por exemplo, estão ligadas ao metabolismo das proteínas. Essas poderiam ser detectadas nos exossomos presentes na urina, indicando assim uma possível utilização desses exossomos como biomarcadores (PISITKUN, JOHNSTONE, KNEPPER, 2006). Na urina de pacientes com *diabetes insipidus*, já foram isolados exossomos contendo aquaporina-2, uma proteína nefrogênica. Muitos estudos similares, de várias proteínas presentes nos exossomos isolados de urina, evidenciam a descoberta do potencial papel dos exossomos no diagnóstico, prognóstico e na fisiopatologia renais (HOORN et al., 2005). Assim como nas patologias renais, os exossomos são excelentes candidatos a biomarcadores no diagnóstico de câncer, com enfoque no tumor da bexiga, onde exossomos expressam proteínas como a Psoriasina, a Kertaina-14, a Galectina-7, a Proteína Epidérmica Ligadora de Ácidos Graxos (E-FABP), o Fator Inibidor da Migração Ligado às Proteínas 8

e 14 (MRBP8 e MRBP14) e a Estratifina, que são considerados excelentes marcadores para o diagnóstico do câncer de bexiga (PISITKUN, JOHNSTONE, KNEPPER, 2006).

O papel dos exossomos nas inflamações ainda não foi devidamente reportado, porém, Zhang et al. (2006), estudando pacientes com artrite reumatóide, demonstraram que seus fibroblastos sinoviais produziam exossomos que continham uma membrana formada pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) e estes exossomos foram citotóxicos para linhagens celulares (L929) sensíveis ao TNF- α . Ainda quanto à função inflamatória, outro exemplo pode ilustrar bem o papel dos exossomos na inflamação: exossomos de plaquetas obtidas de pacientes com sepse tiveram maior atividade enzimática da nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato oxidase (NADH oxidase), em comparação às plaquetas de controles saudáveis, analisadas pela geração de espécies reativas de oxigênio e induzindo a apoptose. Talvez essa seja a maneira como exossomos derivados de plaquetas, contribuam para a apoptose de células vasculares, constituindo assim, uma via alternativa na fisiologia da sepse (JANISZEWSKI, 2004). De outra forma, durante as sepses, há um aumento na fagocitose das células apoptóticas (MIKSA et al., 2006).

Durante a infecção por micobactérias, macrófagos podem induzir a uma resposta pró-inflamatória, dependente de receptores do tipo *toll like* (TLR) e os exossomos provavelmente contêm os padrões moleculares associados aos patógenos (*Pattern Associate Molecular patogen* - PAMP) (BHATNAGAR, SCHOREY, 2006). O comportamento de macrófagos infectados

com diferentes patógenos intracelulares *in vitro*, inclui a liberação de exossomos contendo os PAMP. Estudos comparativos com modelos murinos infectados com *Mycobacterium bovis*, confirmaram a presença e a atividade dos exossomos contendo esses padrões. Estes fatos ilustram mecanismos anteriormente citados e que eram ainda indefinidos, por exemplo, como as células infectadas com PAMP poderiam promover uma resposta imune (BRATNAGAR et al., 2008).

As nanovesículas derivadas de células dendríticas de *Toxoplasma gondii* pulsadas podem induzir a uma eficiente resposta imune Th1 específica para *T. gondii*, a qual fornece boa proteção contra ambas as fases da toxoplasmose, a aguda e a crônica (SCHOREY, BHATNAGAR, 2007).

Exossomos derivados de células infectadas com *Mycobacterium sp*, foram capazes de induzir a uma resposta pró-inflamatória, indicada pela secreção de TNF- α , da quimiocina como CCL5 (RANTES) e de Sintetase de óxido nítrico (iNOS) na indução de células não estimuladas. Esta resposta foi dependente da molécula adaptadora MyD88, necessária para a maioria dos receptores de sinalização como os receptores do tipo *Toll* (SCHOREY, BHATNAGAR, 2007), confirmando a presença dos PAMP nos exossomos.

O processo celular associado à biogênese e liberação dos corpos multivesiculares foi apreendido durante a evolução por diversos agentes patogênicos, incluindo os vírus, a fim de fornecer um mecanismo de escape à resposta imune do hospedeiro (SHOREY, BHATNAGAR, 2008). Uma provável ligação evolutiva entre retrovírus e a biogênese dos exossomos foi proposta por Pelchen-Matthews, Raposo, Marsh, (2004). Estudos com retrovírus revelaram a

capacidade dos vírus para seqüestrarem os mecanismos intracelulares dos corpúsculos multivesiculares para o processo de brotamento dos mesmos na superfície celular (JOUVE et al., 2007). O Vírus da Imunodeficiência Humana - *Human immunodeficiency virus* (HIV) utiliza endossomos tardios dos macrófagos humanos como principal local de armazenamento (NGUYEN, GOULD, 2003; PELCHEN-MATTHEWS, RAPOSO, MARSH, 2004) de onde se fundem à membrana plasmática da célula, liberando seus conteúdos para o meio extracelular, o que potencialmente contribui para a disseminação da infecção (SCHOREY, BHATNAGAR, 2008).

Embora os exossomos e os produtos virais tenham componentes similares, eles podem ter origens diferentes (CHEN, LAMB, 2007). Curiosamente, estudos recentes em macrófagos infectados pelo HIV-1 sugerem que o retrovírus está internalizado no domínio CD63+ da membrana plasmática e não no endossomo (DENEKA, 2007). Com isso, mais uma nova função para os exossomos é sugerida: a de serem importantes vigilantes imunológicos contra patógenos intracelulares.

Eles podem desempenhar também função anti-inflamatória, porque induzem fortemente a secreção de IL-4 ou IL-10, suprimindo ou atrasando a reação de hipersensibilidade em modelo murino dependente da expressão de MHC de classe II (KIM et al., 2005; KIM et al., 2007a).

Nos transplantes cardíacos, os exossomos derivados de células dendríticas do doador do órgão, transferidas para o receptor antes da cirurgia, podem induzir a uma prolongada sobrevida ao aloenxerto devido à diminuição

da infiltração de leucócitos e conseqüentemente diminuindo o risco de rejeição (PECHE et al., 2003).

Dentre as inúmeras pesquisas a respeito das funções biológicas dos exossomos, muitas têm reportado a presença destas vesículas na gravidez. Durante a gestação, o feto é tolerado pelo sistema imune da mãe, provavelmente por meio de mecanismos que envolvem a expressão de ligantes do tipo Fas pelos trofoblastos fetais, que podem induzir apoptose nas células imunes maternas (TROWSDALE, BETZ, 2006). Os trofoblastos isolados durante o primeiro trimestre não expressam FasL associado à membrana plasmática, mas sim uma forma citoplasmática de FasL associado à via secretória dos lisossomos e esta expressão intracelular de FasL está ligada a liberação de exossomos (ABRAHAMS et al., 2004). Estes resultados foram legitimados mais tarde por Mincheva-Nilsson et al. (2006), que ainda revelaram que a maioria dos FasL intracelulares maternos estavam concentrados em grânulos citoplasmáticos dentro dos exossomos.

Os exossomos encontrados na circulação materna agem como imunossupressores e apresentam marcadores que indicam sua origem placentária, e por isso, o número de exossomos no soro de mulheres grávidas é significativamente mais elevado comparado ao de mulheres não grávidas (TAYLOR et al., 2006). Mulheres que têm parto prematuro têm menos exossomos no soro que as mulheres cujo parto foi a termo, e nessas mulheres os exossomos estão com a expressão de FasL aumentada, pois a presença dessas nanovesículas diminui a expressão e a sinalização dos componentes das células

T, incluindo o complexo CD3 e a tirosina quinase (JAK3) (TAYLOR, et al., 2006). Os exossomos isolados de gestantes expressam MHC de classe I, chamados de MIC. Eles funcionam como um mecanismo tolerogênico, regulando ou diminuindo a ação citotóxica das células *Natural Killer* - matadoras naturais (NK) e das *Peripheral Blood Mononuclear Cells* - células mononucleares do sangue periférico (PBMC) impedindo assim, o reconhecimento como não-próprio dos tecidos fetais (MINCHEVA-NILSSON et al., 2006).

Uma hipótese poderia ser considerada ao se levar em conta o alto efeito regulador dos exossomos associados à gestação, é a de que eles também podem funcionar como moduladores imunes no feto. Dependendo da natureza dos exossomos e do estado inflamatório da mãe, eles podem aumentar ou diminuir o risco de desenvolver doenças alérgicas, por exemplo (TAYLOR et al., 2006).

A maioria das pesquisas desenvolvidas sobre o desempenho dos exossomos tem ocorrido no contexto da biologia dos tumores e da terapia do câncer (ADMYRE et al., 2007), desde relatos sobre a ativação do sistema imune (WOLFERS et al., 2001; ANDRE et al., 2002b), até a casos de inibição (CLAYTON et al., 2007).

Como os exossomos também são secretados por células de tumores malignos (ANDRE et al., 2002b) como os melanomas por exemplo. Por muito tempo acreditou-se que estas vesículas prejudicassem a resposta imune, uma vez que os pacientes cujos exossomos liberados espontaneamente, não tinham uma resposta protetora contra o tumor. Porém, estudos revelaram que

exossomos tumorais podem sim, inibir as células T CD8⁺, alterando a resposta imunológica, que passa de resposta imune citotóxica para resposta imune reguladora, contribuindo para o escape imunológico tumoral (CLAYTON, TABI, 2005; CLAYTON et al., 2007).

Diferentes estratégias têm sido aplicadas para aumentar a imunogenicidade dos exossomos, como a adição de moléculas de RNA ou o dinucleotídeo citosina fosfato guanina (CpG) como adjuvantes (MIGNOT, et al., 2006). Este dinucleotídeo CpG tem sido usado como agente terapêutico em várias doenças ou como adjuvante para vacinas, anticorpos, antígenos e alérgenos, bem como em triagens pré-clínicas ou clínicas para o câncer, para infecções virais, bacterianas, alergias e asma (AGRAWAL, KANDIMALLA, 2002). Além do potencial de utilização dos exossomos como vacinas antitumorais e contra doenças infecciosas, outra utilidade para os mesmos se refere ao tratamento de doenças autoimunes em modelos animais, em que a artrite colágeno-induzida foi suprimida por exossomos (KIM et al.(2007). Os exossomos que expressam o ligante FasL, são importantes supressores da hipersensibilidade tardia e as células dendríticas tratadas com IL-4 e IL-10 têm se mostrado atuantes no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes (KIM et al., 2007b).

1.7 EXOSSOMOS NA ALERGIA

Os exossomos podem apresentar peptídeos de alérgenos e estimular as células T alérgeno-específicas para a proliferação e para a produção

de citocinas de perfil Th2, como a Il-5 e Il-13 (ADMYRE, 2007). Assim sendo, os exossomos podem agir como um fator imunoestimulatório na resposta imune alérgica. Em modelos murinos, foi detectado alérgenos específicos CD4+ respondedores para exossomos carreadores de alérgenos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (QAZY et al., 2009).

Os exossomos também podem funcionar como transportadores de alérgenos, possivelmente alcançando lugares que suas células de origem não podem se acumular. Essas vesículas podem transferir complexos MHC/antígeno entre as células dendríticas, habilitando os receptores destas células para uma eficiente ativação das células T antígeno-específicas (HSU et al., 2003, ANDRÉ et al., 2004). Muitas vezes os exossomos têm função na deterioração da resposta alérgica. Os que derivam de mastócitos, por exemplo, ativam exageradamente a resposta alérgica e induzem a maturação das células dendríticas (SKOKOS et al., 2003). As nanovesículas de mastócitos podem transportar RNA funcional para células receptoras (VALADI et al., 2007), sugerindo um novo caminho para a comunicação celular. O RNA exossomal de mastócitos parece ser altamente seletivo, e de muitas maneiras distinto do RNA da célula doadora. O RNA exossomal pode ser visto como uma forma endógena de geneterapia, a qual supostamente poderia ser usada para melhorar os métodos clínicos de terapia gênica nas doenças, como a alergia. O exato papel funcional do RNA exossomal entre os mastócitos e as outras células envolvidas na alergia, precisa ser melhor determinado.

Os exossomos podem ser encontrados no fluido de lavado bronquioalveolar de indivíduos saudáveis e são similares aos exossomos derivados das células dendríticas, expressam MHC de classe I e II, bem como as moléculas coestimulatórias (ADMYRE et al., 2003). Este fato sugere que os exossomos podem funcionar como reguladores imunológicos e suas concentrações nos pulmões durante diferentes doenças, como na reação alérgica, necessitam ser melhor investigados.

Os exossomos do lavado bronquioalveolar podem ser gerados durante uma reação alérgica por diferentes células, as quais são ativadas durante uma resposta alérgica, incluindo as dendríticas, B, T, mastócitos e conseqüentemente, exacerbando a resposta imune. Estruturas alergênicas, como os polens, contêm componentes lipídicos que podem ser apresentados pelas moléculas CD1 e induzirem a proliferação das células T em indivíduos alérgicos (AGEA, 2005). Isto ocorre porque as moléculas de lipídios e as moléculas CD1b e CD1d ocupam o mesmo local nos corpos multivesiculares, o que favorece a transformação e a apresentação destes antígenos (BRIGL, BRENNER, 2004).

Atualmente, a imunoterapia alérgeno-específicas tem se mostrado eficiente para pacientes alérgicos, resultando na diminuição da responsividade imunológica aos alérgenos (PRADO et al., 2008). Mesmo que ofereça proteção, este tipo de tratamento pode apresentar muitos problemas, como a longa duração, o aspecto anafilático e ainda eficácia limitada, (AKADIS, 2006). É claro que há uma nítida necessidade de desenvolver alternativas estratégicas para a imunoterapia alérgeno-específica, com o objetivo estabelecer uma tolerância

periférica contra os alérgenos (PRADO et al.; 2008). Estudos em modelos murinos com alergia, têm revelado resultados promissores na indução de tolerância mucosal com alérgenos ou seus derivados, tanto na prevenção, quanto no tratamento (WIEDERMANN, 2005).

O papel dos exossomos na inflamação alérgica é ainda pouco conhecido e precisa ser melhor estudado. A caracterização dessas nanovesículas na resposta imune alérgica poderá melhorar a abordagem nas alergias e promover uma alternativa aos medicamentos usuais.

