



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

**REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS E DA PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS IgE ATRAVÉS DO USO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
TOLEROGÊNICAS PULSADAS COM EXTRATO SOLÚVEL DE *Blomia tropicalis***

LUCIANA SOUZA DE ARAGÃO FRANÇA

Salvador – Bahia - Brasil

2014

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS E DA PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS IgE ATRAVÉS DO USO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
TOLEROGÊNICAS PULSADAS COM EXTRATO SOLÚVEL DE *Blomia tropicalis***

LUCIANA SOUZA DE ARAGÃO FRANÇA

Orientador: Lain Carlos Pontes De Carvalho

Co-Orientadora: Fabíola Cardillo

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia
em Saúde e Medicina Investigativa,
para a obtenção do grau de Doutor.

SALVADOR – BRASIL

2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

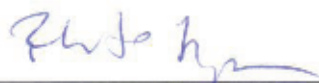
F814r	<p>França, Luciana Souza de Aragão</p> <p>Redução da inflamação das vias aéreas e da produção de anticorpos IgE através do uso de células dendríticas tolerogênicas pulsadas com extrato solúvel de <i>Blomia tropicalis</i>. / Luciana Souza de França. - 2014.</p> <p>83 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, Laboratório de Laboratório de Patologia e Biointervenção.</p> <p>Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.</p> <p>1. Ácaros. 2. Imunomodulação. 2. Tolerância imunológica. I. Título.</p> <p>CDU 595.42</p>
-------	--

" REDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS E DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgE
ATRAVÉS DO USO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÊNCIAS PULSADAS COM EXTRATO
SOLÚVEL DE BLOMIA TROPICALIS."

LUCIANA SOUZA DE ARAGÃO FRANÇA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Roberto José Meyer Nascimento
Professor Titular
ICS/UFBA



Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ



Dra. Maria Fernanda Rios Grassi
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

Ao meu primo e afilhado Roberto de Souza,
porque me emocionou ao me citar como ídolo, e se
esforçar para ser como eu, fazendo de mim sua maior fã e
me incentivando a ser uma profissional e ser humano
melhor, para realmente servir como exemplo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, não pela cumplicidade no trabalho (não é Alberto?), mas por me conceder perseverança e enviar os anjos citados abaixo, essenciais para que esse trabalho fosse possível.

Ao meu marido Elias França, por me ensinar que “a vida é feita de escolhas” e por sempre me apoiar em todas elas. Por compreender o real sentido de tolerância e sempre me motivar a continuar, mesmo nos momentos em que o lado pessoal foi esquecido. Eu te amo. Te amo por me deixar ser tudo o que eu quis, por estar ao meu lado e me ajudar a realizar tudo o que "está dentro da minha cabeça". Eu nunca seria completa sem você.

À minha grande amiga Viviane Junqueira, pela companhia e pelo dom de me tranquilizar nas horas mais difíceis. Você é realmente a pessoa mais íntegra que eu conheço.

Aos meus pais, Gustavo e Edileuza, que além de toda educação escolar e domiciliar que me proporcionaram, agora à distância, se preocupam com meu bem estar e me incluem em suas orações.

Aos meus sogros, Lourdes e Edvaldo, que me receberam em sua família como uma filha e me apoiaram mesmo nos dias de mau humor. Obrigada por todo suporte, paciência e acolhimento.

À Jandy, que sempre tem as palavras certas nas horas mais adequadas.

À minha família B05, por alegrar os dias no laboratório: Viviane, Ayling, Thiago, Virgínia, Pablo, Isabela (meu porquinho), Cintia, André, Mari Borges, Mari Ivo, Daniela, Luecya (bucho), Mayara, David, Tiana, Tássia, Pilar, Thayna, Tyta, Felipe, Tâmara, Yana, Rosane, Danay, Carol e meus ICs. Muitas vezes vocês foram o motivo de querer levantar para trabalhar. Somos uma família hoje e sempre.

Aos meus alunos de Iniciação que me tornaram uma orientadora e colaboraram diretamente para formação da profissional que sou hoje: Rafaela Costa, Fábio Brasil, Priscila Leal, Naiara Dourado, Felipe "Oliver", Camila Trevisan, Andréia Cunha, Rafaela Rolim e Rodrigo Feitosa.

A André Cronemberger, apoio técnico fundamental para referenciar esse trabalho, o mendeley mudou a minha vida!!!! E principalmente pela formatação das figuras do manuscrito. Muito obrigada mesmo!

Ao meu orientador Lain. Tive uma sorte imensa por ser sua aluna. Obrigada por sua orientação, sabedoria e confiança, por ter elevado o padrão muito acima do que eu me supunha capaz de alcançar, e por ter me dado amplo espaço para desenvolver minhas capacidades. Eu não poderia ter escolhido melhor pessoa para me orientar na pós graduação e na vida científica. Muito obrigada.

À Fabíola Cardillo, minha co-orientadora, uma amiga especial, que se fez presente quando precisei, com conhecimentos, artigos, reagentes, mas principalmente, conversas agradáveis.

À Flávia Paixão, nosso anjo administrador, por toda paciência, colaboração e presteza para fazer nossos reagentes serem entregues e a pesquisa acontecer. Com você aprendi muito sobre gestão de projetos e pessoas. Não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim.

Aos colegas da Fiocruz, em especial Sérgio (esterilização), Liliane (citometria) e Rejane (biotério).

À biblioteca Eurydice Pires de Sant'Anna do CPqGM, em especial Ana Maria Fiscina, pelas correções em tempo record e por toda a ajuda dispensada.

Ao laboratório de Acarologia e Alergologia pelo suporte operacional e fornecimento de reagentes. Em especial à Dr^a Neuza Alcântara Neves e aos amigos Ana Tereza, Ryan e Kelly.

Às amigas Vânia Oliveira, Noelma Brito e Simone Macambira pelos bons conselhos, pela amizade e momentos de descontração.

Ao LPBI por me receber e acolher por todos esses anos de pós graduação.

À pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Qualquer um podia deixar-se seduzir pela pesquisa quando os resultados apareciam aos montes. O difícil era amá-la quando eles não vinham e quando as razões disso eram difíceis de compreender.”

“Para sempre Alice”

Lisa Genova

FRANÇA, Luciana Souza de Aragão. Redução da inflamação das vias aéreas e da produção de anticorpos IgE através do uso de células dendríticas tolerogênicas pulsadas com extrato solúvel de *Blomia tropicalis*. 83 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

As alergias afetam cerca de 20 a 30% da população mundial e sua prevalência, bem como a gravidade dos sintomas, tem aumentado nas últimas décadas. As terapias existentes para as desordens do trato respiratório ocorrem por períodos prolongados, apresentam efeitos colaterais, muitas vezes não são efetivas para pacientes graves e dependem do afastamento do alérgeno. Uma alternativa para esses pacientes seria a indução de tolerância imunológica, através da terapia celular com células dendríticas pulsadas com o alérgeno. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de células dendríticas mielóides sensibilizadas *in vitro* com extrato de *B. tropicalis* em modelo murino de alergia respiratória. Em modelos experimentais de alergia respiratória, células T auxiliares (Th2) alérgeno-específica produzem citocinas que regulam a síntese de anticorpos IgE alérgeno-específicos e controlam a inflamação eosinofílica e a remodelação do tecido das vias aéreas, e esses parâmetros foram analisados neste trabalho. Células dendríticas tolerogênicas de camundongos A/J foram obtidas na presença de GM-CSF e dexametasona e caracterizadas por apresentarem baixa expressão de MHC-II e moléculas coestimulatórias, redução acentuada de PD-L2 e um perfil anti-inflamatório de produção de citocina. A inoculação prévia de células dendríticas sensibilizadas com *Blomia* reduziu especificamente e significativamente o número total de leucócitos e o número de eosinófilos no fluido de lavagem broncoalveolar e reduziu a produção de IgE, em comparação à inoculação de células sensibilizadas com ovalbumina, e estes efeitos foram mais intensos com uma segunda inoculação de células tolerogênicas. Além disso, redução do infiltrado inflamatório pulmonar foi observada em animais que tinham sido tratados com células dendríticas, independente do antígeno utilizado na sensibilização das mesmas. Estes resultados indicam que células dendríticas geradas como descrito neste trabalho podem inibir uma resposta alérgica Th2. A especificidade do tratamento, entretanto, deve ser melhor investigada.

Palavras-chave: Ácaros, Imunomodulação, Tolerância imunológica.

FRANÇA, Luciana Souza de Aragão. Reduction of airway inflammation by using tolerogenic dendritic cells pulsed with soluble extract of *Blomia tropicalis*. 83 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Allergies affect about 20-30% of world population and its prevalence and severity of symptoms has increased in recent decades. Existing therapies to respiratory tract disorders are extensive, with side effects, not effective for severe patients and depending on the allergen removal. An alternative for these patients is the induction of immune tolerance by cell therapy with dendritic cells pulsed with the allergen. This study aimed to evaluate the effect of myeloid dendritic cells sensitized *in vitro* with *B. tropicalis* extract in a murine model of respiratory allergy. In experimental models of respiratory allergy, T helper cells (Th2) produce allergen-specific cytokines which regulate the synthesis of allergen-specific IgE antibodies and control eosinophilic inflammation and tissue remodeling of the airways, these parameters were evaluated in this study. Tolerogenic dendritic cells from A / J mice were obtained in the presence of GM-CSF and dexamethasone and were characterized by low MHC-II expression and costimulatory molecules, marked reduction of PD-L2 and anti-inflammatory profile of cytokine production. Prior inoculation of sensitized dendritic cells with *Blomia* significantly and specifically reduced the total number of leukocytes and eosinophils in the bronchoalveolar lavage fluid and reduces IgE production compared to inoculation with cells sensitized with ovalbumin, and these effects were improved with a second inoculation of tolerogenic cells. Furthermore, reducing the pulmonary inflammatory infiltrate was seen in animals that had been treated with dendritic cells regardless of the antigen used for sensitization. These results indicate that dendritic cells generated as described here can inhibit an allergic Th2 response. The specificity of the treatment, however, should be examined.

