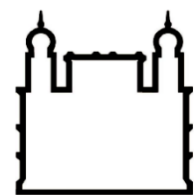




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE  
ALERGIA A CAMARÃO**

**IVANÉIA VALERIANO NUNES**

**Salvador-Bahia**

**2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE  
ALERGIA A CAMARÃO**

**IVANÉIA VALERIANO NUNES**

Orientadora: Dra. Cláudia Ida Brodskyn  
Co-Orientadora: Dra. Juliana de Souza Rebouças

Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Patologia  
Humana para a obtenção do grau  
de Mestre.

**Salvador-Bahia**

**2019**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

N972d Nunes, Ivanéia Valeriano.  
Desenvolvimento de modelo experimental de alergia a camarão / Ivanéia  
Valeriano Nunes. - 2019.  
70 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Cláudia Ida Brodskyn, Laboratório de Interação  
Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Faculdade de Medicina,  
Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo  
Cruz, 2019.

1. Alergia alimentar. 2. Camarão. 3. Ige. 4. Eosinófilos. 5. Mucosa  
Intestinal. I. Título.

CDU 612.392


**“DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE ALERGIA A CAMARÃO”.**

**Ivanéia Valeriano Nunes**

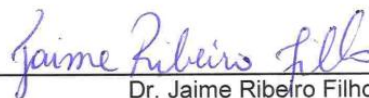
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 06 de dezembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Camila Alexandrina Viana de  
Figueiredo  
Professora  
UFBA



Dr. Jaime Ribeiro Filho  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ



Dra. Cláudia Ida Brodskyn  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

“Todo efeito tem uma causa, todo efeito inteligente tem uma causa inteligente, a potência de uma causa está na razão da grandeza do efeito.”

*(Allan Kardec)*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Dra. Cláudia Ida Brodskyn, a minha eterna gratidão por seu incentivo, suporte e, principalmente, pelas oportunidades a mim concedidas.

À minha co-orientadora, Dra. Juliana de Souza Rebouças, pela motivação em estudar as alergias alimentares e por todo o auxílio durante esta jornada.

Às minhas colegas de estudo da imunidade mucosas, Priscila e Camila, pela disponibilidade e suporte durante extensos experimentos e análises. A todos os meus colegas do Grupo CB, Rafael, Elaine, Léon, Brena e Gabriela pelo companheirismo, apoio e troca de experiências.

À Dra. Natália Tavares pelas discussões e sugestões. A todo o grupo NT pela agradável convivência. Em especial, a Ícaro pelas discussões sobre os imunoensaios e Sara pelo carinho, acolhimento e imagens desenvolvidas.

À Dra Ana Caetano de Faria pela colaboração e sugestões para a execução do trabalho.

À Dr. Washington Luís Conrado dos Santos pelo auxílio nas análises histopatológicas e ensinamentos.

Aos colegas do LaIPHE, pela convivência e sugestões.

À Isabelle e Andrezza Kariny, pelo apoio e suporte administrativo.

Ao serviço de histotecnologia do IGM, pelo apoio na confecção de lâminas e padronização de colorações. Em especial, à Marcela, Lorena, Ana Paula, Andrea, Thaynara e Girlândia.

Aos colegas do LAPEM pelo auxílio e convivência.

Aos colegas do PgPAT, em especial, Breno, Bruna e Jonathan pela parceria durante a macrodisciplina que se tornou uma amizade especial.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia.

Aos profissionais da biblioteca pelo auxílio durante a finalização da dissertação.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

NUNES, Ivanéia Valeriano Nunes. Desenvolvimento de modelo experimental de alergia a camarão. 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** As alergias alimentares são caracterizadas por uma resposta exacerbada do sistema imune mediadas por IgE direcionadas contra alérgenos orais, que podem causar desde sintomas leves, como urticária, até hipotensão grave e anafilaxia. O camarão está entre os alimentos mais sensibilizantes e, portanto, é associado a um grande número de reações anafiláticas. Entretanto, há escassez de estudos que viabilizem a compreensão sistemática dos mecanismos relacionados com esta enfermidade e investigação de novas abordagens terapêuticas. **OBJETIVO:** Nesta perspectiva, este trabalho objetivou estabelecer um novo modelo experimental de alergia a camarão que permita a avaliação de novas alternativas profiláticas, terapêuticas e aspectos comportamentais. **MATERIAL E MÉTODOS:** Fêmeas BALB/c foram sensibilizadas no dia 0 com 100 µg de proteínas do camarão e 1mg de hidróxido de alumínio por via subcutânea. Pela mesma via, esses animais receberam uma dose reforço pela administração de apenas 100 µg de proteínas do camarão no dia 14. Para o desafio, 5 mg/ml de proteínas do camarão foram adicionadas às mamadeiras do dia 21 ao dia 34. Animais controle receberam a administração de salina ou ingestão de água. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -1, 13, 20 e 35, representando as mostras basal, pós sensibilização, pós reforço e pós desafio, respectivamente. A eutanásia ocorreu nos dias 23 e 35 (após 2 e 14 dias de desafio, respectivamente) para coleta de linfonodos mesentéricos e fragmentos do jejuno. As imunoglobulinas IgE e IgG1 específicas foram dosadas no soro por ELISA. sIgA específicas no lavado intestinal e citocinas do jejuno e linfonodos foram também dosadas por ELISA. Fragmentos do jejuno foram utilizados para a confecção de lâminas histológicas, as quais foram confeccionadas e coradas por HE e PAS. **RESULTADOS:** Em comparação aos grupos controles, os animais sensibilizados e desafiados apresentaram elevadas concentrações de anticorpos específicos no soro (IgE e IgG1) e lavado intestinal (sIgA). Foi observado aumento significativo na produção de IL-5 e IL-10 nos linfonodos mesentéricos desses animais, além de alterações histopatológicas significantes na mucosa intestinal, como maior contagem de eosinófilos na lâmina própria e encurtamento de vilos e criptas. **CONCLUSÃO:** As alterações em parâmetros imunopatológicos observadas confirmam o desenvolvimento de alergia alimentar decorrente dos protocolos de sensibilização e desafio oral por ingestão contínua utilizados no presente modelo, sugerindo o seu uso, entre outros, para a avaliação de abordagens terapêuticas.

**Palavras-chave:** Alergia alimentar; Camarão; Ige; Eosinófilos; Mucosa intestinal.



NUNES, Ivanéia Valeriano Nunes. Development of an experimental model of shrimp allergy. 2019. 70 f. Thesis (Master of Human Pathology) – Federal University of Bahia. Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Food allergy is mainly characterized by an exacerbated IgE-mediated immune response towards oral allergens which can lead to mild symptoms such as urticaria as well as hypotension and anaphylaxis. Shrimp is among the most sensitizing food allergens and it has been associated to a large number of anaphylaxis reactions. However, there is still a shortage of studies that enable a systematic understanding related to this disease and the investigation of new therapeutic approaches as well. **AIM:** In this perspective, this study aimed to develop a novel experimental model of shrimp allergy that could enable the evaluation of new treatments and behavioral studies. **MATERIAL AND METHODS:** BALB/c female mice were subcutaneously sensitized with 100 µg of shrimp proteins and 1 mg of aluminum hydroxide on day 0. By the same means, a boost was performed through the subcutaneous injection of 100 µg of shrimp proteins on day 14. Oral challenge protocol was based on the addition of 5 mg/ml of shrimp proteins to the bottle of water from day 21 to day 35. Animals from control group were injected with saline or ingested only water. Blood samples were collected on days -1(basal), 13 (post sensitization), 20 (post boost) and 35 (post challenge). Animals were euthanized after 2 or 14 days of challenge on days 23 and 35 respectively for the collection of mesenteric lymph nodes and a fragment of jejunum. The specific IgE and IgG1 were measured in serum samples by ELISA. In addition, specific sIgA in intestinal lavage and cytokines from jejunum homogenate were analyzed by ELISA as well. Histological slides were manufactured from fragments of jejunum which were colored by HE and PAS. **RESULTS:** Sensitized and challenged animals produced higher titers of specific serum antibodies (IgE and IgG1) and sIgA when compared to the other groups. Also, these animals presented a significant increase in the production of IL-5 and IL-10 at mesenteric lymph nodes and significant histological changes in the intestinal mucosa such as higher eosinophil count at the lamina propria and shrinkage of villi and crypts. **CONCLUSION:** The immunopathological changes observed in our work confirm the development of food allergy due to the applied protocols of sensitization and oral challenge through continuous ingestion. Thus, it suggests that this model can be used for the evaluation of therapeutic approaches.

**Keywords:** Food allergy; Shrimp; Ige; Eosinophils; Intestinal mucosa.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Composição da mucosa intestinal .....	18
<b>Figura 2.</b> Resposta imune na alergia .....	21
<b>Figura 3.</b> Delineamento experimental do modelo de alergia a camarão .....	32
<b>Figura 4.</b> Perda de peso corporal é observada em animais sensibilizados e desafiados ..	39
<b>Figura 5.</b> IgE sérica anti-camarão apresenta aumento em animais sensibilizados após o desafio.....	41
<b>Figura 6.</b> Desafio induz aumento de IgG1 sérica anti-camarão em animais sensibilizados .....	42
<b>Figura 7.</b> Animais sensibilizados e desafiados apresentam aumento de sIgA em lavado intestinal .....	43
<b>Figura 8.</b> Aumento de IL-4 no jejuno de animais sensibilizados e desafiados por 48 horas. ....	44
<b>Figura 9.</b> Produção de IL-5 e IL-10 apresenta aumento em linfonodos mesentéricos de animais sensibilizados e desafiados. ....	45
<b>Figura 10.</b> Animais sensibilizados e desafiados apresentam maior contagem de eosinófilos.....	42
<b>Figura 11.</b> Animais sensibilizados e desafiados apresentam alterações morfométricas na mucosa intestinal.....	49
<b>Figura 12.</b> Produção de muco é aumentada em animais sensibilizados após exposição oral contínua ao alérgeno. ....	51
<b>Figura 13.</b> Consumo de líquido durante desafio oral é reduzida em animais sensibilizados. ....	52

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Alergia Alimentar;
AMPs	Peptídeos Antimicrobianos;
APC	Células Apresentadora de Antígeno;
CD	Cluster de Diferenciação;
DC	Células Dendrítica;
FAE	Folículo Associado ao Epitélio;
FC $\epsilon$ RI	Receptor de Alta-afinidade à IgE;
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i> ;
GALT	Tecido Linfóide Associado ao Trato Gastrointestinal;
HA	Hidróxido de Alumínio;
HD5	$\alpha$ -defensina 5;
HD6	$\alpha$ -defensina 6;
IFN-	$\gamma$ Interferon $\gamma$
IL-4	Interleucina 4;
IL-5	Interleucina 5;
IL-10	Interleucina 10;
IL-13	Interleucina 13;
IL-33	Interleucina 33;
IgA	Imunoglobulina A;
IgE	Imunoglobulina E;

IgG1	Imunoglobulina G1;
kDa	Kilodalton;
LNM	Linfonodo Mesentérico;
MHCII	Complexo Principal de Histocompatibilidade 2
MUC2	Mucina 2;
OVA	Ovalbumina;
PP	Placas de Peyer;
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador $\beta$
TGI	Trato Gastrointestinal;
Th0	T <i>helper</i> 0;
Th1	T <i>helper</i> 1;
Th2	T <i>helper</i> 2;
TC	Toxina Colérica;
TLR4	<i>Toll Like Receptor 4</i>
TM	Tropomiosina;
Treg	T regulatória;
TSLP	Linfopoetina Estromal Tímica;

## **LISTA DE URLS**

Allergen

<http://www.allergen.org/>

Allergome

<http://www.allergome.org/>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA MUCOSA INTESTINAL .....	16
1.2	MECANISMOS DE TOLERÂNCIA ORAL .....	18
1.3	CARACTERÍSTICAS DAS RESPOSTAS IMUNES NAS ALERGIAS .....	19
1.4	ALERGIAS ALIMENTARES.....	21
1.5	MODELOS EXPERIMENTAIS DE ALERGIA ALIMENTAR.....	23
1.5.1	<b>Modelos Experimentais de Alergia a Camarão</b> .....	26
1.6	AVERSÃO ALIMENTAR.....	28
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	30
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
4.4	OBJETIVO GERAL.....	31
4.5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>5</b>	<b>DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	32
<b>6</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
6.1	PREPARO DO EXTRATO DE CAMARÃO .....	33
6.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	33
6.3	COLETA DE SANGUE .....	33
6.4	DOSAGEM DE IgG1 SÉRICA ANTI-CAMARÃO.....	34
6.5	DOSAGEM DE IgE SÉRICA TOTAL E ANTI-CAMARÃO .....	34
6.6	HOMOGENATO TECIDUAL DO JEJUNO .....	35
6.7	REESTÍMULO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DOS LINFONODOS MESENTÉRICOS	35
6.8	DOSAGEM DE CITOCINAS .....	36
6.9	LAVADO INTESTINAL .....	36
6.10	DOSAGEM DE IgA SECRETÓRIA ANTI-CAMARÃO NO LAVADO INTESTINAL.....	36
6.11	CONFECÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS .....	37
6.13	MENSURAÇÃO DA ÁREA DE MUCO .....	37
6.14	AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE LÍQUIDO .....	38
6.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	39

7.1	PESO CORPORAL É REDUZIDO EM ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS .....	39
7.2	ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS APRESENTAM AUMENTO PROGRESSIVO DA PRODUÇÃO DE IgE SÉRICA TOTAL E ANTI-CAMARÃO	40
7.3	SENSIBILIZAÇÃO INDUZ AUMENTO EXPRESSIVO NA PRODUÇÃO DE IgG1 SÉRICA ANTI-CAMARÃO .....	42
7.4	INGESTÃO CONTÍNUA DO ALÉRGENO PROMOVE RESPOSTA HUMORAL INTESTINAL EM ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS .....	43
7.5	NÍVEIS DE IL-4 APRESENTAM-SE ELEVADOS NO JEJUNO DE ANIMAIS SENSIBILIZADOS APÓS 2 DIAS DE DESAFIO ORAL .....	43
7.6	LINFONODOS MESENTÉRICOS DE ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS PRODUZEM IL-5 E IL-10 .....	44
7.7	SENSIBILIZAÇÃO SEGUIDA DE DESAFIO ORAL INDUZ AUMENTO DA PRESENÇA DE EOSINÓFILOS NA LÂMINA PRÓPRIA INTESTINAL .....	46
7.8	ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS NA MUCOSA INTESTINAL SÃO OBSERVADAS APÓS INGESTÃO CONTÍNUA DO ALÉRGENO .....	48
7.9	DESAFIO ORAL SUGERE AUMENTO DA PRODUÇÃO DE MUCO INTESTINAL EM ANIMAIS SENSIBILIZADOS .....	50
7.10	CONSUMO DE LÍQUIDO É REDUZIDO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À INGESTÃO CONTÍNUA DO ALÉRGENO .....	52
<b>10</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>PRINCIPAIS ACHADOS</b> .....	<b>59</b>
<b>12</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>13</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>72</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA MUCOSA INTESTINAL

O Trato Gastrointestinal (TGI) está diariamente exposto a diferentes componentes da dieta humana e microrganismos. Especificamente, o intestino apresenta a mais extensa área do corpo humano em contato com o ambiente externo. Por este motivo, os intestinos delgado e grosso dispõem de distintos mecanismos de defesa e uma vasta população de células do sistema imune. Além disso, a mucosa intestinal conta com barreiras semipermeáveis que possibilitam a absorção de nutrientes, mas também limitam o acesso de moléculas e microrganismos patogênicos (VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017).

Por toda a sua extensão, o epitélio intestinal é composto por uma variedade de perfis celulares em camada simples (Figura 1). Dentre elas, os enterócitos que participam no processo de digestão e absorção de nutrientes junto às células enteroendócrinas, as quais apresentam-se as primeiras de forma justaposta por meio de junções de oclusão que formam barreiras semipermeáveis ao transporte paracelular de íons, moléculas de água e solutos. Tais junções são compostas por moléculas como, zonulinas, ocludinas, claudinas e moléculas de adesão juncional (LERNER; MATTHIAS, 2015). Pelo mesmo princípio da semipermeabilidade, essas junções representam barreiras físicas para o acesso de microrganismos, alérgenos e partículas às camadas de tecido subjacente ao epitélio (HARRER et al., 2019; XU et al., 2019).

As primeiras linhas de defesa nesse sítio são estabelecidas pela ação do próprio epitélio que é composto ainda por outros perfis celulares, como as células caliciformes, células de Paneth, células enteroendócrinas, células tufo e células *Microfold*. De modo geral, estas células contribuem direta e indiretamente para a manutenção dos mecanismos de defesa.

As células caliciformes, por exemplo, são eficientes produtoras de glicoproteínas, como a mucina 2 (MUC2), que compõem o muco, um polímero em rede no lúmen intestinal (BIRCHENOUGH et al., 2015). Atualmente, sabe-se que o muco é composto por duas camadas no cólon. Assim, na camada mais externa, caracteristicamente mais fluída, pode ser encontradas bactérias da microbiota intestinal, enquanto a camada mais interna previne o acesso de microrganismos ao epitélio, ao qual o muco encontra-se firmemente ancorado. Já no intestino delgado, observa-se apenas uma camada de muco, facultando neste sítio as



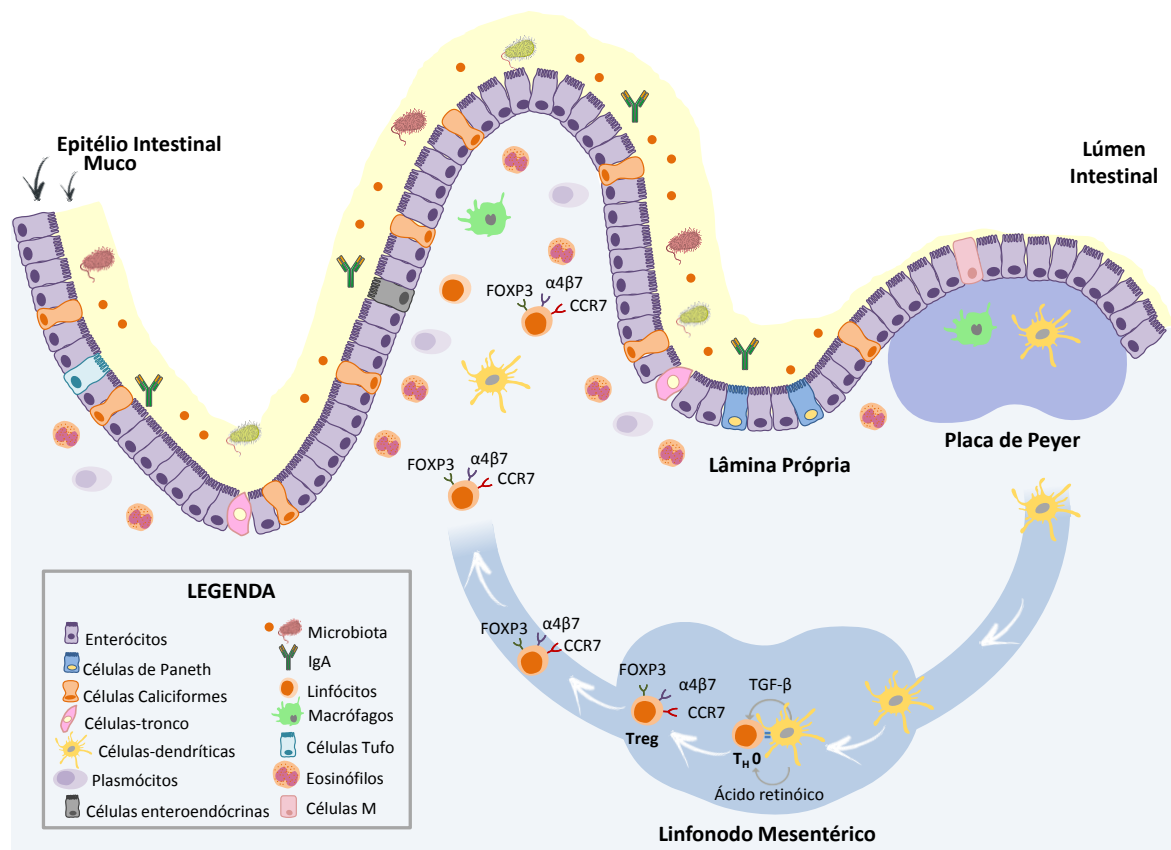
interações de imunovigilância da mucosa, como a captura de antígenos por células *Microfold* ou M discutidas a seguir (ERMUND et al., 2013).

Desta forma, o muco colabora para a impermeabilidade do epitélio a patógenos e representa a primeira barreira intestinal. À impermeabilidade também é atribuída um gradiente de peptídeos antimicrobianos (AMPs) depositados ao muco. Dentre eles, as  $\alpha$ -defensinas 5 (HD5), -6 (HD6) (em humanos) e criptidinas (em camundongos), são capazes de induzir a formação de poros na membrana de patógenos (MEYER-HOFFERT et al., 2008). Entretanto, elas podem também contribuir para a homeostase de microrganismos comensais (MASUDA et al., 2011; NAKAMURA et al., 2016). Nesta perspectiva, a redução na expressão e produção dessas moléculas tem sido associada à disbiose, bem como à doença de Chron e à enterocolite necrosante (MARKASZ et al., 2018; WEHKAMP; STANGE, 2010).

Em outra perspectiva, algumas células são consideradas sentinelas por sua função sensorial na mucosa intestinal. As células enteroendócrinas e as células tufo, por exemplo, apresentam função sensorial na detecção de patógenos.

Nesse sentido, as células *Microfold* ou M, participam também na imunovigilância da mucosa intestinal pela constante amostragem do conteúdo luminal por fagocitose e transcitose de antígenos (MABBOTT et al., 2013). Desta forma, a importância dessas células na indução das respostas imunes na mucosa tem sido investigada. A depleção de células M, bem como o *knock out* de seu receptor uromodulina, tem sugerido a sua contribuição para a captura de antígenos, dada a consequente redução na internalização de antígenos e dos efeitos imunomodulatórios em modelos de imunização oral (CUNNINGHAM et al., 2016; YANAGIHARA et al., 2018).

Sabe-se que o epitélio intestinal desempenha também papel importante na indução de respostas imunes, dadas suas interações com aglomerados de Tecido Linfoide Associado ao Trato Gastrointestinal (GALT), localizados na lâmina própria e submucosa intestinal. Os Folículos Associados ao Epitélio (FAE), Placas de Peyer (PPs) ou ainda os Linfonodos Mesentéricos (LNMs) são exemplos de tecidos linfóides na mucosa intestinal. Eles exercem funções cruciais, por exemplo, na manutenção da homeostase intestinal decorrente da tolerância oral (NAGATANI et al., 2011; SPAHN et al., 2002). Este tópico será melhor abordado na seção seguinte.



**Figura 1. Aspectos imunológicos da mucosa intestinal.**

A mucosa intestinal é composta por diferentes perfis celulares que participam na absorção de nutrientes e na defesa contra a invasão de microorganismos patogênicos. Neste sítio, observa-se ainda a presença de Tecido Linfóide Associado ao Trato Gastrointestinal (GALT), como as Placas de Peyer (PP) e Linfonodos Mesentéricos (LNMs) que auxiliam na manutenção da homeostase intestinal e também na indução de tolerância oral, configurando ao intestino um ambiente primordialmente tolerogênico.

## 1.2 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA ORAL

Estima-se que, anualmente, a mucosa intestinal processe entre 130 a 190 gramas de proteínas oriundas da dieta (BRANDTZAEG, 2010). A maioria dos indivíduos, apesar da exposição frequente a antígenos, não é capaz de induzir resposta imune que resulte em dano tecidual.

A mucosa intestinal possui diferentes mecanismos imunológicos que impedem a indução de reações exacerbadas frente a antígenos inócuos. Tais mecanismos são resultado da tolerância imunológica natural, sendo essa hiporresponsividade após um contato prévio a dado antígeno denominada tolerância oral (WEINER et al., 2005)

Os mecanismos envolvidos na indução e manutenção da tolerância oral envolvem a interação bem orquestrada da mucosa intestinal com os agregados linfóides associados ao

trato gastrointestinal. Apesar de tais mecanismos não serem completamente elucidados, sabe-se que a indução de tolerância oral pode ocorrer pela indução de células T regulatórias (Treg) e envolvem a participação crucial do GALT, como sítio indutor da tolerância oral (REZENDE; WEINER, 2017).

Como o GALT não possui veias linfáticas, a captura de antígenos é realizada diretamente pela mucosa intestinal, como mencionado anteriormente. Inicialmente, células apresentadoras de antígeno (APCs) na lâmina própria captam antígenos por meio das células M via transcitose, por meio de células caliciformes via translocação ou lançam seus próprios dendritos para o lúmen.

Nos tecidos linfoides, essas células são capazes de promover a diferenciação dos linfócitos T *helper* 0 (Th0) em linfócitos Treg. As APCs podem produzir o fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e ácido retinóico que, conseqüentemente, induzem a expressão do marcador *forkhead box P3* (Foxp3) em células T e de marcadores de residência intestinal como o  $\alpha 4\beta 7$ , respectivamente (CASSANI et al., 2011). Assim, a expressão desses marcadores é correlacionada com a diferenciação ao perfil Treg (BAKDASH et al., 2015; CASSANI et al., 2011; VILLABLANCA, 2013).

As células Treg desempenham papel importante na manutenção da tolerância oral. Essas células produzem TGF- $\beta$  e Interleucina 10 (IL-10), citocinas anti-inflamatórias. Assim, a liberação de IL-10 inibe a produção de IL-4 e IL-5 por células T *helper* 2 (Th2) (WAWRZYNIAK; O'MAHONY; AKDIS, 2017), enquanto a liberação de TGF- $\beta$  pode induzir a produção da Imunoglobulina A (IgA) secretória (SAKAI et al., 2014). Por sua vez, a IgA quando depositada ao muco é capaz de induzir a opsonização de bactérias, neutralização de toxinas e outras moléculas, como os alérgenos a fim de prevenir o desencadeamento de respostas imunes (INAMINE; SCHNABL, 2017; SALERNO-GONCALVES et al., 2016).

Desta forma, observa-se que a mucosa intestinal apresenta diferentes interações celulares e moleculares que tendem a culminar num ambiente tolerogênico, porém também apto ao combate em processos patológicos. Entretanto, a falta de indução ou quebra deste perfil tolerogênico parece levar ao surgimento de patologias, como as alergias.