2. Objetivos

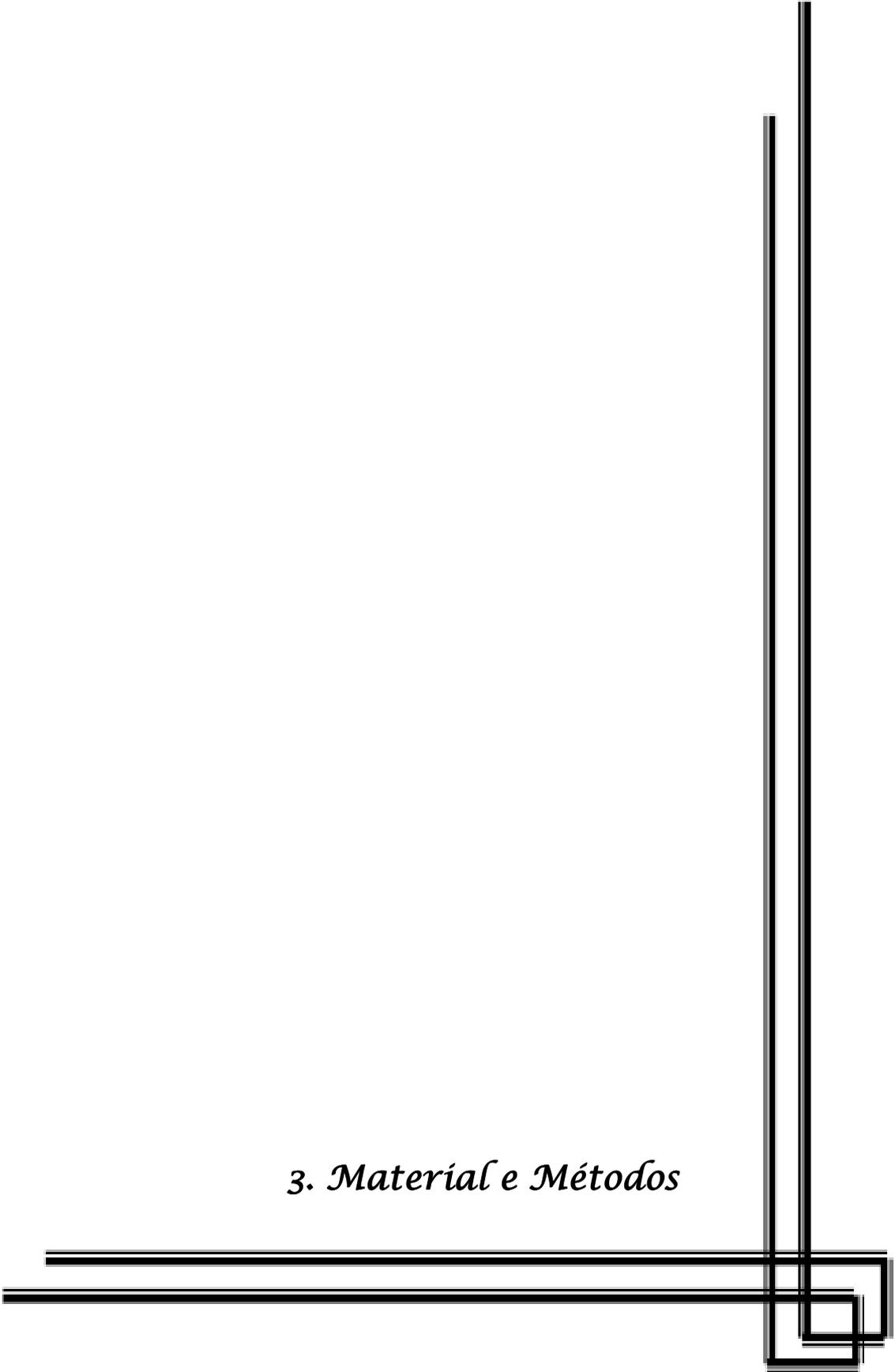
2.1 Geral

- ✓ Isolar, purificar e caracterizar exossomos produzidos por PBMC de indivíduos não-atópicos.

2.2. Específicos

- ✓ Analisar exossomos quanto ao perfil eletroforético de suas proteínas;
- ✓ Marcar exossomos quanto à presença de moléculas específicas, como Tfr2, CD63 e CD81;
- ✓ Observar influência de exossomos no perfil de citocinas secretadas *in vitro*, pelas PBMC de indivíduos atópicos.

3. Material e Métodos



3.1 PROCEDIMENTO ÉTICO

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), órgão do Conselho Nacional de Saúde (CNS) sob o nº 386/09 (Anexo 1).

Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento (Anexo 2), pelo qual foram informados sobre todos os procedimentos adotados, segundo as normas da Resolução CNS 196/96, que regulamenta a ética em pesquisa envolvendo seres humanos. Neste documento, o nome da pesquisa foi informado, bem como seus objetivos.

Em seguida, passaram por uma anamnese (Anexo 3), segundo os critérios adotados pelo ISAAC - *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (1998), para auxiliar na avaliação clínica inicial de cada participante, supervisionado pelo médico alergista responsável, Dr. Ernesto Akio Taketomi.

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

3.2 LOCAIS DE ESTUDO

Os procedimentos técnicos foram realizados nas dependências dos Laboratórios de Alergia e Imunologia Clínica, de Imunoparasitologia, de

Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, nos Blocos 4C, 2A e 2E, respectivamente.

3.3 PARTICIPANTES

Um total de 20 indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 18 a 60 anos, foram selecionados entre voluntários não-atópicos (10) e atópicos (10) entre os alunos dos cursos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários da UFU durante o período de setembro a outubro de 2009.

Todos os indivíduos convidados a participarem deste projeto de pesquisa, assinaram um Termo de Consentimento (Anexo 2) pelo qual foram informados sobre todos os procedimentos adotados, segundo as normas da Resolução CNS 196/96, que regulamenta a ética em pesquisa envolvendo seres humanos.

Neste documento, o nome da pesquisa foi informado, bem como seus objetivos. Eles também responderam a algumas questões para avaliação dos sintomas clínicos (Anexo 3). Esta etapa da pesquisa foi supervisionada pelo médico alergista responsável pelo laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU, Dr. Ernesto Akio Taketomi. Todos foram avisados sobre a possibilidade de se retirarem do estudo se assim o desejassem.

Os participantes foram selecionados depois de passarem por critérios que permitiram a sua inclusão ou exclusão. Para inclusão os

participantes apresentaram sintomas respiratórios relacionados à poeira domiciliar, com Teste Cutâneo de Puntura (TCP) positivo ao *Dermatophagoides farinae*. Foram excluídos aqueles que usaram anti-histamínicos ou corticosteróides, por via oral ou tópica, na semana anterior ao teste, os que fizeram uso sistêmico de corticosteróides por período de tempo prolongado e também, aqueles cuja região do teste cutâneo apresentou-se com lesões dermatológicas.

Foram considerados participantes atópicos, aqueles cujos TCP apresentaram resultados com pápulas maiores que 3 mm em relação ao controle negativo, além de sintomas típicos de alergias respiratórias.

Os participantes não-atópicos não apresentaram sintomas de alergia respiratória e seus testes cutâneos foram negativos.

3.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE *D. farinae*

A extração dos alérgenos brutos de *D. farinae* foi realizada segundo método adotado por Pereira et al. (2005). O material foi cedido pelo Prof. Dr. Federico Montealegre (Laboratório de Imunoquímica, Escola de Medicina de Ponce - Porto Rico, EUA). Em resumo, 200 g de material seco de cultivo de ácaro, foram peneirados (Peneiras Granutest-Telastem, ABNT 35, - TYLER 32), para separar, por retenção, o material de cultura dos corpos e fezes dos ácaros. Em seguida, aos 10 g deste material, foi acrescentado 50 mL de solução salina

tamponada com borato a 5mM, em pH 8,0 contendo inibidores de protease, como fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF - ICN Biomedicals, Inc., Aurora, EUA) 1 mM, Benzamidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) 1 mM, aprotinina (Sigma) 0,2 % e leupeptina (Sigma) 1 µM.

Esta mistura passou por extensa maceração, na presença de nitrogênio líquido, para ruptura dos ácaros. Logo a seguir, foi transferida para tubos cônicos e incubada em agitador orbital por 18 horas a 4°C. Após este período, a mistura foi centrifugada a 20.000 x g por 45 minutos e 4°C e o sobrenadante, o extrato total, foi concentrado e submetido à diálise em sistema Amicon (W.R. Grace & Co., Beverly, EUA), com membrana porosa YM-10 (Whatman International Ltd., Maidstone, Inglaterra) em 500 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM, pH 7,2. O extrato alergênico foi aliquoteado em microtubos de polipropileno (Eppendorf) e sua concentração protéica determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

3.5 EXTRATO ANTIGÊNICO DE ÁCAROS PARA TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (TCP)

Para a preparação do reagente utilizado nos testes cutâneos, o extrato *D. farinae* bruto foi diluído em PBS contendo fenol a 0,4 % e glicerina a 50 % (Bayer Corporation, Spokane, USA) em uma concentração protéica final de

2 mg/mL. Esta solução foi armazenada em frascos de vidro do tipo âmbar com conta-gotas até a realização dos testes cutâneos.

3.6 TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (TCP)

Um volume de aproximadamente 10 µL de extrato de *D. farinae* foi depositado na região antebraquial anterior (CTA - COMISSÃO DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA, 2001), após anti-sepsia do local com álcool 70 %. Uma puntura cutânea (Puntores Aiko, Rio de Janeiro, Brasil) foi feita no local de depósito da gota e depois de 15 minutos foi medido o diâmetro ortogonal da pápula formada, com régua milimetrada. O resultado foi considerado positivo quando a pápula apresentou-se maior que 3 mm em relação ao controle negativo (OWNBY, 1998) (Anexo 4).

3.7 AMOSTRAS DE SANGUE

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

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

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

3.8 CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

As PBMC foram isoladas a partir de 20 mL de sangue total de indivíduos não-atópicos por centrifugação usando solução de Ficoll-Hipaque (densidade: 1,077 g/mL, Histopaque - 1077, Sygma Aldrich), lavadas duas vezes em PBS estéril e ressuspensionadas a uma densidade de células de 2×10^6

células/mL (método de exclusão Trypan Blue) em RPMI (Gibco Laboratories, Paisley, Escócia), meio suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), previamente livre de exossomos bovinos por ultracentrifugação a 100.000 x g por 18 horas a 4°C. As PBMC com densidade igual a 2 x 10⁶ células/mL/poço (450µL de suspensão celular) foram cultivadas em triplicata em 24 poços da placa de cultura (TPP®, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), seguida pela adição de 50 µL de mitógeno (fitohemaglutinina - PHA a 5 µg/mL) ou 50 µL de extrato de alérgenos (*Dermatophagoides farinae* - Df, 10 mg/mL) ou 50 µL de meio de cultura (controle negativo), resultando em um volume final de 500 µL/poço. As placas foram incubadas por 5 dias a 37 ° C e 5% de CO₂.

3.9 ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS

Os exossomos podem ser isolados com base em seu tamanho, densidade e suas propriedades bioquímicas. Usando um protocolo previamente descrito (LAMPARSK et al., 2002), brevemente, após 5 dias de cultura, as PBMC de indivíduos não-atópicos, foram removidas das placas, centrifugadas a 3.000 x g, por 20 minutos à 4 °C, os sobrenadantes foram novamente centrifugados a 10.000 x g, 30 min, 4 °C para remover os restos celulares. Os exossomos foram isolados a partir do sobrenadante de cada estímulo (PHA, Df ou meio) por ultracentrifugação a 100.000 x g por 2 horas (Sorvall, WX 90, 80,2 TFT-rotor,

Osterode, Alemanha) e os sedimentos foram ressuspensos em 50 uL de RPMI (para a microscopia eletrônica) ou PBS. A concentração protéica dos exossomos foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), de acordo com os valores de DO da curva de calibração com soroalbumina bovina (*Bovine serum albumin* - BSA, Sigma) em diluições seriadas de 500 a 15 ug/mL. Os valores da DO foram calculados por meio do *software* Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). As amostras foram alíquotas e congeladas a - 70 ° C. Exossomos isolados de sobrenadantes de PBMC de indivíduos não-atópicos foram designados como ExoA (após a estimulação com o meio), ExoB (após estimulação com PHA) e ExoC (após estimulação com Df). Os estímulos ExoA, ExoB e ExoC são resultado de um *pool* de exossomos obtidos de indivíduos não-atópicos.

3.10 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS EXOSSOMAS

Para analisar o perfil protéico do *pool* exossomos, 10 mL de cada amostra (ExoA, EXoB e ExoC - aproximadamente 10 mg) foram solubilizadas em tampão de amostra, aquecidas a 95 ° C por 5 minutos e separadas em gel de eletroforese (*dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* - SDS-PAGE), utilizando 12% gel de separação, de acordo com a recomendação do fabricante (Bio-Rad Laboratories) seguido de coloração com Coomassie Coloidal Blue.

3.11 IMMUNOBLOTTING

Para identificar marcadores específicos para exossomos, proteínas do *pool* de exossomos separadas por SDS-PAGE foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories). As membranas foram cortadas em tiras de 3 mm e bloqueadas por 2 horas em PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) mais 5% de leite desnatado (PBS-TM), seguido de incubação durante a noite em temperatura ambiente com os anticorpos primários: camundongo monoclonal anti-TFR2 (1:100 - clone 3C5, Sigma-Aldrich Co.), policlonal anti-CD63 (1:100 - clone 2B5, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) e monoclonal anti-CD81 (1:100 - clone 2B7, Sigma-Aldrich Co.). As tiras foram lavadas 5 vezes em PBS-T e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com anti-IgG monoclonal biotinilada de camundongo, como anticorpo secundário (1: 200 – Sigma-Aldrich Co.). Após novas lavagens, as tiras foram incubadas com estreptavidina peroxidase (1:250 - Sigma-Aldrich Co.) por 1 hora em temperatura ambiente. As bandas imunorreativas foram detectadas pela adição de substrato (H₂O₂ 0,03% e diaminobenzidina [DAB, Sigma-Aldrich Co.]) (TOWBIN, STAEHELIN, GORDON, 1979).

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

3.12 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E IMUNOMARCAÇÃO

As amostras de exossomos mantidas -70°C foram descongeladas em banho de gelo e ressuspendidas em glutaraldeído 1%/PBS por 30 minutos. Foram pipetados 5 μL desta suspensão em grades de carbono revestida de polivinil (SPI-Chem TM Formvar [®] Resina, SPI Supplies, West Chester, PA, EUA) seguido por 30 minutos de repouso em temperatura ambiente. As grades foram transferidas para gotas de 50 μL de água bidestilada por 2 minutos e este processo foi repetido sete vezes para um total de oito lavagens com água. As amostras foram coradas durante 30 minutos em banho de gelo com 5 μL de acetato de uranila a 2%. O líquido em excesso foi removido com papel de filtro Whatman e após 10 minutos as amostras foram analisadas por microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, EM 109, Carl Zeiss Optical, Inc, Alemanha) (CLAYTON et al., 2008).

Para a imunomarcação com ouro (10 nm, Sigma-Aldrich Co.), as grades foram lavadas em PBS, bloqueadas com 0,5% BSA/PBS por 30 minutos e então incubadas com um anticorpo primário monoclonal anti-camundongo anti-TfR2 (1:200) diluído em 0,1% BSA/PBS durante a noite à 4°C . Em seguida as grades foram lavadas com 100 μL de PBS e incubadas com anticorpo de camundongo anti-IgG marcado com partículas de ouro (10 nm) diluído em 0,1% BSA/PBS por 2 horas a 4°C . Em seguida, estas grades foram fixadas com solução glutaraldeído 0,5% por 20 minutos, lavadas em acetato de amônio 0,2 M e coradas negativamente com 100 μL de acetato de uranila a 2% durante 30

minutos. Este material foi então analisado por microscopia eletrônica de transmissão (SKOKOS et al., 2001).