Palavras-chave: Mite, Immunomodulation, Immune tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imunofenotipagem de células dendríticas diferenciadas a partir da medula óssea na presença de dexametasona. (manuscrito 1)	60
Figura 2	Produção de citocinas antiinflamatórias de células dendríticas diferenciadas a partir da medula óssea na presença de dexametasona. (manuscrito 1)	61
Figura 3	Protocolo de avaliação do efeito de células dendríticas diferenciadas a partir da medula óssea na presença de dexametasona no desenvolvimento de inflamação das vias aéreas. (manuscrito 1)	62
Figura 4	Número total de leucócitos e porcentagem de eosinófilos no lavado broncoalveolar e atividade de peroxidase no BALF e extrato pulmonar de camundongos tratados com células dendríticas tolerogênicas induzidas por dexametasona. (manuscrito 1)	63
Figura 5	Produção de citocinas no lavado broncoalveolar de camundongos tratados com células dendríticas tolerogênicas induzidas por dexametasona. (manuscrito 1)	64
Figura 6.	Células dendríticas tolerogênicas induzidas por dexametasona promoveram redução de inflamação das vias aéreas (manuscrito 1)	65
Figura 7	Inibição da produção de anticorpos IgE anti <i>Blomia tropicalis</i> por células dendríticas tolerogênicas induzidas por dexametasona (manuscrito 1)	66
Figura 8	Protocolo utilizado para avaliar o efeito de duas doses de células dendríticas no desenvolvimento de inflamação das vias aéreas	68
Figura 9	Efeito da inoculação de duas doses de células dendríticas pulsadas com extrato de <i>B. tropicalis</i> sobre a celularidade do fluido do lavado broncoalveolar e sobre a atividade de peroxidase do eosinófilo no fluido do lavado broncoalveolar e no pulmão	70
Figura 10	Produção de citocinas em fluido de lavado broncoalveolar	71
Figura 11	Concentração de anticorpos no soro dos camundongos alérgicos tratados com protocolo preventivo de tolerância imunológica	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Grupos experimentais

68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

33D1+	Marcador fenotípico de células dendríticas do baço, linfonodo e placa de Peyer
Blo t	Antígeno recombinante do ácaro <i>Blomia tropicalis</i>
BtE ou EBt	Extrato de <i>Blomia tropicalis</i>
CCL	Quimiocina com motivos C-C
CCR7	receptor de quimiocina C-C tipo 7
CD	Grupo de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>)
CD45RA+	receptor de proteína tirosina fosfatase tipo C
CTLA-4	Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico
DCs	Células dendríticas (<i>dendritic cell</i>)
Dexa	Dexametasona
FCεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos macrófagos
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IOM	Comissão de avaliação da asma e do ar interior do Instituto de Medicina dos Estados Unidos
ip	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MK-7246	-{(7R)-7-[(4-fluorofenil)sulfonyl](metil)amino]-6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-a]indol-10-il}ácido acético
Na ⁺ /H ⁺ NHE3	Canal de sódio e hidrogênio 3
PD-1	Proteína de morte celular programada
PD-L1	Ligante 1 de PD-1
PD-L2	Ligante 2 de PD-1
SGK1	<i>Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1</i>
STAT6	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta (<i>transforming growth factor</i> beta)
Th2	Linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) do tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TolDCs-	Células dendríticas tolerogênicas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1.	ALERGIAS E ASMA	16
2.1.1.	Aspectos gerais	16
2.1.2.	<i>Blomia tropicalis</i>	17
2.1.3.	Modelos experimentais	18
2.1.4.	Epidemiologia	18
2.1.5.	Terapias	19
2.2.	TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA	20
2.3.	CÉLULAS DENDRÍTICAS	21
2.3.1.	Aspectos gerais	21
2.3.2.	Geração de células dendríticas tolerogênicas <i>in vitro</i>	22
2.3.3.	Aplicações terapêuticas	24
3	JUSTIFICATIVA	25
4	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVO GERAL	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5	MANUSCRITO	27
6	RESULTADOS PRELIMINARES	67
6.1	EFEITO DE DUAS DOSES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS SOBRE A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGE E SOBRE A INFLAMAÇÃO PULMONAR EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM EXTRATO DE <i>B. TROPICALIS</i>	67
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
8	PERSPECTIVAS	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

As doenças alérgicas são altamente prevalentes, podendo atingir cerca de 20 a 30 % de indivíduos em todo mundo. A prevalência dessas doenças vem aumentando nas últimas décadas, tanto em crianças quanto em adultos (HOLGATE *et al.*, 2010), sendo que a asma, uma das manifestações alérgicas mais graves, afeta de 5 a 10% da população mundial (KUHLEN *et al.*, 2014). Trabalhos realizados em Salvador, Bahia, mostram prevalência acima de 12% para asma brônquica e rinite alérgica, em indivíduos de diferentes classes sociais (BAQUEIRO *et al.*, 2007; MEDEIROS JUNIOR *et al.*, 2000).

A asma é uma síndrome complexa, caracterizada patologicamente por inflamação das vias aéreas, remodelamento brônquico, broncoconstrição e hiperresponsividade, e clinicamente por dispneia, tosse, coriza e aperto no peito (ATHARI e ATHARI, 2014). Esses eventos são mediados por citocinas liberadas por linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2) e células como eosinófilos, basófilos, mastócitos e células dendríticas (ATHARI e ATHARI, 2014; CHIPPS, 2004; GILL, 2012; GUERRA; MARTINEZ, 2008). Antígenos ambientais, particularmente os antígenos inalados, associados a fatores genéticos, podem levar a ativação de uma resposta de hipersensibilidade imediata, resultando em asma alérgica. A Comissão de Avaliação da Asma e do Ar Interior do Instituto de Medicina dos Estados Unidos (IOM) considera que os alérgenos domésticos tem forte relação causal ou pelo menos estão associados com a exacerbação da asma (IOM, 2000). Os ácaros da poeira são os principais agentes desencadeadores de asma em indivíduos sensibilizados especificamente à poeira e a exposição contínua a esses alérgenos pode levar à hiperreatividade brônquica crônica (IOM, 2000; PLATTS-MILLS *et al.*, 1997), e estão associados a quadros de rinite alérgica e asma (SATO *et al.*, 2002). Dentre estes, o *Blomia tropicalis* e o *Dermatophagoides pteronyssinus* revelam-se como importante causa de fenômenos alérgicos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (SATO *et al.*, 2002), sendo o *B. tropicalis* o ácaro mais prevalente em leitos domésticos na cidade de Salvador, Bahia, estando presente em 71,8% desses leitos (BAQUEIRO *et al.*, 2006).

A relevância do desenvolvimento de protocolos capazes de inibir o desenvolvimento ou reduzir os sinais e sintomas da alergia respiratória a ácaros da poeira doméstica se torna cada vez mais evidente, visto que os tratamentos atuais para enfermidades alérgicas objetivam limitar os danos ocorridos ou amenizar os sintomas, assim como reduzir o risco de crises

posteriores mais graves. A terapia geralmente apresenta efeitos colaterais importantes como a imunossupressão gerada pelo uso de corticosteróides, droga de primeira escolha em alergias. A eficácia da maioria das imunoterapias para alergia respiratória atualmente em uso é controversa, além de necessitarem de anos de aplicação constante (WALKER, C.; ZUANY-AMORIM, 2001). Diversas abordagens para desenvolvimento de vacinas contra alergia foram propostas (WALKER, M. L. *et al.*, 2014; WOHLLEBEN; ERB, 2001). Recentemente, a indução de tolerância imunológica se tornou um alvo essencial para estratégias de prevenção e tratamentos para diversas doenças nas quais a desregulação do sistema imune desempenha um papel crucial, como as alergias (AKDIS, 2006). Células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígeno profissionais do sistema imune, com potencial de iniciar, estimular ou inibir respostas imunes (MOSER, 2003). Além disso, DCs humanas (LI, X. *et al.*, 2010) e murinas (HENRY *et al.*, 2008) geneticamente modificadas para expressar interleucina 10 (IL-10), foram capazes de induzir tolerância duradoura *in vitro* e em modelo experimental de asma induzida por ovalbumina, respectivamente. A abordagem desenvolvida nesse trabalho envolve o uso de células dendríticas tolerogênicas, induzidas por dexametasona, como imunoterapia específica para alergias ao ácaro *Blomia tropicalis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 ALERGIAS E ASMA

2.1.1 Aspectos gerais

Alergias respiratórias são distúrbios inflamatórios das vias aéreas, resultantes de reações de hipersensibilidade tipo I a alérgenos (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008). As alergias apresentam um amplo espectro de possíveis sintomas e, portanto, suas manifestações cobrem uma vasta gama de fenótipos, dentre eles asma, rinite, conjutivite, dermatite atópica, urticária e reações anafiláticas (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008; PAPADOPOULOS *et al.*, 2012). A asma alérgica pode ser caracterizada por uma sequência de eventos que envolvem a obstrução reversível das vias aéreas, broncoconstricção, hiperresponsividade brônquica, desencadeados por resposta do tipo Th2 e inflamação eosinofílica mediada por imunoglobulina E (IgE), que podem estar relacionados a fatores genéticos, definindo a atopia, ou ambientais, como exposição a epitélio de animais e a antígenos de baratas, pólen e ácaros de poeira (CHIPPS, 2004; GUERRA; MARTINEZ, 2008; MIZUTANI; NABE; YOSHINO, 2013).

A atopia pode ser definida como uma predisposição genética à síntese de anticorpos IgE contra os alérgenos ambientais ou inócuos, ocasionando reatividade cutânea aos mesmos antígenos (GODAVA; VRTEL; VODICKA, 2013). A interação de múltiplos genes é responsável pelo surgimento dos vários fenótipos existentes na asma (BORISH, 1999). Dentre os genes envolvidos, pode-se destacar o gene codificador das citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-15, no cromossoma 5, cromossoma 11 (cadeia beta do receptor de alta afinidade para IgE), cromossoma 16 (receptor da IL-4), e cromossoma 12 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 6- STAT 6), e os genes envolvidos na apresentação de antígeno e da cadeia alfa do receptor da célula T (BORISH, 1999; GODAVA; VRTEL; VODICKA, 2013).

A resposta inflamatória se inicia com a captura de antígenos por células apresentadoras, responsáveis por iniciar a ativação de linfócitos T CD4 *naïve*, diferenciando-os em linfócitos efetores tipo Th2, produtores de IL-4 (HAMMAD; LAMBRECHT, 2006). Uma das principais características das doenças relacionadas à atopia é a produção de IgE após ativação dos linfócitos B por IL-4 (GODAVA; VRTEL; VODICKA, 2013). Esses anticorpos IgE se associam a receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) em células como eosinófilos,

basófilos e mastócitos, as quais são conseqüentemente ativadas ao reconhecerem antígenos, liberando rapidamente uma variedade de mediadores inflamatórios, causando aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e contração do músculo liso visceral e brônquico, caracterizando a reação de hipersensibilidade tipo I ou imediata (LARCHÉ; AKDIS; VALENTA, 2006; LARCHÉ, 2007; NAKAJIMA; TAKATSU, 2007).

A fase tardia, que pode persistir por dias em ausência de tratamento, é caracterizada pelo remodelamento das vias aéreas, envolvendo hiperplasia das células caliciformes, metaplasia das células produtoras de muco, espessamento do músculo liso e fibrose, associado com a liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos e basófilos (HOLGATE *et al.*, 2010; MIZUTANI; NABE; YOSHINO, 2013; WILLS-KARP, 1999) e a ativação das células Th2 (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008). IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, citocinas produzidas pelas células Th2, estimulam a inflamação alérgica e eosinofílica, bem como células epiteliais e de músculo liso, que contribuem para as alterações patológicas da asma (HOLGATE; POLOSA, 2008; NAKAJIMA; TAKATSU, 2007).