### 1.3 CARACTERÍSTICAS DAS RESPOSTAS IMUNES NAS ALERGIAS

Nas últimas décadas, a prevalências de doenças alérgicas tem aumentado substancialmente entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento. Em geral, as doenças

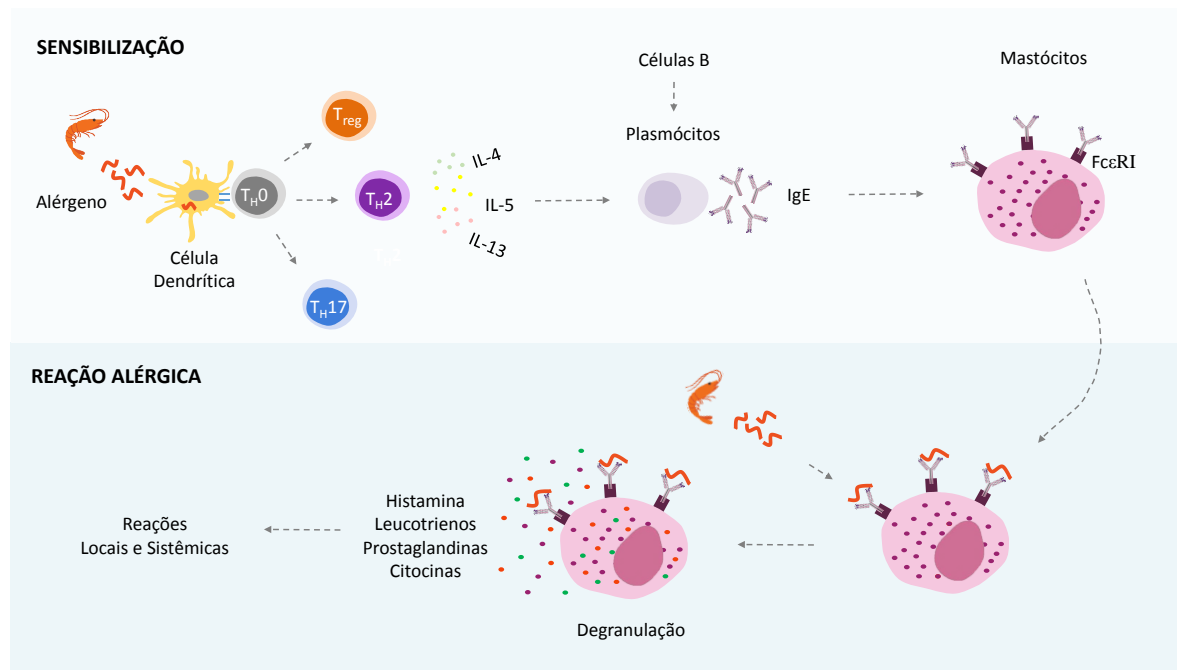
alérgicas são caracterizadas por uma reação exacerbada a componentes do ambiente, ou alérgenos, que são ditos inócuos à maioria dos indivíduos. Geralmente, a manifestação inicial ocorre durante a infância e pode progredir por toda a vida (BURKS et al., 2012).

A típica reação exacerbada observada nas reações alérgicas é um resultado de uma resposta Th2 polarizada em detrimento da resposta Th1. Esta polarização é seguida de altas concentrações de IL-4, IL-5 e IL-13, considerados biomarcadores na imunopatogênese da alergia. Juntos, IL-4 e IL-13 promovem a troca de classes de cadeia pesada em linfócito B pela indução dos fatores de transcrição STAT6 e NF- $\kappa$ B que interagem com a região promotora da sequência  $\epsilon$  e culminam com a produção de IgE específica para o alérgenos em questão (WALSH, 2017), bem como induzem o aumento da produção de IgG1 (RAPHAEL et al., 2015). Por outro lado, a IL-5 exerce papel importante na maturação, proliferação e sobrevivência de eosinófilos (PELAIA et al., 2017).

Resumidamente, as reações alérgicas ocorrem em uma fase de sensibilização e uma fase tardia subsequente onde as manifestações clínicas são observadas. Inicialmente, APCs capturam, processam os antígenos e ativam células T CD 4<sup>+</sup> *naive* por meio da apresentação destes através do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe 2 (MHCII). Conseqüentemente, essas células T CD4<sup>+</sup> *naive* diferenciam-se em células do perfil Th2, liberando as citocinas acima mencionadas como biomarcadores da alergia. Os títulos de IgE são aumentados em resposta à liberação dessas citocinas. Além disso, a IgE liga-se a mastócitos e basófilos através receptor de IgE de alta afinidade (FC $\epsilon$ RI) na superfície da membrana dessas células (BURKS et al., 2012) (Figura 2) .

Em um contato subsequente, a exposição ao agora alérgeno desencadeia a reação alérgica observada na fase tardia. A IgE específica é capaz de reconhecer os alérgenos e, pela ligação cruzada ao alérgeno, desencadear a degranulação de mastócitos e basófilos que liberam altos níveis de histamina e culminam com a liberação de leucotrienos e proteases. Como mediadores pró-inflamatórios, a liberação dessas moléculas induz a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de contribuir para o recrutamento de eosinófilos e manifestações clínicas típicas do quadro alérgico (ESPINOSA; VALITUTTI, 2018; MIYAKE; KARASUYAMA, 2017; WERNERSSON; PEJLER, 2014) (Figura 2).

Deste modo, predominantemente, manifestações clínicas localizadas são observadas, como: rinite, asma, dermatite de contato, urticária e alergia alimentar. Em alguns indivíduos, entretanto, o alérgeno pode desencadear uma reação extremamente exacerbada, a anafilaxia, que é potencialmente fatal por se tratar de uma reação sistêmica.



**Figura 2. Resposta imunológica na alergia.**

A imunopatogênese na alergia pode ser dividida em duas fases. Na fase da sensibilização, o alérgeno é processado por células apresentadoras de antígenos que, por meio da apresentação destes, induz a diferenciação de células T<sub>H0</sub> em T<sub>H2</sub>. Então, por consequência das citocinas IL-4, IL-5 e IL13 liberadas por estas as células, os plasmócitos são induzidos a produzir a imunoglobulinas específicas do tipo E (IgE) que se liga a receptores específicos (FcεRI) da membrana de mastócitos. Numa próxima exposição ao alérgeno, a IgE capaz de reconhecê-lo e promover a degranulação e liberação de mediadores inflamatórios capazes de desencadear os sinais clínicos da alergia.

#### 1.4 ALERGIAS ALIMENTARES

As alergias alimentares (AAs) são definidas como uma resposta imune exacerbada a antígenos proteicos e outro alérgenos, mediadas por IgE. Manifestações clínicas localizadas são associadas às AAs, bem como reações sistêmicas. Eritema, urticária, prurido, edema de laringe, rinorreia, congestão nasal e náusea são exemplos de reações localizadas (PAJNO et al., 2017). Manifestações gastrointestinais, como esofagite eosinofílica, diarreia e constipação intestinal, também são relatadas (MOAWAD, 2017; NOWAK-WEGRZYN; SZAJEWSKA; LACK, 2017). Entretanto, casos mais severos de sensibilização podem vir a resultar em reação anafilática, como já mencionado.

Os alérgenos alimentares são proteínas que variam entre 10-70 kilodaltons (kDa) de peso molecular e, em geral, são estáveis ao calor, ácido e proteases (BØGH; MADSEN, 2015). Apesar de imunogênicos, em geral, não induzem resposta deletéria na maioria dos indivíduos. Entretanto, tem sido sugerido que as AAs surjam em decorrência da falta de

indução ou quebra de tolerância oral (CHEHADE; MAYER; YORK, 2005; HAMAD; BURKS, 2017; TAN et al., 2016).

Os mecanismos imunológicos nas alergias alimentares podem envolver reações de hipersensibilidade mediadas ou não por IgE e ainda reações mistas (SOLÉ et al., 2018). Apesar de não elucidada a razão principal para o desenvolvimento das AAs, alguns fatores genéticos de risco vem sendo associados, como o histórico familiar de indivíduos atópicos. Um estudo de base populacional observou que crianças com dois ou mais membros alérgicos na família apresentavam maior probabilidade de tornarem-se também alérgicos (KOPLIN et al., 2013).

Além disso, algumas influências ambientais têm sido sugeridas como potenciais fatores de risco, por exemplo, a ingestão nutricional do indivíduo. Evidências sugerem que os baixos níveis de vitamina D no soro são inversamente proporcionais à severidade das reações observadas nas AAs (MAZZOCCHI et al., 2017; YU; FREELAND; NADEAU, 2016). Etnia, gênero e demografia também são identificados como fatores de risco destacados (AFIFY; PALI-SCHÖLL, 2017; LEUNG; WONG; TANG, 2014; PANG et al., 2017; POULOS et al., 2007).

A prevalência global das AAs tem sido reportada em 6% da população infantil e 3-4% dos adultos e vem crescendo no mundo todo (BURKS et al., 2012). Devido à variação da metodologia empregada, genética, exposição dietética, influências ambientais e outros aspectos, a obtenção de dados epidemiológicos referentes à prevalência das AAs pode ser ambígua.

Na Ásia, a prevalência de AAs é relativamente baixa. Ovos, leite de vaca e trigo representam as AAs mais comuns no Japão, onde 5-10% dos infantes e 5% das crianças são alérgicas. Porém, essas taxas tendem a diminuir com a idade (URISU et al., 2014). Em Cingapura, uma pesquisa indicou que 5,2% das crianças entre 14 a 16 anos de idade são alérgicas a crustáceos, a qual representa a AA mais comum nesta população (LEE; SHEK, 2014). Na Índia, um estudo baseado em questionário observou que 1,2% da população é alérgica a algum componente da dieta, dos quais 0,5% são alérgicos a leite de vaca e 0,5% à maçã (MAHESH et al., 2016).

Um estudo baseado em meta-análise avaliou a prevalência de AAs entre a população europeia mostrando diferenças entre a população infantil e adulta. De modo geral, os alimentos com maior prevalência seriam: leite de vaca, ovos, trigo, soja, amendoim, castanhas, peixes e crustáceos. Porém, enquanto o leite de vaca e ovos são os mais frequentes entre as crianças, os demais estão mais associados aos adultos (NWARU et al., 2014).

Nos Estados Unidos e Canadá observa-se uma prevalência maior de AAs entre as crianças (6-8%) e os alérgenos mais comuns foram os derivados dos seguintes alimentos: amendoim, leite, nozes e crustáceos (DEVDAŞ et al., 2017; GUPTA et al., 2015). Os dados apresentam-se escassos para a América Latina. Entretanto, sabe-se que o crescente consumo do alimento tem acompanhado também a ocorrência de casos de reações alérgicas (LOPATA; HEHIR; LEHRER, 2010). No Brasil, estudo conduzido por Vieira e colaboradores (2010) observou uma prevalência e incidência de 5,4% e 2,2%, respectivamente, de crianças alérgicas a leite entre 9.478 pacientes. Entre a população adulta, os principais alérgenos observados são principalmente os derivados de leite de vaca, frutas, camarão e outros crustáceos (SILVA et al., 2017).

### 1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ALERGIA ALIMENTAR

A investigação dos mecanismos imunológicos envolvidos no surgimento das alergias é essencial para o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas. Entretanto, a execução de tais estudos não é viável em humanos, dado a sensibilização dos mesmos. Desta forma, no contexto das AAs, os modelos experimentais tem apresentado grande relevância.

O fácil manuseio, manutenção, reprodução e, principalmente, similaridade genética e na patogênese de diversas doenças, tornaram os camundongos os animais mais utilizados para o estabelecimento de modelos (YUE et al., 2014). A possibilidade de manipulação genética desses animais resultou em uma variedade de linhagens que, atualmente, podem atender diferentes perspectivas de modelos experimentais. Assim, sabe-se que tais linhagens podem diferir em seu genótipo, o que pode, conseqüentemente, diferenciar sua hiperresponsividade a alérgenos. De modo geral, as linhagens BALB/c e C3H/HeJ são as mais utilizadas em modelos experimentais de alergia alimentar, dada a tendência ao desenvolvimento de inflamações alérgicas.

Vários modelos de alergia à ovalbumina (OVA) já foram estabelecidos em camundongos BALB/c. Van Halteren e colaboradores demonstraram a correlação entre citocinas do perfil Th2, a produção de IgE e liberação de histamina em um modelo de alergia à OVA (1997). Brunner e colaboradores também utilizaram animais da mesma linhagem e evidenciaram as propriedades do alumínio (alum) como adjuvante na sensibilização do

mesmo alérgeno (2009). Perda de peso, inflamação alérgica no intestino delgado e hiperplasia de células califormes também puderam ser demonstradas em modelo de alergia alimentar crônica à OVA mediada por IgE (SALDANHA et al., 2004). Outros alérgenos também tem sido estudados em animais BALB/c, como frutos secos, proteínas do leite e trigo (GAO et al., 2019; HAZEBROUCK et al., 2009; KUMAR et al., 2018)

Uma mutação pontual no gene do receptor do tipo *toll* 4 (TLR4) na linhagem C3H/HeJ parece estar associada à sua susceptibilidade ao desenvolvimento de anafilaxia (BERIN et al., 2006). Assim, diversos modelos de anafilaxia em animais sensibilizados a amendoim vêm sendo desenvolvidos nesta linhagem (ORGEL; KULIS, 2018; SRIVASTAVA et al., 2016). Entretanto, animais C3H/HeJ também demonstram-se passíveis de sensibilização a outros alérgenos, como a já citada OVA (BENEDÉ; BERIN, 2018). Além disso, parâmetros como a via de sensibilização são critérios importantes no estabelecimento de modelos experimentais, já que, devem buscar mimetizar a imunopatogênese observada em humanos. Apesar das propriedades alergênicas de muitos alimentos, protocolos de sensibilização, em sua maioria, requerem o uso de adjuvantes. Os principais são o hidróxido de alumínio e a toxina colérica.

O hidróxido de alumínio (HA) é o adjuvante mais comumente utilizado em modelos experimentais de alergia. De uso clínico aprovado, este adjuvante pode contribuir para o desenvolvimento de resposta imune frente a antígenos a ele adsorvidos. Apesar dos mecanismos não serem completamente definidos, sabe-se que a adsorção ao hidróxido de alumínio pode promover um estímulo prolongado pelo efeito de reposição também conhecido como efeito de alta deposição de antígenos que libera gradualmente o antígeno, conseqüentemente, aumentando a captura dos antígenos adsorvidos por APCs. Além disso, tem sido discutido a ativação do domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NOD) como proteína 3 do receptor (NLRP3) e, por conseguinte, a ativação deste inflamassomo pode induzir a produção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 por macrófagos (HE; ZOU; HU, 2015). O HA é ainda capaz de induzir produção de IgE e IgG1, seguidas de citocinas do perfil Th2 (BRUNNER; JENSEN-JAROLIM; PALI-SCHÖLL, 2010).

A toxina colérica (TC), uma endotoxina secretada pelo *Vibrio Cholerae*, também tem sido aplicada a diversos trabalhos de sensibilização oral nos quais apresentou propriedades imunogênicas (BALDAUF et al., 2015; GUO et al., 2012). Apesar da eficiência da indução de resposta alérgica pelo uso deste adjuvante, tem sido sugerido que a TC liga-se a receptores de enterócitos e induz aumento de permeabilidade, desta forma, não refletindo diretamente a imunopatogênese observada em humanos e tornando questionável sua aplicação a modelos experimentais (BRUNNER; JENSEN-JAROLIM; PALI-SCHÖLL, 2010).



Tais adjuvantes podem ser utilizados em diferentes protocolos de sensibilização. A via intraperitoneal é considerada uma rota de sensibilização bastante eficaz na indução de anticorpos específicos a alérgenos alimentares. Esta rota foi eficaz na sensibilização à  $\beta$ -lactoglobulina (GOMES-SANTOS et al., 2015), bem como à TM de camarão (FU et al., 2017), induzindo elevadas taxas de anticorpos reativos.

As mucosas também tem sido utilizadas como via de sensibilização. Alérgenos alimentares, especialmente panalérgenos como a TM, podem apresentar reação cruzada com alérgenos inalantes. Um estudo desenvolvido por Fisher e colaboradores (2005) comparou as vias oral e nasal. Quando desafiados por via nasal, animais sensibilizados desenvolveram perfis de resposta diferentes. Enquanto a sensibilização oral induziu maior produção de IgE, eosinofilia pulmonar e produção de citocinas do perfil Th2, a via nasal induziu a produção de IgG e neutrofilia pulmonar. Modelos de exposição aérea poderiam auxiliar na investigação destes mecanismos, entretanto, poucos estudos já foram desenvolvidos seguindo tal parâmetro.

Diversos modelos tem utilizado o protocolo de sensibilização oral. Entretanto, o uso de adjuvantes pode ser considerado imprescindível, já que, assim como em humanos, a exposição oral a alérgenos alimentares tende a gerar resposta tolerogênica em animais experimentais. Tem sido observado que a via oral é efetiva na indução da produção de IgE e IgG1 séricas, além do aumento histamina e IgA no intestino (CAPOBIANCO et al., 2018). A produção de anticorpos específicos também pode ser induzida por meio da derme. Por exemplo, a via epicutânea foi efetiva na indução de anafilaxia após desafio oral com OVA, não observada quando os animais foram sensibilizados por via oral (BARTNIKAS et al., 2013). Neste mesmo contexto, dados epidemiológicos e modelos experimentais tem sugerido que a exposição durante a infância à alérgenos alimentares na pele de indivíduos que apresentam dermatite atópica pode levar à sensibilização alimentar (BENOR; ETKIN; KIVITY, 2019; SICHERER; SAMPSON, 2010; SPERGEL; PALLER, 2003). Tal associação tem sido evidenciada para alérgenos do amendoim (BROUGH et al., 2014). Os efeitos gastrointestinais, como a expansão de mastócitos em lâmina própria, observados em decorrência da sensibilização epicutânea tem sido associados à produção de linfopoetina estromal tímica (TSLP) e IL-33, citocinas que participam do perfil Th2 na pele (HAN et al., 2014, 2018).

Em outra perspectiva, a IL-33 não se mostrou essencial para a produção de IgE e IgG1 anti-papaína em animais sensibilizados, desta vez, pela via subcutânea (KAMIJO et al., 2016). A via subcutânea, inclusive, parece induzir maior produção de anticorpos específicos que a

via intraperitoneal, por exemplo (AUN et al., 2015). Saldanha e colaboradores (2004) desenvolveram modelo de alergia crônica em animais BALB/c por meio de duas administrações subcutâneas de OVA. Efeitos gastrointestinais foram observados pela observação de infiltrado eosinofílico no jejuno logo após a primeira sensibilização. Aumento de IgE e IgG1 séricas específicas e muco intestinal foi observado, além do aumento de permeabilidade intestinal 6 horas após o final do desafio desses animais.

Desta forma, o ajuste desde a linhagem à via de sensibilização utilizada mostra-se essencial para o estabelecimento de um modelo de alergia alimentar. Tais parâmetros podem influenciar ativamente o desenvolvimento de resposta Th2, bem como podem ajudar a elucidar diversos questionamentos que permeiam as alergias alimentares.

### 1.5.1 Modelos Experimentais de Alergia a Camarão

O camarão está entre os alimentos mais sensibilizantes. Os tratamentos disponíveis para as reações alérgicas em decorrência da exposição a esse alérgeno são baseados apenas na sintomatologia do indivíduo com a administração de, principalmente, anti-histamínicos, e a exclusão do alérgeno da dieta. Exposições acidentais, porém, podem induzir reações cruzadas, inclusive, por conta dos pan-alérgenos presentes no camarão.

De modo geral, os principais alérgenos presentes na maioria dos crustáceos são: a tropomiosina (TM) (34-39 kDa); arginina quinase (40 kDa); cadeia leve da miosina (20 kDa) e a proteína de ligação ao retículo sarcoplasmático (20 kDa). Vários outros alérgenos já tem sido identificados (LOPATA; HEHIR; LEHRER, 2010). Entretanto, deve-se salientar que todos estes citados podem ser encontrados em diferentes espécies de crustáceos e, conseqüentemente, fonte de reações cruzadas. Por exemplo, os alérgenos *Pen a 1*, *Lit v 1* e *Met e 1* são alguns dos alérgenos mais estudados no contexto da alergia alimentar a camarão. Trata-se de proteínas do grupo das TM, envolvidas na contração muscular. Estas proteínas, em geral, são hidrossolúveis e resistentes ao calor. Além disso, apresentam sequência bastante conservada entre os crustáceos e outros invertebrados sendo algumas já apontadas como panalérgenos (REESE; AYUSO; LEHRER, 1999; WOO; BAHNA, 2011).

Plataformas como a Allergen e a Allergome são bancos de dados nos quais podem ser encontradas informações quanto à bioquímica, características moleculares e fontes diversas de alérgenos já identificados. Quanto ao camarão, já são apontados cerca de 130 alérgenos. A

maioria destes enquadra-se nas classes acima mencionadas, sendo expressos no músculo ou por todo o corpo do camarão, entretanto, nem todos eles são encontrados em todas as espécies.

As reações desencadeadas pelos alérgenos do camarão são bastante semelhantes às observadas aos demais alimentos. Em geral, a exposição oral desencadeia reações imediatas como o prurido oral, indigestão, diarreia, além de angioedema dos lábios e faringe em casos mais severos.

Apesar deste cenário, observa-se uma escassez de modelos experimentais de alergia a camarão na literatura. Além disso, os modelos já desenvolvidos são alérgeno-específico, ainda que o camarão apresente dezenas de alérgenos, como mencionado.

Leung e colaboradores (2008) utilizaram uma TM de *Metapenaeus ensis*, o alérgeno *Met e 1*, para induzir hipersensibilidade TM-específica em camundongos BALB/c. Foram feitas 4 administrações intragástricas do alérgeno, seguidas de um desafio pela mesma via. Além das reações de hipersensibilidade, os animais sensibilizados e desafiados apresentaram produção de IgE específica, proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IL-4 em cultura de esplenócitos.

Mais recentemente, utilizando o mesmo modelo de hipersensibilidade à TM, Lam e colaboradores (2015) mostraram as alterações gastrointestinais e imunológicas decorrente da sensibilização e desafio oral proteína-específicos. Tal estudo observou a presença de eosinófilos e mastócitos no duodeno e jejuno especialmente nas primeiras 24 horas após o desafio, apesar de observá-los também após 72 horas, além da maior expressão de citocinas do perfil Th2.

Reações de hipersensibilidade à TM oriunda de *M. ensis* também foram observadas em animais oralmente desafiados com 600 µg de TM após serem sensibilizados por 4 administrações intragástricas de 30 a 100 µg do alérgeno. Os animais sensibilizados com a maior dose de alérgeno apresentaram maior produção de IgE e IgG1 séricas anti-tropomiosina, IgA específica nas fezes, além da produção das citocinas IL-4, IL-13 e IFN-γ em esplenócitos reestimulados *in vitro* (CAPOBIANCO et al., 2008). Entretanto, alterações estruturais, como a adição de anidrido maleico, podem reduzir a habilidade de ligação à IgE anti-TM. Após apenas uma sensibilização intraperitoneal utilizando a proteína modificada pela adição do anidrido maleico observou-se uma redução na alergenicidade e modulação para um perfil Th1 de citocinas em sobrenadante de esplenócitos, quando comparada à TM nativa (RAJAGOPAL; GANESH; SUBBA, 2000).

A TM de outras espécies, como o *Litopenaeus vannamei* também já foram utilizada em modelos experimentais. Animais foram sensibilizados duas vezes por semana, durante 4 semanas com proteínas que passaram ou não por tratamento de alta pressão. Durante o desafio, os animais receberam as respectivas proteínas 3 vezes/semana durante 3 semanas. Foi observado que os animais que receberam as proteínas que passaram pelo processamento induziram valores menores de anticorpos séricos específicos, histamina em soro e expressão reduzida das citocinas IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10 no jejuno (LONG et al., 2015). Por direcionar-se ao processamento de alimentos, o estudo não traz mais contribuições para a elucidação dos mecanismos imunopatológicos do estabelecimento de alergia a camarão.

Modelos experimentais também têm sido desenvolvidos utilizando proteínas recombinantes, principalmente tropomiosinas, de diferentes espécies de camarão. Entretanto, a produção destas proteínas requer metodologia dispendiosa. Além disso, modelos baseados na sensibilização proteína-específica reduzem consideravelmente a aplicação destes para a investigação de abordagens terapêuticas, uma vez que, diferentes indivíduos são sensibilizados a diferentes alérgenos. Assim, o desenvolvimento de modelos que utilizem extratos totais podem fornecer mais informações quanto a imunopatogênese da alergia alimentas a camarão.

## 1.6 AVERSÃO ALIMENTAR

Previamente, uma associação entre quadros de ansiedade e AAs foi sugerida por alguns trabalhos Gettis e colaboradores (1989). Tal associação impulsionou outros estudos que, de modo geral, salientaram uma relação articulada entre os sistemas imune e nervoso no fenômeno de aversão alimentar.

Corroborando com tais evidências, Cara e colaboradores (1994) demonstraram que animais, submetidos a testes de preferência alimentar, sensibilizados à OVA apresentaram aversão ao alérgeno mesmo quando adocicado. Além disso, o referido grupo demonstrou que o fenômeno de aversão alimentar poderia ser reproduzido em animais *naive* quando recebiam o soro ou esplenócitos de animais sensibilizados (CARA, et al. 1997).

Posteriormente, foi observado comportamento ansioso em animais alérgicos submetidos a testes comportamentais em labirintos, além da maior expressão de *c-fos* no núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo central da amígdala e o núcleo do trato solitário, sendo estas duas últimas, áreas

correlacionadas com comportamentos afetivos e emocionais (CASTEX et al., 1995). Entretanto, os achados não foram observados quando os animais foram tratados com anticorpos anti-IgE antes do desafio oral, demonstrando o papel essencial dessa imunoglobulina no processo (BASSO et al., 2003).

Nas últimas décadas, outras interações que medeiam o eixo intestino-cérebro tem sido descobertas. Sabendo da importância dessas interações sobre o comportamento do indivíduo, modelos experimentais que possam avaliar a ocorrência da aversão alimentar a outros alérgenos podem contribuir para uma melhor elucidação dos mecanismos envolvidos neste fenômeno.

Diante do exposto, observa-se a necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais que possibilitem uma melhor investigação da patogênese da alergia a camarão. Tais estudos devem auxiliar na elaboração de estratégias terapêuticas mais racionais para o tratamento da AA em questão.

## **2 JUSTIFICATIVA**

O camarão representa um dos frutos do mar mais presente na culinária brasileira e relatos de alergia a camarão são frequentemente observados dentre a população brasileira e muitos destes casos são clinicamente confirmados. Assim, o camarão tem sido elencado como um dos alimentos mais sensibilizantes em todo o mundo, causando ainda reações alérgicas graves e, em casos de agravo sistêmico, pode levar ao óbito. Entretanto, a literatura disponível apresenta-se escassa e requer a elaboração de mais estudos que investiguem a imunopatogênese envolvida na alergia a camarão. Nesta perspectiva, nosso estudo objetiva o desenvolvimento de um modelo de alergia alimentar de fácil execução, pouco invasivo e que permita o entendimento das rotas imunológicas envolvidas.

## **3 HIPÓTESE**

A sensibilização subcutânea com proteínas alergênicas do camarão e adsorvidas em hidróxido de alumínio pode induzir polarização do perfil Th2 com produção de anticorpos específicos e alterações histopatológicas decorrentes de um protocolo de desafio por ingestão contínua, evidenciando a indução de alergia alimentar.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.4 OBJETIVO GERAL**

Estabelecer um modelo experimental murino de alergia alimentar a componentes alergênicos do camarão.

### **4.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar mudanças em parâmetros fisiológicos como a perda de peso em decorrência do quadro alérgico;
- Avaliar o desenvolvimento de resposta humoral por meio de parâmetros imunológicos como a produção de IgG1 e IgE séricas anti-camarão;
- Verificar a resposta imune na mucosa intestinal através da dosagem de IgA secretória anti-camarão, além da produção de citocinas pró-inflamatórias;
- Identificar alterações no padrão histopatológico intestinal quanto à presença de inflamação tecidual tipo Th2, modificações na morfometria do epitélio e a produção de muco;
- Avaliar o desenvolvimento de aversão alimentar em animais sensibilizados.

## 5 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram inicialmente sensibilizados por via subcutânea (Dia 0) pela injeção de 100 µl de uma solução contendo 100 µg de proteína total do extrato de camarão adsorvida em 1 mg de hidróxido de alumínio, Al(OH)<sub>3</sub>. No dia 14, como reforço, os animais previamente sensibilizados receberam apenas 100 µg de proteína total do extrato de camarão pela mesma via. Os animais não sensibilizados receberam apenas 100 µl de solução salina por via subcutânea durante a sensibilização e reforço. Este protocolo de sensibilização foi baseado naquele utilizado por Saldanha e colaboradores (2004).