3.13 ANÁLISE DE CITOCINAS

As PBMC de indivíduos atópicos foram separadas seguindo o mesmo protocolo para a separação das PBMC de indivíduos não-atópicos. Em resumo, as células foram lavadas duas vezes em PBS estéril e ressuspensas a uma densidade de 2×10^6 células/mL (método de exclusão por Trypan) em meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino livre de exossomos bovinos por ultracentrifugação a $100.000 \times g$ por 18 horas a 4°C . Em seguida, $400\mu\text{L}$ de suspensão celular (2×10^6 células/mL) foram adicionadas a cada poço de uma placa de 24 poços de cultura. No primeiro dia foram estimuladas com $50 \mu\text{L}$ dos seguintes estímulos em quatro condições experimentais: (I) PBMC foram estimuladas com Meio de cultura completo ou PHA (5 g/mL) ou Df (10 mg/mL); (II) PBMC foram estimuladas com Meio de cultura completo acrescido do *pool* de ExoA (1 mg/mL) ou PHA acrescido do *pool* de ExoB (1 mg/mL), ou Df (10 mg/mL) acrescido do *pool* de ExoC (1 mg/mL); (III) PBMC foram estimuladas somente com o *pool* de ExoA (1 mg/mL) ou *pool* de ExoB (1 mg/mL) ou *pool* de ExoC (1 mg/mL); (IV) PBMC foram novamente estimuladas somente com o *pool* de ExoA (1 mg/mL) ou *pool* de ExoB (1 mg/mL) ou *pool* de ExoC (1 mg/mL). Após 24 h de cultura, apenas os poços contendo as células da condição experimental III foram estimulados com Meio de cultura completo ou

PHA ou Df, nas mesmas concentrações. Após 72 horas de cultura para todas as condições, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a - 70 ° C até a análise da produção de citocinas (FIGURA 3). As células foram expostas às quatro condições experimentais em triplicata. Os níveis das citocinas IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ e TGF- β foram quantificados pelo método imunoenzimático - ELISA *sandwich* de acordo com as instruções do fabricante (R & D Systems. Mineapolis, MN). Resumidamente, as placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura por 18 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS-Tween e bloqueio com as soluções bloqueadoras apropriadas por 1 hora à temperatura ambiente, os sobrenadantes de cultura foram adicionados, não diluídos, em duplicata. Simultaneamente, as curvas padrões das respectivas citocinas recombinantes foram realizadas com diluições duplas seriadas. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinizados por 2 horas à temperatura ambiente. Após subseqüentes lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H₂O₂ a 0,03% e tetrametilbenzedina [TMB]). A D O foi determinada em leitor de placas a 450 nm e filtro de referência a 570 nm. Os valores da DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com as curvas padrões obtidas com as

respectivas citocinas recombinantes humanas, utilizando-se o *software* Microplate Manger PC versão 4.0 (Bio-Rac Laboratories Inc., Hercules, EUA).

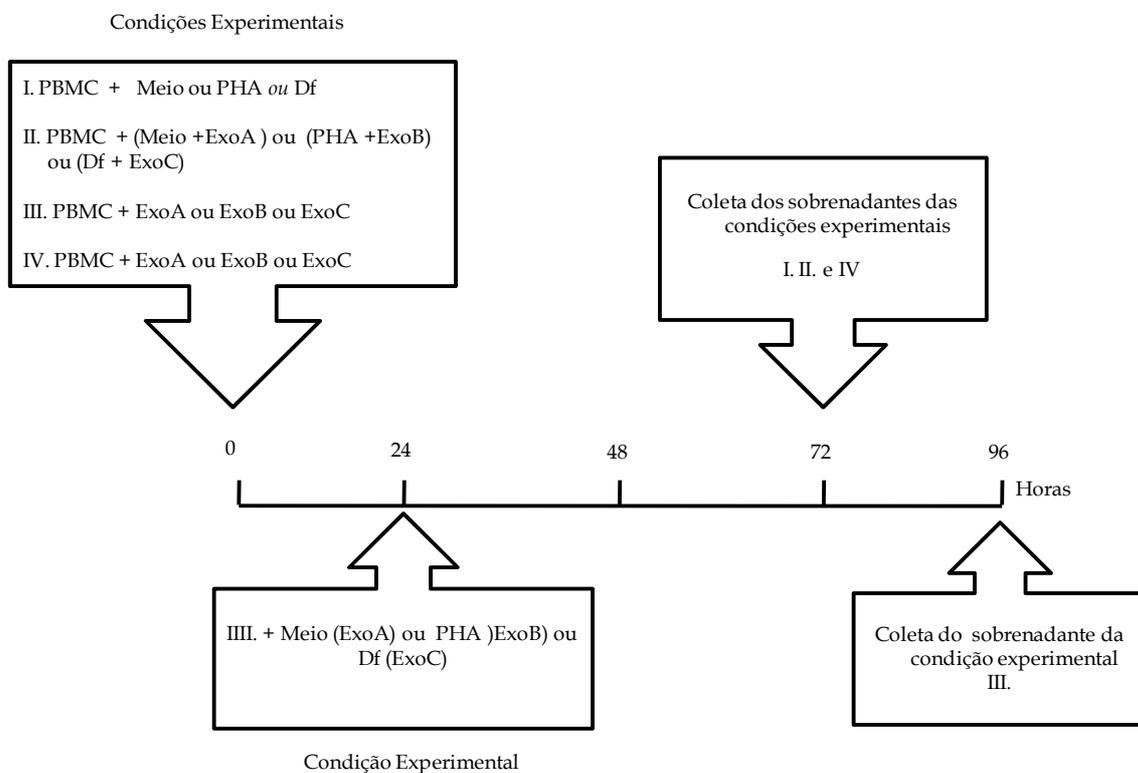


FIGURA 3. Condições experimentais nas quais foram expostas as PBMC de indivíduos alérgicos para análise da produção de citocinas *in vitro*.

A sensibilidade dos testes foi de 23 pg/mL (IL-5) ou 31 pg/mL (IFN- γ , IL-10, IL-17 e TGF- β) ou 94 pg/mL (IL-13). Dados abaixo da sensibilidade de cada ensaio foram calculados por extrapolação da curva padrão, correspondente a uma parcela da regressão quadrática. Os coeficientes de variação para essas citocinas foram abaixo de 10%, 10% e 15%, respectivamente.

3. 14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises estatísticas e confecção dos gráficos foi utilizado o *software* GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Todos os dados foram representados com média \pm desvio padrão ou erro padrão. Os pós-testes one-way ANOVA e Bonferroni de comparação múltipla foram utilizados para comparações entre as células estimuladas em relação ao meio de cultura (controle) dentro de cada condição experimental, bem como para comparar as quatro condições experimentais em cada estímulo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. 15 BIOSSEGURANÇA

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

4. Resultados

4.1 RESULTADOS

Os protocolos adotados para produção e isolamento dos exossomos foram compostos por etapas de centrifugação e ultracentrifugação, onde as células e os fragmentos celulares foram eliminados (Figura 4).

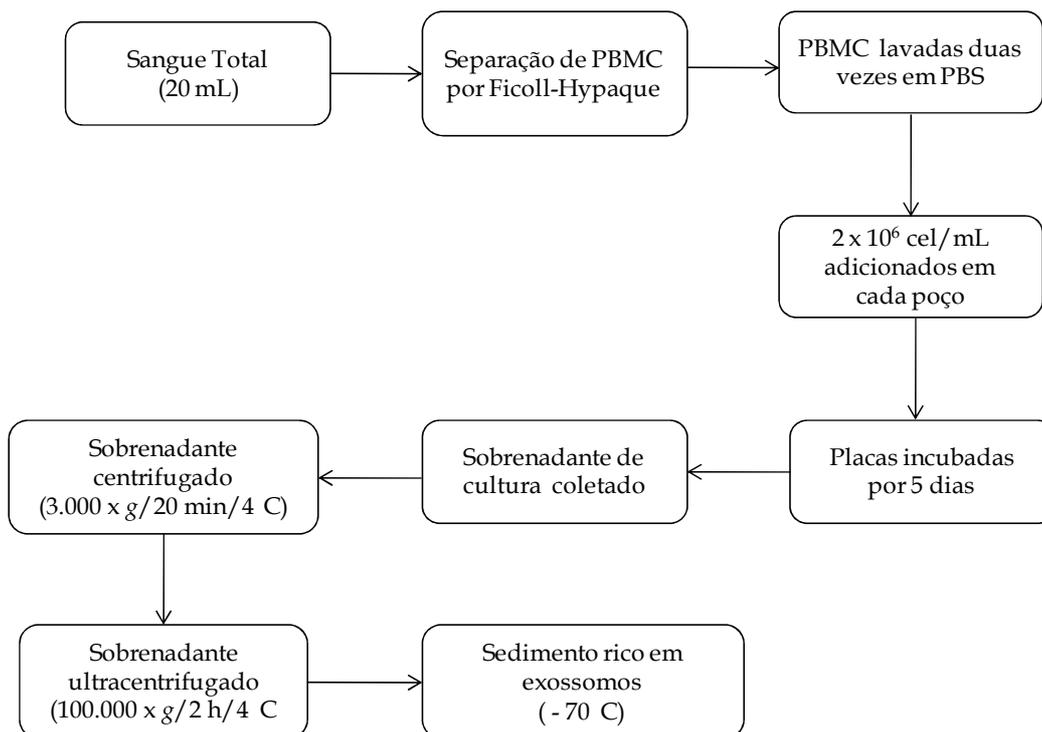


Figura 4. Esquema simplificado do isolamento de exossomos a partir de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos não-atópicos.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS

Para caracterizarmos as vesículas que foram isoladas das PBMC de indivíduos não-atópicos e nos certificarmos de que eram verdadeiramente exossomos, observamos alguns parâmetros tais como: a concentração e a massa

molecular relativa, o perfil eletroforético das proteínas, a imunomarcação para moléculas específicas e a análise ultraestrutural.

Determinamos a concentração de proteínas dos exossomos isolados das PBMC dos indivíduos não-atópicos usando amostras contendo um *pool* de exossomos resultante das células estimuladas apenas com Meio de cultura (ExoA), um *pool* de exossomos resultante das células estimuladas apenas com o mitógeno PHA (ExoB) e um *pool* de exossomos resultante das células estimuladas apenas com o alérgeno Df (ExoC). Os valores obtidos foram de aproximadamente 1 mg/mL (TABELA 3).

Tabela 3: Concentração de proteínas de exossomos isolados de PBMC de indivíduos não-atópicos pelo Método de Bradford.

<i>Pool</i> de Exossomos	Estímulos	Proteína mg/mL
ExoA	Meio Completo	0,90
ExoB	PHA	1,15
ExoC	Df	0,94

PHA: Fitohemaglutinina, Df: alérgeno de *Dermatophagoides farinae*.

Não encontramos diferenças significativas entre a concentração protéica dos exossomos provenientes dos três diferentes estímulos. Para determinar o peso molecular relativo das proteínas dos exossomos derivados das PBMC dos indivíduos não-atópicos, extratos protéicos do *pool* dos

exossomos de diferentes preparações foram submetidos ao SDS-PAGE. O perfil eletroforético mostrou padrões semelhantes entre as diferentes amostras do *pool* de exossomos (ExoA, ExoB e ExoC) dos indivíduos não-atópicos após estimulação *in vitro* com os respectivos estímulos (Meio de cultura, PHA e Df). Notamos uma coloração acentuadamente forte de bandas variando de 40 a 80 kDa, e uma ligeira coloração das bandas em torno de 20 kDa, no intervalo de 19 kDa (TFR2) e 55 kDa (CD63) (FIGURA 5).

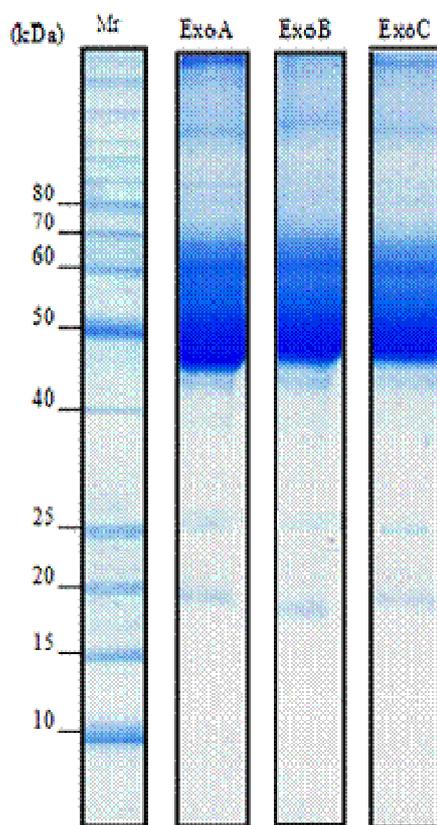


Figura 5. Perfil eletroforético do *pool* de exossomos provenientes de PBMC de indivíduos não-atópicos estimuladas com Meio (ExoA), PHA (ExoB) e Df (ExoC) em SDS-PAGE a 12%, corado com Comassie Coloidal Azul. PBMC: células mononucleares de sangue periférico. Mr: massa molecular relativa, em kiloDalton (kDa).

O fenótipo dos exossomos também foi confirmado da visualização das bandas protéicas como o Receptor Transferrina 2 - TFR2 (19 kDa), as tetraspaninas CD63 (60 kDa) e CD81 (26 kDa) por *immunoblotting* (FIGURA 7).

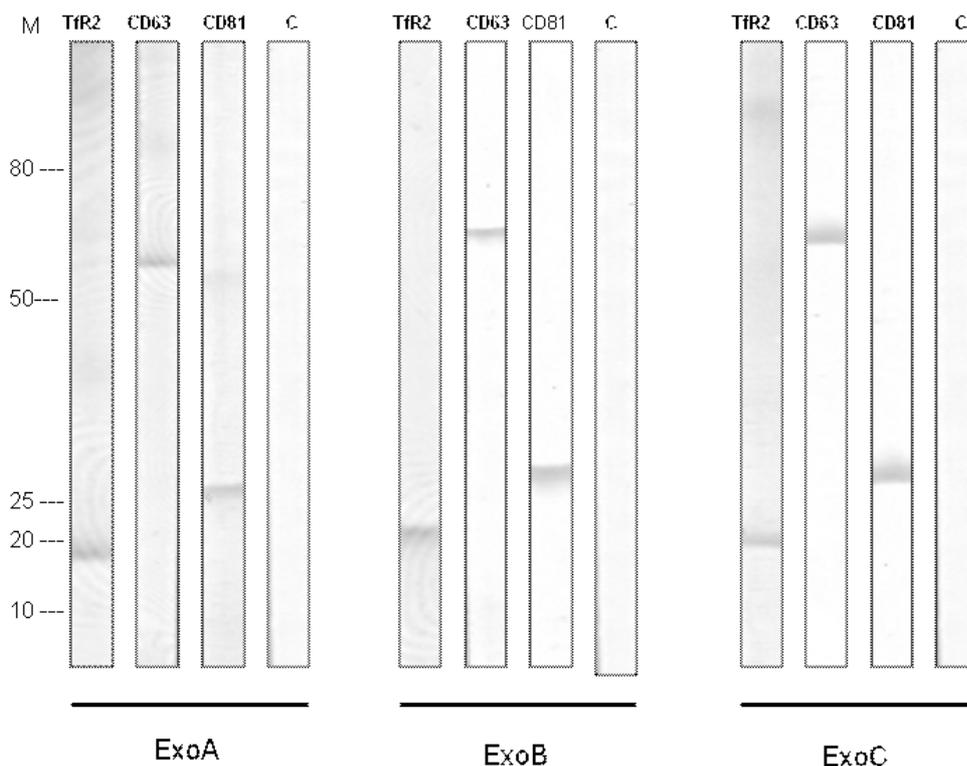


FIGURA 6. *Immunoblotting* representativo para o *pool* de exossomos isolados de PBMC sob diferentes estímulos, ExoA (Meio de cultura), ExoB (PHA) e ExoC(Df). Foram marcadas proteínas específicas de exossomos, TFR2 (19 kDa), CD63 (60 kDa) e CD81 26 (kDa). A massa molecular relativa (M) está indicada em kiloDalton (kDa).