2.1.2 *Blomia tropicalis*

Os ácaros da poeira doméstica são os principais agentes desencadeadores de fenômenos alérgicos em todo o mundo (PLATTS-MILLS *et al.*, 1997), estando principalmente associados a quadros de rinite alérgica e asma (FERNÁNDEZ-CALDAS, ENRIQUE; PUERTA; CARABALLO, 2014). Dentre estes, o *B. tropicalis* e o *D. pteronyssinus* revelam-se como importantes causas de fenômenos alérgicos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (ARRUDA *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 2006). O *B. tropicalis* já foi descrito na literatura como tendo alta prevalência em países da América do Sul e Ásia como Cuba, Venezuela, Taiwan e Brasil, assim como nos Estados Unidos e Europa (CASTRO ALMARALES *et al.*, 2006; CROCE *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ-CALDAS, E *et al.*, 1990; MÜSKEN *et al.*, 2000; RIZZO *et al.*, 1997; TSAI *et al.*, 1998). Nestas áreas, antígenos do *B. tropicalis* demonstraram ser componentes alergênicos da poeira doméstica importante clinicamente, capazes de induzir resposta de anticorpos IgE em pacientes com doenças alérgicas, tais como asma e rinite.

O extrato de *B. tropicalis* possui mais de 30 proteínas potencialmente alergênicas, dentre as quais, sabidamente, duas reagem intensamente com IgE no soro de pacientes com

teste cutâneo positivo para esse ácaro, o antígeno recombinante do ácaro *B. tropicalis* (Blo t 1 (70%) e Blo t 5 (87 %)) (TANG *et al.*, 2011; TSAI *et al.*, 1998). Embora seja descrita a reação cruzada entre antígenos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*, um estudo utilizando diferentes técnicas, como *dot blot* e imunoelektroforese enzimática, mostrou que essa reação é pequena e que os antígenos de *Blomia* devem ser incluídos no desenvolvimento de novas terapias (CHEW *et al.*, 1999).

Foi demonstrado por colaboradores do nosso grupo de pesquisa que o *B. tropicalis* é a fonte dos principais aeroalérgenos na cidade de Salvador- Bahia (BAQUEIRO *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2008), sendo este o ácaro mais prevalente, estando presente em 71,8% dos leitos domésticos naquela cidade (BAQUEIRO *et al.*, 2006).

2.1.3 Modelos experimentais

Geralmente os modelos experimentais convencionais de indução de alergia respiratória utilizam a ovalbumina como antígeno (MASID-DE-BRITO *et al.*, 2014). No entanto, o uso de alérgenos desencadeadores de crises em seres humanos em modelos experimentais tem maior relevância quando se objetiva o desenvolvimento de terapias direcionadas a esses antígenos. Na literatura existem poucos grupos que estudam modelos experimentais em que a alergia é induzida através da sensibilização com *B. tropicalis* (CARVALHO *et al.*, 2004; COLLAZO; DÍAZ, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2004; SATO *et al.*, 2002; TAKEDA *et al.*, 2004), e muitos desses trabalhos foram desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (BAQUEIRO *et al.*, 2006, 2010; BARBOZA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2012; PONTE *et al.*, 2011). Em um desses trabalhos, um protocolo curto de indução de alergia experimental ao *B. tropicalis* foi avaliado em quatro diferentes linhagens de camundongos (CBA/J, BALB/c, A/J e C57Bl/6) e mostrou que a linhagem A/J foi a melhor respondedora a sensibilização por esse ácaro, com indução de muco no interior dos brônquios, hiperresponsividade das vias aéreas e inflamação pulmonar (BAQUEIRO *et al.*, 2010).

2.1.4 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Alergia (2011), a prevalência de doenças alérgicas em todo o mundo está aumentando drasticamente tanto em países desenvolvidos como nos em

desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, centenas de milhões de indivíduos no mundo sofrem de rinite alérgica e estima-se que cerca de 300 milhões possuem asma alérgica, o que afeta significativamente a qualidade de vida desses indivíduos.

Trabalho desenvolvido na cidade de Salvador- Bahia, com indivíduos residentes em uma favela, indicou prevalência de asma brônquica de 14,5% e de rinite alérgica de 17,4% (MEDEIROS JR. *et al.*, 2000). Nosso grupo observou prevalências semelhantes às obtidas por Medeiros e colaboradores, para asma brônquica (12,1%) e rinite (18,8%) em indivíduos de nível socioeconômico baixo, enquanto para indivíduos de condições socioeconômicas mais favoráveis, as prevalências de asma e rinite foram mais elevadas, respectivamente de 21,1% e 32,5% (BAQUEIRO *et al.*, 2007).

2.1.5 Terapias

A relevância do desenvolvimento de protocolos capazes de inibir o desenvolvimento ou reduzir os sinais e sintomas da alergia respiratória a ácaros da poeira doméstica se torna cada vez mais evidente, visto que muitos dos tratamentos atuais para enfermidades alérgicas são sintomáticos, envolvendo uso de medicamentos geralmente caros e com efeitos colaterais, e/ou depende de afastamento, nem sempre possível, do alérgeno. A cura não é alcançada em muitos indivíduos, especialmente quando se considera todos os fenótipos de asma (WENZEL, 2012). Verifica-se também que as imunoterapias para alergia respiratória em uso, atualmente, têm efeito controverso, além de necessitarem de anos de aplicação constante (WALKER, C.; ZUANY-AMORIM, 2001).

Há muitos estudos na literatura sobre terapias para doenças alérgicas, tais como vacinas com antígenos purificados ou recombinantes, vacinas, usando citocinas e produtos bacterianos como adjuvantes (WALKER, C.; ZUANY-AMORIM, 2001; WOHLLEBEN; ERB, 2001), os corticosteróides (KANDEEL *et al.*, 2013; KUNICKA *et al.*, 1993) e β 2-agonistas (PAGE; SPINA, 2006), inibidores da resposta imune celular (GERVAIS *et al.*, 2011; KON *et al.*, 2001) e estudos que tem citocinas Th2 como alvo (PAVORD *et al.*, 2012; WENZEL, 2012).

A imunoterapia com alérgenos pode levar a reações anafiláticas e é indicado apenas para pacientes com asma controlada (CRETICOS, 2000). Embora os corticosteróides sejam os tratamentos farmacológicos mais eficazes, eles inibem a resposta das vias aéreas ao alérgeno

através de mecanismos não-específicos (KUNICKA *et al.*, 1993; MANEECHOTESUWAN *et al.*, 2009; PAGE; SPINA, 2006). Cerca de 50-60% dos pacientes com asma grave não respondem a terapia anti-IgE específica (omalizumabe) (HANANIA *et al.*, 2011) e são refratários ao uso de corticosteróides. Esses pacientes foram tratados com imunossuppressores, tais como sais de ouro, metotrexato, azatioprina, ciclosporina e tacrolimus (HOLGATE, 2012) e imunoglobulina intravenosa (BEL; TEN BRINKE, 2005). Mais recentemente, os anticorpos monoclonais têm sido usados para inibir a resposta das células T (Keliximab) (KON *et al.*, 2001), eosinófilos (MK-7246) (GERVAIS *et al.*, 2011) e mastócitos (DAVIS; TODD; COCKCROFT, 2005). No entanto, os efeitos adversos dessas terapias são superiores aos benefícios da sua utilização clínica.

A inibição de células T e da coestimulação por DCs é uma nova abordagem interessante para atenuar as respostas de células T na asma.

2.2 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA

Tolerância imunológica pode ser compreendida como a modulação do sistema imunológico, através de diversos mecanismos, que levam a ausência de resposta a um antígeno. Esse processo é dividido em tolerância central, que ocorre nos órgãos linfóides geradores, e periférica, que ocorre nos órgãos linfóides secundários. No processo de tolerância central, os linfócitos T incapazes de reconhecer a interação entre o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e o peptídeo próprio ou que reconhecem com alta afinidade sofrem apoptose (ANDERSON, G.; JENKINSON, 2007). Apesar do processo de deleção clonal no timo, vários grupos mostram evidências de que não é completamente eficaz, uma vez que muitos clones autorreativos são encontrados na periferia (MATHIS; BENOIST, 2004). A tolerância periférica envolve mecanismos como inibição da coestimulação pela ligação da proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) com CD28, expressão da proteína de morte celular programada (PD-1) nos linfócitos que ao interagir com seu ligante 1 (PD-L1) em células apresentadoras de antígenos inibem a resposta de linfócitos T (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005), ação de citocinas regulatórias como TGF- β e IL-10 (WATANABE *et al.*, 2002), indução de anergia e supressão (KAMRADT; MITCHISON, 2001) e de células regulatórias (MOSER, 2003).

Recentemente, a indução de tolerância imunológica se tornou um alvo essencial para estratégias de prevenção e tratamentos para diversas doenças nas quais a desregulação do sistema imune desempenha um papel crucial, como as alergias (AKDIS, 2006).

2.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS

2.3.1 Aspectos gerais

As DCs são células apresentadoras de antígeno profissionais do sistema imune, com potencial de iniciar, estimular ou inibir respostas imunes (HUBO *et al.*, 2013; MOSER, 2003). São imunofenotipicamente e funcionalmente heterogêneas e estão distribuídas através dos tecidos linfóides e na maioria dos tecidos não linfóides (BODEY; SIEGEL; KAISER, 2004). Essas células representam o principal grupo de células apresentadoras de antígeno, funcionando como sentinelas da superfície mucosa, capturando antígenos para apresentação aos linfócitos T (BODEY; SIEGEL; KAISER, 2004; GILL, 2012). As DCs apresentam capacidade de interagir com células epiteliais através da expressão de citocinas e moléculas coestimulatórias, quando essa interação ocorre com o epitélio pulmonar a resposta inflamatória a aeroalérgenos pode ser afetada (GILL, 2012). São também capazes de fornecer todos os sinais coestimulatórios necessários para a ativação de linfócitos T *naïves*, sendo consideradas as células mais efetivas na indução da resposta imunológica mediada por células T (PAGLIA *et al.*, 1993), inclusive após a exposição a alérgenos (BATES *et al.*, 1998).

Embora tenham sido descobertas em 1868 por Paul Langerhans na epiderme, confundidas com células nervosas, apenas em 1973 foram identificadas e caracterizadas morfofuncionalmente (STEINMAN, R M; COHN, 1973). Este trabalho levou a uma nova compreensão do controle da tolerância e da resposta imune e deu início a um novo campo de estudo dentro de imunologia: o papel das células dendríticas na regulação imune, o seu potencial para a descoberta de novas vacinas e tratamentos de doenças autoimunes.