O desafio foi iniciado no dia 21. Nesta etapa do protocolo houve a ingestão contínua de uma solução contendo 5 mg/ml de proteínas do extrato de camarão até o dia 23 e 35, totalizando 2 e 14 dias de ingestão, respectivamente. Os animais não desafiados ingeriram apenas água seguindo os mesmos parâmetros descritos. Assim, foram formados 4 grupos de estudo: grupo controle, grupo desafiado, grupo sensibilizado, grupo sensibilizado e desafiado. Ao fim do desafio, os animais foram eutanasiados para a coleta de amostras biológicas. O desenho experimental aplicado é demonstrado na Figura 3.

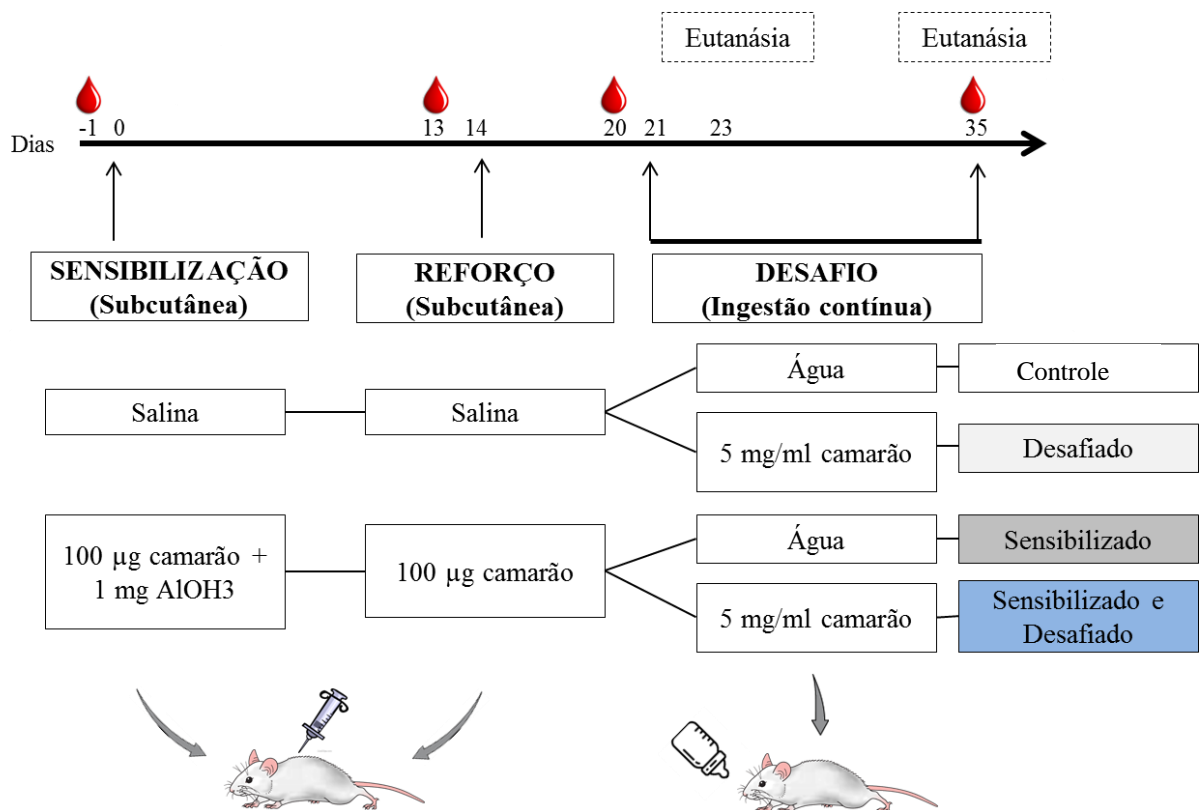


Figura 3. Delineamento experimental do modelo de alergias a camarão.



## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 PREPARO DO EXTRATO DE CAMARÃO

Para o preparo do extrato foram utilizados camarões pré-cozidos e descascados da espécie *Litopenaeus vannamei*. O protocolo de extração utilizado foi semelhante aquele usado por Ayuso e colaboradores (2008), com algumas adaptações. Inicialmente, um processador foi utilizado para triturar as amostras de camarão até a obtenção uma pasta homogênea. Para a extração das proteínas, a pasta foi adicionada a uma solução PBS 1X (100 ml / 50 g) e então submetida à agitação orbital durante a noite a 4 °C.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi coletado e sofreu uma ultracentrifugação 15000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Desta vez, o sobrenadante formado foi coletado e armazenado a – 20 °C para uso posterior. A dosagem de proteínas totais no extrato de camarão foi realizada pelo método de Pierce fazendo uso do kit Micro BCA (ThermoFisher Scientific).

### 6.2 ASPECTOS ÉTICOS

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 6-8 semanas de idade foram utilizadas neste trabalho. Todas as intervenções foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo Moniz pelo protocolo 021/2018. Os animais foram mantidos no biotério do referido Instituto, onde estiveram sob temperatura ambiente e ciclo claro/escuro de 12 horas controlados, além de livre acesso à comida e água até a etapa do desafio oral.

### 6.3 COLETA DE SANGUE

As coletas de sangue foram realizadas 1 dia antes da sensibilização e nos dias 13, 20 e 35 para o acompanhamento do desenvolvimento da resposta humoral. As coletas de sangue foram realizadas pelo plexo retro orbital após a administração de colírio anestésico. As amostras de sangue coletadas permaneceram a 4 °C por, aproximadamente, 30 minutos para a formação do coágulo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 10

minutos. Após a coleta do soro, alíquotas foram congeladas a - 20 °C até o momento de sua análise.

#### 6.4 DOSAGEM DE IgG1 SÉRICA ANTI-CAMARÃO

Para a dosagem de IgG1 específica, placas de microtitulação Nunc Maxisorp (ThermoFisher) foram sensibilizadas pela adição de 50 µl/poço de uma solução contendo 5 µg/ml de proteína total do extrato de camarão em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com Tampão Salina Tamponada (PBS) Tween 0,05%, o tampão de lavagem, por 3 vezes e bloqueadas com 100 µl/poço de PBS + Albumina de Soro Bovino (BSA) 1% por 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, os poços foram lavados 3 vezes e, em seguida, 50 µl das amostras de soro do animais diluídas 1:2000 foram adicionadas aos poços. As amostras foram incubadas em câmara úmida a 37 °C por 2 horas. Após a incubação, os poços foram lavados por 5 vezes e 50 µl do anticorpo de detecção anti-IgG1 conjugado à enzima *horseradish peroxidase* (HRP) (Life Technologies) na diluição 1:1000 foram adicionados aos poços e incubados por 1 hora à temperatura ambiente.

Para a revelação da placa, os poços foram lavados por 7 vezes e foi adicionado 50 µl por poço de tetrametilbenzidina (TMB) (Invitrogen). A reação foi interrompida pela adição de 25 µl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2N. A leitura dos poços foi realizada em leitor de ELISA (Molecular Devices) a 450 nm. O soro basal de cada animal foi usado como controle da reação.

#### 6.5 DOSAGEM DE IgE SÉRICA TOTAL E ANTI-CAMARÃO

A concentração de IgE total em soro foi dosada pelo uso de um kit (BD Biosciences) e seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, os poços foram sensibilizados pela adição do anticorpo de captura, seguido do plaqueamento das amostras de soro (1:100) e uma curva-padrão.

Posteriormente, houve a incubação com um anticorpo de detecção conjugado à enzima HRP e desenvolvimento da reação colorimétrica pelo uso do substrato TMB. Ácido sulfúrico (2N) foi utilizado para a parada da reação. A leitura foi realizada a 450 nm. Finalmente, as

concentrações nas amostras foram encontradas pela interpolação dos dados com a curva-padrão, considerando o fator de diluição.

Para analisar a produção de IgE sérica anti-camarão, placas de 96 poços Nunc Maxisorp foram sensibilizadas com 10 µg/ml de proteínas do camarão (50 µl/poço) e incubadas durante a noite a 4°C. O bloqueio ocorreu pela adição de 100 µl/poço de PBS-Soro Bovino Fetal 10% por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras de soro foram plaqueadas (50 µl/poço) na diluição 1:100 e incubadas durante a noite a 4°C. Para a detecção dos anticorpos específicos, um anticorpo anti-IgE conjugado à HRP foi adicionado (1:1000, 50 µl/poço) durante 2 horas a temperatura ambiente. Após a incubação, 50 µl de TMB foram utilizados por poço, gerando uma reação colorimétrica que foi parada e mensurada tal como descrito para os demais ensaios descritos neste trabalho. O soro individual basal foi utilizado como controle da reação.

#### 6.6 HOMOGENATO TECIDUAL DO JEJUNO

Um fragmento de 100 mg do jejuno foi coletado para a análise da produção de citocinas. Este fragmento foi macerado em 1 ml de PBS 1X contendo um coquetel de inibidor de proteases (1:100). O homogenato tecidual foi então centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquotado e armazenado a -20°C até o momento do uso para dosagens de citocinas.

#### 6.7 REESTÍMULO *IN VITRO* DE CÉLULAS DOS LINFONODOS MESENTÉRICOS

Durante a necropsia dos animais, os linfonodos mesentéricos foram coletados e macerados. Utilizando placas de 96 poços em fundo U,  $1 \times 10^6$  (200 µl) células foram adicionadas por poço. Estas células foram reestimuladas pela adição de 100 µg/ml de proteínas de camarão a cada poço. Para este ensaio, controles negativos (células em meio sem estímulo) também foram utilizados, além de controles positivos aos quais foram adicionados 50 µg/ml de conconavalina A (Sigma).

As células foram incubadas em meio RPMI 1640 (bicarbonato de sódio, glutamina, pH 7,4, Gibco) a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 (para dosagem de IL-4 e IL-5) ou 48 horas (para dosagem

de IL-10 e IFN- $\gamma$ ). Após a incubação, procedeu-se uma centrifugação por 10 minutos a 1200 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e alíquotado para posterior dosagem de citocinas.

#### 6.8 DOSAGEM DE CITOCINAS

As citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  foram dosadas pelo método de ELISA sanduíche utilizando os kits BD Biosciences. As dosagens foram realizadas como sugerido pelo fabricante. Resumidamente, a dosagem foi realizada pelo uso de um anticorpo de captura, seguido da amostra de sobrenadante e, posteriormente, um anticorpo conjugado à enzima HRP utilizando o TMB (Invitrogen) como substrato para o desenvolvimento da reação colorimétrica.

#### 6.9 LAVADO INTESTINAL

A partir do intestino delgado coletado foi realizado um lavado intestinal. O procedimento consistiu da injeção de 10 ml de salina gelada com o auxílio de uma seringa com agulha em uma das extremidades do intestino. A extremidade oposta foi direcionada ao interior de um tubo falcon 15 ml, aonde o lavado intestinal resultante foi coletado.

As amostras de lavado foram homogeneizadas com o auxílio de um vórtex e, posteriormente, centrifugadas a 1200 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a dosagem de IgA específica no mesmo dia.

#### 6.10 DOSAGEM DE IgA SECRETÓRIA ANTI-CAMARÃO NO LAVADO INTESTINAL

A sensibilização da placa para a dosagem de IgA anti-camarão foi realizada pela deposição de 50  $\mu$ l de uma solução de tampão carbonato-bicarbonato contendo 10  $\mu$ g/ml de proteínas do camarão. Em seguida, a placa foi incubada durante a noite a 4 °C. Após lavagem, o bloqueio foi realizado utilizando 100  $\mu$ l de PBS Tween + BSA 1 % durante 2 horas à temperatura ambiente. As amostras de lavado intestinal (50  $\mu$ l/poço, diluição 1:2) foram plaqueadas e incubadas durante a noite a 4 °C.

O anticorpo anti-IgA conjugado à peroxidase (Life Technologies) foi adicionado aos poços (50  $\mu$ l, diluição 1:1000) por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, 50  $\mu$ l de

TMB (Invitrogen) foram transferidos a cada poço. A reação foi interrompida pelo uso de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2N e a leitura realizada a 450 nm.

### 6.11 CONFECÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS

Com a finalidade de avaliar alterações histopatológicas em decorrência do quadro de alergia alimentar, amostras do jejuno foram coletadas durante a necrópsia dos animais. Os fragmentos foram fixados em formalina tamponada (10%, pH 7,2). Posteriormente, para a desidratação e clarificação, os fragmentos embebidos numa bateria de troca sucessiva entre álcool absoluto, xilol e parafina.

Os fragmentos foram incluídos em blocos sólidos de parafina que permitiram sua microtomia em secções transversais do jejuno com 5 µm de espessura. Desta forma, as secções produzidas foram desparafinizadas e destinadas a diferentes colorações.

A coloração por Hematoxilina e Eosina (HE) permitiu a análise morfométrica de vilos e criptas, bem como a contagem de eosinófilos na lâmina própria intestinal, enquanto a coloração por ácido periódico-Schiff (PAS), própria para a marcação de muco possibilitou também foi para a mensuração do volume de muco.

### 6.12 CONTAGEM DE EOSINÓFILOS E ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE VILOS E CRIPTAS

Lâminas coradas por HE foram fotografadas no aumento 40X em 5 campos aleatórios com o auxílio de um microscópio Olympus acoplado a câmera. Tais lâminas foram também fotografadas no aumento de 10X para a análise morfométrica de vilos e criptas. Para tal análise, foram utilizados vilos de extensão íntegra.

As contagens de eosinófilos foram realizadas com a ajuda do *software* ImageJ<sup>®</sup> e os resultados são expressos em eosinófilos/campo. A mensuração do tamanho de vilos e criptas foi realizada por meio do mesmo *software* com o auxílio de uma régua milimetrada de calibração e são expressas em µm.

### 6.13 MENSURAÇÃO DA ÁREA DE MUCO

Lâminas coradas por PAS foram fotografadas no aumento de 10X. Com o auxílio do *software* ImageJ<sup>®</sup>, foi realizada a binarização de cor das imagens capturadas binarizadas e a

área de muco marcada pela coloração foram calculadas. Os valores foram demonstrados em  $\mu\text{m}^2\text{PAS}/\text{campo}$ .

#### 6.14 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE LÍQUIDO

O consumo do líquido ofertado nas mamadeiras durante o desafio foi mensurado diariamente. Para isso, consideramos a diferença entre o volume oferecido ao início do dia e a sobra obtida no início do dia seguinte.

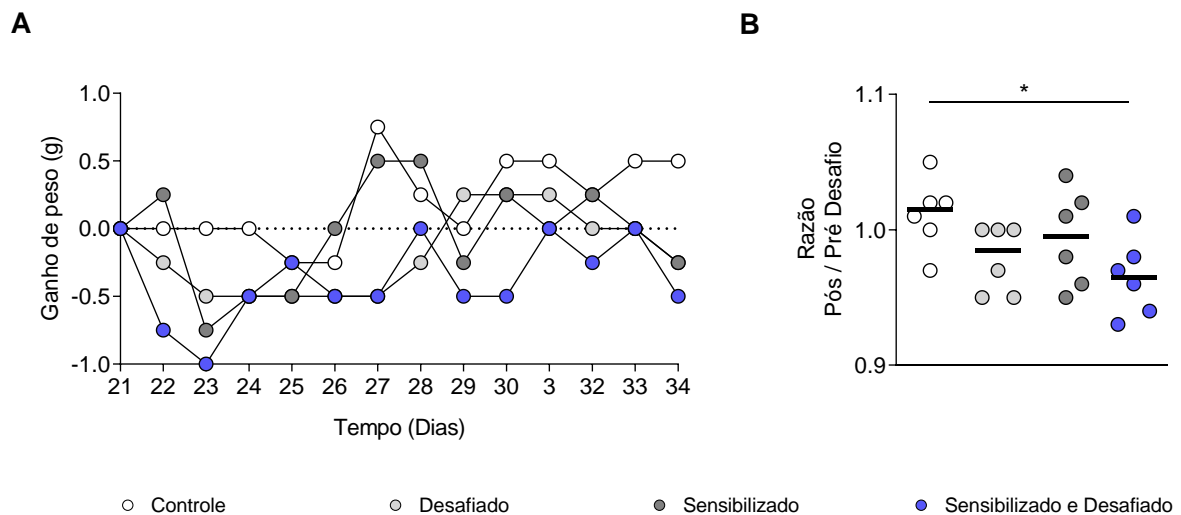
#### 6.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos dados gerados foi analisada por meio dos testes de normalidade D'Agostino-Person e Shapiro-Wilk. Para aqueles conjuntos de dados que assumiram distribuição normal, utilizamos o teste paramétrico ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, enquanto o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn foi usado para analisar dados com distribuição não normal. O nível de significância aplicado foi de  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 8 (San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 PESO CORPORAL É REDUZIDO EM ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS

Um dos parâmetros observados no desenvolvimento de alergia alimentar é a redução de peso corporal (SALDANHA et al., 2004). Para avaliar a influência do desafio oral no presente modelo experimental, o peso dos animais foi aferido diariamente toda esta etapa. Observa-se uma alteração no peso corporal dos animais que foram sensibilizados e desafiados com as proteínas do camarão (Figura 4A). Por meio da análise de razão entre o peso após 14 dias de desafio e o peso ao início do desafio, pode ser observada uma redução significativa entre o grupo controle e o grupo sensibilizado e desafiado (Figura 4B).



**Figura 4. Perda de peso corporal é observada em animais sensibilizados e desafiados.** Fêmeas BALB/c (n=6/grupo) foram sensibilizadas com 100 µg de proteínas do camarão + 1 mg de hidróxido de alumínio. No dia 14, esses animais receberam uma dose reforço de 100 µg pela mesma via e após uma semana foram desafiados por 14 dias pela ingestão contínua de uma solução contendo 5 mg/ml de proteínas totais do camarão. Os demais animais receberam apenas veículo em todas as etapas do protocolo, apenas o protocolo de sensibilização ou o protocolo de desafio. O peso corporal foi acompanhado diariamente durante o desafio. (A) Ganho de peso durante o desafio. (B) Razão do peso corporal pós/pré desafio. Os resultados são expressos em mediana e foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. \* $p < 0,05$

## 7.2 ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS APRESENTAM AUMENTO PROGRESSIVO DA PRODUÇÃO DE IgE SÉRICA TOTAL E ANTI-CAMARÃO

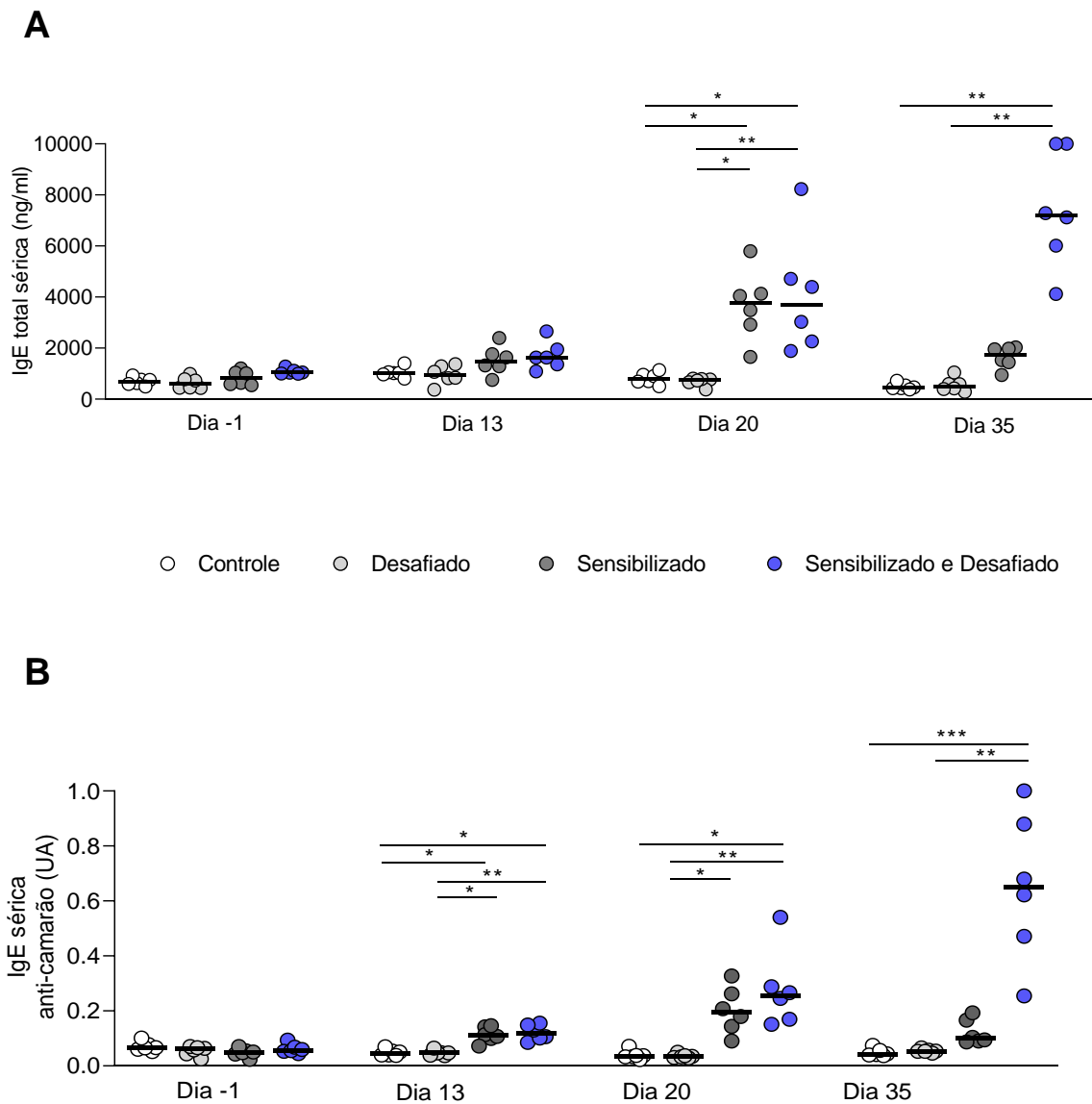
Durante a fase de sensibilização, imunoglobulinas do tipo E ligam-se a receptores de membrana de mastócitos teciduais e, num contato subsequente com o antígeno, uma série de mediadores inflamatórios são liberados. Desta forma, a avaliação do desenvolvimento de resposta alérgica anti-camarão se deu pela dosagem de IgE sérica.

As dosagens de IgE total sérica mostraram-se aumentadas em animais sensibilizados após o reforço. Em decorrência do desafio, as concentrações dessa imunoglobulina apresentaram-se ainda mais elevadas em animais sensibilizados e desafiados (Figura 5A).

A detecção de IgE específica apresentou-se correlacionada àquela encontrada para a dosagem total. A sensibilização subcutânea foi capaz de induzir a produção de IgE anti-camarão. A produção desse anticorpo apresentou aumento progressivo durante as diferentes etapas do modelo em animais que foram sensibilizados, porém após a etapa do desafio, apenas os animais do grupo sensibilizado e desafiado mantiveram o aumento da produção dos anticorpos (Figura 5B).

Assim, a produção de IgE específica após a exposição oral às proteínas do camarão confirma o quadro alérgico mediado por IgE nesses animais. Os grupos controle e desafiado não apresentaram reatividade detectável, já o grupo de animais que foram apenas sensibilizados, apesar de detectada reatividade após a sensibilização e reforço, sua reatividade aproximou-se àquela basal para o mesmo grupo.

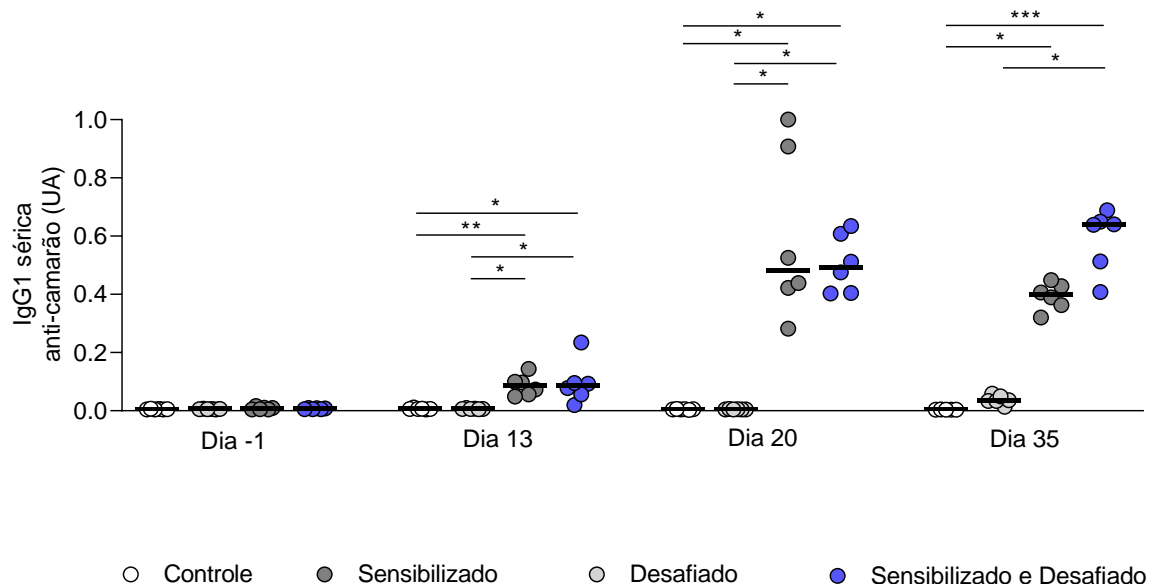




**Figura 5. IgE sérica anti-camarão apresenta aumento em animais sensibilizados após o desafio.** Camundongos da linhagem BALB/c ( $n=6$ /grupo) foram sensibilizados pela via subcutânea com proteínas do camarão. Após 14 dias, esses animais foram expostos ao alérgeno pela administração de uma dose reforço pela mesma via. Finalmente, após um semana do reforço, os animais foram desafiados pela ingestão de 5 mg/ml de proteínas do camarão adicionadas à mamadeira durante 14 dias. Amostras de sangue foram coletadas antes das intervenções e após o último dia de desafio. O soro obtido foi utilizado para a dosagem de IgE séricas total e anti-camarão por ELISA (diluição 1:100). Os resultados são expressos em mediana. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

### 7.3 SENSIBILIZAÇÃO INDUZ AUMENTO EXPRESSIVO NA PRODUÇÃO DE IgG1 SÉRICA ANTI-CAMARÃO

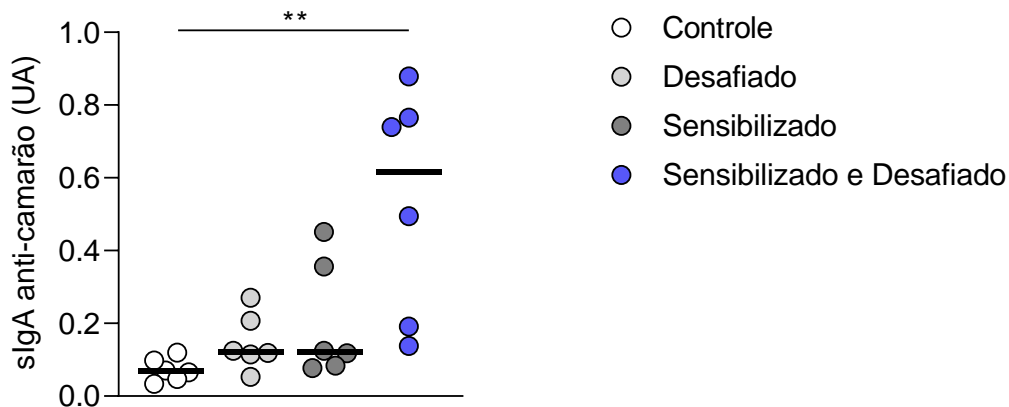
No quadro de alergia, por estímulo das da citocinas IL-4 e IL-13, ocorre também a produção de anticorpos IgG1. Para a dosagem de IgG1 anti-camarão, coletas de sangue foram realizadas para a obtenção do soro basal (pré-intervenções) e após os protocolos de sensibilização, reforço e desafio. A produção de IgG1 anti-camarão pode ser detectada em decorrência da sensibilização apenas em animais sensibilizados. Observa-se que a exposição ao alérgeno durante o reforço induziu o aumento da produção desse anticorpo nos mesmo grupos. Entretanto, somente o grupo sensibilizado e desafiado manteve o aumento de IgG1 anti-camarão após a etapa de desafio (Figura 6).