Além disso, a análise ultraestrutural revelou vesículas pequenas (30-150 nm de diâmetro) (FIGURA 7A), com morfologia homogênea, correspondentes ao tamanho característico de exossomos por microscopia eletrônica de transmissão em relação aos fragmentos (controle), onde se observam formas heterogêneas e

tamanhos entre 150 a 200 nm. A imunomarcação para Tfr2 confirmou também o fenótipo de exossomos, da visualização de partículas de ouro na superfície das nanovesículas (FIGURA 7).

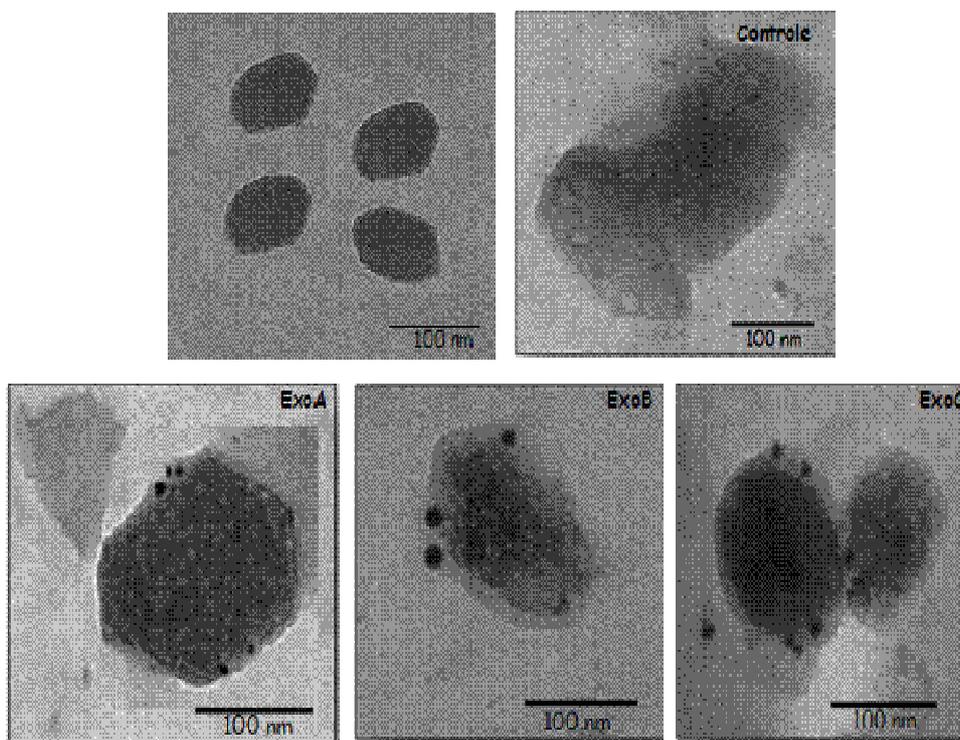


FIGURA 7: Análise ultraestrutural dos exossomos evidenciando a morfologia e tamanho típicos das nanovesículas em relação ao controle e a imunomarcação com partículas de ouro para o Receptor Transferrina 2. Barra: 100 nm.

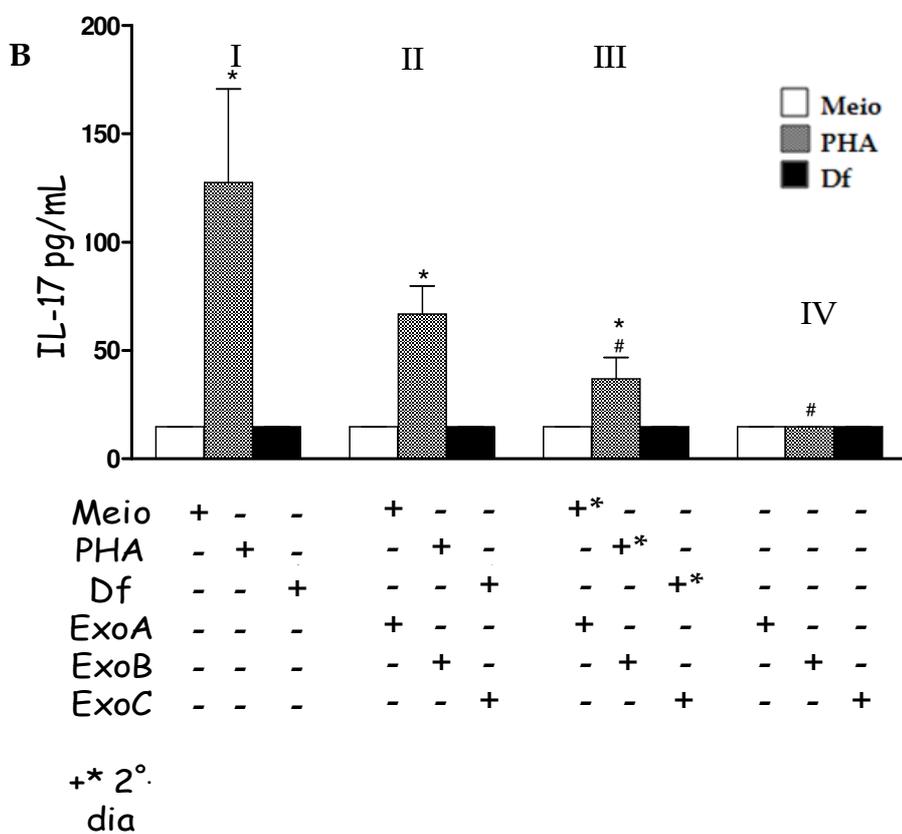
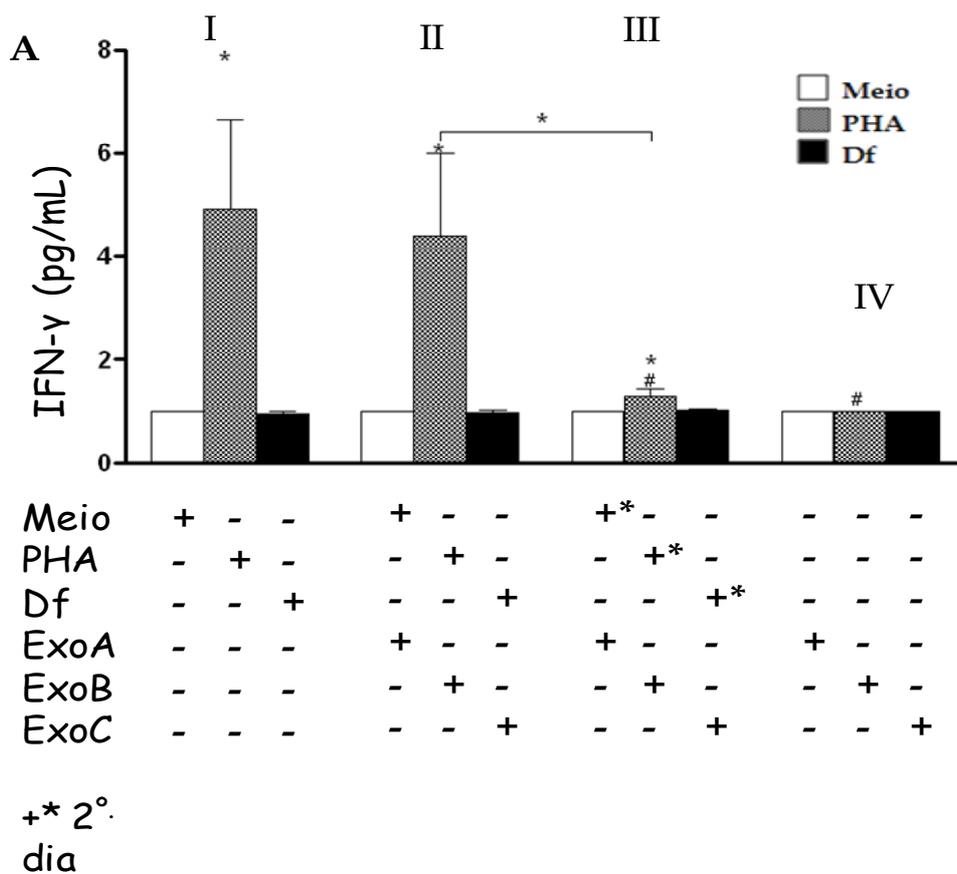
4.2 EFEITO DO ESTÍMULO COM EXOSSOMOS SOBRE O PERFIL DE CITOCINAS

O efeito do estímulo com exossomos derivados de PBMC de indivíduos não-atópicos no perfil de citocinas secretadas pelas PBMC de indivíduos alérgicos foi avaliado e os níveis das citocinas foram medidos no

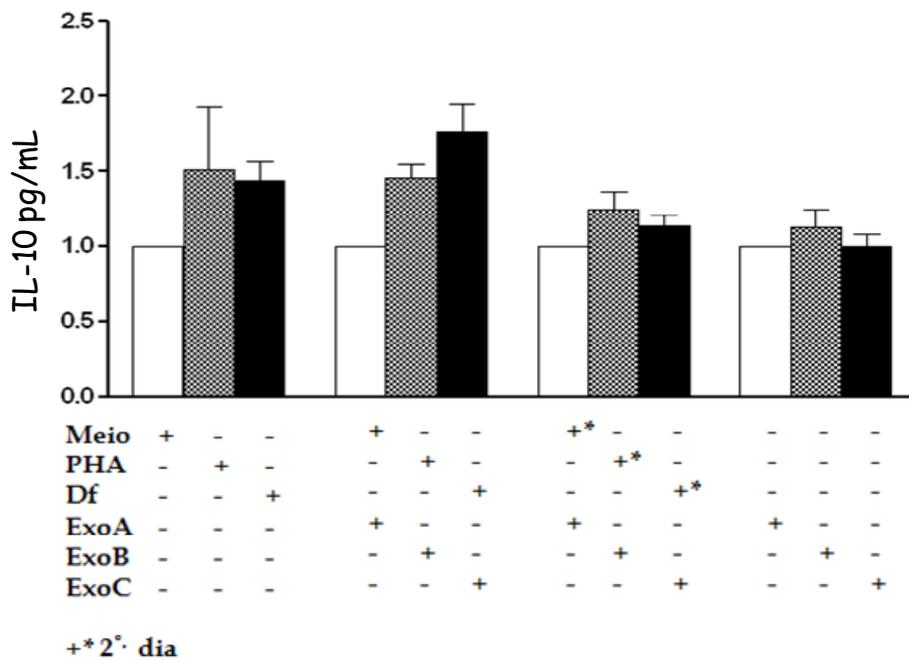
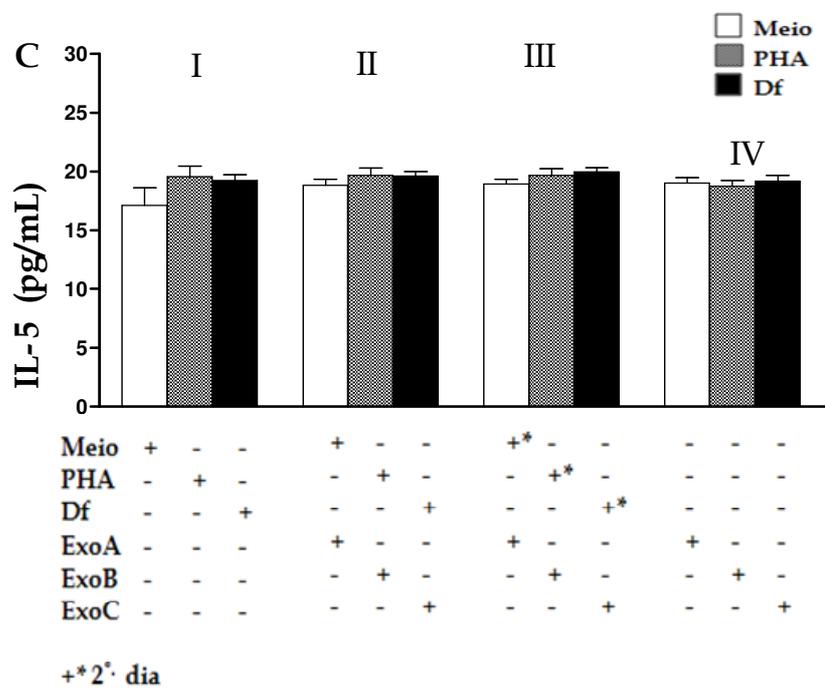
sobrenadante da cultura após 72 horas por ELISA em quatro condições experimentais descritas anteriormente. Os resultados mostraram um aumento significativo dos níveis de IFN- γ (FIGURA 8A) e IL-17 (FIGURA 8B), após estímulo com o mitógeno PHA, na ausência de estímulo com o *pool* de exossomos (I), ao passo que discretos aumentos, porém sem diferenças significativas foram observados para IL-13 (FIGURA 8D), IL -10 (FIGURA 8E) e TGF- β (FIGURA 8F) nesta mesma condição experimental.

Ao analisarmos o efeito dos exossomos associados aos diferentes estímulos (médio, PHA, DF), observamos que apenas a produção de IFN- γ (FIGURA 8A) e IL-17 (FIGURA 8B) sofreram interferência dos diferentes estímulos, possivelmente um efeito imunomodulador, principalmente quando as PBMC foram estimuladas apenas com PHA, como demonstrado pela diminuição dos níveis dessas citocinas, tanto nas condições experimentais II quanto na III, embora diferenças significativas tenham sido observadas somente na condição III, quando as PBMC foram previamente estimulados com PHA antes do estímulo com ExoB ($P < 0,05$). Além disso, o estímulo das PBMC apenas com exossomos (IV) não surtiu efeito na produção de citocinas.