Existem diferentes subpopulações de DCs, caracterizadas imunofenotipicamente por imunocitoquímica ou citometria de fluxo. Elas podem ser derivadas da medula óssea, e subdivididas em DCs mieloides CD8⁺ CD205⁺ ou CD8⁻ 33D1⁺, DCs plasmocitóides, CD45RA⁺, produtoras de interferon (IFN) tipo I e as DCs produtoras de Fator de necrose tumoral α (TNF- α) e óxido nítrico. Já foram descritas também DCs derivadas do baço, da derme e epiderme, conhecidas com células de Langerhans, células derivadas de tecidos

linfoides e de tecidos não linfoides, como por exemplo, pulmão e fígado (BODEY; SIEGEL; KAISER, 2004; HU; WAN, 2011; MOORE; ANDERSON, 2013; STEINMAN, RALPH M; BANCHEREAU, 2007). As DCs podem ser encontradas ao longo de todo o epitélio do trato respiratório, desde o nariz até o interstício alveolar. No pulmão de camundongos podem ser encontrados três subtipos de DCs: as DCs convencionais com alta expressão de CD11c, subdivididas em CD103⁺ e CD11b⁺, e as DCs plasmocitóides, com Siglec-H, Ly6C e B220 e baixa expressão de CD11c (GILL, 2012). Enquanto as últimas estão relacionadas a tolerância aos antígenos inócuos inalados (DE HEER *et al.*, 2004), as DCs CD11b⁺ produzem quimiocinas atratoras de linfócitos Th2 e TCD8⁺, influenciando a inflamação alérgica (VAN RIJT *et al.*, 2005).

A principal molécula diferencial de superfície das DCs mielóides murinas é a CD11c (LI, H. S.; WATOWICH, 2013; XIAO-KUI HE, XIANG-LING WU, XIU-JUAN HE, BO LI, 2010). Ao contato com antígenos, DCs são responsáveis por sua captura e processamento, quando são ativadas e amadurecem, adquirindo novas propriedades, como aumento na expressão de MHC-II, de moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86, de secreção de citocinas, como o TNF- α , IL-12, IL-15 e IL-6 e elevação da expressão de CCR7 (HUBO *et al.*, 2013; STEINBRINK *et al.*, 2009; TISCH, 2010). O CCR7 é necessário para migração das DCs para os linfonodos periféricos e é alvo das quimiocinas CCL19 e CCL21, produzidas em linfonodos nas zonas de linfócitos T (TISCH, 2010).

Os protocolos descritos na literatura para geração de células dendríticas tolerogênicas utilizam células de origem mieloide, a partir de medula óssea animal ou células mononucleares de sangue periférico humano (BOKS *et al.*, 2012; KOYA *et al.*, 2007; STEINBRINK *et al.*, 2009).

2.3.2 Geração de células dendríticas tolerogênicas *in vitro*

A geração de células dendríticas a partir de progenitores de medula óssea de camundongos ocorre de modo dependente do receptor tirosina quinase Flt3 e do fator estimulante de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF), enquanto DCs podem ser derivadas de monócitos humanos quando cultivadas em presença de GM-CSF e IL-4 (HUBO *et al.*, 2013; LI, H. S.; WATOWICH, 2013).

Embora o GM-CSF seja geralmente adicionado em culturas *in vitro* para estimular o desenvolvimento de DCs, ele não é capaz de estimular a diferenciação de todos os subtipos de DCs, como por exemplo, as DCs CD8⁺ (MOORE; ANDERSON, 2013). No entanto, GM-CSF parece desempenhar um papel importante na função de DCs. A adição de GM-CSF resultou no aumento da expressão de CD103 e na capacidade de apresentação cruzada por essas células (SATHE *et al.*, 2011), além de levar à ativação de DCs CD11b⁺ indutoras da resposta Th2 (GILL, 2012; ZHOU *et al.*, 2014). A apresentação cruzada é uma característica de alguns subtipos de DCs derivadas da medula óssea, em que essas células apresentam antígenos exógenos via MHC-I (SATHE *et al.*, 2011). Essa habilidade é crucial para ativação de linfócitos T CD8⁺ e para manutenção de tolerância imunológica a tecidos próprios (SHORTMAN; HEATH, 2010).

A adição de agentes farmacológicos na cultura de DCs, como aspirina (HACKSTEIN *et al.*, 2001), vitamina D3 (ANDERSON, A. E. *et al.*, 2008; PIEMONTI *et al.*, 2000), drogas imunossupressoras, como corticóides (ANDERSON, A. E. *et al.*, 2008), rapamicina (HORIBE *et al.*, 2008), micofenilato mofetil (GREGORI *et al.*, 2001), e citocinas como IL-10 e TGF- β (LAN *et al.*, 2006), inibem o amadurecimento das DCs, induzindo-as a um estado de amadurecimento parcial, mantendo-as em seu imunofenótipo tolerogênico.

A dexametasona (DEXA) pertence a um grupo de glicocorticóides sintéticos, conhecidos por suas propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras, sendo comumente utilizados para tratar diversas doenças autoimunes e alérgicas, e se apresenta como um agente farmacológico de interesse para indução de células dendríticas tolerogênicas (XIAO-KUI HE, XIANG-LING WU, XIU-JUAN HE, BO LI, 2010).

A dexametasona regula a resposta imune modulando as células dendríticas fenotípica e bioquimicamente, estimulando o aumento da atividade do canal de Na⁺/H⁺ NHE3 através da quinase SGK1, causando acidificação citosólica e redução do volume celular (ROTTE *et al.*, 2011). Foi demonstrado ainda, que a dexametasona induz a redução da produção de IL-12 através do aumento da produção da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (ROCA *et al.*, 2007) e é capaz de reverter ou interferir nos efeitos do lipopolissacarídeo (LPS) nas células dendríticas sobre o volume celular e produção de intermediários reativos do oxigênio (GONG *et al.*, 2011). Mesmo sem alterações fenotípicas marcantes, o efeito da dexametasona na inibição de citocinas próinflamatórias, como a IL-12, é capaz de suprimir a resposta de linfócitos T efetores, através de indução de células T regulatórias, que dependem da expressão

de CD80 e CD86 para proliferação (ALBERT; JEGATHESAN; DARNELL, 2001; YAMAZAKI; STEINMAN, 2009).

2.3.3 Aplicações terapêuticas

O uso de DCs tolerogênicas (tolDCs) vem sendo extensivamente estudado para desenvolvimento de imunoterapias específicas para doenças alérgicas e autoimunes. Já foi demonstrado anteriormente que tolDCs mostraram-se capazes de inibir o desenvolvimento de tireoidite autoimune (GANESH *et al.*, 2009; VERGINIS; LI; CARAYANNIOTIS, 2005), diabetes autoimune (KRIEGEL; RATHINAM; FLAVELL, 2012), miocardite autoimune (YANG *et al.*, 2006) e interferir na resposta de células T derivadas de pacientes com esclerose múltipla (RAÏCH-REGUÉ *et al.*, 2012). Além disso, DCs humanas (LI, X. *et al.*, 2010) e murinas (HENRY *et al.*, 2008) geneticamente modificadas para expressar IL-10 foram capazes de induzir tolerância duradoura *in vitro* e em modelo experimental de asma induzida por ovalbumina, respectivamente.

2 JUSTIFICATIVA

A asma é uma das doenças mais comuns do trato respiratório. Ela afeta cerca de 20 a 30% da população humana e sua prevalência vem aumentando nas últimas décadas (HOLGATE *et al.*, 2010). Trabalhos realizados em Salvador demonstraram prevalência de asma brônquica de 14,5% e de rinite alérgica de 17,4% para indivíduos com nível socioeconômico baixo e de 21,1% e 32,5% para indivíduos de classe alta (BAQUEIRO *et al.*, 2007; MEDEIROS JR., 2000). A eficácia da maioria das imunoterapias para alergia respiratória atualmente em uso é controversa, além de necessitarem de anos de aplicação constante, envolvendo uso de medicamentos geralmente caros e com efeitos colaterais, e/ou depende de afastamento, nem sempre possível, do alérgeno. Embora, nas últimas décadas, significativa redução na morbidade e mortalidade pela asma tenha ocorrido graças ao avanço de pesquisas para a compreensão da patogenia, novas estratégias ainda precisam ser desenvolvidas (SZEFLER, 2011). A inflamação das vias aéreas está fortemente associada ao agravamento dos sintomas da asma e é mediada por fatores que envolvem a interação entre o epitélio pulmonar e as células dendríticas. O papel crucial das células dendríticas na regulação resposta imune após a inalação de aeroalérgenos as torna um potencial alvo terapêutico. A indução de tolerância imunológica ocorre fisiologicamente a antígenos inócuos no epitélio das vias respiratórias, mediada por células dendríticas plasmocitóides, enquanto as DCs mielóides estão associadas a inflamação (GILL, 2012). A modulação farmacológica de DCs mielóides, através do uso de dexametasona, visando gerar células tolerogênicas específicas pode contribuir na terapêutica das doenças alérgicas, através do desvio da resposta imune ou indução de células T regulatórias.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel de DCs diferenciadas de células de medula óssea na presença de dexametasona na modulação de resposta alérgica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se DCs diferenciadas de células de medula óssea na presença de dexametasona e pulsadas *in vitro* com extrato de *B. tropicalis* são capazes de inibir a produção de IgE específica em modelo de alergia respiratória em camundongos A/J
- Analisar o impacto da inoculação de DCs geradas na presença de dexametasona no infiltrado inflamatório pulmonar dos camundongos A/J submetidos ao modelo de alergia experimental
- Avaliar a modulação da produção de citocinas Th2 no lavado broncoalveolar após tratamento com as DCs pulsadas com extrato de *B.tropicalis*
- Avaliar a especificidade dos efeitos das DCs
- Investigar se o reforço da tolerização é eficaz na potenciação do efeito das DCs pulsadas com extrato de *B.tropicalis*

4 MANUSCRITO 1

TITLE: Dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells reduce airway inflammation and IgE antibody response in dust mite extract-immunized mice

AUTHORS: Luciana Souza de Aragão França¹; André Cronemberger Andrade¹; Daniel Abensur Athanazio^{1,3}; Fábio Henrique Brasil da Costa^{1,2}; Viviane Costa Junqueira Rocha¹; Cintia Figueiredo de Araújo¹; Fabíola Cardillo¹; Neuza Maria Alcântara Neves³; Lain Carlos Pontes de Carvalho^{1,2}

AFFILIATIONS: ¹Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Research Center, Salvador, BA, Brazil. ²Bahia School of Medicine and Public Health, Salvador, BA, Brazil. ³Health Science Institute, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil.

CONSIDERAÇÕES:

Este manuscrito foi conduzido para determinar se DCs mielóides geradas na presença de GM-CSF e dexametasona e pulsadas *in vitro* com extrato de *B. tropicalis* são capazes de modular a resposta inflamatória em modelo de alergia respiratória em camundongos A/J. Com essa finalidade, parâmetros importantes relacionados a inflamação das vias aéreas foram avaliados, tais como produção de IgE específica, influxo de células para o lavado broncoalveolar, infiltrado inflamatório pulmonar e produção de citocinas Th2. Para comprovação da especificidade da terapia, comparamos os efeitos das DCs pulsadas com extrato de de *B. tropicalis* com DCs pulsadas com ovalbumina, antígeno comumente utilizado na literatura na indução de asma experimental.

Dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells reduce airway inflammation and IgE antibody response in dust mite extract-immunized mice

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-14-38600
Article Type:	Research Article
Full Title:	Dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells reduce airway inflammation and IgE antibody response in dust mite extract-immunized mice
Short Title:	Dexamethasone-induced dendritic cells ameliorate experimental allergy
Corresponding Author:	Lain Pontes-de-Carvalho Fundação Oswaldo Cruz Salvador, BRAZIL
Keywords:	allergy; dendritic cell; dexamethasone; tolerance; IgE; immune regulation
Abstract:	Allergies affect about 20 to 30% of the world population and their prevalence, as well as the severity of their symptoms, have been increasing in recent decades. <i>Blomia tropicalis</i> has been implicated as one of the most important causative agents of allergic diseases in many Latin-American countries, and it is related to the occurrence of asthma, atopic dermatitis and rhinitis. Dendritic cells in a state of partial maturation have a tolerogenic profile, being able to induce immunological tolerance. In this work, the effect of intraperitoneally injected myeloid DCs that had been in vitro sensitized with a <i>Blomia tropicalis</i> extract was evaluated in a murine respiratory allergy model. Tolerogenic dendritic cells from A/J mice were obtained in the presence of GM-CSF and dexamethasone. They expressed low amounts of MHC-II and costimulatory molecules, and had a marked reduction of PD-L2 and an anti-inflammatory cytokine profile. In allergic models, allergen-specific T helper type 2 cells produce cytokines that lead to the synthesis of allergen-specific IgE and to eosinophilic airway inflammation and airway remodeling. These cells were in vitro sensitized with <i>B. tropicalis</i> extract and intraperitoneally inoculated into mice in which respiratory allergy to <i>B. tropicalis</i> extract was subsequently induced. This procedure specifically and significantly reduced the total number of leukocytes and the number of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid and reduced the serum concentrations of anti- <i>B. tropicalis</i> extract IgE antibodies. Reduced lung inflammatory infiltrate was observed in animals that had been treated either with <i>B. tropicalis</i> extract- or ovalbumin-sensitized dendritic cells. These results indicate that the dendritic cells generate here can inhibit Th2 allergic responses. The specificity of the treatment should be further investigated so that tolerogenic dendritic cells could be considered as a possible therapeutic strategy for Th2-immune response mediated diseases.
Order of Authors:	Luciana Souza Aragão-França André Cronemberger-Andrade Daniel Abensur Athanasio Fábio Henrique Brasil Costa Viviane Junqueira Rocha Cíntia Figueiredo de-Araújo Fabíola Cardillo Neuza Maria Alcantara-Neves Lain Pontes-de-Carvalho
Suggested Reviewers:	Bernhard Ryffel French National Centre for Scientific Research bryffel@cnsr-orleans.fr Works on allergy, antigen-presenting cells and mouse models Francesco Annunziato

	University of Florence francesco.annunziato@unifi.it Works on allergy and immunomodulation
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
<p>Financial Disclosure</p> <p>Please describe all sources of funding that have supported your work. A complete funding statement should do the following:</p> <p>Include grant numbers and the URLs of any funder's website. Use the full name, not acronyms, of funding institutions, and use initials to identify authors who received the funding.</p> <p>Describe the role of any sponsors or funders in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If they had <u>no role</u> in any of the above, include this sentence at the end of your statement: "<i>The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</i>"</p> <p>If the study was unfunded, provide a statement that clearly indicates this, for example: "<i>The author(s) received no specific funding for this work.</i>"</p> <p>* typeset</p>	<p>DAA, FC, NMAN and LCPC are recipients of productivity fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (www.cnpq.br), Ministry of Science and Technology, Brazil. The work received financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB (www.fapesb.ba.gov.br), State Government of Bahia, and CNPq, Brazil (PRONEX).</p>
<p>Competing Interests</p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or non-financial competing interests.</p> <p>Do any authors of this manuscript have competing interests (as described in the PLOS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests)?</p> <p>If yes, please provide details about any</p>	<p>The authors have declared that no competing interests exist.</p>

and all competing interests in the box below. Your response should begin with this statement: *I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests:*

If no authors have any competing interests to declare, please enter this statement in the box: *"The authors have declared that no competing interests exist."*

* typeset

Ethics Statement

You must provide an ethics statement if your study involved human participants, specimens or tissue samples, or vertebrate animals, embryos or tissues. All information entered here should **also be included in the Methods section** of your manuscript. Please write "N/A" if your study does not require an ethics statement.

Human Subject Research (involved human participants and/or tissue)

All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or an equivalent committee, and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the [Declaration of Helsinki](#). Informed consent, written or oral, should also have been obtained from the participants. If no consent was given, the reason must be explained (e.g. the data were analyzed anonymously) and reported. The form of consent (written/oral), or reason for lack of consent, should be indicated in the Methods section of your manuscript.

Please enter the name of the IRB or Ethics Committee that approved this study in the space below. Include the approval number and/or a statement indicating approval of this research.

Animal Research (involved vertebrate animals, embryos or tissues)

It is stated in the Material and Methods, 'Animals and ethical consideration' section, that 'The experiments and all the animal procedures were approved by the Committee for Ethics in Use of Experimental Animals, Gonçalo Moniz Research Centre, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil.'

<p>All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. If your study involved non-human primates, you must provide details regarding animal welfare and steps taken to ameliorate suffering; this is in accordance with the recommendations of the Weatherall report, "The use of non-human primates in research." The relevant guidelines followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.</p> <p>If anesthesia, euthanasia or any kind of animal sacrifice is part of the study, please include briefly in your statement which substances and/or methods were applied.</p> <p>Please enter the name of your Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or other relevant ethics board, and indicate whether they approved this research or granted a formal waiver of ethical approval. Also include an approval number if one was obtained.</p> <p>Field Permit</p> <p>Please indicate the name of the institution or the relevant body that granted permission.</p>	
<p>Data Availability</p> <p>PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available, without restriction and from the time of publication, with only rare exceptions to address legal and ethical concerns (see the PLOS Data Policy and FAQ for further details). When submitting a manuscript, authors must provide a Data Availability Statement that describes where the data underlying their manuscript can be found.</p> <p>Your answers to the following constitute your statement about data availability and will be included with the article in the event of publication. Please note that simply stating 'data available on request from the author' is not acceptable. If, however, your data are only available upon request from the author(s), you must answer "No" to the first question below, and explain your exceptional situation in the text box provided.</p>	<p>Yes - all data are fully available without restriction</p>

<p>Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?</p>	
<p>Please describe where your data may be found, writing in full sentences. Your answers should be entered into the box below and will be published in the form you provide them, if your manuscript is accepted. If you are copying our sample text below, please ensure you replace any instances of XXX with the appropriate details.</p> <p>If your data are all contained within the paper and/or Supporting Information files, please state this in your answer below. For example, "All relevant data are within the paper and its Supporting Information files."</p> <p>If your data are held or will be held in a public repository, include URLs, accession numbers or DOIs. For example, "All XXX files are available from the XXX database (accession number(s) XXX, XXX)." If this information will only be available after acceptance, please indicate this by ticking the box below. If neither of these applies but you are able to provide details of access elsewhere, with or without limitations, please do so in the box below. For example:</p> <p>"Data are available from the XXX Institutional Data Access / Ethics Committee for researchers who meet the criteria for access to confidential data."</p> <p>"Data are from the XXX study whose authors may be contacted at XXX."</p> <p>* typeset</p>	<p>All relevant data are within the paper.</p>
<p>Additional data availability information:</p>	

Dear Sirs/Madams,

The present manuscript deals with myeloid-derived dendritic cells that have differentiated in vitro from bone-marrow cells in the presence of dexamethasone and subsequently stimulated with bacterial LPS. It shows that these cells clearly down-modulate important inflammatory/immunological parameters in mice in which experimental respiratory allergy to a house dust mite allergenic extract is induced.

We hope the manuscript is suitable for publication in PLoS One.

Sincerely,

Lain Pontes-de-Carvalho

1 **TITLE:** Dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells reduce
2 airway inflammation and IgE antibody response in dust mite extract-
3 immunized mice

4

5 **AUTHORS:** Luciana Souza de Aragão-França¹; André Cronemberger-
6 Andrade¹; Daniel Abensur Athanazio^{1,2}; Fábio Henrique Brasil da
7 Costa^{1,3}; Viviane Costa Junqueira Rocha¹; Cintia Figueiredo de-
8 Araújo¹; Fabíola Cardillo¹; Neuza Maria Alcântara Neves⁴; Lain Carlos
9 Pontes-de-Carvalho^{1,3}

10

11 **AFFILIATIONS:** ¹Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa
12 Gonçalo Moniz, Salvador, Brazil. ²Faculdade de Medicina,
13 Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil.

14 ³Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil.

15 ⁴Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia,
16 Salvador, Brazil.

17

18 **CORRESPONDING AUTHOR:** Lain Carlos Pontes de Carvalho - Rua
19 Waldemar Falcão 121, Candeal, Salvador, BA, Brasil, CEP 41830-290.
20 Telephone: +55 71 3156 2216, FAX: +55 71 3156 2290, E-mail:
21 lain.carvalho@gmail.com.

22

23 **COMPETING INTERESTS:** The authors have declared that no
24 competing interests exist.

25

26 **AUTHOR CONTRIBUTIONS:** Conceived and designed the
27 experiments: LSAF FHBC LCPC. Performed the experiments: LSAF
28 FHBC VCJR CFA ACA. Analyzed the data: LSAF DAA FC LCPC.
29 Contributed reagents/materials/analysis tools: NMAN. Wrote the
30 paper: LSAF LCPC. Reviewed the manuscript: DAA FC NMAN LCPC.

31

32 **ABSTRACT**

33 Allergies affect about 20 to 30% of the world population and their
34 prevalence, as well as the severity of their symptoms, have been
35 increasing in recent decades. *Blomia tropicalis* has been implicated as
36 one of the most important causative agents of allergic diseases in
37 many Latin-American countries, and it is related to the occurrence of
38 asthma, atopic dermatitis and rhinitis. Dendritic cells in a state of
39 partial maturation have a tolerogenic profile, being able to induce
40 immunological tolerance. In this work, the effect of intraperitoneally
41 injected myeloid DCs that had been *in vitro* sensitized with a *Blomia*
42 *tropicalis* extract was evaluated in a murine respiratory allergy model.
43 Tolerogenic dendritic cells from A/J mice were obtained in the
44 presence of GM-CSF and dexamethasone. They expressed low
45 amounts of MHC-II and costimulatory molecules, and had a marked
46 reduction of PD-L2 and an anti-inflammatory cytokine profile. In
47 allergic models, allergen-specific T helper type 2 cells produce
48 cytokines that lead to the synthesis of allergen-specific IgE and to
49 eosinophilic airway inflammation and airway remodeling. These cells
50 were *in vitro* sensitized with *B. tropicalis* extract and intraperitoneally
51 inoculated into mice in which respiratory allergy to *B. tropicalis*
52 extract was subsequently induced. This procedure specifically and
53 significantly reduced the total number of leukocytes and the number
54 of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid and reduced the serum
55 concentrations of anti-*B. tropicalis* extract IgE antibodies. Reduced
56 lung inflammatory infiltrate was observed in animals that had been
57 treated either with *B. tropicalis* extract- or ovalbumin-sensitized
58 dendritic cells. These results indicate that the dendritic cells generate
59 here can inhibit Th2 allergic responses. The specificity of the
60 treatment should be further investigated so that tolerogenic dendritic
61 cells could be considered as a possible therapeutic strategy for Th2-
62 immune response mediated diseases.