**Figura 6. Desafio induz aumento de IgG1 sérica anti-camarão em animais sensibilizados.** Camundongos da linhagem BALB/c (n=4-6/grupo) foram sensibilizados pela via subcutânea com proteínas do camarão. Após 14 dias, esses animais foram expostos ao alérgeno pela administração de uma dose reforço pela mesma via. Finalmente, após um semana do reforço, os animais foram desafiados pela ingestão de 5 mg/ml de proteínas do camarão adicionadas à mamadeira durante 14 dias. Amostras de sangue foram coletadas antes das intervenções e após o último dia de desafio. O soro obtido foi utilizado para a dosagem de IgG1 sérica anti-camarão por ELISA (diluição 1:2000). Os resultados são expressos em mediana. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

#### 7.4 INGESTÃO CONTÍNUA DO ALÉRGENO PROMOVE RESPOSTA HUMORAL INTESTINAL EM ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS

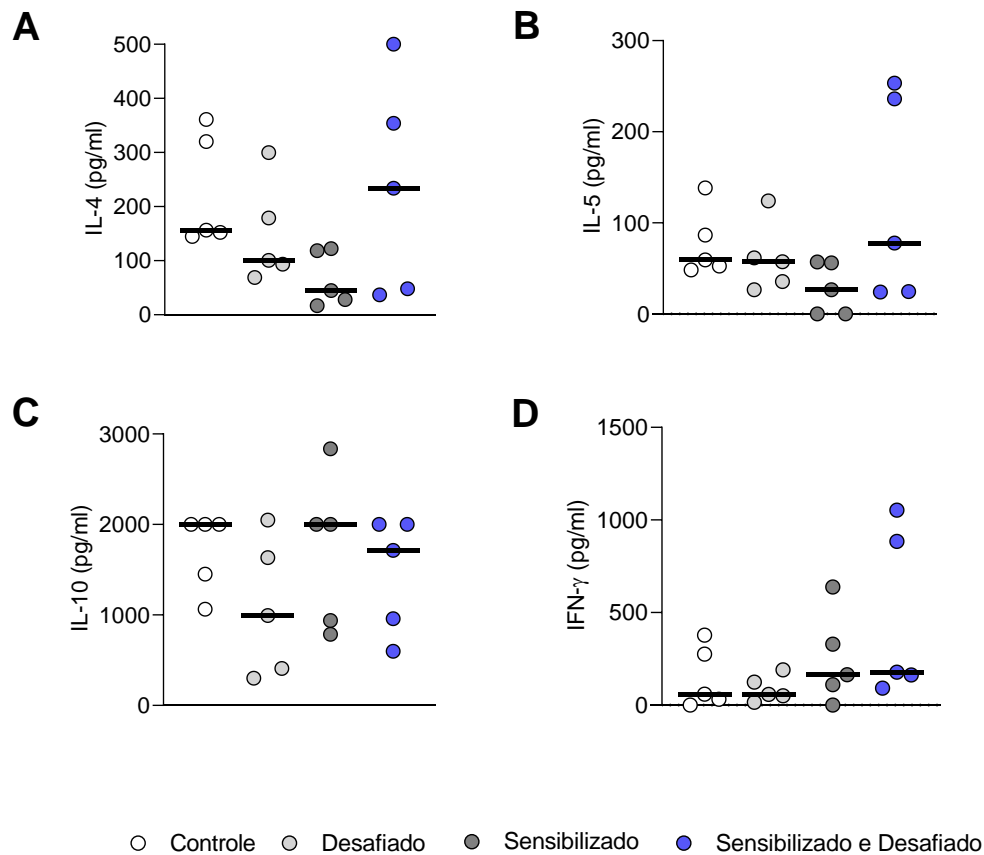
A IgA secretória participa das barreiras iniciais de defesa intestinal pelo bloqueio de toxinas, além da opsonização de microrganismos patogênicos. Desta forma, a indução de resposta humoral intestinal foi analisada pela dosagem de IgA secretória específica no lavado intestinal. Tal análise revelou a produção e secreção dessa imunoglobulina no lavado intestinal de animais sensibilizados e desafiados ao final do protocolo de desafio oral. Não foi observada produção significativa nos demais grupos (Figura 7).



**Figura 7. Animais sensibilizados e desafiados apresentam aumento de sIgA em lavado intestinal.** Fêmeas da linhagem BALB/c (n=6/grupo) foram sensibilizadas pela via subcutânea com proteínas do camarão, seguido de uma dose reforço pela mesma via após 14 dias. O desafio foi iniciado 7 dias após a dose reforço pela ingestão contínua de 5 mg/ml de proteínas do camarão durante 14 dias. O intestino delgado foi lavado e o conteúdo utilizado para a dosagem de sIgA anti-camarão por ELISA (diluição 1:2). Os resultados são expressos em mediana. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

#### 7.5 NÍVEIS DE IL-4 APRESENTAM-SE ELEVADOS NO JEJUNO DE ANIMAIS SENSIBILIZADOS APÓS 2 DIAS DE DESAFIO ORAL

A diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de citocinas do perfil Th2 é observada na inflamação tecidual alérgica. Por isso, analisamos a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  no jejuno dos animais no dia 23. Apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas na produção das citocinas analisadas, observa-se que houve aumento, porém sem significância estatística, na produção de IL-4 no jejuno de animais do grupo sensibilizado e desafiado (Figura 8A).

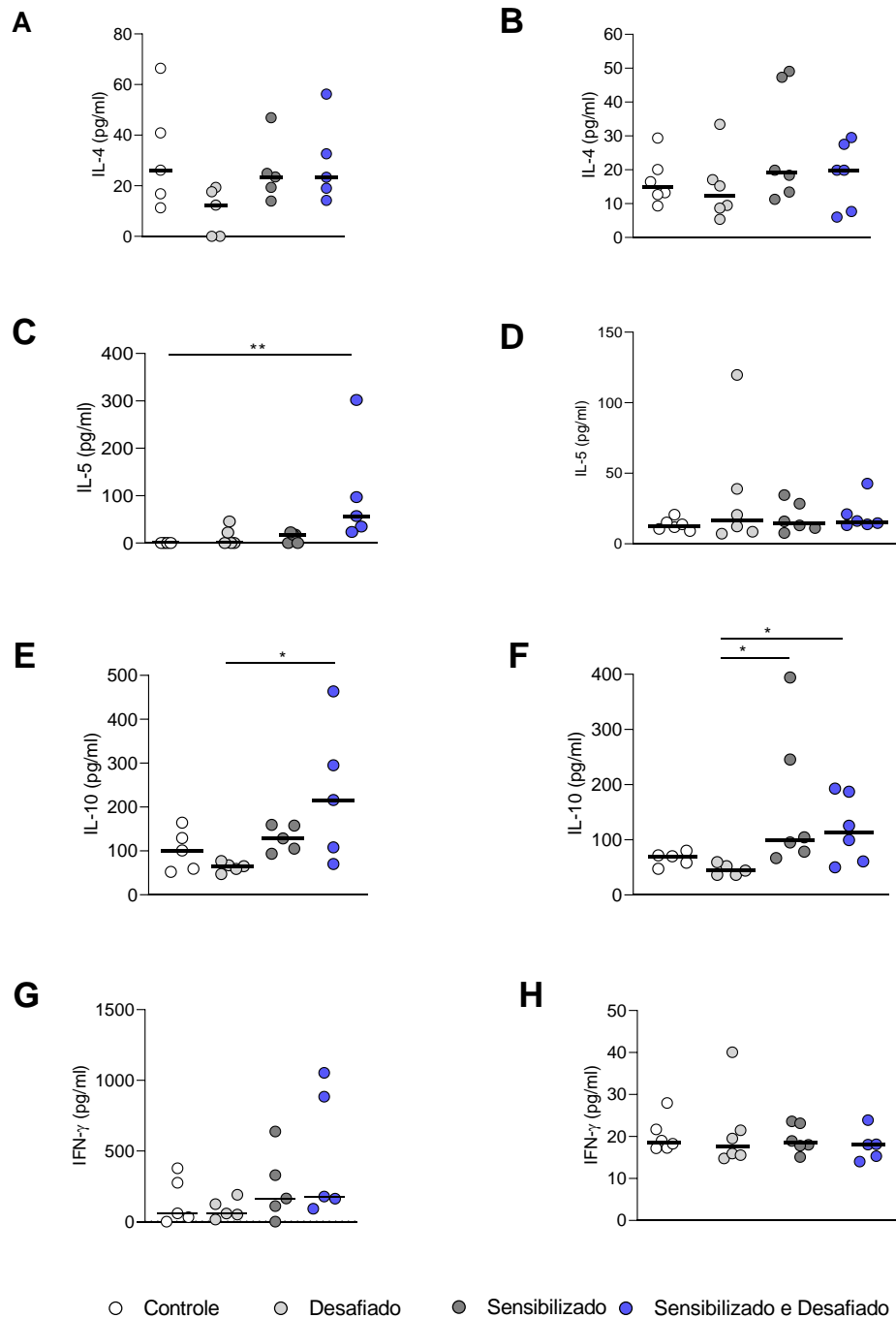


**Figura 8. Aumento de IL-4 no jejuno de animais sensibilizados e desafiados por 2 dias.** Após a sensibilização e reforço por via subcutânea, camundongos da linhagem BALB/c (n=5/grupo) foram desafiados por 48 horas pela ingestão de proteínas do camarão. Fragmentos do jejuno foram coletados para a dosagem de citocinas. Dosagem de IL-4 (A), IL-5 (B) IL-10 (C) e IFN- $\gamma$  (D). Os resultados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn e são expressos em mediana.

## 7.6 LINFONODOS MESENTÉRICOS DE ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS PRODUZEM IL-5 E IL-10

O GALT desempenha papel essencial na homeostase intestinal pela manutenção do ambiente tolerogênico, mas também participando dos mecanismos de defesa em processos inflamatórios, como no caso das alergias alimentares. Para avaliar a influência do nosso modelo de indução de alergia, LNMs foram coletados nos dias 23 e 35 e suas células reestimuladas *in vitro*. As citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  foram dosadas a partir do sobrenadante da cultura destas células (Figura 9). Tal dosagem revelou o aumento da

produção de IL-5 nos animais sensibilizados e desafiados no dia 23 (Figura 9C), além de aumento na produção de IL-10 em ambos os pontos de análise (Figuras 9E e 9F). Não foram observadas diferenças para as demais citocinas analisadas.

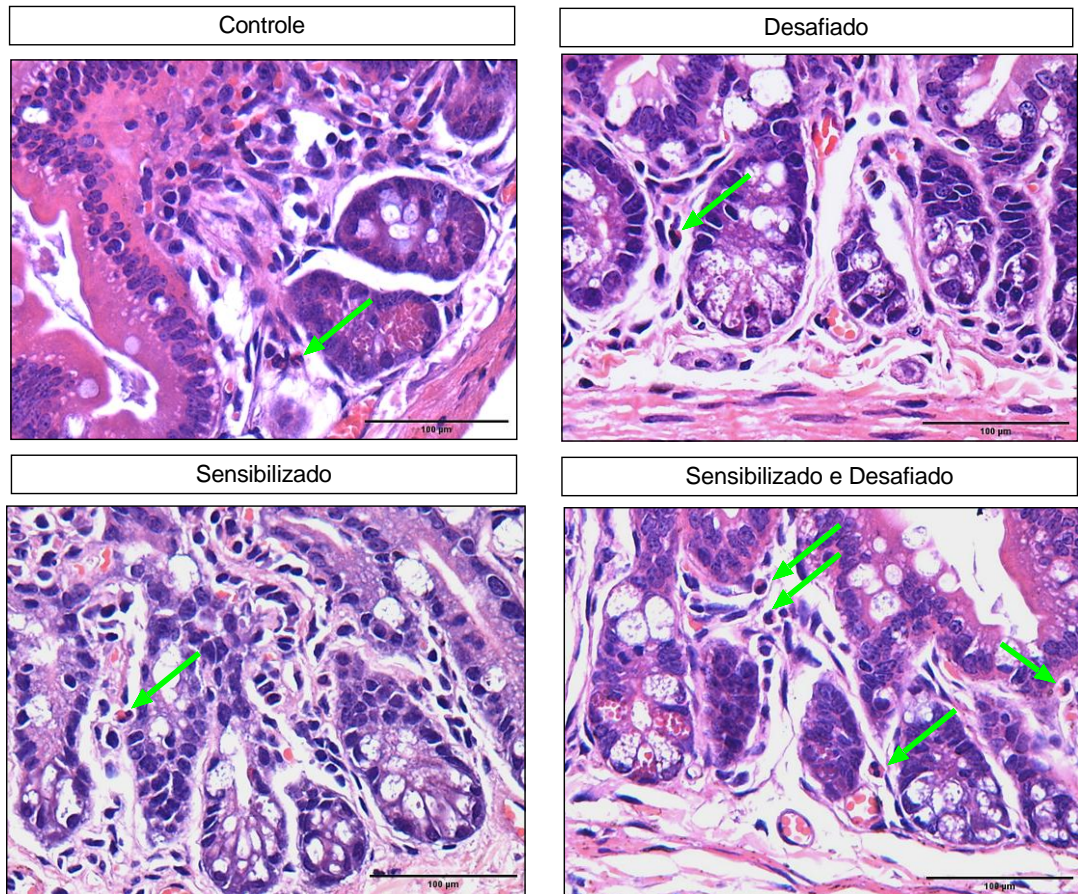


**Figura 9. Produção de IL-5 e IL-10 apresenta aumento em linfonodos mesentéricos de animais sensibilizados e desafiados.** Após a sensibilização e reforço por via subcutânea, camundongos da linhagem BALB/c (n=5-6/grupo) foram desafiados pela ingestão contínua de 5 mg/ml de proteínas do camarão adicionadas à mamadeira durante 2 ou 14 dias (dia 23 e 35, respectivamente). Linfonodos mesentéricos foram coletados e as células reestimuladas *in vitro* com proteínas do camarão para a dosagem de citocinas por ELISA. Dosagem de IL-4 no dia 23 (A) e dia 35 (B), IL-5 no dia 23 (C) e 35 (D), IL-10 no dia 23 (E) e dia 35 (F), IFN- $\gamma$  no dia 23 (G) e dia 35 (H). Os resultados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn e são expressos em mediana.

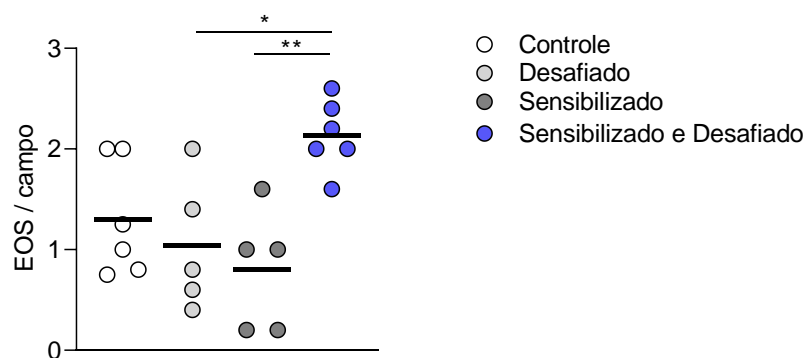
## 7.7 SENSIBILIZAÇÃO SEGUIDA DE DESAFIO ORAL INDUZ AUMENTO DA PRESENÇA DE EOSINÓFILOS NA LÂMINA PRÓPRIA INTESTINAL

Em decorrência da produção de fatores quimiotáticos, infiltrados inflamatórios eosinofílicos são observados na lâmina própria intestinal. Em nosso modelo, observamos a presença de eosinófilos neste sítio em animais do grupo sensibilizado e desafiado após 14 dias de exposição alérgeno pela ingestão contínua do mesmo. Não foram observadas diferenças nos demais grupos (Figura 10A e 10B).

A



B



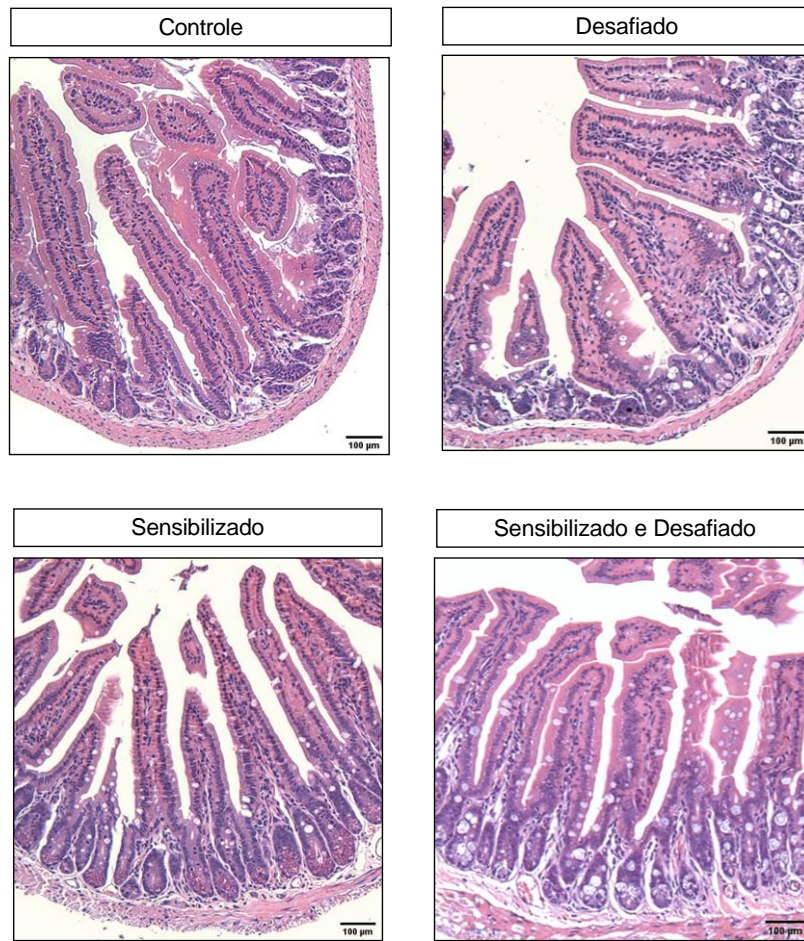
**Figura 10. Animais sensibilizados e desafiados apresentam maior contagem de eosinófilos.** Por via subcutânea, animais da linhagem BALB/c (n=5-6/grupo) foram sensibilizados e receberam uma dose reforço com proteínas do camarão. Posteriormente, os animais foram desafiados durante 14 dias pela ingestão contínua de 5 mg/ml de proteínas do camarão. Fragmentos dos jejuno foram coletados e processados para a confecção de lâminas histopatológicas. Secções foram coradas por Hematoxilina e Eosina para a contagem de eosinófilos em lâmina própria por meio de 5 campos aleatórios fotografados. (A) Imagem representativa das secções histológicas por grupo. (B) Contagem diferencial de eosinófilos em lâmina própria. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e são expressos em media  $\pm$  desvio-padrão.

## 7.8 ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS NA MUCOSA INTESTINAL SÃO OBSERVADAS APÓS INGESTÃO CONTÍNUA DO ALÉRGENO

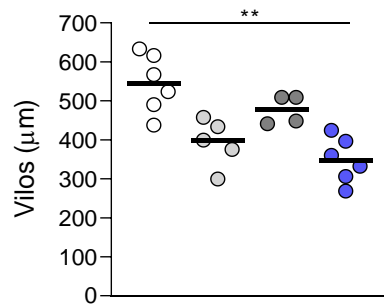
O quadro de alergia alimentar pode induzir alterações na morfometria da mucosa intestinal. Saldanha e colaboradores (2005) evidenciaram a redução do comprimento de vilos na porção do jejuno proximal de animais alérgicos. Para identificar possíveis alterações no tamanho de vilos e criptas, secções do jejuno foram analisadas por microscopia óptica que revelou a redução do comprimento de vilos do grupo desafiado e do grupo sensibilizado e desafiado, enquanto esse último grupo apresentou também redução no comprimento de suas criptas (Figura 11B). O grupo Controle apresentou valor reduzido do tamanho de cripta quando comparado ao grupo sensibilizado, o qual apresentou o maior comprimento de cripta entre os grupos analisados.



A



B



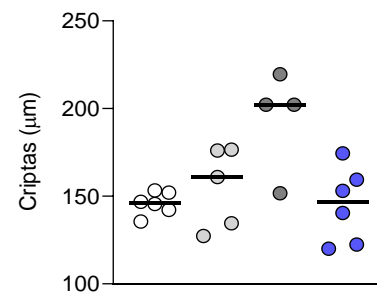
○ Controle

○ Desafiado

● Sensibilizado

● Sensibilizado e Desafiado

C

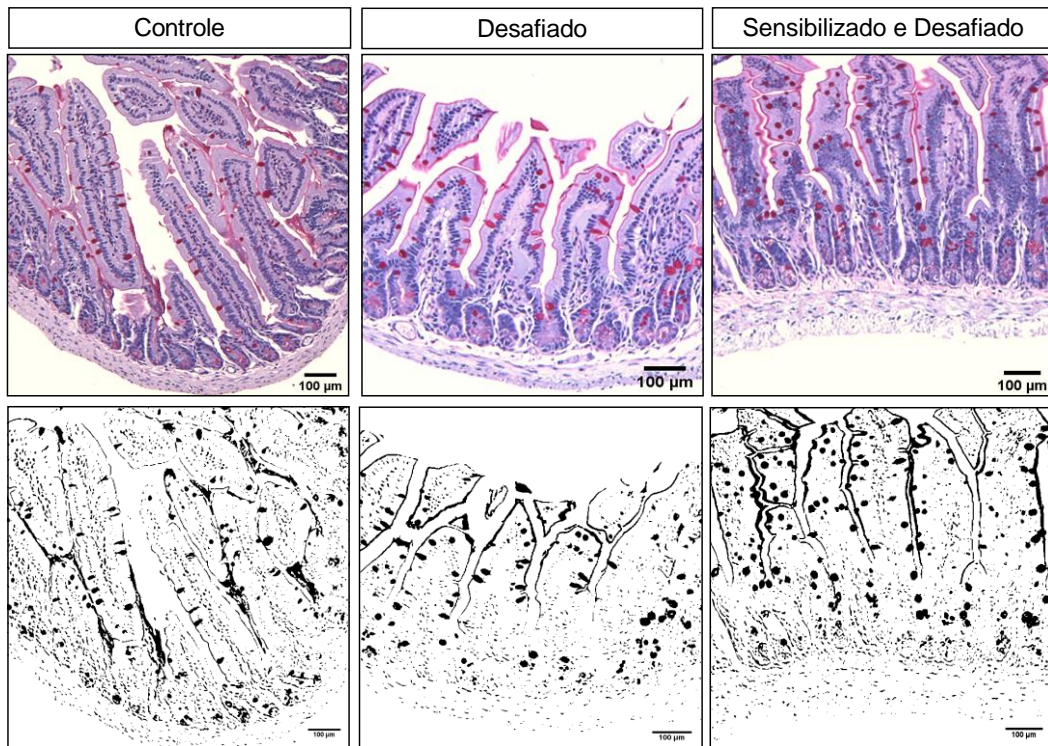


**Figura 11. Animais sensibilizados e desafiados apresentam alterações morfométricas na mucosa intestinal.** Animais da linhagem BALB/c (n=4-6/grupo) foram sensibilizados e receberam uma dose reforço com proteínas do camarão por via subcutânea. Os animais foram desafiados 14 dias pela ingestão contínua de 5 mg/ml de proteínas do camarão por 14 dias. Fragmentos do jejunum foram coletados e processados para a confecção de lâminas histopatológicas. Secções foram coradas por Hematoxilina e Eosina para a análise morfométrica de vilos e criptas por meio de 5 campos aleatórios fotografados. (A) Imagem representativa das secções histológicas por grupo. (B) Mensuração do comprimento de vilos e criptas. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

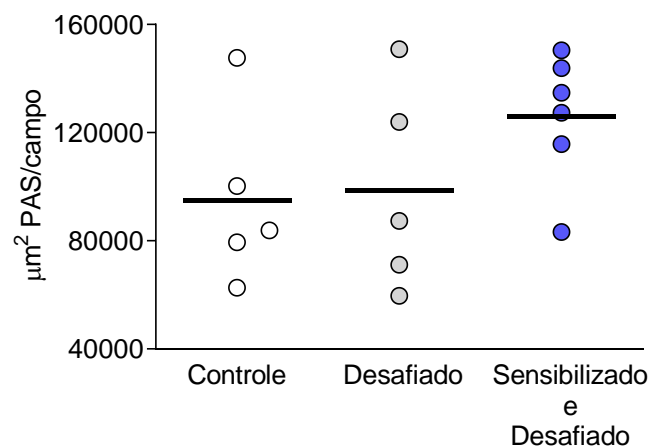
## 7.9 DESAFIO ORAL SUGERE AUMENTO DA PRODUÇÃO DE MUCO INTESTINAL EM ANIMAIS SENSIBILIZADOS

A rede de proteínas formada pelo muco depositado ao lúmen intestinal, junto AMPs e sIgA a ele adicionados, formam um gradiente de impermeabilidade ao acesso ao epitélio intestinal por agentes patogênicos. Nesta perspectiva, a produção de muco foi analisada por meio de secções histológicas coradas por PAS capaz de evidenciar seus componentes (Figura 12A). A partir da mensuração da área de muco nas secções, observou-se que os animais do grupo sensibilizado e desafiado apresentaram aumento da área de muco em tecido, porém não foi observado aumento estatisticamente significativo (Figura 12B).

A



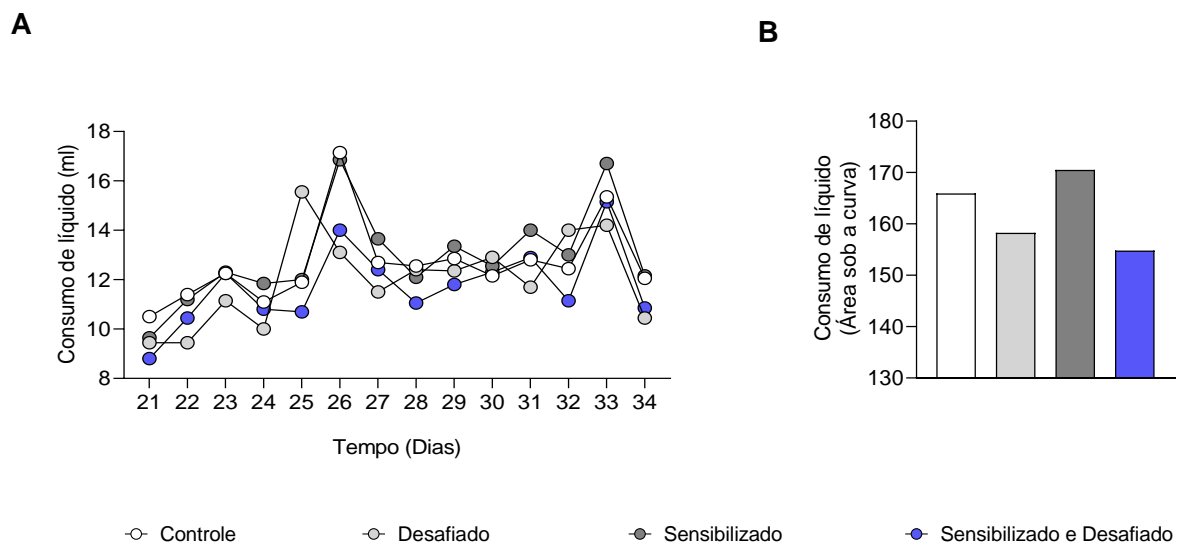
B



**Figura 12. Produção de muco é aumentada em animais sensibilizados após exposição oral contínua ao alérgeno.** Fêmeas da linhagem BALB/c (n=5-6/grupo) foram sensibilizadas com proteínas do camarão por via subcutânea. Posteriormente, o desafio ocorreu durante 14 dias pela ingestão contínua de 5 mg/ml de proteínas do camarão por 14 dias. Fragmentos do jejuno foram coletados e processados para a confecção de lâminas histopatológicas. Secções foram coradas por PAS para a identificação da área de muco por meio de 5 campos aleatórios fotografados. (A) Imagem representativa das secções histológicas por grupo. (B) Mensuração da área de muco. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

## 7.10 CONSUMO DE LÍQUIDO É REDUZIDO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À INGESTÃO CONTÍNUA DO ALÉRGENO

Os mecanismos imunes envolvidos na alergia alimentar tem sido associados ao fenômeno da aversão alimentar ao alérgeno em questão (CASTEX et al., 1995). Em nosso modelo, nossos dados preliminares sugerem redução do consumo de líquido em animais que ingeriram o alérgeno durante a etapa de desafio oral, ou seja, o grupo desafiado e o grupo sensibilizado e desafiado. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 13).