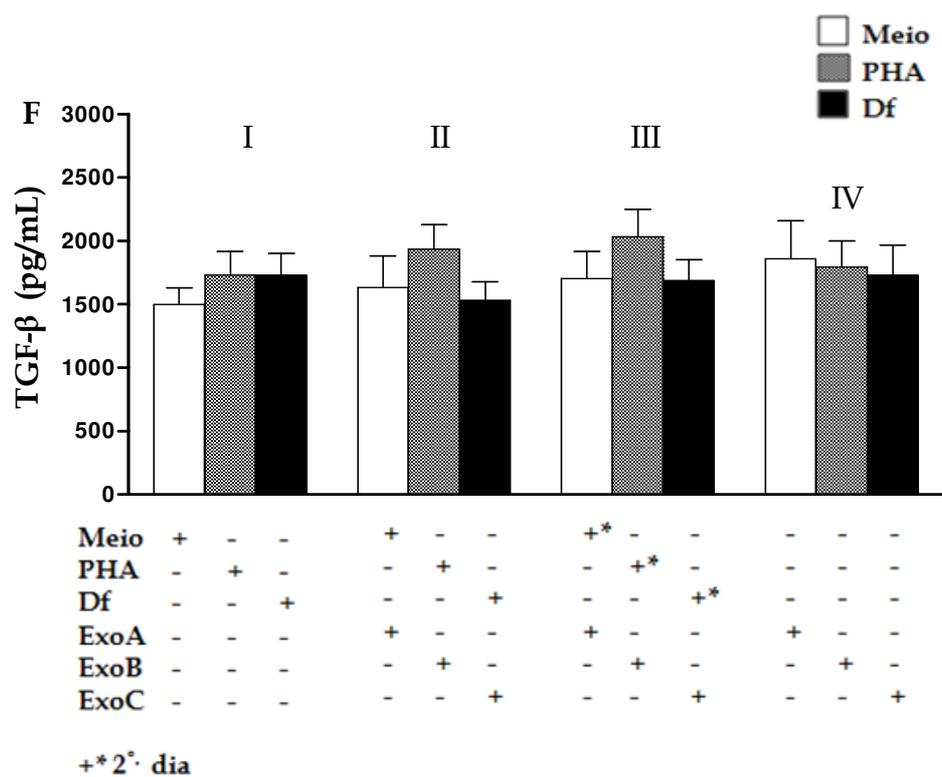
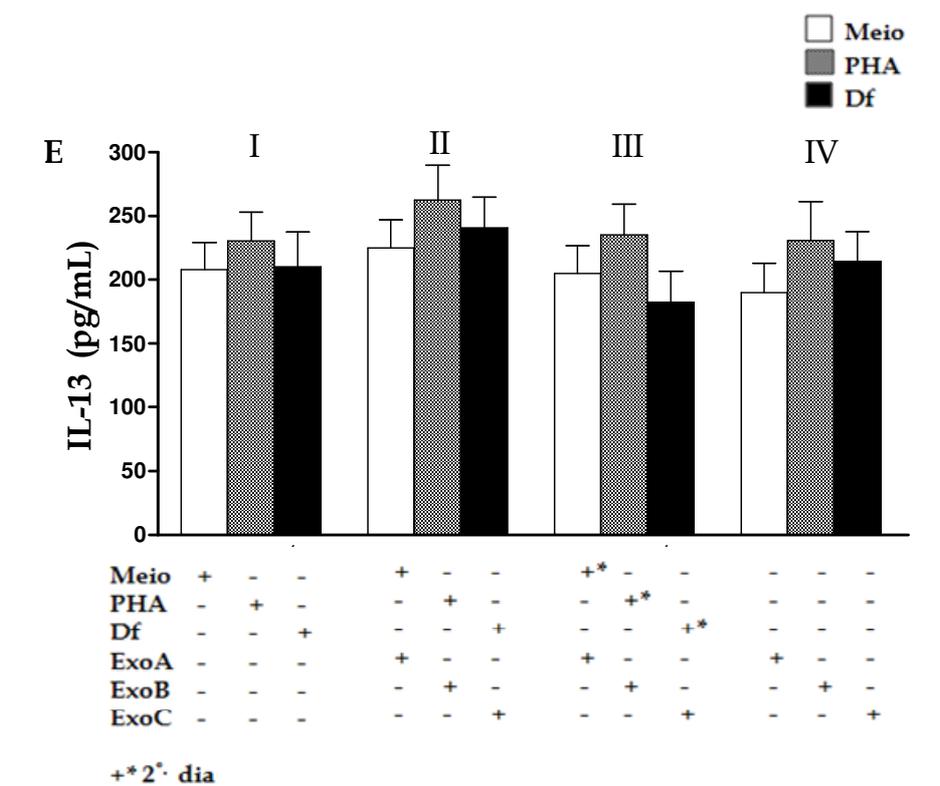
Resultados



Resultados



Resultados



5. Discussão

Isolamos e purificamos nanovesículas liberadas por PBMC de indivíduos não-atópicos, após estimulação *in vitro* com Meio (ExoA), PHA (ExoB) e Df (ExoC). A caracterização destas nanovesículas, foi definida por análise ultraestrutural, pela concentração protéica, pela massa molecular relativa e por marcadores qualitativos específicos para exossomos.

Baseando-nos em SDS-PAGE, *Immunoblotting* e imunomarcção, não encontramos diferenças significativas entre os exossomos isolados após os três diferentes estímulos, demonstrando que estas nanovesículas parecem ser idênticas, em termos de concentração de proteínas, presença do Receptor Transferrina (TfR2) e das tetraspaninas (CD63 e CD8). Estas proteínas da família Tetraspanina, estão presentes enriquecendo a membrana plasmática da maioria dos exossomos e podem ser usadas para a detecção dos mesmos (EKSTROM, 2008).

O nosso resultado quanto ao isolamento e caracterização dos exossomos é inequivocamente verossímil. Vários relatos têm demonstrado que os exossomos são estruturas vesiculares de origem endossomal que se fundem às membranas plasmáticas para serem exocitados, são produzidos como vesículas intraluminares dentro de corpos multivesiculares e apresentam pequenas dimensões (30-100 nm de diâmetro) (WOLFERS et al., 2004, EKSTRON, 2008). Além disso, os exossomos são definidos como vesículas membranosas de forma arredondada, bastante homogênea com diâmetro não superior a 150 nm por microscopia eletrônica, enquanto que os fragmentos de membrana apresentam-se com forma não-homogênea e dimensões variáveis (>

150 nm) (BARD et al., 2001). Estes relatos corroboram os nossos resultados quando avaliamos o aspecto morfológico dos exossomos. O momento exato para a coleta do sobrenadante de cultura (72 horas) para a extração dessas nanovesículas, também se mostrou adequado, porque nanovesículas são abruptamente liberadas pelas células no sobrenadante, a partir de 5 a 6 dias de cultura, seguido por um platô nos dias 7 a 8 (ADMYRE et al., 2004). Portanto, nosso modelo experimental para isolar, purificar e caracterizar exossomos foi estabelecido com base nestes critérios e pode ser considerado bem sucedido.

Os resultados obtidos a partir do perfil eletroforético das proteínas exossomais analisadas por SDS-PAGE, os marcadores específico (TFR2, CD63 e CD81) em *immunoblotting*, a análise ultraestrutural e imunomarcação de TFR2 reforçaram que estas nanovesículas isoladas são exossomos típicos.

Para avaliarmos se os exossomos secretados por PBMC de indivíduos não-atópicos, sob ação de diferentes estímulos, poderiam efetivamente desempenhar papel como imunossupressores nas reações alérgicas, em especial sobre o perfil de citocinas, usamos estes exossomos isolados de PBMC de indivíduos não-atópicos para estimular *in vitro* as PMBC de indivíduos alérgicos e subsequentemente avaliamos a produção de citocinas nos sobrenadantes de cultura celular por ELISA. Observamos que os exossomos derivados das PBMC dos indivíduos não-atópicos foram capazes de modular negativamente a resposta imune celular após a estimulação por mitógenos, especialmente envolvendo as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17. No

entanto, eles não foram capazes de inibir fortemente as respostas imunes Th2, uma vez que não observamos nenhuma mudança significativa na expressão das citocinas IL-5, IL-10 e IL-13. Além disso, o efeito dos exossomos foi especialmente notável quando eles foram usados antes do mitógeno na condição experimental III, reforçando o seu papel imunomodulador na produção de citocinas pró-inflamatórias.

Infelizmente, a hipótese sugerida por nós de que exossomos derivados de PBMC de indivíduos não-atópicos poderiam levar a uma mudança do perfil de resposta imune - de Th2 para Th1 - em indivíduos alérgicos não pôde ser confirmada, muito provavelmente porque o perfil de citocinas Th2 obtidos após a estimulação por mitógenos ou alérgeno de PBMC destes indivíduos alérgicos mostrou-se inalterada ou apenas em níveis basais dessas citocinas. Assim, os níveis de IL-5 se mantiveram inalterados na presença dos vários estímulos e em todas as condições experimentais, bem como IL-13 e IL-10, que apresentaram níveis com leves alterações entre os diferentes estímulos e diferentes tratamentos. Da mesma forma, o aumento esperado nos níveis de citocinas imunomoduladoras como TGF- β , por exemplo, sob estímulo de exossomos não foi observado, exceto por um discreto aumento do TGF- β e da produção de IL-10, mas sem diferenças significativas entre todos os estímulos e todas as condições experimentais. Esses achados podem estar relacionados, dentre outros fatores, ao pouco tempo de coleta dos sobrenadantes de cultura para análise de citocinas.

Os resultados contraditórios entre os diferentes estudos sobre a capacidade dos exossomos de estimular ou inibir as células T pode ser devido a diferenças no fenótipo dos exossomos utilizados, a diferenças no fenótipo das células de resposta, do tipo de antígeno utilizado ou o método de detecção empregado (ADMYRE et al., 2008).

Em modelos murinos, exossomos derivados de células dendríticas têm se mostrado imunomodulatórios ou imunossupressores, dependendo do tipo e do estágio de maturação das células dendríticas. Estas nanovesículas podem ainda, estimular diretamente as células na ausência de células apresentadoras de antígenos (RAPOSO et al., 1986), alguns outros tipos de exossomos exigem a presença de células apresentadoras de antígenos para exercer seus efeitos (VINCENT-SCHNEIDER, STUMPTNER, LANKAR, 2002). Portanto, como os exossomos interagem com as células T e quais moléculas são importantes para essa interação, precisa ser melhor investigado (ADMYRE et al., 2008).

Para esclarecermos estas questões sobre imunomodulação e imunossupressão, novos estudos devem ser realizados para avaliarmos a expressão dos RNA mensageiros de citocinas por *PCR* em tempo real.

A maneira como exossomos induzem uma resposta imune ainda não está elucidada e o papel que os exossomos desempenham na inflamação alérgica ainda é desconhecido. Além disso, exossomos derivados de indivíduos alérgicos são mal definidos e o papel deles na resposta alérgica *in vivo* carece de novas pesquisas (ADMYRE et al., 2008). Os exossomos já foram isolados nos

pulmões de pacientes asmáticos, indicando com isso que eles estão presentes nestes órgãos durante a inflamação alérgica (GATTI et al., 2005). Se for comprovado realmente que os exossomos podem ser importantes para uma resposta alérgica, estes poderão constituir um novo alvo terapêutico nas doenças alérgicas, alternativamente, poderiam ser usados também para manipular a resposta imune por induzir preferencialmente uma resposta imune T reguladora e não a uma resposta inflamatória alérgica, como na promoção de uma resposta de perfil Th2. Alguns trabalhos com camundongos indicam que exossomos derivados de células dendríticas tratadas com exossomos provenientes de células dendríticas geneticamente modificadas para expressarem FasL, têm demonstrado a capacidade de suprimirem a resposta inflamatória (KIM et al., 2005; KIM et al. 2006), este fato poderia ser avaliado como uma possibilidade na utilização de exossomos como agentes na imunoterapia anti-alérgica, porém a aplicação clínica de exossomos exigirá ainda uma ampla caracterização bioquímica e uma profunda análise dos mecanismos subjacentes à suas atividades biológicas. Estas nanovesículas com suas propriedades peculiares, apresentam algumas vantagens em relação a outras células se forem usadas na imunoterapia, porque são incapazes de alterar seu fenótipo após serem liberadas, o que as tornam estáveis e insensíveis aos estímulos *in vivo* (ZITVOGEL et al., 1998). A manipulação da composição molecular dos exossomos com novas propriedades desejáveis, apresenta possibilidades para a concepção de novas terapias e novos métodos diagnósticos. Utilizar os exossomos como transportadores de citocinas,

antígenos tumorais ou alérgenos para ativarem as células dendríticas, as células T e as células NK poderia aumentar a eficiência dessa vesículas como vacina (DELCAIRE, LE PECQ, 2006).

Fundamentados nos fatos descritos anteriormente, concluímos com este trabalho que:

- ✓ Os exossomos isolados das PBMC dos indivíduos não-atópicos, influenciam o perfil de citocinas pró-inflamatórias de indivíduos alérgicos, modulando negativamente o perfil dessas citocinas, como as IFN- γ e IL-17, induzindo a um perfil de resposta imune com efeito imunorregulador ao invés de imunossupressor.
- ✓ Este fato não indica por si só a possibilidade dos exossomos virem a ser utilizados como alvos terapêuticos para prevenção, diagnóstico e tratamento antialérgico, porém explicita a capacidade dessas nanovesículas influenciarem o perfil de resposta imune na secreção de citocinas.

6. Referências Bibliográficas

allergen peptides and activate allergen-specific T-cells to proliferate and produce Th2-like cytokines. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 120, p. 1418-1424, 2007.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2007, p. 432-452.

ABRAHAMS, V. M.; STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L, GULLER, S.; MOR, G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, p. 55-63, 2004.

ADMYRE, C.; GRUNEWALD, J.; THYBERG, J.; GRIPENBACK, S.; TORNLING, G.; EKLUND, A.; SCHEYNIUS, A.; GABRIELSSON, S. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. **European Respiratory Journal**, v. 22, p. 578- 583, 2003.

ADMYRE, C. Exosomes in immune regulation and allergy, 2007.

ADMYRE, C.; BOHLE, B.; JOHANSSON, S. M.; FOCKE-TEJKL, M.; VALENTA, R.; SCHEYNIUS, A.; GABRIELSSON, S. B-cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T-cells to proliferate and produce Th2-like cytokines. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 120, p. 1418-1424, 2007.

AGEA, E.; RUASSANO, A.; BISTONI, O.; MANNUCCI, R.; NICOLETTI, I.; CORAZZI, L.; POSTLE, A.; DE LIBERO, G.; PORCELLI, S. A.; SPINOZZI, F. Human CD1-restricted T cell recognize of lipids from pollens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, p. 295-308, 2002.

AGRAWAL, S.; KANDIMALLA, E. R. Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, ed. 3, p. 114-121, 2002.

AKADIS, C. A. Future of allergen-specific immunotherapy: better understanding of the mechanism, novel treatment, and long-term-cure. **Immunology and Allergy Clinical North America**, v.: 26, p.: 13-26, 2006.