63

64

65

66 INTRODUCTION

67 The concept of allergic asthma equates to a group of clinical and
68 physiological characteristics including reversible airway obstruction,
69 bronchoconstriction in association with airway hyperresponsiveness
70 (AHR), T helper type (Th)2 responses and eosinophilic airway
71 inflammation mediated by allergen-specific IgE [1,2]. Airway
72 remodeling, which involves permanent changes such as goblet cell
73 hyperplasia, mucus cell metaplasia, smooth muscle thickening,
74 fibrosis and release of inflammatory mediators by mast cells and
75 basophils, is a feature of chronic inflammation, orchestrated by Th2
76 cytokines, such as IL-4, IL-5 and IL-13 [1,3].

77 Asthma is one of the most common diseases of respiratory tract in
78 childhood [4], although epidemiologic studies have demonstrated the
79 high prevalence of asthma in all ages [5]. This chronic airway
80 inflammation affects 5–10% of the population in many developed
81 countries and has been inversely correlated with socioeconomic
82 burden, explained by the hygiene hypothesis [6]. However, recent
83 studies demonstrate that this association needs to be revised. The
84 ISAAC study showed that the prevalence of asthma and allergic
85 diseases is progressively increasing in countries in Africa, Latin
86 America and parts of Asia, but it is not uniform [7]. In Brazil, every
87 year, there are 350,000 hospitalizations for asthma, which is the
88 fourth leading cause of hospitalization in the public health system
89 (2.3% of total). Our research group has demonstrated a prevalence
90 of 71.8% of *Blomia tropicalis* followed by 39.9% of
91 *Dermatophagoides pteronyssinus* in beds of different districts in the
92 city of Salvador, Brazil [8].

93 The dendritic cells (DCs) constitute an immunophenotypically and
94 functionally heterogeneous population of professional antigen
95 presenting cells that display a unique potential to initiate both
96 immunogenic and tolerogenic primary immune responses depending
97 on their functional state [9–11]. This ability is due in part to the fact
98 that those DCs are found in lymphoid tissues, such as the thymus
99 and lymph nodes, and in non-lymphoid organs, such as skin and lung
100 [10], privileged location that favors the capture of antigens, but
101 mainly because they provide all the essential costimulatory signals for
102 activation of naïve T lymphocytes [12,13]. The activation of the
103 immune response or induction of tolerance by DCs is set up during
104 the process of maturation [14]. Antigen-presenting DCs in a state of
105 partial maturation — alternative activated tolerogenic DCs — have
106 therefore a tolerogenic profile, being able to induce immunological
107 tolerance [15,16].

108 In this work, DCs were differentiated from murine bone-marrow cells
109 *in vitro* in the presence of dexamethasone, activated with bacterial
110 lipopolysaccharide (DC-DexaLPS) and sensitized with a *Blomia*
111 *tropicalis* mite extract (BtE). The effect of intraperitoneal injections of
112 this dendritic cell preparation (DC-DEXA^{BtE}) on a murine experimental
113 respiratory allergy model was evaluated. Significant reductions in
114 levels of circulating anti-*Blomia tropicalis* IgE, eosinophil numbers in
115 bronchoalveolar lavage fluid and lung inflammation were observed.

116

117 **MATERIAL AND METHODS**

118

119 **Animals and ethical consideration**

120 Five to 7 week-old A/J female mice were bred and maintained at the
121 animal house of the Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz
122 Foundation, Salvador, Brazil. The experiments and all the animal
123 procedures were approved by the Committee for Ethics in Use of

124 Experimental Animals, Gonçalo Moniz Research Centre, Fundação
125 Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil.

126

127 **Antigens**

128 The antigens used in this study were the following: house dust mite
129 *Blomia tropicalis* (Greer Laboratories, Lenoir, NC, USA); ovalbumin
130 grade V (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

131

132 **Generation of bone marrow-derived dendritic cells (BMDC)**

133 The method of isolation of BMDC was adapted from a previously
134 described protocol [14]. A/J mouse bone marrow cells were collected
135 by flushing femur bone marrows with RPMI medium (Sigma-Aldrich,
136 St. Louis, MO, USA). The cells were then cultured in 75 cm² flasks at
137 a concentration of 10⁶ nucleated cells/mL in RPMI medium, with 100
138 mM pyruvate, 200 mM glutamine, 10 mM HEPES, 10% fetal bovine
139 serum (FBS; Cripion, São Paulo, Brazil), 50-80 µg/mL gentamicin,
140 0.2% NaHCO₃, pH 7.4, supplemented with 30% of the supernatant
141 from a X-63-cell culture (containing GM-CSF). Cultures were
142 incubated at 37° C in a 5% CO₂ atmosphere. After 72 hours, the
143 supernatant was removed and the sediments containing non-
144 adherent cells were resuspended with fresh medium. DC-DexaLPS
145 were obtained by adding dexamethasone (10⁻⁶ M; Decadron, Prodome
146 Laboratory, Campinas, SP, Brazil) on days 3 and 6 of culture. After 7
147 days of culture, the BMDC were harvested and activated with 1
148 µg/mL bacterium lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich, St. Louis,
149 MO, USA) for 24 hours. Some bone-marrow cells were left to
150 differentiate into BMDC in the absence of dexamethasone and then
151 stimulated with LPS (DC-LPS).

152

153

154 Dendritic cell characterization

155 The phenotypic characterization of DCs was carried out by three-
156 colour flow cytometry. Monoclonal antibody (mAb)-fluorochrome or
157 biotin conjugates [fluorescein isothiocyanate anti-CD11c mAb,
158 phycoerythrin-cyanine anti-CD11b mAb, biotin anti-I-A^d mAb, biotin
159 anti- PD-L1, biotin anti- PD-L2, phycoerythrin (PE) anti-CD40 mAb,
160 PE anti-CD80 mAb, PE anti-CD86 mAb] were from eBioscience
161 (eBioscience Inc., San Jose , CA, USA). The cells were incubated with
162 the conjugates on ice for 20 minutes and washed twice. Those
163 incubated with biotin-mAb conjugates were subsequently incubated
164 with PE-avidin for 20 minutes. The cell suspensions were then
165 washed once with 0.15 M phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS).
166 For each sample, data from 100,000 cells were acquired. Dendritic
167 cells were typically 70% CD11c-positive, as published elsewhere [17].
168 The cells supernatants, harvested 24 hours after LPS stimulation,
169 were stored at -20° C until used for cytokine measurements. IL-1 β ,
170 IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α concentrations were quantified in
171 commercial ELISA Ready-SET-Go! kits, in accordance with
172 manufacturer's instructions (eBioscience Inc., San Jose, CA, USA).

173

174 Experimental allergy model

175 Groups of A/J mice were sensitized by means of intraperitoneal
176 injections of *BtE* containing 100 μ g of protein adsorbed to 1.6 mg of
177 aluminium hydroxide gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) on days
178 0 and 14. They were challenged intranasally with of *BtE* containing 10
179 μ g of protein in 25 μ l of saline on days 21, 23, 25 and 27. Control
180 groups received only saline and were challenged with saline. The
181 mice were euthanized 24 hours after the last challenge.

182

183

184 **Antigen-sensitization of DCs and induction of tolerance**

185 For induction of tolerogenic dendritic cells, DC-DexaLPS were pulsed
186 overnight with *BtE* (100 µg of protein/mL of medium; DC-Dexa^{BtE}) or
187 100 µg ovalbumin/mL of medium (DC-Dexa^{OVA}) on day 6 of culture.
188 Ten days before the first sensitizing exposure to *BtE*, mice were
189 injected intraperitoneally with 10⁶ DC-Dexa^{BtE} or DC-Dexa^{OVA}, in 100
190 µL of saline. Control mice were injected only with the vehicle (saline).

191

192 **Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) collection and cell** 193 **counting**

194 The tracheas of the dead mice were cannulated and the BALF
195 collected with 0.5 mL of PBS containing 1% of bovine serum albumin
196 (PBS-BSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). An aliquot of
197 the BALF cells was washed by centrifugation, and the cell pellet
198 resuspended in PBS-BSA. Total cell counts were carried out in a
199 Neubauer chamber. Differential cell counts were performed in blinded
200 fashion by counting 100 cells in hematoxylin and eosin-stained
201 cytospin preparations in a light microscope. Following centrifugation
202 of the BALF (400 g for 5 minutes at 4° C), the supernatants were
203 collected and stored at -20° C for subsequent measurement of
204 cytokine content, and the pellets were used for the measurement of
205 eosinophil peroxidase (EPO) activity.

206

207 **Quantification of EPO and histopathology analysis**

208 After the BALF collection, the lungs were perfused, via the heart right
209 ventricle, to remove residual blood, with PBS containing 10 mM
210 EDTA. Fragments of the lungs were macerated with Hank's balanced
211 salt solution (HBSS) and incubated for 5 minutes with red blood cell
212 lysis buffer (0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃ and 0.1 mM EDTA, pH 7.4).
213 Following centrifugation (400 g for 10 minutes at 4° C), the
214 precipitates were resuspended in HBSS containing 0.5%

215 hexadecyltrimethyl-ammonium bromide and stored at -20° C for
216 subsequent measurement of EPO activity.

217 A second fragment of 100 mg of lung tissue was resuspended in
218 a solution containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.1 mM PMSF,
219 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KIU/mL
220 aprotinin. The samples were centrifuged (9,300 g for 10 minutes at
221 4° C) and the supernatants collected and stored at -20° C for
222 subsequent measurement of cytokine content.

223 For histological analysis, a third fragment of the lung was fixed
224 with 10% formalin. Specimens were placed onto slides, stained with
225 hematoxylin and eosin, and evaluated by light microscopy. The
226 degree of peribronchial and perivascular inflammation was scored by
227 three independent, blinded investigators using a subjective scale of 0
228 to 3 (0, no detectable inflammation; 1, occasional cuffing with
229 inflammatory cells; 2, most bronchi or vessels surrounded by a thin
230 layer of between one and five inflammatory cells; 3, most bronchi or
231 vessels surrounded by a thick layer of more than five inflammatory
232 cells), as described elsewhere [18].