**Figura 13. Consumo de líquido durante desafio oral é reduzida em animais sensibilizados.** Animais da linhagem BALB/c foram sensibilizados com proteínas do camarão por via subcutânea. Posteriormente, 5 mg/ml de proteínas do camarão foram adicionadas à mamadeira dos animais durante 14 dias. Os animais (n=6/grupo) foram divididos em 2 caixas com 3 animais, resultando em um n=2/grupo. O consumo foi acompanhado diariamente pela mensuração da sobra de líquido de cada caixa. (A) Consumo de líquido dos animais. (B) Área sob a curva do consumo de líquido. Os resultados são expressos em mediana.

## 10 DISCUSSÃO

No contexto das alergias alimentares, a literatura dispõe de diferentes modelos experimentais para alimentos sensibilizantes, como o ovo, leite e amendoim. Entretanto, observa-se uma escassez de modelos animais de alergia quando o alimento em questão é o camarão. Neste contexto, nosso trabalho objetivou o desenvolvimento de um modelo animal que pudesse ser empregado na investigação de novas imunoterapias, mas também possibilitasse a identificação de alterações fisiológicas, gastrointestinais e possível ocorrência do fenômeno de aversão alimentar.

Maiores demandas energéticas são observadas durante processos inflamatórios. Mudanças metabólicas como redução da massa de tecido adiposo epididimal, além de inflamação local e aumento de lipólise, foram identificadas por Dourado e colaboradores (2011) em animais alérgicos à OVA utilizando um modelo similar de indução de alergia alimentar. Tais mudanças foram acompanhadas por uma perda de peso significativa. Em nosso modelo também observamos perda de peso corporal significativa, embora mais discreta, em animais sensibilizados e desafiados por via oral quando comparados aos animais do grupo Sham (Figura 1B).

Alterações fisiológicas podem ser observadas em decorrência do quadro alérgico. Entretanto, tais reações de hipersensibilidade são caracterizadas, principalmente, pelo aumento da produção da IgE no contexto imunológico. Ao ligar-se ao receptor FCεRI presente em eosinófilos, mastócitos e basófilos, a IgE forma um complexo capaz de ativar domínios de imunoreceptores de ativação baseados em tirosina (ITAMs) e, por conseguinte, levar à uma sinalização que promove a liberação de cálcio intracelular e, em última instância, a degranulação de mediadores inflamatórios por mastócitos que medeiam as reações locais e sistêmicas observadas nas alergias (revisado em KUMAR et al., 2012).

Desta forma, acompanhamos a cinética de produção de anticorpos alérgeno-específicos nas diferentes etapas do nosso modelo. Como resultado, observamos que há produção significativa de anticorpos IgE anti-camarão já após a sensibilização e ocorre exacerbação desta produção em decorrência dos 14 dias de desafio oral (Figura 5B). Nossos dados corroboram com aqueles observados no estudo de Leung e colaboradores (2008), no qual foi observada alta produção de IgE em animais oralmente sensibilizados à tropomiosina Met e 1 do *Metapenaeus ensis* após a indução de anafilaxia. Utilizando um modelo similar ao presente estudo, Saldanha e colaboradores (2004) detectaram aumento de IgE alérgeno-específica após o desafio oral também por 14 dias de animais sensibilizados à OVA por via

subcutânea. Desta forma, esses dados demonstram que a produção de anticorpos alérgeno-específicos pode ser induzida de forma eficaz por meio da sensibilização subcutânea, seguida da exposição oral contínua a pequenas doses do alérgeno em questão.

Junto à IgE, a participação da IgG1 nas alergias alimentares permanece debatida na literatura. Entretanto, alguns trabalhos tem demonstrado o papel desta imunoglobulina na resposta humoral. Por exemplo, Miyajima e colaboradores evidenciaram a indução de reações anafiláticas IgG1-dependentes utilizando animais *knock out* para seus sítios de ligação, as cadeias  $\gamma$  dos receptores Fc $\gamma$ RIII (1997). Animais BALB/c sensibilizados com TM de camarão por via intraperitoneal demonstraram elevada produção de IgG1 específica após seguidos desafios intragástricos quando comparados a animais tratados (FU et al., 2017). Em nosso estudo, a produção de anticorpos da classe IgG1 anti-camarão foi detectada já após a sensibilização subcutânea (dia 13) e houve um aumento progressivo na produção do anticorpo até o final do desafio oral (dia 35) pelos animais do grupo sensibilizado e desafiado (Figura 6). Juntos esses dados evidenciam a participação da IgG1 na imunopatogênese da resposta humoral na alergia a camarão.

Ambas as classes de imunoglobulinas apresentaram elevada produção durante todos os pontos analisados. Observamos ainda que a produção de anticorpos IgG1 anti-camarão se manteve mais elevada em comparação à produção de IgE. Essa é uma observação presente em outros modelos de alergia a camarão e outros alérgenos (CAPOBIANCO et al., 2008; SALDANHA et al., 2004).

Sabe-se que o microambiente é determinante para o processo de mudança de classes de anticorpos em linfócitos B. Durante este processo, ocorre excisão de segmentos no *locus* de genes de cadeia pesada da porção constante pela ação de endonucleases para se obter um segmento que codifique uma classe específica de anticorpo. No contexto das alergias, as citocinas IL-4, IL5 e IL-13 podem induzir a troca de classe para os anticorpos IgE e IgG1. Entretanto, a região  $\epsilon$  é menor, menos frequente do que a  $\gamma$ 1 e mais distante da região doadora, o que, entre outros fatores, pode reduzir sua probabilidade de recombinação na troca de classes de anticorpos em células B (revisto em HACKNEY et al., 2009), o que pode justificar o observado em nosso modelo.

Apesar de detectadas no soro de animais do grupo sensibilizado, a IgE e IgG1 anti-camarão não aumentaram após a dose reforço, inclusive, retornando à detecção basal no caso da IgE. Tal observação demonstra que a exposição ao alérgeno durante a fase de desafio oral foi essencial para o aumento da produção desses anticorpos (Figuras 5B e 6).

A IgA é essencial para a imunidade de mucosas, representando a resposta humoral nestes sítios atuando na eliminação de agentes patogênicos e evitando o acesso destes ao epitélio intestinal. Frossard e colaboradores (2004), utilizando um modelo de anafilaxia à  $\beta$ -lactoglobulina, demonstraram que animais alérgicos apresentavam baixa titulação de IgA específica nas fezes em comparação a animais tolerantes. Por outro lado, um estudo utilizando um modelo de alergia semelhante ao aplicado em nosso estudo observou o aumento da produção de IgA total em animais alérgicos também à  $\beta$ -lactoglobulina (GOMES-SANTOS et al., 2015).

Aumento de IgA específica em fezes foi observado após sucessivas sensibilizações com TM de camarão *M. ensis* por via intragástrica (CAPOBIANCO et al., 2008). Em nossos achados, observamos que os animais do grupo sensibilizados e desafiados apresentaram aumento de IgA anti-camarão em lavado intestinal após 14 dias de desafio oral. Desta forma, pode ser sugerida a participação protetora da IgA na eliminação das proteínas alergênicas do camarão e contra os possíveis danos teciduais gerados. Sobretudo, a produção elevada de IgE e IgG1 sérica anti-camarão, além da produção de IgA anti-camarão em lavado intestinal demonstram que nosso protocolo de sensibilização foi eficaz na indução de resposta humoral sistêmica e local.

O microambiente, no que concerne às citocinas, desempenha papel fundamental na imunopatogênese da alergia. Por exemplo, a polarização do perfil Th2 com aumento da liberação de IL-4, IL-5 e IL-13, é capaz de induzir a troca de classes de anticorpos em células B e a produção de IgE específica, bem como a migração de eosinófilos. Em outros modelos de sensibilização oral à TM foi observada maior expressão e liberação de IL-4, IL-5, IL-13, IFN- $\gamma$  e IL-17 por esplenócitos reestimulados *in vitro* sugerindo a participação dessas citocinas a nível sistêmico (CAPOBIANCO et al., 2008; LEUNG et al., 2008). Atualmente, tem sido discutido a participação da IL-25 (também conhecida como IL-17E). Foi observado que animais que apresentavam superexpressão constitutiva de IL-25 e sensibilizados à OVA eram mais susceptíveis ao desenvolvimento de alergia alimentar e anafilaxia, enquanto animais *Il17rb<sup>-/-</sup>* eram mais resistentes. Além disso, em resposta à IL-25, houve produção de IL-5 e IL-13 principalmente por células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2s) intestinais, sugerindo a participação desta citocina nas alergias alimentares (LEE et al., 2016).

Tal polarização é observada também na mucosa intestinal, onde a captura e processamento de antígenos direcionados a tecidos linfoides, como os LNMs, pode diferenciar células T CD4<sup>+</sup> ao perfil Th2. Avaliando a administração de bactérias lácticas na indução de células T regulatórias, Fu e colaboradores (2017) observaram que o grupo de

animais alérgicos à TM de *Penaeus monodon*, mas que não foram tratados com tais bactérias apresentava maior produção de IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e IFN- $\gamma$  em LNMs após o desafio.

Em nosso trabalho, avaliamos a produção de citocinas nos LNMs nos dias 23 e 35, correspondendo 2 e 14 dias de desafio oral com proteínas do camarão, respectivamente. O grupo sensibilizado e desafiado apresentou maior produção das citocinas IL-5 no dia 23 (Figura 9D), enquanto esse mesmo grupo demonstrou aumento significativo de IL-10 em ambos os pontos de análise (Figura 9G-H). Nossos dados corroboram com os observados no estudo conduzido por Fu e seu grupo, demonstrando assim a participação dos LNMs na polarização do perfil Th2 na mucosa intestinal.

Por serem classificados como granulócitos, os eosinófilos requerem para o seu desenvolvimento e ativação fatores como o GM-CSF e as citocinas IL-3 e IL-5 (GOUNNI et al., 2000; LUTTMANN et al., 1996; ROBINSON et al., 2009). Por outro lado, a IL-10 é capaz de não somente inibir a apresentação de antígenos, mas também a produção de citocinas do perfil Th1, bem como citocinas do perfil Th2. Desta forma, o aumento de IL-5 nos LNMs sugere a promoção de inflamação tecidual alérgica com possível participação de eosinófilos, enquanto o aumento na liberação de IL-10 pode ter sido deflagrado como um mecanismo protetor.

Ainda no contexto das citocinas do perfil Th2, a análise de mRNA em animais alérgicos à TM demonstrou aumento da expressão de IL-14, IL-10 e IFN- $\gamma$  no jejuno e cólon, enquanto a expressão de IL-13 nesses animais foi detectada apenas no jejuno, sugerindo assim o jejuno como o sítio preponderante na polarização Th2 da alergia a camarão (CAPOBIANCO et al., 2008). Embora seja observado um discreto aumento na produção de IL-4 (Figura 8A), nossas análises do jejuno não revelaram diferenças dessas citocinas. Assim, novas análises que possibilitem o aumento do grupo amostral devem ser necessárias para confirmar esta observação.

A partir das observações dos parâmetros imunológicos já descritos, analisamos ainda as alterações histopatológicas em nosso modelo para investigar as características da inflamação tecidual na mucosa intestinal. Os eosinófilos estão normalmente presentes nas mucosas, entretanto, sabe-se que nas alergias alimentares mediadas por IgE, essas células podem infiltrar intensamente a lâmina própria intestinal atraídas por fatores quimiotáticos, como a CCL11. Infiltrado eosinofílico foi observado no duodeno e jejuno de animais alérgicos à Met e 1 de camarão após 24 e 72 horas de desafio intragástrico (LAM et al., 2015).

Após 14 dias de desafio pela ingestão contínua do extrato de camarão, os animais do grupo sensibilizado e desafiado apresentaram maior contagem de eosinófilos na lâmina



própria intestinal (Figura 10B). Resultados semelhantes foram encontrados em um modelo de alergia à OVA utilizando a via subcutânea para sensibilização (SALDANHA et al., 2004). Este estudo observou que, o infiltrado eosinofílico em animais alérgicos era mais proeminente nas etapas iniciais do modelo e tempos iniciais do desafio oral. Assim, tais parâmetros podem ser utilizados em novas análises a fim de avaliar melhor a participação desse perfil celular em nosso modelo.

Os eosinófilos possuem diferentes grânulos secretórios, a proteína básica principal 1 (MBP-1) e 2 (MBP-2), a proteína catiônica eosinofílica (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) e a peroxidase eosinofílica (EPO), que desempenham um papel crucial na defesa contra helmintos. Entretanto, tem sido demonstrada a citotoxicidade da MCP, ECP e EPO ao epitélio. Um estudo *in vitro* apontou alteração no epitélio respiratório superior e estase ciliar causada pela MCP (HISAMATSU et al., 1990). Citotoxicidade ao epitélio intestinal também já foi apontada (revisto em ROTHENBERG et al., 2001).

A exposição oral contínua ao alérgeno induziu encurtamento de vilos e criptas na mucosa intestinal de animais alérgicos em nosso modelo (Figura 11B). Após a ingestão contínua de whey por 7 dias, animais alérgicos à  $\beta$ -lactoglobulina apresentaram não somente infiltrado eosinofílico na mucosa intestinal, mas também apresentaram redução da extensão de vilos (GOMES-SANTOS et al., 2015). Desta forma, tais alterações morfométricas na mucosa intestinal poderiam estar associadas ao recrutamento de eosinófilos decorrente da exposição prolongada a proteínas alergênicas e degranulação dos mesmos.

Outras alterações histopatológicas podem ser observadas no quadro de alergia alimentar. A hipersecreção de muco pelas células caliciformes da mucosa intestinal pode ser notada em decorrência da ação de mediadores inflamatórios liberados por mastócitos, como a histamina (WHITE, 1990).

Animais alérgicos apresentaram aumento, porém não significativo, da produção de muco no jejuno em nosso modelo (Figura 12B), enquanto hiperplasia de células caliciformes no duodeno foi observada em animais alérgicos a TM 24 e 72 horas após o desafio (LAM et al., 2015). Juntos, esses dados demonstram que o microambiente inflamatório deflagrado pela resposta humoral e celular na alergia a camarão pode resultar ainda na hipersecreção de muco, visto que a rede por ele formada no lúmen representa uma barreira para acesso de alérgenos ao epitélio intestinal.

Fatores imunológicos parecem influenciar não somente nas alterações imunopatológicas, mas também na expressão de marcadores neurais de nocicepção, como o c-fos (CASTEX et al., 1995), que pode ser traduzido no fenômeno comportamental da aversão

alimentar. Este fenômeno foi observado na alergia à OVA (CARA et al., 1994). Em nosso estudo, animais alérgicos consumiram menos líquido durante a fase de desafio oral pela ingestão de solução contendo o extrato de camarão. Entretanto, estes são dados preliminares e requerem repetições e novas análises, como o teste de preferência alimentar.

A partir dos dados observados, análises posteriores ainda são necessárias para confirmação de determinados dados. Entretanto, pode-se observar que os protocolos alicados no presente estudo puderam reproduzir os parâmetros fisiológicos e imunopatológicos observados na alergia a camarão.

## 11 PRINCIPAIS ACHADOS

- Perda de peso corporal em animais alérgicos;
- Produção elevada de IgE e IgG1 séricas anti-camarão em animais alérgicos;
- Aumento de sIgA anti-camarão no lavado de animais alérgicos;
- Produção de IL-5 e IL-10 em células de LNMs reestimuladas *in vitro*;
- Presença de maior número de eosinófilos na mucosa intestinal em animais alérgicos;
- Encurtamento de vilos e criptas na mucosa de animais alérgicos;

## 12 CONCLUSÃO

Através dos protocolos de sensibilização e desafio oral propostos em nosso modelo, observamos elevadas dosagens dos anticorpos IgE, IgG1 específicos no soro de animais alérgicos, além da produção de sIgA, IL-5, IL-10 e alterações histopatológicas na mucosa intestinal. Desta forma, pode-se inferir que o modelo de alergia alimentar desenvolvido em nosso trabalho reproduziu as características imunopatológicas observadas na alergia alimentar a camarão.

Além da fácil reprodutibilidade deste modelo, acreditamos que seu delineamento experimental torna possível a avaliação de abordagens terapêuticas e também a investigação de fenômenos comportamentais. Por conseguinte, o novo modelo proposto pode contribuir para a elucidação da imunopatogênese na alergia a camarão, um alérgeno alimentar ainda pouco estudado. Entretanto, estudos posteriores ainda são necessários para investigar dados ainda inconclusivos.

### 13 PERSPECTIVAS

- Avaliar parâmetros imunológicos e histopatológicos nos dias 2, 23 e 29;
- Identificar a população de células T reg e efectoras na lâmina própria do intestino;
- Avaliar a manutenção da permeabilidade intestinal no quadro alérgico;
- Investigar o padrão de consumo de animais alérgicos por meio de ensaios comportamentais de preferência alimentar;
- Desenvolver abordagens baseadas em nanotecnologia para a indução de imunomodulação na alergia a camarão.

## REFERÊNCIAS

- AFIFY, S. M.; PALI-SCHÖLL, I. Adverse reactions to food: the female dominance – A secondary publication and update. **World Allergy Organization Journal**, v. 10, n. 1, p. 43, 2017.
- AUN, M. V. *et al.* Sensitization by subcutaneous route is superior to intraperitoneal route in induction of asthma by house dust mite in a murine mode. **Einstein**, v. 13, n. 4, p. 560–566, 2015.
- AYUSO, R. *et al.* Myosin light chain is a novel shrimp allergen , Lit v 3. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 4, p. 795–802, 2008.
- BAKDASH, G. *et al.* Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 2, p. 265–278, 2015.
- BALDAUF, K. J. *et al.* Cholera Toxin B: One Subunit with Many Pharmaceutical Applications. **Toxins**, p. 974–996, 2015.
- BARTNIKAS, L. M. *et al.* Epicutaneous sensitization in IgE-dependent intestinal mast cell expansion and food anaphylaxis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 2, p. 451–460, 2013.
- BASSO, A. S. *et al.* Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, p. 69–77, 2003.
- BENEDÉ, S.; BERIN, M. C. Mast cell heterogeneity underlies different manifestations of food allergy in mice. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2018.
- BENOR, S.; ETKIN, S.; KIVITY, S. Epicutaneous Exposure to Peanut Oil Induces Systemic and Pulmonary Allergic Reaction in Mice. p. 1–5, 2019.
- BERIN, M. C. *et al.* Role of TLR4 in allergic sensitization to food proteins in mice. **Allergy**, v. 61, p. 64–71, 2006.
- BIRCHENOUGH, H. *et al.* The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. **Immunological Reviews**, v. 260, n. 1, p. 8–20, 2015.

BØGH, K. L.; MADSEN, C. B. Food allergens : Is There a Correlation between Stability to Digestion and Allergenicity? **Critical reviews in food science and nutrition**, n. March, p. 37–41, 2015.

BRANDTZAEG, P. Food allergy : separating the science from the mythology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. July, p. 380–400, 2010.

BROUGH, H. A. *et al.* Atopic dermatitis increases the effect of exposure to peanut antigen in dust on peanut sensitization and likely peanut allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 164- 170.e4, 2014.

BRUNNER, R. *et al.* Aluminium per se and in the anti-acid drug sucralfate promotes sensitization via the oral route. **Allergy**, v. 64, p. 890–897, 2009.

BRUNNER, R.; JENSEN-JAROLIM, E.; PALI-SCHÖLL, I. The ABC of clinical and experimental adjuvants — A brief overview. **Immunology Letters**, v. 128, p. 29–35, 2010.

BURKS, A. W. *et al.* Current perspectives ICON : Food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 4, p. 906–920, 2012.

CAPOBIANCO, F. *et al.* Oral sensitization with shrimp tropomyosin induces in mice allergen-specific IgE , T cell response and systemic anaphylactic reactions. **International Immunology**, v. 20, n. 8, p. 1077–1086, 2008.

CAPOBIANCO, F. *et al.* Oral sensitization with shrimp tropomyosin induces in mice allergen-specific IgE , T cell response and systemic anaphylactic reactions. **International Immunology**, v. 20, n. 8, p. 1077–1086, 2018.

CASSANI, B. *et al.* Gut-tropic T Cells that Express Integrin  $\alpha 4\beta 7$  and CCR9 are Required for Induction of Oral Immune Tolerance in Mice. **Gastroenterology**, v. 141, n. 6, p. 2109–2118, 2011.

CASTEX, N. *et al.* c-fos expression in specific rat brain nuclei after intestinal anaphylaxis : involvement of receptors and vagal afferent fibers. **Brain Research**, v. 688, p. 149–160, 1995.

CHEHADE, M.; MAYER, L.; YORK, N. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 1, p. 3–12, 2005.

CUNNINGHAM, A. L. *et al.* M-Cells Contribute to the Entry of an Oral Vaccine but Are Not Essential for the Subsequent Induction of Protective Immunity against *Francisella tularensis*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–14, 2016.

DEVIDAS, J. M. *et al.* Food Allergy in Children: An Overview. **The Indian Journal of Pediatrics**, p. 1–6, 2017.

DOURADO, L. P. A. *et al.* Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation , systemic metabolic alterations and weight loss in mice. **Cellular Immunology**, v. 270, n. 2, p. 198–206, 2011.

ERMUND, A. *et al.* Studies of mucus in mouse stomach , small intestine , and colon . I . Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer ' s patches. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 5, p. G341–G347, 2013.

ESPINOSA, E.; VALITUTTI, S. New roles and controls of mast cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 50, p. 39–47, 2018.

FISCHER, R. *et al.* Oral and Nasal Sensitization Promote Distinct Immune Responses and Lung Reactivity in a Mouse Model of Peanut Allergy. **American Journal of Pathology**, v. 167, n. 6, p. 1621–1630, 2005.

FROSSARD, C. P.; HAUSER, C.; EIGENMANN, P. A. Antigen-specific secretory IgA antibodies in the gut are decreased in a mouse model of food allergy. **American Academy of Allergy, Ashtma ansd Immunology**, v. 114, n. 2, p. 377–382, 2004.

FU, L. *et al.* Lactic acid bacteria-specific induction of CD4 + Foxp3 + T cells ameliorates shrimp tropomyosin- induced allergic response in mice via suppression of mTOR signaling. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1987, p. 1–14, 2017.

GAO, H. *et al.* Development and validation of a mouse-based primary screening method for testing relative allergenicity of proteins from different wheat genotypes. **Journal of Immunological Methods**, v. 464, p. 95–104, 2019.

GETTIS, A. Food Sensitivities and Psychological Disturbance : a Review \*. **Nutrition and Health**, v. 6, n. 3, p. 135–146, 1989.



- GOMES-SANTOS, A. C. *et al.* Hydrolyzed whey protein prevents the development of food allergy to b -lactoglobulin in sensitized mice. **CELLULAR IMMUNOLOGY**, p. 1–7, 2015.
- GOUNNI, A. S. *et al.* Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression , differentiation , and survival of human eosinophils. **Blood**, v. 96, n. 6, p. 2163–2172, 2000.
- GUO, L. *et al.* Prophylactic and therapeutic efficacy of the epitope vaccine CTB-UA against *Helicobacter pylori* infection in a BALB / c mice model. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1437–1444, 2012.
- GUPTA, R. S. *et al.* The Prevalence, Severity, and Distribution of Childhood Food Allergy in the United States. **Pediatrics**, v. 128, n. Supplement, p. S10–S11, 2015.
- HACKNEY, J. A. *et al.* **Chapter 5 - DNA Targets of AID: Evolutionary Link Between Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 101
- HALTEREN, A. G. S. VAN *et al.* IgE and mast cell responses on intestinal allergen exposure : A murine model to study the onset of food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 99, n. 1, p. 94–99, 1997.
- HAMAD, A.; BURKS, W. Oral tolerance and allergy. **Seminars in Immunology**, n. August 2016, p. 1–8, 2017.
- HAN, H. *et al.* Thymic stromal lymphopoietin – mediated epicutaneous inflammation promotes acute diarrhea and anaphylaxis Find the latest version : Thymic stromal lymphopoietin – mediated epicutaneous inflammation promotes acute diarrhea and anaphylaxis. **The Journal of Clini**, v. 124, n. 12, p. 5442–5452, 2014.
- HAN, H. *et al.* IL-33 promotes gastrointestinal allergy in a TSLP-independent manner. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 2, p. 394–403, 2018.
- HARRER, A. *et al.* *Campylobacter jejuni* enters gut epithelial cells and impairs intestinal barrier function through cleavage of occludin by serine protease HtrA. **Gut Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 1–16, 2019.
- HAZEBROUCK, S. *et al.* Allergic Sensitization to Bovine Beta-Lactoglobulin : Comparison between Germ-Free and Conventional BALB / c Mice. **International Archieves of Allergy and Immunology**, v. 148, n. 65, p. 65–72, 2009.

HE, P.; ZOU, Y.; HU, Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 477–488, 2015.

HISAMATSU, K. *et al.* Cytotoxicity of human eosinophil granule major basic protein to human nasal sinus mucosa in vitro. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 86, n. 1, p. 52–63, 1990.

INAMINE, T.; SCHNABL, B. Immunoglobulin A and liver diseases. **Journal of Gastroenterology**, p. 1–10, 2017.

KAMIJO, S. *et al.* Subcutaneous Allergic Sensitization to Protease Allergen Is Dependent on Mast Cells but Not IL-33: Distinct Mechanisms between Subcutaneous and Intranasal Routes. **The Journal of Immunology**, v. 196, p. 3559–3569, 2016.

KOPLIN, J. J. *et al.* The impact of family history of allergy on risk of food allergy: A population-based study of infants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 11, p. 5364–5377, 2013.

KUMAR, S. *et al.* Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 4, p. 432–439, 2012.

KUMAR, S. *et al.* Allergenicity assessment of Buchanania lanzan protein extract in Balb / c mice. **International Immunopharmacology**, v. 63, p. 170–182, 2018.

LAM, Y. F. *et al.* Gastrointestinal Immune Response to the Shrimp Allergen Tropomyosin : Histological and Immunological Analysis in an Animal Model of Shrimp Tropomyosin Hypersensitivity. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 167, p. 29–40, 2015.

LEE, A.; SHEK, L. Food allergy in Singapore: opening a new chapter. **Singapore Medical Journal**, v. 55, n. 05, p. 244–247, 2014.

LEE, J. *et al.* IL-25 and CD4+ Th2 cells enhance ILC2-derived IL-13 production that promotes IgE-mediated experimental food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 4, p. 1216–1225, 2016.

LERNER, A.; MATTHIAS, T. Autoimmunity Reviews Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 6, p. 479–489, 2015.

LEUNG, A. S. Y.; WONG, G. W. K.; TANG, M. L. K. Food Allergy in the developing world. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 1, p. 76- 78.e1, 2014.