ALFVEN, T.; BRAUN-FAHRLÄNDER, C.; BRUNEKREEF, B.; VON MUTIUS, E.; RIEDLER, J.; SCHEYNIUS, A.; VAN HAGE, M.; WICKMAN, M.; BENZ, M. R.; BUDDE, J.; MICHELS, K. B.; SCHRAM, D.; UBIAGGER, E.; WASER, M.; PERSHAGEN, G. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle : the PARSIFAL study. **Allergy**, v. 61, p. 112, 2006.

ALINE, F.; BOUT, D.; AMIGORENA, S.; ROINGEARD, P.; DIMIER-POISSON, I. Toxoplasma gondii antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against T. gondii infection. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 4127-4137, 2004.

AL-NEDAWI, K.; SZEMRAJ, J.; CIERNIEWSKI, C.S. Mast Cell-Derived Exosomes Activate Endothelial Cells to Secrete Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, v. :1744, 2005.

ALM, J. S.; SWARTZ, J.; LILJA, G.; SCHEYNIUS, A.; PERSHAGEN, G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. **Lancet**, v. 1, p. 1485-8, 1999.

ALTIERI, S. L.; KHAN, A. N.; TOMASI, T. B. Exosomes from plasmacytoma cells as a tumor vaccine. **Journl of Immunotherapy**, v. 27, p. 282 8, 2004.

AMAZALLAG, N.; PASSER, B. J.; ALLANIC, D; SEGURA, E.; THERY, C.; GOUD, B.; AMSON, R.; TELERMAN, A. TPSA6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine - releasing factor via NONCLASSICAL PATHWAY. **Journal of Biology and Chemistry**, V. 279, P. 46104 - 12, 2004.

ANDRE, F.; CHAPUT, N.; SCHARTZ, N. E.; FLAMENT, C.; AUBERT, N.; BERNARD, J.; LEMONNIER, F.; RAPOSO G.; ESCUDIER, B.; HSU, D. H. TURSZ, T.; AMIGORENA, S.; ANGEVIN, E.; ZITVOGEF, L. Exosomes as potent cell-free peptide based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 2126- 2136, 2004.

ANDRE, F.; ANDERSEN, M.; WOLFERS, J.; LOZIER, A.; RAPOSOS, G.; SERRA, V.; RUEGG, C.; FLAMENT, C.; ANGEVIN, C.; AMIGORENA, S.; ZITVOGEL, L. Exosomes in cancer immunotherapy: preclinical data. **Advances and Experimental Medicine and Biology**, v. 495, p. 349- 354, 2001.

ANDRE, F.; SCHARTZ, N. E.; MOVASSAGH, M.; FLAMENT, C.; PAUTIER, P.; MORICE, P.; POMEL, C.; LHOMME, C.; ESCUDIER, B.; LE CHEVALIER, T.; TURSZ, T.; AMIGORENA, S.; RAPOSO, G.; ANGEVIN, E.; ZITVOGEL, L. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. **The Lancet**, v.: 360, p.: 295-305, 2002b.

AI-NEDAWI, K.; SZEMRAJ, J.; CIERNIEWSKI, C. S. Mast Cell-Derived Exosomes Activate Endothelial Cells to Secrete Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p. 1744-49, 2005.

ASHER, M.I.; MONTEFORT, S.; BJORKSTEN, B.; LAI, C. K.; STRACHAN, D. P.; WEILAND, S. K.; WILLIAMS, H. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood : ISSAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **The Lancet**, v. 368, p. 733-43, 2006.

BACHY, I.; KOZYRAKI, R.; WASSEF, M. The particles of the embryonic cerebrospinal fluid: how could they influence brain development? **Brain Research Bulletin**, vol. 75, no.: 2-4, p. 289-294, 2008.

BOTTCHER, M. F.; JENMALM, M. C.; BJORKSTEN, B.; GAROFALO, R. P. Chemoattractant factors in breast milk from allergic and nonallergic mothers. **Pediatric Research**, v. 47, p. 592-7, 2000.

BOSTOCK, J. Case of a periodical affection of the eyes and the chest. **Medical Surgery Transaction**. London, v, XIV, p. 437- 446, 1819.

BRATNAGAR, S.; SHINAGAWA, K.; CASTELLINO, F. J.; SCHOREY, J. S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3234 - 3244, 2007.

BHATNAGAR, S.; SCHOREY, J. S. Exosomes Released from Infected Macrophages Contain Mycobacterium avium Glycopeptidolipids and Are Proinflammatory. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 282, p. 25779-89, 2007.

BLANCHARD, N., LANKAR, D.; FAURE, F.; REGNAULT, A.; DUMONT, C.; RAPOSO, G.; HIVROZ, C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/complex. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 3235-3241, 2002.

BRIGL, M. AND BRENNER, M.B. CD1: antigen presentation and T cell function. **Annu. Review. Immunology**. 22, 817-890, 2004.

BROWN, R.; CLUGSTON, C.; BURNS, P.; EDLIN, A.; VASEY, P.; VOJTESEK, B.; KAYE, S. B. Increased accumulation of p53 protein in cisplatin-resistant ovarian cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 55, p. 678-684, 1993.

BURNIER, L.; FONTANA, P.; KWAK, B. R.; ANGELILLO-SCHERRER, A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. **Thrombosis and Haemostasis**, vol.: 101, no.: 3, p.: 439-451, 2009.

CABY, M. P.; LANKAR, D.; VINCENDEAU-SCHERRER, C.; RAPOSO, G. BONNEROT, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **International Immunology**, v. 17, p. 879-87, 2005.

CHEN, W.; WANG, J.; SHAO, C.; LIU, S.; YU, Y.; WANG, Q.; CAO, X. Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, p. 1598-1607, 2006.

CHEN, B. J.; LAMB, R. A. Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? **Virology**, v. 372, p. 221-232, 2007.

CLAYTON, A.; TURKES, A.; DEWITT, S.; STEADMAN, R.; MASON, M.B. HALLETT, M. B. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. **FASEB Journal**, v. 18, p. 9779, 2004.

CLAYTON, A.; TABI, Z. Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer. **Blood Cells and Molecular Diseases**, v.: 34, p.: 206-13, 2005.

CLAYTON, A.; TURKES, A.; NAVABI, H.; MANSON, M. D.; TABI, Z. Induction of heat shock protein in B-cell exosomes. **Journal of Cell Science**, v.: 118, p.: 3631-8, 2005.

CLAYTON, A., MITCHELL, J. P., COURT, J., MASON, M. D.; TABI, Z. Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2. **Cancer Research**, v.: 67, p.: 7458-66, 2007.

COFFMAN, R. L.; CARTY J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 949-954, 1986.

COGSWELL, J. P.; WARD, J.; TAYLOR, I. A.; WATERS, M.; SHIN, Y.; CANNON, B.; KEINAR, K.; KEMPPAINEN, J.; BROWN, D.; CHEN, C.; PRINJHA, K.; RICHARDSON, J. C.; SAUNDERS, M.; ROSES, A. D.; RICHARDS, C. A. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. **Journal of Alzheimer's Disease**, vol.: 14, no.: 1, p.: 27-41, 2008.

COURT, F. A.; HENDRIKS, W. T.; MACGILLAVRY, ALVAREZ, D. J.; VAN MINNEN, J. Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. **Journal of Neuroscience**, vol.: 28, no.: 43, pp.: 11024-11029, 2008.

COPPIETERS, K.; ANA MARÍA BARRAL A. M.; JUEDES A.; WOLFE T.; RODRIGO E.; CLOTILDE THÉRY C.; SEBASTIAN AMIGORENA S.; VON HERRATH M. G. No Significant CTL Cross-Priming by Dendritic Cell-Derived Exosomes during Murine Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 2213-2220, 2009.

CTA - COMISSÃO DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANATOMIA. Terminologia anatômica. São Paulo: Manole, 2001. 248 p.

CUNREN-LIU, C.; YU, S.; ZINN, K.; WANG, J.; ZHANG, L.; JIA, Y.; KAPPES, J. C.; BARNES, B.; KIMBERLY, R. P.; GRIZZLE, W. E.; ZHANG, H. Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 1375-1385, 2006.

DARDALHON, V.; AWASTHI, A.; KOWN, H.; GALILEOS, G.; GAO, G.; SOBEL, R. A.; MITTSDOERFFER, M.; STROM, B.; ELYAMAN, V.; HO, C.; KOURY, S.; OUKKA, M.; KURCHROO, V.K. IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ effector T cells. **Nature immunology**, v.: 9, p.: 1347 - 1355, 2008.

DE GASSART, A.; GEMINARD, C.; FEVRIER, B.; RAPOSO, G.; VIDIGAL, M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. **Blood**, v. 102, p. 4336-44, 2003.

DE GASSART, A.; GEMINARD, C.; HOEKSTRA, D.; AND VIDAL, M. Exosome Secretion: The Art of Reutilizing Nonrecycled Proteins? **Traffic**, v. 5, p. 896-903, 2004.

DENEKA, M.; PELCHEN-MATTHEWS, A.; BYLAND, R.; RUIZ-MATEOS, E.; MARSH, M. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. **Journal of Cellular Biology**, v. 177, p. 329-341, 2007.

DENZER, K.; KLEIJMEER, M. J.; HEIJNEN, H. F.; STOORVOGEL, W.; GEUZE, H. J. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 19, p. 3365-3374, 2000.

DEVOS, S.; CORMONT, F.; VRTALA, S.; HOOGHE-PETERS, E.; PIRSON, F.; SNICK, J. Allergen-induced interleukin-9 production *in vitro*: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 174-182, Feb. 2006.

DOAN, T. T.; MELVOLD, R.; WALTEBAUGH, C. **Imunologia Médica Essencial**. Tradução por Eiler Frisch Toros, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

EAACI Position paper - A revised nomenclature for allergy: EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, v. 56, p. 813-24, 2001.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Structures of the *Erythrina corallodendron* lectin and of its complexes with mono and disaccharides. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 277, n. 4, p. 917-932, Apr. 1998.

EKSTROM, K.; VALADI, H.; BOSSIOS, A.; SJOSTRAND, M.; LEE, J. J.; LOTVALL, J. O.. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cellular and Biology**, v. 9, p. 654-659, 2007.

ESCOLA, J.; M., KLEIJMEER, M.J., STLOORVOGEL, W., GRIFFITH, J.M.; YOSHIE O.; GUEZE, H. J. Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes, **Journal of Biology and Chemistry**, v. 273, p. 20121-27, 1998.

FAURE, J.; LACHENAL, G.; COURT, M.; HIRRLINGER, J.; CHATELLARD-CAUSSE, C.; BLOT, B.; GRANGE, J.; SCHOEHN, G.; GOLDBERG, Y.; BOYER, V.; KURCHROFF, F.; RAPOSO, G.; GARIN, J. SADOUL, R. Exosomes are released by cultured cortical neurones. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 31, p. 642-48, 2006.

FLANAGAN, J.; MIDDELDORP, J.; SCULLEY, T. Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 1871-1879, 2003.

GATTI, J. L.; METAYER, BELGHAZI, S. M.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L.; Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles, **Biology of Reproduction**, v. 72 , p. 1452-65, 2005.

GUO, S.; E. LO, H. Dysfunctional cell-cell signaling in the neurovascular unit as a paradigm for central nervous system disease. **Stroke**, v. 40, n. 3, suplemento 1, p. S4-S7, 2009.

HAO, S.; BAI, O.; YUAN, J.; QURESHI, M.; XIANG, J. Dendritic cell-derived exosomes stimulate stronger CD8⁺ CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosomes. **Cellular Molecular Immunology**, v. 3, p. 205-11, 2006.

HARDING, C.; HEUSER, J.; STAHL, P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. **European Journal of Cellular Biology**, v. 35, p. 256-263, 1984.

HARRINGTON, L. E. Interleukin 17- producing CD41 effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1123-1132, 2005.

HEMELER, M. E. Tetraspanin functions and associated microdomains. **Nature Review Molecular Cellular Biology**, v. 6, p. 801-11, 2005.

HELENIUS, A.; AEBI, M. Intracellular functions of N-linked glycans. **Science**, Washington, v. 291, n. 5512, p. 2364-2369, Mar. 2001.

HOORN, E. J.; PISITKUN, T.; ZIETSE, R.; GROSS, P.; FROKIAER J.; WANG, N. S.; GONZALES, P. A.; STAR, R. A.; KNEPPER, M. A. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. **Nephrology (Carlton)**, v. 10, p. 283-290, 2005.

HSU, D. H.; PAZ, P.; VILLAFLOR, G.; RIVAS, A.; MEHTA-DAMANI, A.; ANGEVIN, E.; ZITVOGEL, L.; LE PECQ, J. B. Exosomes as a tumor vaccine: enhancing potency through direct loading of antigenic peptides. **Journal of Immunotherapy**, v. 26, p. 440-450, 2003.

HWANG, I.; SHEN, X.; SPRENT, J. Direct stimulation of naïve cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells distinct roles for CD54 and B7 molecules. **Proceedings of Nacional Academy of Science USA**, v. 100, p. 6670-5, 2003.

ICHIM, E. T.; ZONG, Z.; KAUSHAL, S.; ZHENG, X.; RENS, X.; HAOS, X, JOYCE, A. J.; HANLEY, H. H.; RIORDAN, N. H.; KOROPATNICK, J.; BOGIN,

V.; MINV, B. R.; MIN, WP, TULL, R. H. Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications. **Journal of Transational Medicine**, v. 6, p. 37 2008.

JANISZEWSKI, M.; DO CARMO, A. O.; PEDRO, M. A.; SILVA, E.; KNOBEL, E.; LAURINDO, F.R. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. **Critical Care Medicine**, v.: 32, p.: 818-25, 2004.

JAVAHERIAN, A.; KRIEGSTEIN, A. A stem cell niche for intermediate progenitor cells of the embryonic córtex. **Cerebral Cortex**, vol.: 19, suplemento 1, p. i70-i77, 2009.

JOHANSSON, S. G.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S.; LANIER, B. Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; ORTEGA-MARTELL, J. A; PLATTS-MILLS, T. A. E.; RING, J.; THIEN, F.; VAN CAUWENBERGE, P.; WILLIAMS, H. C. Revised nomenclature of allergy for global use: Report of the Nomenclature Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 5, p. 832-836, 2004.

JOHNSTONE, R.M.; ADAM, M.; HAMMOND, J. R.; ORR, L.; TURBIDE C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **Journal of Biology and Chemistry**, v. 262, p. 9412-9420, 1987.

JOUVE M, SOL-FOULON N, WATSON S, SCHWARTZ O, BENAROCH P. HIV-1 buds and accumulates in "no acidic" endosomes of macrophages. **Cellular Host Microbe**, v. 2, p. 85-95, 2007.

KALLIOMAKI M, ISOLAURI E. Pandemic of atopic diseases – a lack of microbial exposure in early infancy? **Current Drug. Targets and Infectious Disorders**, v. 2, p. 193-199, 2002.

KAM, K. L.; HSIEH, K. H. Comparison of three in vitro assays for serum IgE with skin testing in asthmatic children. **Annual Allergy**, v. 73, p. 329-36, 1994.