233 The EPO activity present in lung cells and BALF was determined
234 by means of a colorimetric assay [19]. Briefly, the BALF was
235 incubated with erythrocyte-lysing buffer and centrifuged. The cell
236 pellets were resuspended in PBS and lysed by three successive
237 freezing and thawing procedures, and then assayed for peroxidase
238 activity in 96-well microassay plates, in duplicates, using 6.6 mM
239 H₂O₂ and 1.5 mM orthophenylenediamine (Merck, Whitehouse
240 Station, NJ, USA).

241

242 **Cytokine assays**

243 The BALF and the lung cells supernatants were stored at -70° C until
244 used. IFN- γ and IL-4, IL-10 and IL-13 concentration measurements
245 were assayed with commercial ELISA kits according to manufacturer's
246 instructions (eBioscience Inc., San Jose, CA, USA).

247

248 ELISA for immunoglobulin isotypes

249 Serum anti-BtE IgG1 and IgG2a antibodies were measured using BtE-
250 coated microtitre plates and biotin-conjugated anti-mouse IgG1 or
251 anti-mouse IgG2a, respectively (Pharmingen, St. Diego, CA, USA),
252 streptavidin-horseradish peroxidase, H₂O₂ and
253 orthophenylenediamine (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) [20].
254 Serum anti-BtE IgE antibodies were detected using BtE-coated
255 microtitre plates and biotin-conjugated anti-mouse IgE (eBioscience
256 Inc., San Jose, CA, USA), streptavidin-horseradish peroxidase, H₂O₂
257 and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (eBioscience Inc., San Jose, CA,
258 USA) [21].

259

260 Statistical analysis

261 The normality of the data was determined by the Shapiro-Wilk
262 normality test. In order to analyze differences among more than two
263 mouse groups, the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni's
264 test was used for parametric data and the Kruskal-Wallis test
265 followed by the Dunn's post test was used for non-parametric data.
266 To compare the means of two groups, the Mann-Whitney's U test for
267 non-parametric data and the t test for parametric data were used. All
268 results were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

269

270 RESULTS AND DISCUSSION**271 Dexamethasone treatment induces a semi-mature phenotype
272 and an antiinflammatory profile to myeloid DCs**

273

274 It has been shown that myeloid dendritic cells are the main cells that
275 initiate allergic asthma [22]. These cells, therefore, may be important
276 targets for the induction of immunological tolerance. Several

277 approaches to generate TolDCs from myeloid precursors have been
278 developed, which include pre-treatment with immunosuppressive
279 agents, such as dexamethasone [23,24], rapamycin [25], and
280 mycophenolate mofetil [26], the addition of pharmacological agents
281 to the bone marrow culture such as aspirin [27], vitamin D3
282 [24,26,28], and the cytokines IL-10 or TGF- β [29], followed by
283 activation by LPS or CD40-L [30]. In this work, DCs with a
284 tolerogenic profile were generated *in vitro* by adding dexamethasone
285 on the 3rd and 6th day of A/J mouse bone-marrow cell culture in the
286 presence of GM-CSF, followed by activation by LPS [24].

287 The maturity of the myeloid DCs differentiated in the presence of
288 dexamethasone was evaluated by conventional light microscopy for
289 morphology changes and flow cytometry for changes in surface
290 molecules. DC-DexaLPS appeared regular, round, with less prominent
291 dendrites than DC-LPS, which were variable in size, with many cells
292 forming clusters (not shown).

293 The dendritic cells derived from bone marrow were characterized as
294 CD11c⁺ CD11b⁺ cells and constituted approximately 80% of cells in
295 culture (Figure 1, A). Those double-positive cells were gated for
296 posterior analysis of costimulatory molecules that have been shown
297 to be markers of dendritic cell activation [31,32].

298 Programmed cell death 1 (PD-1) is a receptor expressed on activated
299 T cells. Signaling via PD-1 is involved in maintaining peripheral
300 tolerance, via apoptosis [33,34]. Antigen-presenting cells have two
301 ligands to this molecule, PD-L1 and PD-L2. A higher percentage of
302 cells expressing PD-L1 in the DC-DexaLPS preparation (52%) than in
303 the DC-LPS preparation (36%) was observed (Figure 1, B). On the
304 other hand, PD-L2 was strikingly downregulated (from 42.0% to
305 5.6%) in the DC-DexaLPS (Figure 1, C). The relationship between the
306 expression of PD-1 ligands and induction of tolerance by tolerogenic
307 dendritic cells is controversial in the literature and can vary
308 depending on the stimulus, cell line, species or tolerogenic induction.

309 Although these molecules are inversely correlated with maturation
310 [35], a study clearly shows the increase of these ligands in
311 alternatively activated DCs [36], another shows their downregulation
312 [37], while others show no variation [37,38]. A study on lung
313 biopsies from allergic individuals shows a direct association of PD-L2
314 expression with allergen-induced airway hyperresponsiveness and
315 with the production of IL-12 by DCs [39]. In an allergy context,
316 therefore, it seems that PD-L2 is associated with pathology, and the
317 fact that the DC-DexaLPS express little PD-L2 might be relevant for
318 their possible therapeutic use. The marked decrease in PD-L2
319 concentration in tolerogenic DCs, to the best of the authors'
320 knowledge, has not been reported so far.

321

322 The exposure of immature DCs to dexamethasone resulted in a semi-
323 mature phenotype, as indicated by the reduced expression of CD80
324 (66 % of the cells in DC-DexaLPS cultures and 96 % in DC-LPS
325 cultures; Figure 1, D), CD86 (15 % of the cells in DC-DexaLPS
326 cultures and 46 % in DC-LPS cultures; Figure 1, E), CD40 (2.0 % of
327 the cells in DC-DexaLPS cultures and 4.5 % in DC-LPS cultures;
328 Figure 1, F), and MHC II (43,51 % of the cells in DC-DexaLPS
329 cultures and 90,51% in DC-LPS cultures; Figure 1, G and H), and the
330 lack of secretion of TNF- α , IL-12p70, and IL-1 (Figure 2, A-C). The
331 downregulation of CD80 was mainly due to a reduction of the CD80
332 high subpopulation, from 42% to 13% (Figure 1, D). Although only a
333 small percentage (4.5%) of DC-LPS expressed CD40, this percentage
334 was 2.25-fold lower in DC-DexaLPS (2.0%; Figure 1, F). The
335 reduction in the percentage of DC-DexaLPS that expressed MHC II
336 was mainly accounted for by the MHC II-high subpopulation (which
337 was 21.6% in the DC-DexaLPS and 51.3% in DC-LPS; Figure 1, H).

338 Recent studies demonstrate that the lack of IL-12p70 production is a
339 key feature of tolerogenic DCs and is important to their regulatory
340 actions, since the replacement of this cytokine can prevent anergy of

341 T cells, and, together with IL-10 production, its absence is considered
342 as a quality control criterium for therapeutic DCs preparations [29].
343 Both dendritic cell preparations, the DC-DexaLPS and the DC-LPS,
344 produced similar amounts of IL-10 (Figure 2, E).

345 MCP-1 (CCL2) is a chemokine which plays an important role in the
346 recruitment of different immune cells to sites of inflammation. Ours
347 results show similar amounts of MCP-1 in both DC cultures (Figure 2,
348 D), indicating that DC-DexaLPS may be induced to migrate by that
349 chemokine.

350 Collectively, these results demonstrate that DCs with an
351 immunosuppressive phenotype were generated in the present work
352 by the presence of dexamethasone during their differentiation
353 process from bone marrow cells, confirming previous reports in the
354 literature [14,24,28,29].

355

356 ***Blomia*-pulsed dexamethasone-induced tolerogenic DCs**
357 **reduce in a specific manner important markers of allergy**

358

359 There are many reports in the literature on therapies for allergic
360 diseases, such as immunotherapies with purified or recombinant
361 antigens, immunotherapies using cytokines or bacterial products as
362 adjuvants [40,41], corticosteroids [42,43] and β 2-agonists [44],
363 inhibitors of the cellular immune response [45,46] and targeting of
364 Th2 cytokines [47,48]. However, the cure is not achieved in many
365 subjects, especially when considering all asthma phenotypes [6].
366 While corticosteroids are the most effective pharmacotherapies, they
367 have as drawback the inhibition the immune response to allergen
368 through non-specific mechanisms [42,44,49].

369 Tolerogenic DCs have already been used before prophylactically and
370 therapeutically to prevent the development of allergic respiratory
371 diseases in laboratory animals. However, cells differentiated in the
372 presence of TGF- β or IL-10 were used [50–53]. In the present work,

373 dendritic cells generated in the presence of dexamethasone, which
374 produce normal amounts of IL-10 (Figure 2, E), were used to induce
375 immune tolerance to the house dust mite *Blomia tropicalis*. One
376 million DC-Dexa^{BtE} were injected intraperitoneally 10 days before
377 induction of airway inflammation (Figure 3). In order to assess the
378 specificity of the tolerance induction procedure, the same number of
379 dendritic cells were pulsed with ovalbumin and inoculated in a group
380 of A/J mice prior to immunization.

381 The total number of cells (Figure 4, A), the percentage of eosinophils
382 (Figure 4, B), and the concentration of IL-5 (Figure 5, A) were
383 significantly lower in the BALF from DC-Dexa^{BtE}-treated mice than in
384 the BALF from non-treated sensitized mice or DC-Dexa^{OVA} treated
385 group. In two out of three experiments, an increase in the percentage
386 of macrophages in the BALF of animals which have received DC-
387 Dexa^{BtE} was observed (data not shown). No differences in EPO
388 activity levels in BALF or lung extracts were observed (Figure 4, C).

389 The immunization protocol used here consistently failed to lead to
390 increased levels of IL-5, IL-13 and IFN- γ in the BALF (Figure 5) and in
391 lung extract (not shown). Even so, the BALF of mice that received
392 DC-Dexa^{BtE} had lower amounts of IL-5 than the mice that received
393 the other treatments (Figure 5, A), a fact that is consistent with their
394 having less eosinophils in the BALF than the other mice.

395 Inoculation of both DC-Dexa^{BtE} and DC-Dexa^{OVA} significantly reduced
396 the allergen-induced airway inflammation (Figure 6, A) and lung
397 perivascular infiltration by polymorphonuclear cells (Figure 6, B). The
398 neutrophilic infiltrates were mostly found around bronchioles and
399 vessels (Figure 6, D-G). No differences in mucus production were
400 observed (Figure 6, C), in accordance with the finding that IL-13 were
401 practically undetectable in the BALF (Figure 5, B) or in the lung
402 extract (not shown) of any mice.

403 The mice treated with DC-Dexa^{BtE} had significantly lower levels of
404 BtE-specific IgE antibodies than the control mice that were not

405 treated with DCs. Although they also had lower levels than those that
406 received DC-Dexa^{OVA}, the difference was not statistically significant
407 (Figure 7).