LEUNG, P. S. C. *et al.* Induction of Shrimp Tropomyosin- Specific Hypersensitivity in Mice. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 147, p. 305–314, 2008.

LONG, F. *et al.* Effects of combined high pressure and thermal treatments on the allergenic potential of shrimp ( *Litopenaeus vannamei* ) tropomyosin in a mouse model of allergy. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 119–124, 2015.

LOPATA, A. L.; HEHIR, R. E. O.; LEHRER, S. B. Shellfish allergy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 40, p. 850–858, 2010.

LUTTMANN, W. *et al.* Activation of human eosinophils by IL-13. Induction of CD69 surface antigen, its relationship to messenger RNA expression, and promotion of cellular viability. **Journal of immunology**, v. 1557, p. 1678–1683, 1996.

MABBOTT, N. A. *et al.* Microfold ( M ) cells : important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 4, p. 666–677, 2013.

MAHESH, P. A. *et al.* Prevalence of food sensitization and probable food allergy among adults in India: The EuroPrevall INCO study. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 71, n. 7, p. 1010–1019, 2016.

MARKASZ, L. *et al.* Diminished DEFA6 Expression in Paneth Cells Is Associated with Necrotizing Enterocolitis. **Gastroenterology Research and Practice**, 2018.

MASUDA, K. *et al.* Bactericidal Activity of Mouse alpha-Defensin Cryptdin-4 Predominantly Affects Noncommensal Bacteria. **Journal of Innate Immunity**, v. 0021, n. 3, p. 315–326, 2011.

MAZZOCCHI, A. *et al.* The role of nutritional aspects in food allergy: Prevention and management. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 1–12, 2017.

MEYER-HOFFERT, U. *et al.* Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. **Gut**, v. 57, n. 6, p. 764–771, 2008.

MIYAJIMA, I. *et al.* Systemic Anaphylaxis in the Mouse Can Be Mediated Largely through IgG1 and FcgRIII. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 5, p. 901–914, 1997.

MIYAKE, K.; KARASUYAMA, H. Emerging roles of basophils in allergic inflammation. **Allergology International**, v. 66, n. 3, p. 382–391, 2017.

MOAWAD, F. J. Eosinophilic Esophagitis Incidence and Prevalence Eosinophilic esophagitis Epidemiology Prevalence Incidence. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of NA**, p. 1–11, 2017.

NAGATANI, K. *et al.* Antigen-specific regulatory T cells are detected in Peyer ' s patches after the interaction between T cells and dendritic cells loaded with orally administered antigen. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 416–422, 2011.

NAKAMURA, K. *et al.* Paneth cell  $\alpha$ -defensins and enteric microbiota in health and disease. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 35, n. 2, p. 57–67, 2016.

NOWAK-WEGRZYN, A.; SZAJEWSKA, H.; LACK, G. Food allergy and the gut. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 4, p. 241–257, 2017.

NWARU, B. I. *et al.* Prevalence of common food allergies in Europe : a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, p. 992–1007, 2014.

ORGEL, K.; KULIS, M. A Mouse Model of Peanut Allergy Induced by Sensitization Through the Gastrointestinal Tract. **Type 2 Immunity: Mthods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1799, p. 39–47, 2018.

PAJNO, G. B. *et al.* EAACI Guidelines on allergen immunotherapy: IgE-mediated food allergy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, n. September, 2017.

PANG, K. A. *et al.* Food allergy and allergic rhinitis in 435 asian patients - A descriptive review. **Medical Journal of Malaysia**, v. 72, n. 4, p. 215–220, 2017.

PELAIA, C. *et al.* Severe eosinophilic asthma: From the pathogenic role of interleukin-5 to the therapeutic action of mepolizumab. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 3137–3144, 2017.

POULOS, L. M. *et al.* Trends in hospitalizations for anaphylaxis, angioedema, and urticaria in Australia, 1993-1994 to 2004-2005. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 4, p. 878–884, 2007.

RAJAGOPAL, D.; GANESH, A.; SUBBA, P. V. Modulation of Allergen-Specific Immune Responses to the Major Shrimp Allergen , Tropomyosin , by Specific Targeting to Scavenger Receptors on Macrophages. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 121, p. 308–316, 2000.

RAPHAEL, I. *et al.* Cytokine T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. v. 74, p. 5–17, 2015.

REESE, G.; AYUSO, R.; LEHRER, S. B. Tropomyosin : An Invertebrate Pan-Allergen. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 119, p. 247–258, 1999.

REZENDE, R. M.; WEINER, H. L. Seminars in Immunology History and mechanisms of oral tolerance. **Seminars in Immunology**, n. July 2016, 2017.

ROBINSON, A. J. *et al.* Fluvastatin and lovastatin inhibit granulocyte macrophage – colony stimulating factor-stimulated human eosinophil adhesion to inter-cellular adhesion molecule-1 under flow conditions Clinical & Experimental Allergy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 1866–1874, 2009.

ROTHENBERG, M. E. *et al.* Gastrointestinal eosinophils. **Immunological Reviews**, v. 179, p. 139–155, 2001.

SAKAI, F. *et al.* Lactobacillus gasseri SBT2055 Induces TGF- b Expression in Dendritic Cells and Activates TLR2 Signal to Produce IgA in the Small Intestine. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

SALDANHA, J. C. S. *et al.* A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 809–816, 2004.

SALERNO-GONCALVES, R. *et al.* Free and complexed-secretory immunoglobulin A triggers distinct intestinal epithelial cell responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 185, n. 3, p. 338–347, 2016.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S116–S125, 2010.

SILVA, L. A. *et al.* Adult Food Allergy Prevalence : Reducing Questionnaire Bias. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 920, p. 261–264, 2017.

SOLÉ, D. *et al.* Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar : 2018 - Parte 1 - Etiopatogenia , clínica e diagnóstico . Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 2, n. 1, p. 7–38, 2018.

SPAHN, T. W. *et al.* Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer ' s patches. **European Journal of Immunology**, p. 1109–1113, 2002.

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

SRIVASTAVA, K. D. *et al.* Investigation of peanut oral immunotherapy with CpG/peanut nanoparticles in a murine model of peanut allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 2, p. 536- 543.e4, 2016.

TAN, J. *et al.* Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Article Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. **CellReports**, v. 15, n. 12, p. 2809–2824, 2016.

URISU, A. *et al.* Japanese Guideline for Food Allergy 2014. **Allergology International**, v. 63, n. 3, p. 399–419, 2014.

VANCAMELBEKE, M.; VERMEIRE, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert Review Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 9, p. 821–834, 2017.

VIEIRA, M. C. *et al.* A survey on clinical presentation and nutritional status of infants with suspected cow ' milk allergy. 2010.

VILLABLANCA, E. J. Retinoic acid-producing dcs and gut-tropic FOXP3+ regulatory T cells in the induction of oral tolerance. **OncoImmunology**, v. 2, n. 2, p. 3–5, 2013.

WALSH, G. M. Biologics for asthma and allergy. **Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 25, n. 3, p. 231–234, 2017.

WAWRZYNIAK, M.; O'MAHONY, L.; AKDIS, M. Role of Regulatory Cells in Oral Tolerance. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 9, n. 2, p. 107–115, 2017.

WEHKAMP, J.; STANGE, E. F. Paneth ' s disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 4, n. 5, p. 523–531, 2010.

WEINER, H. L. *et al.* Oral Tolerance. **Immunology Reviews**, v. 206, p. 232–259, 2005.

WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: Armed for battle. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 478–494, 2014.

WHITE, M. V. The role of histamine in allergic diseases. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 86, n. 4, p. 599–605, 1990.

WOO, C.; BAHNA, S. L. Not all shellfish “ allergy ” is allergy ! **Clinical and Translational Allergy**, v. 1, n. 3, p. 1–7, 2011.

XU, C. *et al.* Claudin-7 gene knockout causes destruction of intestinal structure and animal death in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 5, p. 584–599, 2019.

YANAGIHARA, S. *et al.* Uromodulin – SlpA binding dictates *Lactobacillus acidophilus* uptake by intestinal epithelial M cells. **International imm**, v. 29, n. 8, p. 357–363, 2018.

YU, W.; FREELAND, D. M. H.; NADEAU, K. C. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. **Nature Publishing Group**, 2016.

YUE, F. *et al.* A Comparative Encyclopedia of DNA Elements in the Mouse Genome. **Nature**, v. 515, n. 7527, p. 355–364, 2014.

## ANEXOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 021/2018

PROJETO: "Desenvolvimento de modelo experimental de alergia alimentar a camarão"

COORDENADORA: Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongos Balb/c	348

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IGM) em 12/03/2019, e tem validade até 12/03/2021.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the IGM-FIOCRUZ at 03/12/2019, being valid until 03/12/2021.

**SOLICITAMOS O ENVIO DOS RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL NOS PRAZOS ESTABELECIDOS ABAIXO:**

Vigência: 12/03/2019 a 12/03/2021

Relatório parcial: 13/03/2020;

Relatório Final: 13/03/2021

Salvador, 12 de março de 2019.

*Karine A. Damasceno*  
**KARINE ARAÚJO DAMASCENO**  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

*Karine Araújo Damasceno*  
 Coord. da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ





# Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View

Rafael Tibúrcio<sup>1,2</sup>, Sara Nunes<sup>1,2</sup>, Ivanéia Nunes<sup>1,2</sup>, Mariana Rosa Ampuero<sup>1,2</sup>, Icaro Bonyek Silva<sup>1,2</sup>, Reinan Lima<sup>1,2</sup>, Natalia Machado Tavares<sup>1,2,3\*</sup> and Cláudia Brodskyn<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil, <sup>2</sup> Federal University of Bahia, Salvador, Brazil, <sup>3</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) iii Instituto de Investigação em Imunologia, São Paulo, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Daniela Santoro Rosa,  
Federal University of São Paulo, Brazil

### Reviewed by:

Laila Gutierrez Kobeh,  
National Autonomous University of  
Mexico, Mexico

Mayda Gursel,

Middle East Technical University,  
Turkey

Nahid Ali,

Indian Institute of Chemical Biology  
(CSIR), India

Jude Ezeh Uzonna,

University of Manitoba, Canada

### \*Correspondence:

Natalia Machado Tavares

natalia.tavares@bahia.fiocruz.br

Cláudia Brodskyn

brodskyn@bahia.fiocruz.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Antigen Presenting Cell Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 28 September 2018

**Accepted:** 28 January 2019

**Published:** 22 February 2019

### Citation:

Tibúrcio R, Nunes S, Nunes I, Rosa  
Ampuero M, Silva IB, Lima R,  
Machado Tavares N and Brodskyn C  
(2019) Molecular Aspects of Dendritic  
Cell Activation in Leishmaniasis: An  
Immunobiological View.  
Front. Immunol. 10:227.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.00227

Dendritic cells (DC) are a diverse group of leukocytes responsible for bridging innate and adaptive immunity. Despite their functional versatility, DCs exist primarily in two basic functional states: immature and mature. A large body of evidence suggests that upon interactions with pathogens, DCs undergo intricate cellular processes that culminate in their activation, which is paramount to the orchestration of effective immune responses against *Leishmania* parasites. Herein we offer a concise review of the emerging hallmarks of DCs activation in leishmaniasis as well as a comprehensive discussion of the following underlying molecular events: DC-*Leishmania* interaction, antigen uptake, costimulatory molecule expression, parasite ability to affect DC migration, antigen presentation, metabolic reprogramming, and epigenetic alterations.

**Keywords:** dendritic cell activation, *leishmania*- dendritic cell interaction, parasite uptake, dendritic cells migration, metabolism of infection, epigenetic modifications

## INTRODUCTION

### Important Considerations in Leishmaniasis

Leishmaniasis comprises a collection of neglected protozoan infections caused by unicellular organisms belonging to the genus *Leishmania* spp. According to the current World Health Organization estimation, 12 million people are affected by leishmaniasis and 350 million are at risk of infection worldwide (1–3).

The pathology of this disease results in a wide spectrum of clinical manifestations not only associated with the biological aspects of *Leishmania* species and strains, but also with host immune responses. Interestingly, it has been recently suggested that the clinical progression of the disease is influenced by several other factors, ranging from the host's nutritional status to the presence of RNA viruses in the *Leishmania* species (4–7).

These manifestations are dichotomically divided into Visceral (VL) and Tegumentary Leishmaniasis (TL). The former is characterized by the dissemination of parasites to visceral organs, while the latter branch includes Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL), a frequent form of TL in which ulcerated skin lesions are common. It has been abundantly reported that a modest fraction of LCL cases can evolve into mucosal lesions, which is termed as Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL). Additionally, TL can also present as a variety of clinical manifestations, such as Disseminated Cutaneous Leishmaniasis (DCL), which comprises multiple nodular ulcerated lesions, whereas Diffuse Leishmaniasis (DL) is characterized by scattered non-ulcerated lesions (5, 8, 9).

*Leishmania* transmission occurs when infected sandflies inoculate the promastigote forms of the parasite into the host skin. Additionally, the arthropod vector also introjects various parasite-associated compounds, along with other molecules found in salivary secretions, which collectively exert immunomodulatory effects on the host defense (10). The early events of infection are characterized by the engagement of different phagocytic cells (e.g., tissue-resident macrophages, dermal DCs, and neutrophils) in the recognition and uptake of parasites (8). Emerging pieces of evidence indicate that neutrophils are one of the first cell types to interact with *Leishmania* parasites (11). Subsequently, depending chiefly on the *Leishmania* species, infected neutrophils become apoptotic and can be phagocytized by macrophages (12). Accordingly, parasite transmission to these cells becomes facilitated, leading to the subsequent differentiation of promastigotes into intracellular replicative amastigotes that occurs in the interior of macrophages phagolysosomes. Additionally, the literature upholds that dendritic cells (DCs) are also key elements in the early interaction with *Leishmania* parasites, thusly these are thought to be a decisive in the outcome of infection (13). Indeed, the complex interactions occurring between DCs and parasites may lead to long-term *Leishmania* replication, or to the establishment of an effective immune response against this pathogen.

## The Immunobiology of Dendritic Cells

DCs are competent antigen presenting cells (APC) that take center stage in both the induction of immunological responses and the generation of tolerance (14). In the context of inflammation and infection, DCs are responsible for orchestrating the connection between the innate and adaptive axis of immunity. Interestingly, despite the significant importance of DCs in several immunological processes, these cells do not comprise a homogeneous population, and are further classified into distinct subtypes according to origin, differential expression of surface proteins, cell localization, and immunological function (15).

### Dendritic Cell Origin

It has been long hypothesized that DCs stem from a bone-marrow resident population of hematopoietic stem cells (HSC), which eventually give rise to both granulocyte-macrophage progenitors (GMP), and multi-lymphoid progenitors (MLP), the precursors of all DC subsets (16). Subsequent stages in DC ontogeny involve precursors, such as CD14<sup>+</sup> monocytes, circulating blood myeloid DCs (mDCs), or plasmacytoid DCs, from which all myeloid and lymphoid DCs are derived. It is noteworthy that mDC precursors comprise a heterogeneous lineage of cells predetermined to develop into CD1<sup>+</sup> or CD141<sup>+</sup> DCs. Additionally, human mDCs express conventional myeloid markers, including CD11c, CD11b, CD13, and CD33 (17). In mice, these cell populations are often referred to as conventional DCs. Interestingly, it has been well-elucidated that in humans, both CD14<sup>+</sup>DCs and inflammatory DCs are derived from classical monocytes, which justifies the fact that these cells present greater similarity to monocytes and macrophages than other DC subsets (18).

## Dendritic Cell Subtypes

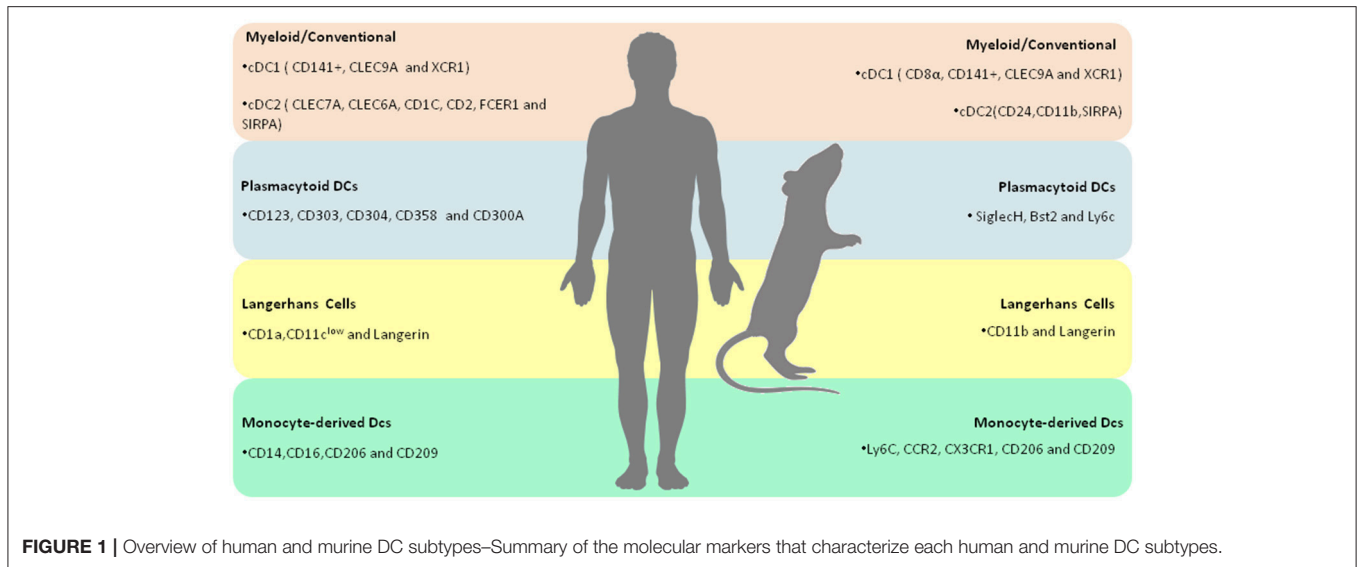
### Myeloid/Conventional Dendritic Cells

Typically, myeloid DCs are classified into two subtypes: cDC1 and cDC2. The human cDC1 subset is identified by the expression of CD141 (BDCA-3), while the murine equivalent is subdivided into a splenic CD8 $\alpha$ -bearing population and another CD141<sup>+</sup> DC subset residing in non-lymphoid tissues (19–21). Human and mouse cDC1 express Clec9A (C-type lectin domain family 9-member A) and XCR1 (a chemokine receptor), which provide specificity for their biological activities in combating invasive microorganisms and tumors (22). In regard to the expression of transcription factors, cDC1s are characterized as producing both BAFT3 (Basic leucine zipper transcription factor) and IRF8 (Interferon regulatory factor 8). It has been long suggested that cDC1s have the capacity to effectively induce the activation of CD8<sup>+</sup> T cells via the process of antigen cross-presentation, as well as produce copious amounts of IL-12p70 (23, 24).

cDC2s express both common myeloid markers, such as CD11b, CD11c, CD13, and CD33, in addition to other antigens more recently identified in these cells: CD1c, CD2, Fc $\epsilon$ R1, and SIRPA (15). cDC2s comprise a large portion of the human conventional DCs found in blood and tissues. The immunological function of cDC2s is granted by a myriad of immune receptors, including Toll-like receptors (TLRs) 2,4,5,7 and 8, C-type lectins, including Dectin-1 and –2 as well as Nod- and RIG-like receptors (Figure 1 and Table 1) (15).

### Plasmacytoid Dendritic Cells

Plasmacytoid DCs (pDCs) comprise a group of Type I interferon (IFN)-producing cells whose distinguishing feature is their participation in the response against viral infection. Interestingly, human pDCs were first identified as a population of cells found in the peripheral blood and tonsils. With respect to morphology, blood pDCs are mainly recognized by their resemblance to lymphocytes, whereas IL-3/CD40L-cultured pDCs possess a microscopic appearance similar to mDCs (22, 25). Typically, human pDCs are characterized by the unique expression of both cell-surface receptors and transcription factors. Of note, the distinctly expressed receptors include both conventional and other recently identified markers. The former includes CD123 (IL-3R), CD303 (BDCA-2), and CD304 (BDCA-4), while the later includes Fc $\epsilon$ R1, DR6 (CD358), and CD300A. As previously mentioned, these cells also exhibit distinctive TF expression, including E2-2, IRF8, and IRF4 (26, 27). It is particularly interesting to note that, in contrast to cDCs, human pDCs do not express any conventional myeloid markers, e.g., CD11b, CD11c, CD13, and CD33 (15). Murine pDCs express siglecH (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin), bst2 and Ly6C. SiglecH is a surface receptor responsible for binding glycans presenting sialic acids residues. Interestingly, Blasius et al demonstrated that siglecH regulates type I IFN production in a DAPI2-dependent manner (28). Bst2, an integral membrane protein associated with lipid rafts, has also been associated with IFN-mediated responses against viral infection (29). Additionally, several reports have demonstrated that both murine and human pDCs rely on TLR7 and TLR9 expression for IFN- $\alpha$  production



and immunity against viruses (30). Interestingly, mounting evidence have demonstrated that pDCs also play a role in the establishment of peripheral tolerance by delivering antigens to the lymph nodes (**Figure 1** and **Table 1**) (31–33).

#### Langerhans Cells

A distinct lineage of epidermis-resident DCs, known as Langerhans cells (LC), mainly characterized by the expression of C-type lectin Langerin and CD1a, grant organisms immunity against several skin pathogens, such as fungi and bacteria (34). Uniquely, LCs possess Langerin-replete organelles, known as Birbeck granules. Although their main function has not been well-elucidated, the depletion of these granules has not been determined to mitigate the process of antigen presentation (**Figure 1** and **Table 1**) (35).

#### Monocyte-Derived Dendritic Cells

Monocytes constitute a very plastic group of mononuclear phagocytic cells long thought to be the source of macrophages and DCs. Several reports suggest that monocytes possess both pro- and anti-inflammatory functional specializations which are, in turn, chiefly regulated by tissue environments (36). Human monocytes comprise two subsets of peripheral blood circulating cells mainly characterized by the expression of CD14 and CD16, whereas murine monocytes can be identified by the presence of Ly6C, CCR2, and CX3CR1 (22). Of note, in the presence of inflammation, blood-circulating monocytes invade tissues, subsequently differentiating into monocyte-derived Dendritic cells (moDCs). It has been long established that *in vitro* moDCs are obtained by stimulating monocytes with GM-CSF and IL-4 (37). These cells possess a broad functional repertoire, including lymphocyte activation and the production of cytokines, such as IL-6, TNF-α, IL-12, IL-23, and IL-1 (15). Inflammatory DCs (iDCs) express both CD14 and CD16, in addition to CD206, CD209 (DC-SIGN), and CD163. Importantly, a novel tumor necrosis factor (TNF)-and inducible nitric oxide synthase

(iNOS)-producing DCs (TIP-DCs) subset has been reported to exert a pivotal role in the course of several infectious diseases, including experimental leishmaniasis (**Figure 1** and **Table 1**) (38).

#### Adaptive Immunity Gatekeepers: The Role of DCs and T Cells Activation

In an immature state, DCs are typically located in peripheral tissues and express low levels of major histocompatibility complex II (MHC II) and costimulatory molecules. These cells possess highly efficient cellular machinery for antigen recognition and capture (39). In response to signals associated with infection and inflammation, such as the presence of pathogens and other damaging elements, DCs undergo intricate molecular processes that culminate in the acquisition of a mature functional state, whose main characteristic is the ability to induce both naïve CD4<sup>+</sup> T cell activation and proliferation via antigen presentation (40). Most importantly, the signaling process that induces DC maturation involves the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by way of a sophisticated surface and intracellular molecular detection system consisting of pattern recognition receptors (PRRs) and downstream signaling (41).

After interaction with antigen-bearing DCs, naïve CD4<sup>+</sup> T cells are capable of differentiating into two main functional phenotypes: T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) profiles. It should be noted that this dichotomy is a rather simplistic representation of the Th cell repertoire. In recent decades, several studies have identified other Th subtypes, including Th17 (whose hallmark is the production of IL-17 in response to viruses, bacteria and fungi), Th9 (a producer of IL-9 and IL-10, and also a key element in humoral interplay with B cells), Th follicular (characterized by the production of IL-4 and IL-2 (also related to supporting B cell-mediated immunity), and T regulatory (Tregs), involved in the promotion of self-tolerance (42). Since T regs exert a prevalent immunological role in the regulation of other immune cells, their populations

**TABLE 1** | Summary of the hallmarks of *Leishmania* induced DC activation.

Leishmania-prompted effects in DC activation	DC subsets	Parasite species	Experimental model	Functional aftermath	References
TLR9 activation	BMDCs	<i>L. infantum</i>	C57BL/6	Increases Neutrophil chemoattraction and IL-12 production	Sacramento et al. (53)
		<i>L. major</i>		Enhances IFN- $\gamma$ production and cytotoxicity in NK cells	Liese et al. (54)
TLR2/TLR4 activation	BMDCs	<i>L. major</i>	BALB/c	Upregulation of CD80, CD86, and MHC-II expression	Komai-Koma et al. (49)
TLR2 activation	BMDCs	<i>L. braziliensis</i>	C57BL/6	Decreases DC activation and IL-12 production	Vargas-Inchaustegui et al. (50)
Engagement of MyD88 signaling pathway	BMDCs	<i>L. braziliensis</i>	C57BL/6	Enhances IL-12 production	Vargas-Inchaustegui et al. (50)
A2B receptor activation	BMDCs	<i>L. amazonensis</i>	C57BL/6J	Decreases of CD40 expression and IL-12 production	Figueiredo et al. (64)
Increased expression of HIF1 $\alpha$	Murine splenic DCs	<i>Leishmania donovani</i>		Decreases production of IL-12, parasite survival, limited generation of Th1 cells	Hammami et al. (111)
Up-regulation of MHC class II, CD40, CD54, CD80, and CD86	Epidermal Langerhans cells-like DC	<i>L. major</i> amastigotes	C57BL/6	Increase production of IL-12	Von Stebut et al. (78)
Did not change the expression of CD80, CD54, and MHC II molecules	BMDCs	<i>L. mexicana</i> amastigotes	C57BL/6	Did not alter the production of IL-12	Bennett et al. (79)
Lower levels of MHCII, CD86, and CD40 expression	BMDCs	<i>L. amazonensis</i>	C57BL/6	Declined T-cell proliferation	Figueiredo et al. (65)
Low levels of CD40 expression	BMDCs	<i>L. donovani</i>	BALB/c	T regulatory cells expansion and disease intensification	Martin et al. (71)
Fail in producing IL-12 through a CD40-dependent manner	BMDCs	<i>L. amazonensis</i>	BALB/c	Increase in IL-4 levels	Qi et al. (74)
Down-regulation of CD80 and up-regulation of CD86	Human moDCs	<i>L. amazonensis</i>	<i>in vitro</i>	Increase in IL-6 during DC differentiation	Favali et al. (75)
Alterations in DC migration		<i>L. major</i>		Inhibition of DCs motility	Steigerwald et al. (98); Ponte-Sucre et al. (100)

BMDC, bone marrow -derived dendritic cell; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL-12, interleukine-12; NK, natural killer cells; TLR, toll-like receptors; HIF1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ .

heterogeneity and functional specializations are of particular interest. Commonly, T regs are dichotomically classified as “natural” (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells) or inducible T regs (a group that includes the IL-10-secreting Treg1 cells, the Th3 population that produces both TGF-b and IL-10, and foxp3<sup>+</sup> Tregs). A more detailed description of the diversity and functions of T regulatory cells can be found elsewhere (43).

### DC as Modulators of the Adaptive Immune Response in Leishmaniasis

The biological features of pathogens and activation PRRs as well as the underlying signaling processes, are determinant in the specific cytokines secreted by activated DCs, which in turn are one of the key element in the polarization of Th cell subtypes (44).