KARLSSON, M.; LUNDIN, S.; DAHLGREN, U.; KAHU, H.; PETTERSON, I.; TELEMO, E. "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. **European Journal of Immunology**, v. 31, p. 2892 -2900, 2001.

KAWAGUCHI, M.; ADACHI, M.; ODA, N.; , DODUBU, F.; HUANG, S. K. IL-17 cytokine family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, p. 1265-73, 2004.

KELLER, S.; RUPP, C.; STOECK, A.; RUNZ, S. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. **Kidney International** , v. 72, p. 1095-102, 2007.

KIM, S. H.; LECHMAN, E. R.; BIANCO, N.; MENON, R.; KERAVALA, A.; NASH, J. Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 6440-6448, 2005.

KIM, S. H.; BIANCO, N.; MENON, R.; LECHMAN, E. R.; SHUFESKY, W. J.; MORELLI, A. E. Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. **Molecular Therapy**, v. 13, p. 289-300, 2006.

KLEIJMEER, M. J.; ESCOLA, J. M.; UYTDEHAAG, F. G.; JAKOBSON, E.; GRIFFITH, J. M.; OSTERHAUS, A. D.; STORVOGEL, W.; MIELIF, C. J.; ROBOUILLE, C.; GEUZE, H. J. Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract. **Traffic**, v. 2, p. 124 - 37, 2001.

KOLIS, J. K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation, **Immunity**, v. 21, p. 467-76, 2004.

KULL, I.; BOHME, M.; WAHLGREN, C. F.; NORDVALL, L.; PERSHAGEN, G.; WICKMAN, M. Breast-feeding reduces the risk for childhood eczema. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, p. 657-61, 2005.

LAIHO, K.; LAMPI, A. M.; HAMALAINEN, M.; MOILANEN, E.; PIIRONEN, V.; ARVOLA, T.; SYRJANEN, S.; ISOLAURI, E. Breast milk fatty acids,

eicosanoids, and cytokines in mothers with and without allergic disease. **Pediatrics Research**, v. 3, p. 642-7, 2003.

LAITINEN, T.; POLVI, A.; RYDMAN, P.; VENDELIN, J.; PULKKINEN, V.; SALMIKANGAS, P.; MÄKELÄ, S.; REHN, M.; PIRSKANEN, A.; RAUTANEN, A.; ZUCHELLI, M.; GULLSTÉN, H.; LEINO, M.; ALENIUS, H.; PETÄYS, T.; HAAHTELA, T.; LAITINEN, A.; LAPRISE, C.; LAITINEN, L. A.; KERE, J. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. **Science**, v. 9, p. 300-4, 2004.

LAMPARSKI, H. G.; METHA-DAMANI, A.; YAO, J.-Y.; PATEL HSU, D. H.; RUEGG, C.; LE PECQ, J. B. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 270, p. 211-26, 2002.

LAULAGNIER, K.; VINCENT-SCHNEIDER, H.; HAMDI, S.; SUBRA, C. Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 35, p. 116-21, 2005.

LEMANSKE-JUNIOR, R. F.; BUSSE, W. W. Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 111, p. s502-519, Supplement 2, 2003.

LOMBARDI, C.; PASSALACQUA, G.; GARGIONI, S.; CIPRANDI, G.; SENNA, G. E.; CIPRANDI, G.; SCORDAMAGLIA, A.; CANONICA, G. W. The natural history of respiratory allergy: a follow-up study of 99 patients up to 10 years. **Respiratory Medicine**, v. 95, p. 9-12, 2001.

MAROGNA, M.; MASSOLO, A.; BERRA, D.; P. ZANON, P.; CHIODINI, E.; CANONICA, G. W.; PASSALACQUA, G. The type of sensitizing allergen can affect the evolution of respiratory allergy. **Allergy**, v. 61, ed.10, p. 1209-1215, 2006.

MATSUMOTO, K.; MORISAKI, T.; KUROKI, H.; KUBO, M.; ONISHI, H.; NAKAMURA, K.; NAKAHARA, C.; KUGA, H. ; BABA, E.; NAKAMURA, M.; HIRARA, T.; TANAKA, M.; KATANO, M. Exosomes secreted from monocytes-derived dendritic cells support *in vitro* naïve CD 4+T cell survive through NF- κ B activation. **Cellular Immunology**, v. 231, p. 20-9, 2004.

MEARS, R.; CRAVEN, R. A.; HANRAHAN, S.; TOTTY, N. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 4, p. 4019-31, 2004.

MELLMAN, I. Endocytosis and molecular sorting. **Annual Review of Cell Devepmental of Biology**, v. 12, p. 575-625, 1996.

MIGNOT, G., ROUX, S., THERY, C., SEGURA, E.; ZITVOGEL. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, p. 376-88, 2006.

MIKSA, M., WU, R., DONG, W., DAS, P.; YANG, D.; WANG, P. Dendritic cell-derived exosomes containing milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII attenuate proinflammatory responses in sepsis. **Shock**, v. 25, p. 586-93, 2006.

MINCHEVA-NILSSON, L.; NAGAEVA, O.; CHEN, T.; STENDAHL, U.; ANTSIFEROVA, J.; MOGREN, I.; HERNESTAL, J.; BARANOV, V. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 3585-92, 2006.

MOBIUS, W.; VAN DONSELAAR, E.; OHNO-IWAHIDA, Y.; SHIMADA, Y.; HEIJNEN, H. F.; SLOT, J. W.; GEUZE, H. J. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicles bodies harbor most of the cholesterol found endocytic pathway. **Traffic**, v. 4, p. 222-31, 2003.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2348-2357, 1986.

NASPITZ, C. K.; SOLÉ, D.; AGUIAR, M. C.; CHAVARRIA, M. L.; ROSÁRIO FILHO, N.; ZULLIANI, A.; TOLEDO, E. C.; BARRETO, B. A. P.; SOUZA, L. S. F.

Phadiatop® no diagnóstico de alergia respiratória em crianças: Projeto Alergia (PROAL). **Journal of Pediatrics**, v. 80, n. 3, 2004.

NGUYEN, D. G.; BOOTH, A.; GOULD, S. J.; HILDRETH, J. E. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 278, 52347-52354, 2003.

OWNBY, D. R. Allergy testing: in vitro versus in vivo. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 35, n. 5, p. 995-1009, May, 1988.

ODDY, W. H.; HOLT, P. G.; SLY, P. D.; READ, A. W.; LANDAU, L. I.; STANLEY, F. J.; KENDALL, G. E.; BURTON, P. R. Association between breast feeding and asthma in 6 year old children: findings of a prospective birth cohort study. **Bmj**, v. 319, p. 815-9, 1999.

OHGAMI, R. S.; CAMPAGNA, D. R.; ERIC L GREER, E. L.; ANTIOCHOS, B.; MCDONALD, A.; CHEN, J.; SHARP, J. J.; FUJIWARA, Y.; BARKER, J. E.; FLEMING, M. D. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. **Nature Genetics**, v. 37, p. 1264 - 1269, 2005.

OHGAMI, R. S.; CAMPAGNA, D. R.; MCDONALD, A.; FLEMING, M. D. The Steap proteins are metalloreductases. **Blood**, v. 108, p. 1388-1394, 2006.

OSTMAN, S.; TAUBE, M.; TELEMO, E. Tolerosome- induced oral tolerance is MHC-dependent. **Immunology**, v. 116, p. 464-76, 2005.

PALMER, C. N.; IRVINE, A. D.; TERRON-KWIATKOWSKI A, ZHAO, Y.; LIAO, H.; LEE, S. P.; GOUDIE, D. R.; SANDILANDS, A.; CAMPBELL LE, SMITH, F. J.; O'REGAN, G. M.; WATSON, R. M.; CECIL, J. E.; BALE, S. J.; COMPTON, J. G.; DIGIOVANNA, J. J.; FLECKMAN, P.; LEWIS-JONES, S.; ARSECULERATNE, G.; SERGEANT, A.; MUNRO, C. S.; EL HOUATE, B.; MCELREAVEY, K.; HALKJAER, L. B.; BISGAARD, H.; MUKHOPADHYAY, S.; MCLEAN, W. H. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein fillagrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. **Nature Genetic**, v. 38, p. 441-6, 2006.

- PAN, B. T.; JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: Selective externalization of the receptor. **Cell**, v. 33, p. 967–978, 1983.
- PAN, B. T.; TENG, K.; WU, C.; ADAM, M.; JOHMTONE, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **Journal of Cellular Biology**, v. 101, p. 942 - 8, 1985.
- PAJNO, G. B.; BARBERIO, G.; DE LUCA, F.; MORABITO, L.; PARMIANI, S. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 31, p. 1392–1397, 2004.
- PARK, H. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1133–1141, 2005.
- PECHE, H.; HESLAN, M.; USAL, C.; AMIGORENA, S.; CUTURI, M. C. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. **Transplantation**, v. 76, p. 1503–1510, 2003.
- PASSALACQUA, G.; CIPRANDI, G.; GUERRA, L.; PASQUALI, M.; CANÔNICA, G. W. An update on the asthma-rhinitis link. **Current Opinion of Allergy Clinical and Immunology**, v. 4, p. 177-183, 2004.
- PELCHEN-MATTHEWS, A.; RAPOSO, G.; MARSH, M. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. **Trends Microbiology**, v. 12, p. 310–316, 2004.
- PINTO, L. W.; CHIMELLI, L. Componente oligodendroglial e neuronal em glioblastomas. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.: 62, p.: 1074-1078, 2004.
- PISITKUN, T.; SHEN, R. F.; KNEPPER, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **PNAS**, v. 101, p. 13368-73, 2004.
- PRADO, N.; MARAZUELA, E. G.; SEGURA, E.; FERNANDEZ-GARCÍA, H.; VILLALBA, M.; THÉRY, C.; RODRIGUEZ, R.; BATANERO, E. Exosomes from

Bronchoalveolar Fluid of Tolerized Mice Prevent allergic Reaction. **The Journal of Immunology**, v.: 181, p.: 1519-1525, 2008.

PISITKUN, T.; JOHNSTONE, R.; KNEPPER, M. A. Discovery of urinary biomarkers. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 5, p. 1760-1771, 2006.

QAZI, K. R.; GEHRMANN, U.; DOMANGE JORD, E. D.; KARLSSON, A. M. C. I.; GABRIELSSON, S. Dados não publicados.
RAJENDRAN, L.; HONSHO, M.; ZAHN, T. R.; KELLER, P.; GEIGER, K. D.; VERKADE, P.; SIMONS, K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. **PNAS**, v. 103, p. 11172-77, 2006.

RAPOSO, G.; NIJMAN, H. W.; STOORVOGEL, W.; LIEJENDEKKER, R.; HARDING, C. V.; MELIEF, C. J. B lymphocytes secrete antigen presenting vesicles. **Journal of Experimental in Medicine**, v. 183, p. 1161-1172, 1996.

RAPOSO, G.; TENZA, D.; MECHERI, S.; PERONET, R.; BONNEROT, C.; DESAYMARD, C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. **Molecular and Biology Cellular**, v. 8, p. 2631-2645, 1997.

RENAULD, J. C.; VINK A, LOUAHED, J.; VAN SNICK, J. Interleukin-9 is a major anti-apoptotic factor for thymic lymphomas. **Blood**, v.: 85, p.: 1300-5, 1995.

REZENDE, R. O. **Reatividade de IgE específica a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) e suas frações ligantes de Concanavalina A no soro de pacientes com alergia respiratória.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2006, 94p, dissertação de Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas (Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica), Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2006.

RINTALA-DEMPSEY, A. C.; REZVANPOUR, A.; SHAW, G. S. S100-annexin complexes--structural insights. **Cell Biology International.**, v. 275, p. 4956-66, 2008.

RISAU, W.; ESSER, S.; ENGELHARDT, B. Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. **Pathology Biology**, vol.: 46, no.: 3, p.: 171-175, 1998.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 7.ed., São Paulo: Manole, 2005. 500 p.

SAVINA, A.; FADER, C. M.; DAMIANI, M. T.; COLOMBO, M. I. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicles bodies in a calcium-dependent manner. **Traffic**, v. 6, p. 131 - 43, 2005.

SCHOENWETTER, W. F.; DUPCLAY, L.; APPAJOSYULA, S.; BOTTEMAN, M. F.; PASHOS, C. L. Economic impact and quality-of-life burden of allergic rhinitis. **Current Medicine Respiratory Opinion**, v. 20, p. 305-317, 2004.

SEGURA, E.; NICCO, C.; LOMBARD, B.; VERON, P.; RAPOSO, G.; BATTEREUX, F.; AMIGORENA, S.; THERY, C. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T cell priming. **Blood**, v. 106, p. 216-23, 2005b.

SCHOREY, J. S.; BHATNAGAR, S. Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. **Traffic**, v. 9, n. 6, p. 871-881, 2008.

SEARS, M.R.; GREENE, J.M.; WILLAN, A.R.; TAYLOR, D. R.; FLANNERY, E. M.; COWAN, J. O.; HERBISON, G. P.; POULTON, R. Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. **Lancet**, v. 360, p. 901-7, 2002.

SILTANEN, M.; KAJOSAARI, M.; POUSSA, T.; SAARINEN, K. M.; SAVILAHTI, E. A dual long-term effect of breastfeeding on atopy in relation to heredity in children at 4 years of age. **Allergy**, v. 58, p. 524-30, 2003.

SKOG, J.; WÜRDINGER, T.; VAN RIJN, S.; MEIJER, D. H.; GAINCHE, L.; SENA-ESTEVEZ, M.; JR, CARTER, B. S.; KRICHEVSKY, A. M.; BREAKEFIELD, X. O.. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 12, p. 1470-1476, 2008.

SKOKOS, D.; LE PANSE, S.; VILLA, I.; ROUSSELLE, J. C.; PERONET, R.; DAVID, B.; NAMONE, A.; MECHERI, S. Mast Cell-Dependent B and

TLymphocyte Activation Is Mediated by the Secretion of Immunologically Active Exosomes. **Journal of Immunology**, 166, 868-76, 2001a.

SKOKOS, D.; BOTROS, H. G.; DEMEURE, C.; MORIN, J.; PERONET, R.; BIRKENMEIER, G.; BOUDALY, S.; MECHERI, S. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 3037-3045, 2003.

SOLÉ, D.; YAMADA, E.; VANA, A. T.; WERNECK, G.; SOLANO, L. S. F.; SOLOGUREN, M. J.; BRITO, M.; ROSÁRIO FILHO, N.A.; STEIN, R. T.; MALLOL, J. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): prevalence of asthma and asthma-related symptoms among Brazilian schoolchildren. **Journal of Investigation in Allergology and Clinical Immunology**, v. 11, p. 123-8, 2001.

SOROOSH, P.; DORHERTY, T. A. Th9 and allergic disease. **Immunology**, v. 127, p. 450 - 458, 2009.

SPERGEL, J. M.; PALLER, A. S. Atopic dermatitis and the atopic march. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, s. 6, p. 118-127, 2003.

SPERGEL, J. M. Atopic march: link to upper airways. **Current Opinon in Allergy and Clinical Immunology**, v. 5, p. 17-21, 2005.

STENMARK, H.; OLKKONEN, V. M. The Rab GTPase family. **Genome Biology**, v. 2, reviews: 3007, 2001.

STOORVOGEL, W.; KLEIJMEER, M.J.; GEUZE, H.J.; RAPOSO, G. The biogenesis and functions of exosomes. **Traffic**, v. 3, p. 321-330, 2002.

TAYLOR, D. D.; GERCEL-TAYLOR, C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated t-cell signalling defects. **British Journal of Cancer**, v. 92, p. 305 - 311, 2005.

TAYLOR, D. D.; AKYOL, S.; GERCEL-TAYLOR, C. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol*, v. 176, p. 1534-1542, 2006.

TAYLOR, A. R.; ROBINSON, A. R.; GIFONDORWA, D. J.; TYTELL, M.; MILLIGAN, C. E. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Developmental Neurobiology*, vol.: 67, no.: 13, p.: 1815-1829, 2007.

THÉRY, C.; REGNAULT, A.; GARIN, J.; WOLFERS, J.; ZITVOGEL, L.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; AMIGORENA, S. Molecular Characterization of Dendritic Cell-derived Exosomes: Selective Accumulation of the Heat Shock Protein hsc73. *Journal of Cellular Biology*, v. 147, p. 599-610, 1999.

THEY, C., BOUSSAC, M., VERON, P., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO G, GARIN J, AMIGORENA, S. Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *Journal of Immunology*, v. 166, p. 7309-18, 2001.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Nature Immunology*, v. 2, p. 569-570, 2002.

THÉRY, C., DUBAN, L., SEGURA, E., VERON, P.; LANTZ, O.; AMIGORENA, S. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunology*, v. 3, p. 1156-62, 2002a.

TOWBIN, T.; STAEBELIN, T.; GORDON, I. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Procedure of Nature Academy of Science*, v. 76, p. 4350-4352, 1979.

TROMBETTA, E. S.; PARODI, A. J. N-glycan processing and glycoprotein folding. *Advances in Protein Chemistry*, New York, v. 59, p. 303-344, 2001.

TROWBRIDGE, I. S.; COLLAWN, J. F.; HOPKINS, C. R. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. **Annual Review of Cellular Biology**, v. 9, p. 129-161, 1993.

TROWSDALE, J.; BETZ, A. G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. **Nature Immunology**, v. 7, p. 241-6, 2006.

UYTTENHOVE, C; SIMPSON, R. J.; , VAN SNICK, J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.: 85, p.: 34-38, 1988.

VALADI, H.; EKSTROM, K.; BOSSIOS, A.; SJOSTRAND, M.; LEE, J. J.; LOTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cellular Biology**, v. 9, p. 654-659, 2007.

VAN DEURS, B.; HOLM, P. K.; KAYSER, L.; SANDVIG, K.; HANSEN, S. H. Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes. **European Journal of Cellular Biology**, v. 61, p. 208-224, 1993.

VAN ODIJK, J.; KULL, I.; BORRES, M. P.; BRANDTZAEG, P.; EDBERG, U.; HANSON, L. A.; HOST, A.; KUITUNEN, M.; OLSEN, S. F.; SKERFVING, S.; SUNDELL, J.; WILLE, S. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. **Allergy**, v. 58, p. 833-43, 2003.

VAN NIEL, G.; RAPOSO, G.; CANDALH, C.; BOUSSAC, M.; HERSHBERG, R.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN, M. Intestinal Epithelial Cells Secrete Exosome-like Vesicles. **Gastroenterology**, v. 121, p. 337-49, 2001.

VAN NIEL, G.; HEYMAN, M. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. II. Intestinal epithelial cell exosomes: perspectives on their structure and function. **American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, p. 251-5, 2002.

VAN NIEL, G.; MALLEGOL, J.; BEVILACQUA, C.; CANDALH, C.; BRUGIERE, S.; TOMASKOVIC-CROOK, E.; HEATH, J. K.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN, M. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. **Gut**, v. 52, p. 1690-97, 2003.

VARGHESE, J. N.; MCKIMM-BRESCHKIN, J. L.; CALDWELL, J. B.; KORTT, A. A.; COLMAN, P. M.; The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. **Proteins**, New York, v. 14, n. 3, p. 327-32, Nov. 1992.

VASUDEVAN, A.; LONG, J. E.; CRANDALL, J. E.; RUBENSTEIN, J. L.; BHADE, P. G. Compartment-specific transcription factors orchestrate angiogenesis gradients in the embryonic brain. **Nature Neuroscience**, vol.: 11, no.: 4, p.: 429-439, 2008.

VELHOEN, M.; AWASTHI, A.; VAN SNICK, J.; UYTENHOVE, C.; HELMBY, H.; WESTENDORF, A.; BUER, J.; MARTIN, B.; WILHELM, C.; STOCKINGER, B. TGF- β "reprograms" the differentiation of Th2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. **Nature Immunology**, v. 9, p. 1341 - 1346, 2008.

VELLA, L. J.; GREENWOOD, D. L.; CAPPAL, R.; SCHEERLINCK, J. P.; HILL, A. F. Enrichment of prion protein in exosomes derived From ovine cerebral spinal fluid. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 124, no.: 3-4, p. 385-393, 2008.

VINCENT-SCHNEIDER, H.; STUMPTNER-CUVELETTE, P.; LANKAR, D.; PAIN, S.; DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. **International Immunology**, v. 14, p. 713-22, 2002.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. How Diverse – CD4 Effector T Cells and their Functions. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 20-36, 2009.

WETZIG, H.; SCHULZ, R.; DIEZ, U.; HERBARTH, O.; VIEHWEG, B.; BORTE, M. Associations between duration of breast-feeding, sensitization to hens' eggs and eczema infantum in one and two year old children at high risk of atopy. **Institute Journal of Hygiene of Environment Health**, v. 203, p. 17-21, 2000.

WHITE, I. J.; BAILEY, L. M.; RAZI AGHAKHANI, M.; MOSS, S. E.; FUTTER, C. E. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. **EMBO Journal**, v.: 25, p.: 1-12. 2006.

WIEDERMANN, U. Prophylaxis and therapy of allergy by mucosal tolerance induction with recombinant allergens or allergen constructs. **Allergy**

WIESS, S. T. Eat dirt--the hygiene hypothesis and allergic diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 19, p. 930-1, 2002.

WILLIAMS, H.; ROBERTSON, C.; STEWART, A.; AIT-KHALED, N.; ANABWANI, G.; ANDERSON, R.; ASHER, I.; BEASLEY, R.; BJÖRKSTÉN, B.; BURR, M.; CLAYTON, T.; CRANE, J.; ELLWOOD, P.; KEIL, U.; LAI, C.; MALLOL, J.; MARTINEZ, F.; MITCHELL, E.; MONTEFORT, S.; PEARCE, N.; SHAH, J.; SIBBALD, B.; STRACHAN, D.; VON MUTIUS, E.; WEILAND, S. K. Worldwide variations in prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, p. 125-38, 1999.

WILLIAMS, P. B.; SIEGEL, C.; PORTNOY, J. Efficacy of a single diagnostic test for sensitization to common inhalant allergens. **Annuaire of Allergy and Asthma Immunology**, v. 86, p. 196-202, 2001.

WOLFERS, J.; LOZIER, A.; RAPOSO, G.; REGNAULT, A.; THERY, C.; MASURIER, C.; FLAMENT, C.; POUZIEUX, S.; FAURE, F.; TURSZ, T.; ANGEVIN, E.; AMIGORENA, S.; ZITVOGEL, L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. **Nature Medicine**, v. 7, p. 297 - 303, 2001.

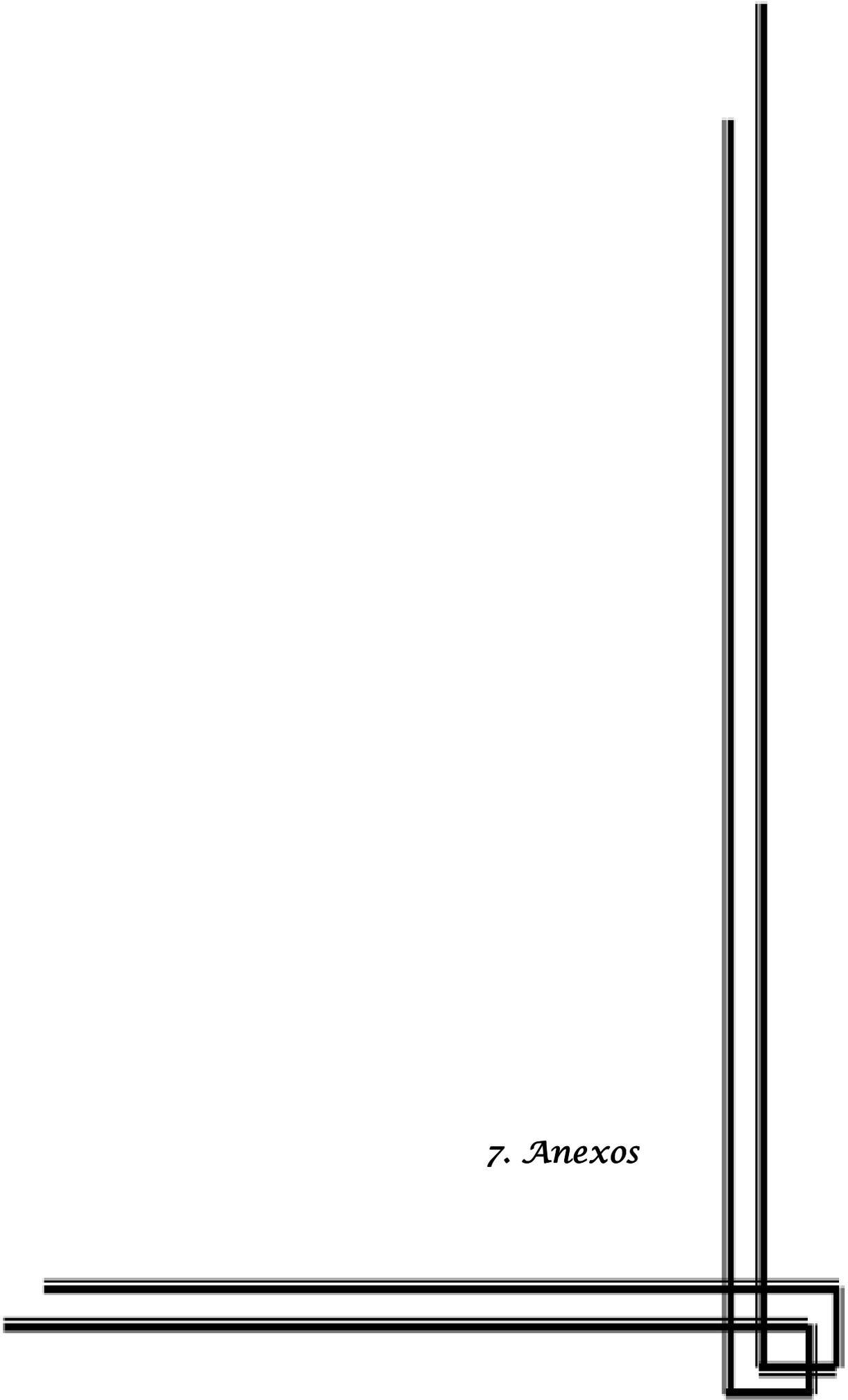
WUBBOLTS, R.; LECKIE, R. S.; VEENHUIZEN, P. T. SCHWARZMANN, G.; MOBIUS, W.; HOEMSCHEMEYER, J.; SLOT, J. W.; GEUZE, H. J.; STOORVOGEL, W. Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 278, p. 10963-72, 2003.

ZHANG, H.G.; LIU, C.; SU, K.; YU, S.; ZHANG, L.; ZHANG, S.; WANG, J.; CAO, X.; GRIZZLE, W.; KIMBERLY, R.P. A membrane form of TNF-alpha

presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. **Journal of Immunology**, v.: 176, p.: 7385-93, 2006.

ZITVOGEL, L.; REGNAULT, A.; LOZIER, A.; WOLFERS, J. FLAMENT, C.; TENZA, D.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; AMIGORENA, S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nature Medicine**, v. p. 4, 594-600, 1998.

7. Anexos



7.2 ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica
Tel: (34) 3218-2394 Telefax: (34) 3218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar do Projeto de Pesquisa: **“Isolamento de exossomos de indivíduos não-atópicos e sua influência no perfil de citocinas secretadas por leucócitos de indivíduos alérgicos *in vitro*”** sob a responsabilidade da mestrandia Helena Maria Caleiro Acerbi Penha e do orientador Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender se os exossomos (estruturas muito pequenas liberadas por várias células, tecidos e órgãos), serão capazes de alterar a resposta imunológica em pacientes com alergia respiratória. A obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é de responsabilidade da mestrandia Helena Maria Caleiro Acerbi Penha.

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

possamos extrair os exossomos, estruturas muito pequenas que são o objeto de estudo deste projeto de pesquisa.

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

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

Você não corre risco ao participar deste projeto. O máximo que pode acontecer é uma resposta local mais exagerada, isto é; presença de coceira mais intensa, com vermelhidão no local do teste cutâneo. Estes sintomas melhoram após algumas horas. São raríssimos os casos de resposta exagerada aos testes. Quanto à coleta de sangue, você não corre nenhum risco, todo o material usado é descartável. Quanto aos benefícios, nós esperamos que estas estruturas presentes no sangue dos indivíduos não-atópicos possam ser usadas para alterar a resposta imunológica dos indivíduos alérgicos, melhorando a qualidade de vida dos pacientes alérgicos.

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

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

Av. Pará 1720 - Bloco 4C - Campus Umuarama,

Caixa Postal: 593 - Bairro: Jardim Umuarama,

38.400.902 - Uberlândia, MG

Fone: 34 3218 2394

Fax: 34 3232 8620

CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J,

Campus Santa Mônica - Uberlândia, MG, CEP:

38.408.100;

Fone: 34 3239 4531

Uberlândia, _____ de _____ de 2009.

Mestranda: Helena Maria Caleiro Acerbi Penha

Orientador: Dr. Ernesto Akio Taketomi

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

Uberlândia, _____ de _____ de 2009.

Assinatura do Participante

8.3 ANEXO 3

“Isolamento e purificação de exossomos de indivíduos não-atópicos e sua influência no perfil de citocinas secretadas <i>in vitro</i> por leucócitos de indivíduos alérgicos	
Nome:	Idade:
Sexo:	Escolaridade:

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

Rinite

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

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

Sim () Não ()

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

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

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

5. Nos últimos 12 meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal? Nada () Pouco () Moderado ()
Muito ()

8.4 ANEXO 4

TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA
(Ácaro *Dermatophagoides Farinae* de poeira domiciliar)

No.	Extrato	Pápula (mm)	Eritema (mm)
1.	Controle Negativo		
2.	<i>Dermatophagoides farinae</i>		
3.	Controle Positivo		

Valores de referência:

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

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

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Responsável Técnico