In general, Th1 cells produce pro-inflammatory cytokines, such as Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ), which lead to Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) production by innate immune cells, promoting a resistance profile against *Leishmania*. The hallmark of IFN- $\gamma$  leishmanicidal activity relies on the classical

activation of infected macrophages, leading to increased production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), which subsequently culminate in intracellular *Leishmania* elimination (13). By contrast, the Th2 profile is characterized by the production of IL-4, IL-5, and IL-13, which are mostly associated with enhanced arginase activity accompanied by the alternative activation of macrophages, parasite survival and proliferation, and pronounced susceptibility (13). Additionally, in recent decades, the contributions of the Th17 subtype on the progression of leishmaniasis has become a growing concern. The hallmark of the Th17 profile is the production of IL-17, and the subsequent recruitment of neutrophils to the site of inflammation. As reviewed elsewhere, the joint actions of this subtype paradoxically play a dual role in leishmaniasis, since these cells are not only responsible for the elimination of parasites, but also for the exacerbation of the inflammatory process and tissue damage (45). Crosstalk between *Leishmania* and DCs via the stimulation of various cellular apparatuses and the engagement of multiple signaling processes culminates in phenotypic and functional alterations in DCs. Such modifications

are imperative for proper cytokine production and the activation of Th cells, which induce immune events that can result in parasite control (46).

## DENDRITIC CELL-LEISHMANIA INTERACTION

### Leishmanial Signals Prompt DCs Activation

One of the biological functions of DCs is to recognize molecular patterns associated with pathogens (PAMPs). To this end, DCs employ PRRs that interact with a variety of PAMPs expressed by distinct species of *Leishmania*. The activation of DCs can be substantially modulated by these interactions, which greatly influence the immune response against *Leishmania* (46).

### The DC Recognition Apparatus: the Role of PRRs in Leishmania-DC Interplay

Toll-like receptors (TLRs) are germline-encoded immune receptors that play a pivotal role in the immunosurveillance function of DCs. These receptors are subdivided into 10 families in humans (TLR1 to TLR10) and 12 families in mice (TLR1 to TLR9, and TLR11 to TLR13) (47), and are expressed on either the cell membrane surface or in intracellular compartments. TLRs possess leucine-rich repeats that serve as molecular docking sites for ligand-receptor interactions. Upon ligand-mediated activation, TLRs undergo an intricate dimerization process that activates a variety of biochemical pathways, culminating in the transcription of several inflammatory genes. Of note, it has been proposed that TLRs may be central elements in the establishment of immune homeostasis, as these cells participate in the delicate balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory responses (48). However, despite their relevance in the recognition of several pathogens and the induction of immune responses, only TLR2, TLR4, and TLR9 have been described in the mediation of DC-*Leishmania* interaction.

It has been demonstrated that the neutralization of TLR2 and TLR4 decreases the expression of molecules involved in the process of antigen presentation during *L. major* infection, which suggests that both receptors may be key players in the establishment of effective responses against *Leishmania* (49). Interestingly, a study documented that TLR2 deficiency increases DC activation, leading to IL-12 production during *L. braziliensis* infection. On the other hand, a deficiency of MyD88 results in lower levels of DC activation and IL-12 production, both essential elements in mounting protective immunity against *L. braziliensis* (50).

TLR2 also recognizes Lipophosphoglycan (LPG), a surface molecule conserved in all *Leishmania* species that is considered an important virulence factor, especially due to its role in the modulation of immune cell activation (51). When LPG of *L. mexicana* is recognized by the TLR2 of moDCs, the expression of MHC-II and CD86 as well as the secretion of IL-12p70, are enhanced. Subsequently, the interaction of DCs with NKT cells culminates in higher IFN- $\gamma$  production. This cellular interaction could possibly contribute to the protective state observed during the acute phase of *L. mexicana* infection (52).

TLR9 has been described as important in DC activation as well as in the production of neutrophil chemoattractant during *L. infantum* infection in C57BL/6 mice (53). Additionally, TLR9 is also required for the induction of IL-12 production in mouse bone marrow-derived DCs (BMDCs) infected with *L. major*, leading to both IFN- $\gamma$  expression and cytotoxicity enhancement in NK cells (54). Collectively, these findings contribute to the understanding of how the intracellular TLRs in DCs mediate the stimulation of other immune cells that promote parasite eradication.

Different *Leishmania* species can mitigate the signaling pathways of CTLRs to promote parasite proliferation and survival. Iborra et al. showed that *L. major* releases a soluble protein ligand of Mincle (Macrophage inducible Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin receptor) that targets an inhibitory ITAM signaling pathway, resulting in the impairment of DC activation and migration (55). In a similar vein, Zimara et al. experimentally demonstrated the importance of CTLRs in mounting an adaptive immune response against *L. major*. These researchers observed an increased expansion of Dectin-1<sup>+</sup> DCs following *L. major* inoculation in C57BL/6 and BALB/c mice as well as in the peripheral blood of CL patients. Additionally, experiments with BMDM stimulated with a Dectin-1 agonist revealed both high levels of DC maturation and the expansion of CD 4T cells (56). Collectively, these findings serve to indicate the significance of both CTRL signaling and the physical interactions between these cells and pathogens in the promotion of an effective immune response.

### Mechanisms of Leishmania Uptake

In addition to their importance as major mediators of the innate and adaptive branches of immunity, DCs are also recognized for their highly efficient phagocytic activity (57). These cells actively collect antigens in their surroundings, and couple subsequent antigen processing with epitope exhibition via antigen presentation platforms—the major histocompatibility complex molecules (58).

Typically, the mechanisms of capturing pathogens involve specific receptor-ligand interactions as well as the mobilization of cytoskeleton elements that promotes the internalization of parasites (59). Several studies have proposed that the uptake of *Leishmania* by DCs occurs in a parasite life form-dependent manner, since DCs preferentially phagocytose IgG-coated amastigotes. In fact, amastigotes internalization involves the participation of Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RIII (60). It has been suggested that GP63, a protease found on leishmanial membranes, mediates the conversion of C3b into its inactive form, iC3b. Subsequently, iC3b binds to CR3, resulting in the adherence of leishmania to the surface membrane of DCs (60).

Argueta-Donohué et al. demonstrated that DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), a surface receptor mainly found in DCs, mediates a more efficient internalization rates of *L. mexicana* promastigotes after 3 h of *in vitro* infection (52). Moreover, these authors also confirmed that the experimental neutralization of DC-SIGN significantly reduces the rates of infection in moDCs. These intriguing findings illustrate

the fundamental role of DC-SIGN in several instances of *Leishmania*-DC interplay, ranging from the initiation of parasite phagocytosis to discrimination between *Leishmania* life cycle stages (52). Additionally, mounting evidence indicates that DC-SIGN also recognizes *L. pifanoi* surface molecules, contributing to the subsequent uptake of parasite amastigotes (61). Furthermore, *L. major* and *L. donovani*-infected moDCs exhibit reduced surface expression of DC-SIGN in contrast to uninfected cells, with this immunomodulation being accentuated in cells stimulated with excreted-secreted antigens (ESA) of both *Leishmania* species (62). Together, these studies suggest that the consequences of the DC-SIGN-mediated crosstalk between *Leishmania* and host DCs may have profound biological consequences in *Leishmania* infection.

### The Effects of Purinergic Receptors on DC Activation During *Leishmania* Infection

Purinergic receptors play a significant role in the recognition of damage-associated molecular pattern (DAMPs), including the detection of extracellular Adenosine Triphosphate (ATP), a potent pro-inflammatory trigger of immune responses (63). In pathophysiological contexts, ATP is converted into Adenosine (ADO) via the action of the ectonucleotidases CD39 and CD73, and the accumulation of ADO in the extracellular milieu results in the activation of its A2 receptor. This phenomenon has been observed during *L. amazonensis* infection, which was accompanied by the suppression of DC functions via decreased rates of CD40 expression and IL-12 production. Additionally, the activation of the A2b receptor of DCs decreases the capacity of these cells to stimulate T cell proliferation and the production of IFN- $\gamma$ , leading to an insufficient protective immune response, a peculiarity of *L. amazonensis* infection (64). While increases in CD39 and CD73 expression are also observed in *L. braziliensis* and *L. major* infection, A2b receptor activation has not been detected. Interestingly, it has been proposed that the main evasion mechanism employed by these two species is reduced expression of the molecules involved in antigen presentation, which includes the exploitation of the IL-10 receptor (IL-10R). Notwithstanding, this evasion mechanism employed by *L. braziliensis* and *L. major* is followed by the upregulation of CD40, which may suggest that it does not prevent T cell activation (65).

Together, these findings provide evidence that early interactions between DCs and *Leishmania* can have profound effects on disease outcome. Several of the mechanisms of immune evasion employed by *Leishmania* include the mitigation of DC immunobiological functioning via the exploitation of different receptors and the disruption of downstream signaling pathways. In addition, recent data indicate that the impairment of DC activation is directly associated with the enhancement of parasite survival and persistence in hosts.

## CO-STIMULATORY MOLECULES AND ANTIGEN PRESENTATION

Following the recognition and internalization of pathogens, DCs migrate to secondary lymphoid organs to present processed

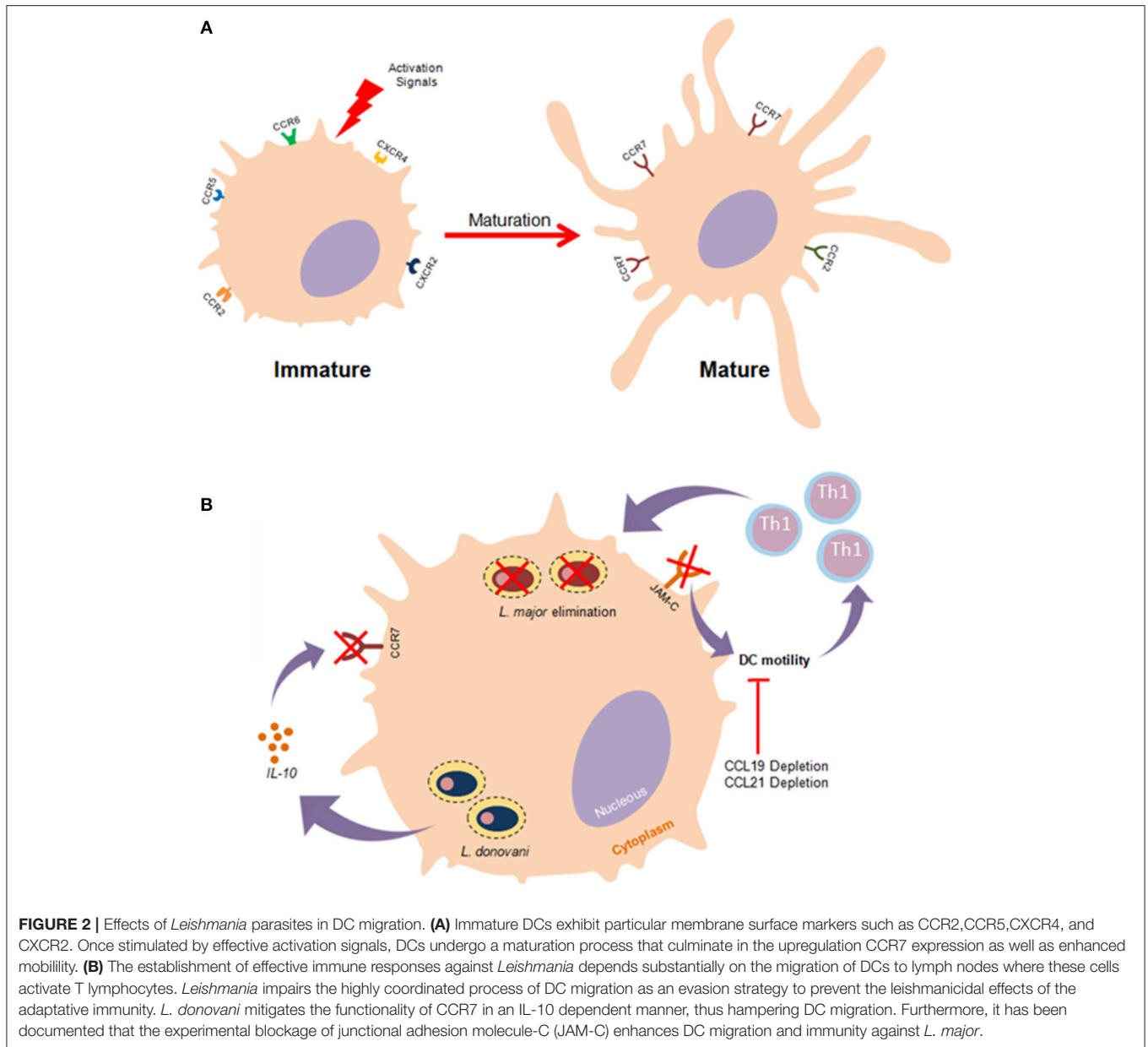
antigens to naïve T cells (66). Subsequently, the adaptive immune response becomes initiated via the presentation of small peptides through either MHC class I or class II molecules. Basically, the former class mediates the recognition of endogenous peptides by cytotoxic CD8+ T cells, while the latter is involved in the presentation of exogenous peptides to CD4+ T helper cells. Notably, the process of antigen fragmentation is of paramount importance to allow for proper antigen presentation, since MHCII molecules only present peptides with a specific number of amino acids (67). Alternatively, DCs are also capable of mobilizing MHC I molecules in order to display exogenously derived-antigens, a process known as cross-presentation (68). Additionally, co-stimulatory molecules (such as CD40, CD80, and CD86) are essential to effective antigen presentation, by providing secondary signals for T cell expansion and differentiation (69).

Several species of *Leishmania* employ distinct strategies to regulate the expression of co-stimulatory molecules, which dampens the process of antigen presentation (70). Accordingly, the modulation of co-stimulatory molecules can be associated not only with enhanced parasites survival and growth, but also with subsequent disease outcome.

Figueiredo et al. experimentally demonstrated that *L. amazonensis* induced lower levels of MHCII, CD86 and CD40 expression in BMDCs (bone marrow -derived DCs) from C57BL/6 mice, resulting in a decline in T-cell proliferation (65). Furthermore, the adoptive transfer of BMDCs expressing low levels of CD40 was associated not only with T regulatory cell expansion, but also with an increase in *L. donovani* burden in BALB/c mice (71). It has been also shown that CD40 and its ligand are important for the development of resistance against *L. major* infection (72, 73). Hai Qi et al. reported that *L. amazonensis* amastigotes mitigated IL-12 production in a CD40-dependent manner in a BALB/c infection model, which was followed by an increase in levels of IL-4 (74). Subsequently, amastigote-infected DCs were observed to be able to activate pathogenic CD4+ T cells, which could potentially lead to exacerbated *Leishmania* proliferation and the progression of pathogenesis (72). Thus, emerging evidence suggests that reduced CD40 expression could possibly facilitate *Leishmania* infection.

The importance of CD80 and CD86 expression has been highlighted in the establishment of early immune responses. For instance, the infection of human moDCs with *L. amazonensis* downregulates the expression of CD80 and upregulates the expression of CD86, which is followed by a decrease in IL-6 production during DC differentiation (75). Although CD86 possibly takes center stage in this context, the equivalent expression of other costimulatory molecules can lead to the early production of IFN- $\gamma$  or IL-4 during infection by *L. major* depending on the experimental model (76). Together, these results reinforce the contribution of these molecules in the production of different cytokines by properly stimulated T cells.

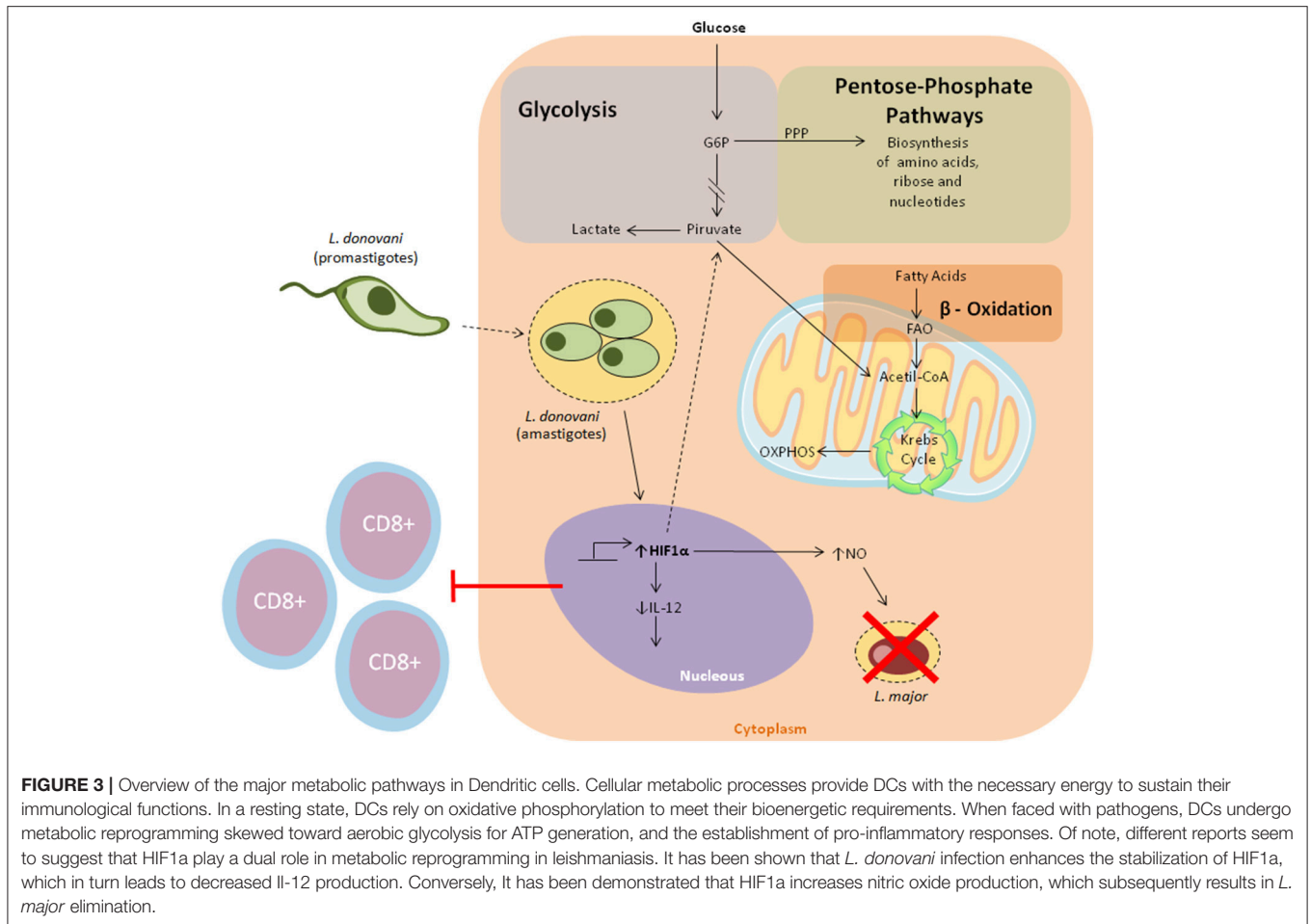
Several species of *Leishmania* can modulate antigen processing and the expression of MHC II molecules (77). DCs infected with *L. major* amastigotes not only upregulate the expression of several molecules involved in antigen presentation,



such as MHC class II, CD40, CD54, CD80, and CD86, but also exhibit elevated rates of IL-12 production. It should be noted that only the amastigote forms of these parasites were capable of inducing this increase in *L. major*-infected DCs (78). Conversely, *L. mexicana* amastigotes do not promote increased expression of CD80, CD54, and MHC II molecules in BMDCs, suggesting that these discrepancies in the immune response by DCs occur in a species-specific manner (79).

Interestingly, a recent study by Resende et al. reported a dichotomic response between *L. infantum*-infected and non-infected DCs. In this study, the authors observed that uninfected DCs expressed higher levels of IL-12p40 and other co-stimulatory molecules, which enabled DCs to elicit appropriate CD4<sup>+</sup> T cell immunoprotective responses, whereas infected DCs expressed lower levels of co-stimulatory molecules and high IL-10

production (80). This finding suggests that *L. infantum*-infected DCs and their uninfected counterparts exert antagonistic roles in the activation and polarization of T cells, mechanistically revealing a novel evasion strategy employed by this species. Along the same lines, a study carried out by Carvalho et al. demonstrated that, in contrast to *L. braziliensis*-infected DCs, only uninfected DCs upregulate the expression of MHC II, CD80, and CD86. Interestingly, it was also observed that despite enhancing the expression of such molecules, *L. braziliensis*-infected DCs produced higher levels of TNF- $\alpha$  in response to stimulation with LPS. These findings corroborate the hypothesis that uninfected and *Leishmania*-infected DCs can act conjointly, yet distinctly, to promote immune responses against the parasite, since uninfected DCs can lead to enhanced T cell activation, while the production of TNF- $\alpha$  by infected DCs may



contribute to the control of parasite proliferation at the site of infection (81).

Paradoxically, DCs are also able to present exogenous antigens through MHC-I, with significant consequences on the activation of CD8 T cells (82). It has been reported that this phenomenon, also known as cross-presentation, is of great importance to the expansion of antigen-specific cytotoxic CD8 T cells, which are responsible for eliciting an effective immune responses against *Leishmania*. Accordingly, in this context, DC figure as the most potent inducers of IFN- $\gamma$  production by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Brewig et al. demonstrated that, in experimental leishmaniasis, the priming of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell relies essentially on the activity of distinct DC subtypes (83). Indeed, it was reported that the depletion of Langerin<sup>+</sup> DCs was associated with the reduced proliferation of *L. major*-specific CD8<sup>+</sup> T cells. As a consequence, the amount of primed CD8 T cells found at the site of infection and in lymph nodes was significantly reduced (83). In a similar vein, a study conducted by Ashok et al revealed the importance of cross-priming DCs in the effective constraint of *L. major* infection. It was shown that Batf3<sup>-/-</sup> mice (which lack CD8<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup> DCs) exhibited increased susceptibility to *L. major* (84). Furthermore, a study by Lemos et al explored the function of CD8<sup>+</sup> DCs in antigen presentation during *L.*

*major* infection in a murine model that restricted the expression of MHC-II to CD8a<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> DCs. Notably, it was observed that CD8a<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> DCs could efficiently restrain *L. major* infection by eliciting the effective constraint of parasites by CD4 T cells (85).

Numerous studies have revealed that the underlying mechanisms of antigen processing depend not only on the constitutive proteasome or the immunoproteasome, but also on the involvement of alternative molecular machineries of cytosolic degradation, such as tripeptidyl peptidase II (TPPII) and nardilysin (86–88). TPPII is a known eukaryotic peptidase related to several cellular processes, such as antigen processing, apoptosis and cell division. However, it should be noted that TPPII activation occurs mainly when proteasome function becomes compromised (89).

Although little is known about the detailed mechanisms of cytosolic endopeptidases, such as Nardilysin, their role seems to be indispensable in the generation of some specific epitopes (90). The importance of alternative antigen processing machinery should be further investigated in the context of leishmaniasis.

Although the participation of CD8<sup>+</sup> T cells in *Leishmania* infection is still controversial, growing evidence indicates that



protective responses rely substantially on the effective dendritic cell-mediated activation of cytotoxic lymphocytes (86, 87, 91, 92).

## LEISHMANIA AFFECTS THE MIGRATION OF DCS

Immature DCs strategically reside in peripheral tissues, where they exercise their main function as immune guards. As discussed previously, these sentinels specialize in antigen uptake via their apparatus to internalize foreign particles. In peripheral tissues, PAMP-mediated activation confers an immunostimulatory phenotype to DCs, characterized by the upregulation of molecules also associated with an enhanced migratory ability. Subsequently, DCs migrate toward lymph nodes, where they exchange information with naïve T cells via the antigen presentation process (93).

In order to ensure precise mobilization, the migration of DCs needs to be highly coordinated and regulated by particular recruitment signals (94). The primary mechanisms of DC migration involve the cooperative action of chemokines and their receptors. Chemokine receptors are typically transmembrane proteins associated with G-proteins whose activation triggers signaling pathways responsible for the promotion of cell mobilization (95). Some evidence seems to suggest that DC subtypes exhibit diverse chemokine receptors, conferring subtype-specific migration dynamics. Commonly, immature DCs express CCR2, CCR5, CCR6, CXCR2, and CXCR4 in a predominant fashion. Upon pathogen-mediated activation, DCs undergo a maturation processes that culminates in the crucial upregulation of CCR7 (**Figure 2A**) (96).

By way of evolution, protozoan parasites developed strategies to mitigate DC functioning by inhibiting access to T cells, thusly restricting the establishment of efficient adaptive immune responses. In the context of flagellate protozoan infection, successful DC migration to draining lymph nodes (dLNs) is substantially dependent on both CCR2 and CCR7 expression (97). Several studies have reported that *Leishmania* can induce a reduction in rates of DC migration (98, 99). *In vitro* studies have elucidated the roles of both soluble products and membrane constituents, such as *L. major* LPG, in the inhibition of DC motility (98, 100). The underlying molecular mechanisms of *Leishmania*-induced mitigation of DC motility remain elusive. A recent study suggested that *L. major* exploits the junction adhesion molecule C (JAM-C) to reduce DC migration rates, and demonstrated that the experimental blockage of this molecule enhanced the immunological response against this parasite (101). An investigation in an animal model exhibited an *L. major*-susceptible phenotype, suggesting that the depletion of CCR2 culminated in poor DC migration and a skewed Th2 immune response (102). Furthermore, infection with *L. donovani*, a viscerotropic species, promotes an inhibition in the expression of CCR7 mediated by IL-10 production, which ensures that DCs will not be able to reach splenic regions, thereby contributing to the progression of visceral leishmaniasis (**Figure 2B**) (103). Another *in vivo* study associated CCL19/CCL21 deficiency with a reduction in both DC mobility and resistance to *L. donovani* infection (103).

Collectively, the current data suggest that efficacious DC migration is essential to the establishment of effective responses against *Leishmania* parasites. The literature clearly indicates that these parasites employ a plenitude of strategies to prevent DCs from activating T cells during the course of several clinical forms of leishmaniasis. Deciphering the complex dynamics surrounding the *Leishmania*-mediated impairment of DC mobilization will provide new insights into the evasion mechanisms employed by these parasites and elucidate their effects on the immunopathogenesis of leishmaniasis.

## METABOLIC REPROGRAMMING DURING DC ACTIVATION

Faced with infection and inflammation, DCs must cope with increasing catabolic and anabolic demands via the redirection of a plethora of metabolic pathways to support their major immune functions (104). Typically, the metabolism of inactive DCs is characterized by the central roles of oxidative phosphorylation (OXPHOS) and fatty acid oxidation (FAO), for energy supply and biomolecule synthesis, respectively (105). New evidence suggests that, after the initiation of PAMP-mediated activation, DCs undergo metabolic reprogramming, relying substantially on anaerobic glycolysis for ATP production, a process characterized by the conversion of pyruvate into lactate. Despite being ineffective in the generation of ATP, glycolysis can be coupled with several anabolic pathways, such as fatty acid synthesis and the pentose phosphate pathway, allowing for the biosynthesis of other macromolecules, namely lipids and nucleotides, respectively (106, 107). In this scenario, DCs exhibit low rates of oxidative phosphorylation. These deviations in the metabolic repertoire of DCs are prominent regulators of immune responses, as metabolic enzymes and their products can influence the establishment of inflammation (108).

In this inflammatory milieu, immune cells are poorly supplied with oxygen and nutrients for their metabolic processes, leading to the activation of hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) (109). Recently, HIF-1 $\alpha$  was recognized as a major player in the induction of glycolysis, since it promotes the transcription of several enzymes involved in glucose metabolism (110). Nevertheless, its expression was shown to favor *L. donovani* infection in a model of chronic visceral leishmaniasis, as increased HIF-1 $\alpha$  expression in murine splenic DCs was correlated with decreased IL-12 production, allowing parasite survival through limited Th1 cell expansion (111). In consonance with these observations, Hammani et al. demonstrated the importance of the IRF-5/HIF1 $\alpha$  transcription factor axis in the impairment of DCs to promote the expansion of CD8<sup>+</sup> T cells (112). Conversely, *in vitro* experiments showed that HIF1 $\alpha$  enhanced both *Leishmania major* elimination and levels of NO production in macrophages (**Figure 3**) (113). Together, while these observations suggest that HIF1 $\alpha$  downregulates some DC functions against *Leishmania*, this effect may be cell-specific. Moreover, a recent study highlighted the contribution of two energetic sensors, Sirtuin 1 (SIRT1) and AMP-activated protein kinase (AMPK), to *L. infantum* survival and replication in macrophages (114).

Given the relevance of the metabolic processes of DCs in supporting the immunobiological functioning of these cells, it is unsurprising that an increasing number of studies have contemplated this interesting topic in recent years. Nevertheless, few studies have attempted to investigate the role of DC immunometabolism in *Leishmania* infection. Currently, the molecular players involved in metabolic reprogramming and the mechanistic basis of immunometabolism continue to remain elusive in the context of leishmaniasis.

## EFFECTS OF EPIGENETIC MODIFICATIONS ON DC DEVELOPMENT AND COURSE OF INFECTION

Interactions between host cells and parasites prompt several alterations in a range of biological processes occurring in DCs, including epigenetic alteration via modified gene expression. This phenomenon is not dependent on DNA sequence modifications and includes DNA methylation, histone modifications, chromatin remodeling and regulation by non-coding RNAs (115–117).

The activation of transcription factors is one of the major regulatory elements occurring in epigenetic alterations (118, 119). PU.1 transcription factor has been described as an essential TF for the development and functioning of DCs, as evidenced by the expression of FLT3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSFR) and macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSFR) (119, 120). It has been demonstrated that PU.1 is also involved in the regulation of basal expression of DC-SIGN, which in turn influences the repertoire of antigen uptake in DCs (121). PU.1 can also regulate the promoter region of genes CD80 and CD86 in murine bone marrow-derived DCs, leading to the overexpression of these co-stimulatory molecules, thereby enhancing DC migration and the activation of T cells (122).

In face of tissue damage or infection, several modifications in the histones alter chromatin conformation, leading to changes in the expression profile of critical genes in specific DC subsets (123, 124). Tserel et al. showed by GWAS (Genome-wide Association Study) that histone modifications can influence the processes of differentiation, phagocytosis and antigen presentation in moDCs through the upregulation of surface marker expression and chemokine production. Similar findings have been reported in macrophages, reinforcing the similarity of epigenetic mechanisms in the development of both cell types (125).

The importance of epigenetic changes in DCs infected by *Leishmania* remains unclear. However, *L. donovani* infection in macrophages was shown to lead to changes in the methylation

of CpGs sites via parasite exosome secretion, which may enhance parasite replication and survival (126). Furthermore, *L. amazonensis* infection promoted epigenetic modifications at the IL-10 locus in murine macrophages, which activated ERK1/2 pathways and promoted parasite survival (127). In addition, this parasite species can upregulate histone deacetylases (HDACs), which enhances iNOS promoters in macrophages, thus favoring infection (128).

Taken together, in addition to playing a crucial role in the development of DCs, these findings seem to suggest that interactions between *Leishmania* and immune cells can trigger epigenetic modifications that may alter the course of the infection. However, much remains to be elucidated with regard to this topic.

## CONCLUSION REMARKS

DCs are relevant immunological agents in the concatenation of innate and adaptive branches of immunity. Here, we have attempted to integrate recent advances in molecular aspects of the immunobiological functioning of DCs with the current state of understanding regarding the pathogenic mechanisms of leishmaniasis. Although a large body of evidence supports the central role of DC activation in the establishment of responses against *Leishmania* parasites, the overwhelming complexity of *Leishmania*-DC interactions impedes the attainment of a comprehensive understanding of the molecular processes involved in DC activation. Further clarification is required to unravel the interplay between different DC subtypes and different species and life cycle stages of *Leishmania* as well as how parasites subvert particular aspects of DC activation in the effort to successfully establish infection. Finally, an enhanced understanding of the fundamental molecular events underlying DC activation will lead to the expansion of our current base of knowledge surrounding leishmaniasis as well as offer new therapeutic targets.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RT and SN designed the review and wrote the manuscript. IN, MR, IS, and RL assembled the review and wrote the manuscript. NM and CB supervised the work, designed the review, and wrote the manuscript.

## FUNDING

This review was supported by CNPq, CAPES, and Fapesb. These financial agencies are responsible for the payment of fellowships of CB, RT, SN, IN, IS, RL, and NM.

## REFERENCES

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* (2012) 7:e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* (2004) 27:305–318. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004
- WHO. *Who Technical Report Series Control of the Leishmaniases* (2016).

4. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* (2011) 9:604–15. doi: 10.1038/nrmicro2608
5. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis. current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop.* (2008) 105:1–9. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.08.003
6. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-marraco S, Schutz F, Zangger H, et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Learn Instr.* (2011) 331:775–8. doi: 10.1126/science.1199326
7. Gatto M, Abreu MM de, Tasca KI, Simão JC, Fortaleza CMCB, Pereira PCM, et al. Biochemical and nutritional evaluation of patients with visceral leishmaniasis before and after treatment with leishmanicidal drugs. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2013) 46:735–40. doi: 10.1590/0037-8682-0198-2013
8. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Publ Gr.* (2016) 16:581–92. doi: 10.1038/nri.2016.72
9. De Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of leishmania braziliensis infection. *Front Immunol.* (2012) 3:145. doi: 10.3389/fimmu.2012.00145
10. Oliveira F, de Carvalho AM, de Oliveira CI. Sand-fly saliva-leishmania-man: the trigger trio. *Front Immunol.* (2013) 4:375. doi: 10.3389/fimmu.2013.00375
11. Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-leishmania interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol.* (2012) 2:59. doi: 10.3389/fcimb.2012.00059
12. Laskay T, Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes – trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes ? (2003) 11:210–4. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00075-1
13. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol.* (2012) 2:83. doi: 10.3389/fcimb.2012.00083
14. Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol.* (2007) 37:53–60. doi: 10.1002/eji.200737400
15. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* (2018) 154:3–20. doi: 10.1111/imm.12888
16. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol.* (2010) 11:585–93. doi: 10.1038/ni.1889
17. Collin M, MCGovern N. Human dendritic cell subsets. (2013) 140:22–30. doi: 10.1111/imm.12117
18. Sprangers S, Vries TJD, Everts V. Monocyte heterogeneity: consequences for monocyte-derived immune cells. *J Immunol Res.* (2016) 2016:1475435. doi: 10.1155/2016/1475435
19. Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c<sup>+</sup> CD141<sup>+</sup> cells as homologues of mouse cd8<sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med.* (2010) 207:1273–81. doi: 10.1084/jem.20100348
20. Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre C-A, Ventre E, et al. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med.* (2010) 207:1283–92. doi: 10.1084/jem.20100223
21. Haniffa M, Shin A, Bigley V, MCGovern N, Teo P, See P, et al. Human tissues contain CD141<sup>hi</sup> cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103<sup>+</sup> nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* (2012) 37:60–73. doi: 10.1016/j.immuni.2012.04.012
22. Reynolds G, Haniffa M. Human and mouse mononuclear phagocyte networks: a tale of two species? *Front Immunol.* (2015) 6:330. doi: 10.3389/fimmu.2015.00330
23. den Haan JMM, Lehar SM, Bevan MJ. Cd8<sup>+</sup> but not Cd8<sup>-</sup> dendritic cells cross-prime cytotoxic t cells *in vivo*. *J Exp Med.* (2000) 192:1685–96. doi: 10.1084/jem.192.12.1685
24. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Hisp Sacra* (2012) 64:661–719. doi: 10.1038/ni.1724
25. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells : recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol.* (2011) 29:163–83. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101345
26. Cisse B, Caton ML, Lehner M, Maeda T, Scheu S, Locksley R, et al. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* (2008) 135:37–48. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.016
27. Ghosh HS, Cisse B, Bunin A, Lewis KL, Reizis B. Continuous expression of the transcription factor E2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* (2010) 33:905–16. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.023
28. Blasius AL, Cella M, Maldonado J, Takai T, Colonna M. Brief report siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. (2017) 107:2474–7. doi: 10.1182/blood-2005-09-3746.supported
29. Douglas JL, Gustin JK, Viswanathan K, Mansouri M, Moses AV, Fröh K. The great escape: viral strategies to counter BST-2/ tetherin. *PLoS Pathog.* (2010) 6:e1000913. doi: 10.1371/journal.ppat.1000913
30. Fuchsberger M, Hochrein H, O’Keeffe M. Activation of plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* (2005) 83:571–7. doi: 10.1111/j.1440-1711.2005.01392.x
31. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol.* (2006) 7:652–62. doi: 10.1038/ni1333
32. de Heer HJ, Hammad H, Soullié T, Hijdra D, Vos N, Willart MAM, et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med.* (2004) 200:89–98. doi: 10.1084/jem.20040035
33. Kohli K, Janssen A, Förster R. Plasmacytoid dendritic cells induce tolerance predominantly by cargoing antigen to lymph nodes. *Eur J Immunol.* (2016) 46:2659–68. doi: 10.1002/eji.201646359
34. Ginhoux F, Merad M. Ontogeny and homeostasis of langerhans cells. *Immunol Cell Biol.* (2010) 88:387–92. doi: 10.1038/icb.2010.38
35. Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (langerhans cells) in vitiligo\*\*from the chester beatty research institute, Royal Cancer Hospital, London, S.W. 3, and the Departments of Anatomy, and Dermatology, St. Mary’s Hos. *J Invest Dermatol.* (1961) 37:51–64. doi: 10.1038/jid.1961.80
36. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol.* (2017) 17:349–62. doi: 10.1038/nri.2017.28
37. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood Monocytes : development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* (2009) 27:669–92. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557
38. Schmid M, Wege AK, Ritter U. Characteristics of “Tip-DCs and MDSCs” and their potential role in leishmaniasis. *Front Microbiol.* (2012) 3:74. doi: 10.3389/fmicb.2012.00074
39. Hammer GE, Ma A. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. *Annu Rev Immunol.* (2013) 31:743–91. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074929
40. Haniffa M, Bigley V, Collin M. Human mononuclear phagocyte system reunited. *Semin Cell Dev Biol.* (2015) 41:59–69. doi: 10.1016/j.semcd.2015.05.004
41. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* (2014) 33:1104–16. doi: 10.1002/embj.201488027
42. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *AJP Adv Physiol Educ.* (2013) 37:273–83. doi: 10.1152/advan.00066.2013
43. Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol.* (2012) 40:186–204. doi: 10.1177/0192623311430693
44. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* (2003) 3:984–93. doi: 10.1038/nri1246
45. Gonçalves-de-Albuquerque SC, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, de Goes TC, de Moraes RCS, Oliveira CNC, et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. *Front Immunol.* (2017) 8:1437. doi: 10.3389/fimmu.2017.01437
46. Soong L. Modulation of dendritic cell function by leishmania parasites. *J Immunol.* (2008) 180:4355–60. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4355
47. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* (2014) 5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461

48. Chauhan P, Shukla D, Chattopadhyay D, Saha B. Redundant and regulatory roles for toll-like receptors in leishmania infection. *Clin Exp Immunol.* (2017) 190:167–86. doi: 10.1111/cei.13014
49. Komai-Koma M, Li D, Wang E, Vaughan D, Xu D. Anti-Toll-like receptor 2 and 4 antibodies suppress inflammatory response in mice. *Immunology* (2014) 143:354–62. doi: 10.1111/imm.12312
50. Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L. Distinct roles for MyD88 and toll-like receptor 2 during leishmania braziliensis infection in mice. *Infect Immun.* (2009) 77:2948–56. doi: 10.1128/IAI.00154-09
51. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. *Leishmania lipophosphoglycan* (LPG) activates NK cells through toll-LIKE receptor-2. *Mol Biochem Parasitol.* (2003) 130:65–74. doi: 10.1016/S0166-6851(03)00160-9
52. Argueta-Donohué J, Wilkins-Rodríguez AA, Aguirre-García M, Gutiérrez-Kobeh L. Differential phagocytosis of leishmania mexicana promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells. *Microbiol Immunol.* (2016) 60:369–81. doi: 10.1111/1348-0421.12325
53. Sacramento L, Trevelin SC, Nascimento MS, Lima-Júnior DS, Costa DL, Almeida RP, et al. Toll-like receptor 9 signaling in dendritic cells regulates neutrophil recruitment to inflammatory foci following leishmania infantum infection. *Infect Immun.* (2015) 83:4604–16. doi: 10.1128/IAI.00975-15
54. Liese J, Schleicher U, Bogdan C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol.* (2007) 37:3424–34. doi: 10.1002/eji.200737182
55. Iborra S, Cueto FJ, Soto M, Lowell CA, Sancho D, Cueto FJ, et al. *Leishmania* uses mincle to target an inhibitory ITAM signaling pathway in dendritic cells that dampens adaptive immunity to infection. *Adaptive Imm.* (2016) 45:788–801. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.012
56. Zimara N, Chanyalew M, Aseffa A, van Zandbergen G, Lepenius B, Schmid M, et al. Dectin-1 positive dendritic cells expand after infection with *Leishmania major* parasites and represent promising targets for vaccine development. *Front Immunol.* (2018) 9:263. doi: 10.3389/fimmu.2018.00263
57. Savina A. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. (2007) 219:143–56. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x
58. Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity* (2016) 44:463–75. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.026
59. Jaumouillé V, Grinstein S. Molecular mechanisms of phagosome formation. *Microbiol Spectr.* (2016) 4:1–18. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0013-2015
60. Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med.* (2006) 203:177–88. doi: 10.1084/jem.20052288
61. Colmenares M, Puig-Kröger A, Pello OM, Corbí AL, Rivas L. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for leishmania amastigotes. *J Biol Chem.* (2002) 277:36766–9. doi: 10.1074/jbc.M205270200
62. Revest M, Donaghy L, Cabillic F, Guiguen C, Gangneux JP. Comparison of the immunomodulatory effects of *L. donovani* and *L. major* excreted- secreted antigens, particulate and soluble extracts and viable parasites on human dendritic cells. *Vaccine* (2008) 26:6119–23. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.005
63. Cronstein BN. Adenosine and inflammation. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem.* (2007) 7:280–5. doi: 10.2174/187152207781369841
64. Figueiredo AB, Souza-Testasica MC, Mineo TWP, Afonso LCC. *Leishmania amazonensis*-induced cAMP triggered by adenosine A2Breceptor is important to inhibit dendritic cell activation and evade immune response in infected mice. *Front Immunol.* (2017) 8:849. doi: 10.3389/fimmu.2017.00849
65. Figueiredo AB, Serafim TD, Marques-da-Silva EA, Meyer-Fernandes JR, Afonso LCC. *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A 2B adenosine receptor activation. *Eur J Immunol.* (2012) 42:1203–15. doi: 10.1002/eji.201141926
66. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* (1998) 392:245–52. doi: 10.1038/32588
67. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present yourself! By MHC Class I and MHC class II molecules. *Trends Immunol.* (2016) 37:724–37. doi: 10.1016/j.it.2016.08.010
68. Fonteneau JF, Kavanagh DG, Lirvall M, Sanders C, Timothy L, Bhardwaj N, et al. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Am Soc Hematol.* (2003) 102:4448–55. doi: 10.1182/blood-2003-06-1801
69. Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* (1999) 20:561–7. doi: 10.1016/S0167-5699(99)01547-9
70. Ghosh M, Bandyopadhyay S. Interaction of leishmania parasites with dendritic cells and its functional consequences. *Immunobiology* (2004) 209:173–7. doi: 10.1016/j.imbio.2004.02.007
71. Martin S, Agarwal R, Murugaiyan G, Saha B. CD40 expression levels modulate regulatory T cells in leishmania donovani infection. *J Immunol.* (2010) 185:551–9. doi: 10.4049/jimmunol.0902206
72. Campbell KA, Ovendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* (1996) 4:283–9. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80436-7
73. Kamanaka M, Yu P, Yasui T, Yoshida K, Kawabe T, Horii T. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity CD40–CD40L interaction also plays a critical role in cell-mediated immune responses. *Immunity* (1996) 4:275–81.
74. Qi H, Popov V, Soong L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4+ T cells *in vivo*. *J Immunol.* (2001) 167:4534–42. doi: 10.4049/jimmunol.167.8.4534
75. Favali C, Tavares N, Clarenco J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol.* (2007) 82:1401–6. doi: 10.1189/jlb.0307187
76. Elloso MM, Scott P. Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *J Immunol.* (1999) 162: 6708–15.
77. Feijó D, Tibúrcio R, Ampuero M, Brodskyn C, Tavares N. Dendritic cells and leishmania infection : adding layers of complexity to a complex disease. (2016) 2016:3967436. doi: 10.1155/2016/3967436
78. von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of *Anti-Leishmania* immunity. *J Exp Med.* (1998) 188:1547–52. doi: 10.1084/jem.188.8.1547
79. Bennett CL, Misslitz A, Colledge L, Aebischer T, Clare Blackburn C. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by leishmania mexicana amastigotes. *Eur J Immunol.* (2001) 31:876–83. doi: 10.1002/1521-4141(200103)31:3<876::AID-IMMU876>3.0.CO;2-I
80. Resende M, Moreira D, Augusto J, Cunha J, Neves B, Cruz MT, et al. *Leishmania*-infected MHC Class II high dendritic cells polarize CD4+ T cells toward a nonprotective Tbet+ IFN- + IL-10+ phenotype. *J Immunol.* (2013) 191:262–73. doi: 10.4049/jimmunol.1203518
81. Carvalho LP, Pearce EJ, Scott P. Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with leishmania braziliensis: infected cells produce high levels of TNF- whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses. *J Immunol.* (2008) 181:6473–80. doi: 10.4049/jimmunol.181.9.6473
82. Embgenbroich M, Burgdorf S. Current concepts of antigen cross-presentation. *Front Immunol.* (2018) 9:1643. doi: 10.3389/fimmu.2018.01643
83. Brewig N, Kissenpfennig A, Malissen B, Veit A, Bickert T, Fleischer B, et al. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J Immunol.* (2009) 182:774–83. doi: 10.4049/jimmunol.182.2.774

84. Ashok D, Schuster S, Ronet C, Rosa M, Mack V, Lavanchy C, et al. Cross-presenting dendritic cells are required for control of *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol.* (2014) 44:1422–32. doi: 10.1002/eji.201344242
85. Lemos MP, Esquivel F, Scott P, Laufer TM. MHC class II expression restricted to CD8 $\alpha$ + and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of *Leishmania major*. *J Exp Med.* (2004) 199:725–30. doi: 10.1084/jem.20030795
86. Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, et al. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol.* (2002) 168:3992–4000. doi: 10.4049/jimmunol.168.8.3992
87. Brosch S, Tenzer S, Akkad N, Lorenz B, Schild H, Stebut EV. Priming of leishmania-reactive CD8 T cells *in vivo* does not require LMP7-containing immunoproteasomes. *J Invest Dermatol.* (2012) 132:1302–5. doi: 10.1038/jid.2011.454
88. von Stebut E, Tenzer S. Cutaneous leishmaniasis: distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. *Int J Med Microbiol.* (2017) 308:206–14. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.11.002
89. Rockel B, Kopec KO, Lupas AN, Baumeister W. Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics* (2012) 1824:237–45. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.07.002
90. Kessler JH, Khan S, Seifert U, Le Gall S, Chow KM, Paschen A, et al. Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nat Immunol.* (2011) 12:45–53. doi: 10.1038/ni.1974
91. Maji M, Mazumder S, Bhattacharya S, Choudhury ST, Sabur A, Shadab M, et al. A Lipid Based antigen delivery system efficiently facilitates MHC class-I antigen presentation in dendritic cells to stimulate CD8+T cells. *Sci Rep.* (2016) 6:27206. doi: 10.1038/srep27206
92. Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, *in vitro*, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis.* (2010) 4:871. doi: 10.1371/journal.pntd.0000871
93. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sánchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol.* (2008) 26:293–316. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090254
94. Tiberio L, Del Prete A, Schioppa T, Sozio F, Bosio D, Sozzani S. Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration review-article. *Cell Mol Immunol.* (2018) 15:346–52. doi: 10.1038/s41423-018-0005-3
95. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* (2018) 285:2944–71. doi: 10.1111/febs.14466
96. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* (2004) 21:279–88. doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.014
97. Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* (2006) 22:32–40. doi: 10.1016/j.pt.2005.11.010
98. Steigerwald M, Moll H. *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. *Infect Immun.* (2005) 73:2564–7. doi: 10.1128/iai.73.4.2564
99. Hermida MDR, Doria PG, Taguchi AMP, Mengel JO, dos-Santos WLC. *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infect Dis.* (2014) 14:450. doi: 10.1186/1471-2334-14-450
100. Ponte-Sucre A, Heise D, Moll H. *Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine langerhans cells. *Immunology* (2001) 104:462–7. doi: 10.1046/j.1365-2567.2001.01333.x
101. Ballet R, Emre Y, Jemelin S, Charmoy M, Tacchini-Cottier F, Imhof BA. Blocking junctional adhesion molecule C enhances dendritic cell migration and boosts the immune responses against *Leishmania major*. *PLoS Pathog.* (2014) 10:e1004550. doi: 10.1371/journal.ppat.1004550
102. Sato N, Ahuja SK, Quinones M, Kostecki V, Reddick RL, Melby PC, et al. CC chemokine receptor (CCR2) is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokin. *J Exp Med.* (2000) 192:205–18. doi: 10.1084/jem.192.2.205
103. Ato M, Maroof A, Zubairi S, Nakano H, Kakiuchi T, Kaye PM. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to leishmania donovani infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. *J Immunol.* (2006) 176:5486–93. doi: 10.4049/jimmunol.176.9.5486
104. Kelly B, O'Neill LAJ. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.* (2015) 25:771–84. doi: 10.1038/cr.2015.68
105. Pearce EJ, Everts B. Dendritic cell metabolism. *Nat Rev Immunol.* (2015) 15:18–29. doi: 10.1038/nri3771
106. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* (2010) 115:4742–9. doi: 10.1182/blood-2009-10-249540
107. Everts B, Amiel E, Huang SCC, Smith AM, Chang CH, Lam WY, et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IRK $\epsilon$  supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat Immunol.* (2014) 15:323–32. doi: 10.1038/ni.2833
108. Gaber T, Strehl C, Buttgerit F. Metabolic regulation of inflammation. *Nat Rev Rheumatol.* (2017) 13:267–79. doi: 10.1038/nrrheum.2017.37
109. Krzywinska E, Stockmann C. Hypoxia, metabolism and immune cell function. *Biomedicines* (2018) 6:56. doi: 10.3390/biomedicines6020056
110. Corcoran SE, Neill LAJO, Corcoran SE, Neill LAJO. HIF1 $\alpha$  and metabolic reprogramming in inflammation find the latest version : HIF1 $\alpha$  and metabolic reprogramming in inflammation. (2016) 126:3699–707. doi: 10.1172/JCI84431
111. Hammami A, Abidin BM, Heinonen KM, Stäger S. HIF-1 $\alpha$  hampers dendritic cell function and Th1 generation during chronic Visceral leishmaniasis. *Sci Rep.* (2018) 8:3500. doi: 10.1038/s41598-018-21891-z
112. Hammami A, Charpentier T, Smans M, Stäger S. IRF-5-mediated inflammation limits CD8 $^{+}$  T cell expansion by inducing HIF-1 $\alpha$  and impairing dendritic cell functions during leishmania infection. *PLoS Pathog.* (2015) 11:e1004938. doi: 10.1371/journal.ppat.1004938
113. Schatz V, Strüßmann Y, Mahnke A, Schley G, Waldner M, Ritter U, et al. Myeloid cell-derived HIF-1 $\alpha$  promotes control of *Leishmania major*. *J Immunol.* (2016) 197:4034–41. doi: 10.4049/jimmunol.1601080
114. Moreira ML, Costa-Pereira C, Alves MLR, Marteleto BH, Ribeiro VM, Peruhype-Magalhães V, et al. Vaccination against canine leishmaniasis increases the phagocytic activity, nitric oxide production and expression of cell activation/migration molecules in neutrophils and monocytes. *Vet Parasitol.* (2016) 220:33–45. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.02.009
115. Wen H, Schaller MA, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL. Dendritic cells at the interface of innate and acquired immunity : the role for epigenetic changes. *J Leukoc Biol.* (2008) 83:439–46. doi: 10.1189/jlb.0607357
116. Lin Q, Chauvstré H, Costa IG, Gusmao EG, Mitzka S, Hanzelmann S, et al. Epigenetic program and transcription factor circuitry of dendritic cell development. *Nucleic Acid Res.* (2018) 43:9680–93. doi: 10.1093/nar/gkv1056
117. Tian Y, Meng L, Zhang Y. Epigenetic regulation of dendritic cell development and function. *Cancer J.* (2017) 23:302–7. doi: 10.1097/PPO.0000000000000280
118. Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* (2002) 9:279–89. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00459-8
119. Satpathy AT, Murphy KM. Transcription factor networks in dendritic cell development. *Semin Immunol.* (2011) 23:388–97. doi: 10.1016/j.smim.2011.08.009
120. Carotta S, Dakic A, D'Amico A, Pang SHM, Greig KT, Nutt SL, et al. The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity* (2010) 32:628–41. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.005
121. Dominguez-Soto A, Puig-Kröger A, Vega MA, Corbí AL. PU 1 regulates the tissue-specific expression of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3-grabbing nonintegrin\*. *J Biol Chem.* (2005) 280:33123–31. doi: 10.1074/jbc.M503401200

122. Kanada S, Nishiyama C, Nakano N, Suzuki R, Maeda K, Hara M, et al. Critical role of transcription factor PU. 1 in the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells. *Blood* (2018) 117:2211–23. doi: 10.1182/blood-2010-06-291898
123. Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Cuddapah S, Cui K, et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet.* (2009) 40:897–903. doi: 10.1038/ng.154.Combinatorial
124. Bornstein C, Winter D, Barnett-Itzhaki Z, David E, Kadri S, Garber M, et al. A negative feedback loop of transcription factors specifies alternative dendritic cell chromatin states. *Mol Cell* (2014) 56:749–62. doi: 10.1016/j.molcel.2014.10.014
125. Tserel L, Kolde R, Rebane A, Kisand K, Org TÄ, Peterson H, et al. Genome-wide promoter analysis of histone modifications in human monocyte-derived antigen presenting cells. *BMC Genomics* (2010) 11:642. doi: 10.1186/1471-2164-11-642
126. Marr AK, MacIsaac JL, Jiang R, Airo AM, Kobor MS, McMaster WR. *Leishmania donovani* infection causes distinct epigenetic DNA methylation changes in host macrophages. *PLoS Pathog.* (2014) 10:e1004419. doi: 10.1371/journal.ppat.1004419
127. Yang Z, Mosser DM, Zhang X. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *J Immunol.* (2007) 178:1077–85. doi: 10.4049/jimmunol.178.2.1077
128. Calegari-Silva TC, Vivarini AC, Pereira RMS, Dias-Teixeira KL, Rath CT, Pacheco ASS, et al. *Leishmania amazonensis* downregulates macrophage iNOS expression via histone deacetylase 1 (HDAC1): a novel parasite evasion mechanism. *Eur J Immunol Immunol.* (2018) 48:1188–98. doi: 10.1002/eji.201747257

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Tibúrcio, Nunes, Nunes, Rosa Ampuero, Silva, Lima, Machado Tavares and Brodskyn. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.