408 Although it has been reported that tolerogenic DCs generated in the
409 presence of dexamethasone may act non specifically [54,55], our
410 results clearly show that these cells modulate immunological
411 parameters related to the pathogenesis of allergic diseases, such as
412 eosinophilic infiltration, IL-5 and IgE antibodies in an antigen-specific
413 way. On the other hand, the reduction of pulmonary inflammation
414 was non-specific, i.e., it was also seen in mice treated with DC-
415 Dexa^{OVA}. It seems, therefore, that the pulmonary inflammation is
416 more easily controlled than the Th2 immune response by DC-
417 DexaLPS.

418 The mechanisms through which dexamethasone generates
419 tolerogenic dendritic cells have been extensively investigated
420 [38,56,57], and the discrepancies between the studies have been
421 associated with the origin of the cells, the culture medium and the
422 stimuli used, and the incubation time with dexamethasone
423 [38,51,54,58]. Boks and colleagues reported an *in vivo* instability of
424 these cells when they were treated with dexamethasone for 1 hour
425 [54], while treating for 48 hours produced better results in terms of
426 inhibiting the IFN- γ production by effector lymphocytes than a 6-hour
427 treatment [58]. In the present work, the differentiating bone marrow
428 cells were treated for four days with dexamethasone.

429 Tolerogenic DCs can induce tolerance by T-cell deletion, T-cell
430 anergy, cytokine deviation or induction of Tregs [35,59,60]. The
431 capacity to produce IL-10, together with the low costimulatory
432 phenotype, is consistent with the view that the DC-DexaLPS could be
433 modulating the airway inflammation via the induction of Tregs. The
434 mechanism of action of the DCs in the present work, however, is
435 open to investigation.

436 Other studies employing DCs have been carried out in an attempt to
437 reduce the allergic phenomena. For instance, genetically engineered
438 DCs protected OVA-sensitized recipient mice from airway eosinophilia
439 upon OVA provocation [61] and airway hyperreactivity was abrogated
440 between three and ten weeks post-induction of allergy in an antigen-
441 specific manner by the inoculation of DCs differentiated *in vitro* in
442 the presence of IL-10 [52]. In the present work a more readily
443 available reagent, dexamethasone, was used in place of IL-10. It
444 should still be investigated, however, whether the DC-DexaLPS would
445 be able to control an ongoing allergic response.

446

447 **CONCLUDING REMARKS**

448 Tolerogenic DCs are promising immunotherapeutic tools for
449 immunologically mediated pathologies. However, there is no
450 consensus in the literature about the most appropriate methodology
451 that should be used for a particular disease. The work described here
452 shows that bone marrow-derived dendritic cells generated in the
453 presence of dexamethasone, and stimulated *in vitro* with LPS, can
454 inhibit the development of a Th2 allergic response. This methodology
455 deserves be further investigated with the aim of specifically inhibiting
456 pathogenic humoral immune responses, such as those found in
457 allergy and autoimmune diseases.

458

459 **ACKNOWLEDGMENTS**

460 The authors thank Ana Tereza Cerqueira Lima for important support
461 in the realization of bronchoalveolar lavage. DAA, FC, NMAN and
462 LCPC are recipients of productivity fellowships from the Conselho
463 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
464 (www.cnpq.br), Ministry of Science and Technology, Brazil. The work
465 received financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa

466 do Estado da Bahia - FAPESB (www.fapesb.ba.gov.br), State
467 Government of Bahia, and CNPq, Brazil (PRONEX).

468

469 REFERENCES

- 470 1. Mizutani N, Nabe T, Yoshino S (2013) Interleukin-33 and
471 alveolar macrophages contribute to the mechanisms underlying
472 the exacerbation of IgE-mediated airway inflammation and
473 remodelling in mice. *Immunology* 139: 205–218.
474 doi:10.1111/imm.12071.
- 475 2. Cohn L, Elias JA, Chupp GL (2004) Asthma: mechanisms of
476 disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 22:
477 789–815. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104716.
- 478 3. Holgate ST, Arshad HS, Roberts GC, Howarth PH, Thurner P, et
479 al. (2010) A new look at the pathogenesis of asthma. *Clin Sci*
480 (Lond) 118: 439–450. doi:10.1042/CS20090474.
- 481 4. Wong GW, Hui DS, Chan HH, Fok TF, Leung R, et al. (2001)
482 Prevalence of respiratory and atopic disorders in Chinese
483 schoolchildren. *Clin Exp Allergy* 31: 1225–1231.
- 484 5. Rosario-Filho NA, Jacob CM, Sole D, Condino-Neto A, Arruda LK,
485 et al. (2013) Pediatric allergy and immunology in Brazil. *Pediatr*
486 *Allergy Immunol* 24: 402–409. doi:10.1111/pai.12069.
- 487 6. Wenzel SE (2012) Asthma phenotypes: the evolution from
488 clinical to molecular approaches. *Nat Med* 18: 716–725.
489 doi:10.1038/nm.2678.
- 490 7. Solé D, Yamada E, Vana AT, Werneck G, Solano de Freitas L, et
491 al. (2001) International Study of Asthma and Allergies in
492 Childhood (ISAAC): prevalence of asthma and asthma-related
493 symptoms among Brazilian schoolchildren. *J Investig Allergol*
494 *Clin Immunol* 11: 123–128.
- 495 8. Baqueiro T, Carvalho FM, Rios CF, dos Santos NM, Alcântara-
496 Neves NM (2006) Dust mite species and allergen concentrations
497 in beds of individuals belonging to different urban socioeconomic
498 groups in Brazil. *J Asthma* 43: 101–105.
499 doi:10.1080/02770900500497958.

- 500 9. Steinman RM, Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type
501 in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology,
502 quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142–1162.
- 503 10. Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE (2004) Antigen presentation by
504 dendritic cells and their significance in antineoplastic
505 immunotherapy. *In Vivo* 18: 81–100.
- 506 11. Kushwah R, Hu J (2010) Dendritic cell apoptosis: regulation of
507 tolerance versus immunity. *J Immunol* 185: 795–802.
508 doi:10.4049/jimmunol.1000325.
- 509 12. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Witmer-Pack M, Steinman RM
510 (1990) Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int Rev*
511 *Immunol* 6: 197–206. doi:10.3109/08830189009056630.
- 512 13. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM (1990) Dendritic
513 cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-
514 specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 172: 631–640.
- 515 14. Ureta G, Osorio F, Morales J, Roseblatt M, Bono MR, et al.
516 (2007) Generation of dendritic cells with regulatory properties.
517 *Transplant Proc* 39: 633–637.
518 doi:10.1016/j.transproceed.2006.12.032.
- 519 15. Baru AM, Hartl A, Lahl K, Krishnaswamy JK, Fehrenbach H, et al.
520 (2010) Selective depletion of Foxp3+ Treg during sensitization
521 phase aggravates experimental allergic airway inflammation.
522 *Eur J Immunol* 40: 2259–2266. doi:10.1002/eji.200939972.
- 523 16. Li X, Yang A, Huang H, Zhang X, Town J, et al. (2010) Induction
524 of type 2 T helper cell allergen tolerance by IL-10-differentiated
525 regulatory dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 190–
526 199. doi:10.1165/rcmb.2009-0023OC.
- 527 17. Pedersen a E, Gad M, Kristensen NN, Haase C, Nielsen CH, et al.
528 (2007) Tolerogenic dendritic cells pulsed with enterobacterial
529 extract suppress development of colitis in the severe combined
530 immunodeficiency transfer model. *Immunology* 121: 526–532.
531 doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02600.x.
- 532 18. Park HS, Kim KH, Jang S, Park JW, Cha HR, et al. (2010)
533 Attenuation of allergic airway inflammation and
534 hyperresponsiveness in a murine model of asthma by silver
535 nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 5: 505–515.
- 536 19. Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ (1985) Detection of
537 eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an

- 538 assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods*
539 83: 209–215.
- 540 20. Baqueiro T, Russo M, Silva VMG, Meirelles T, Oliveira PRS, et al.
541 (2010) Respiratory allergy to *Blomia tropicalis*: immune
542 response in four syngeneic mouse strains and assessment of a
543 low allergen-dose, short-term experimental model. *Respir Res*
544 11: 51. doi:10.1186/1465-9921-11-51.
- 545 21. Costa RS, Carneiro TCB, Cerqueira-Lima AT, Queiroz NV,
546 Alcântara-Neves NM, et al. (2012) *Ocimum gratissimum* Linn.
547 and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation
548 in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia*
549 *tropicalis*. *Int Immunopharmacol* 13: 126–134.
550 doi:10.1016/j.intimp.2012.03.012.
- 551 22. Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MAM, et
552 al. (2010) Inflammatory dendritic cells--not basophils--are
553 necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to
554 inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 207: 2097–2111.
555 doi:10.1084/jem.20101563.
- 556 23. Pedersen AE, Gad M, Kristensen NN, Haase C, Nielsen CH, et al.
557 (2007) Tolerogenic dendritic cells pulsed with enterobacterial
558 extract suppress development of colitis in the severe combined
559 immunodeficiency transfer model. *Immunology* 121: 526–532.
560 doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02600.x.
- 561 24. Anderson AE, Sayers BL, Haniffa M a, Swan DJ, Diboll J, et al.
562 (2008) Differential regulation of naïve and memory CD4+ T cells
563 by alternatively activated dendritic cells. *J Leukoc Biol* 84: 124–
564 133. doi:10.1189/jlb.1107744.
- 565 25. Horibe EK, Sacks J, Unadkat J, Raimondi G, Wang Z, et al.
566 (2008) Rapamycin-conditioned, alloantigen-pulsed dendritic cells
567 promote indefinite survival of vascularized skin allografts in
568 association with T regulatory cell expansion. *Transpl Immunol*
569 18: 307–318. doi:10.1016/j.trim.2007.10.007.
- 570 26. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM,
571 et al. (2001) Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-
572 dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment
573 mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 167: 1945–1953.
- 574 27. Hackstein H, Morelli AE, Larregina AT, Ganster RW, Papworth
575 GD, et al. (2001) Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo
576 immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. *J*
577 *Immunol* 166: 7053–7062.

- 578 28. Pedersen AE, Gad M, Walter MR, Claesson MH (2004) Induction
579 of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1 α ,25-
580 Dihydroxyvitamin D₃. *Immunol Lett* 91: 63–69.
581 doi:10.1016/j.imlet.2003.11.004.
- 582 29. Lan YY, Wang Z, Raimondi G, Wu W, Colvin BL, et al. (2006)
583 “Alternatively activated” dendritic cells preferentially secrete IL-
584 10, expand Foxp3⁺CD4⁺ T cells, and induce long-term organ
585 allograft survival in combination with CTLA4-Ig. *J Immunol* 177:
586 5868–5877.
- 587 30. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, et al.
588 (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell
589 differentiation. *Science* 283: 1183–1186.
- 590 31. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, et
591 al. (1994) Activation of human dendritic cells through CD40
592 cross-linking. *J Exp Med* 180: 1263–1272.
- 593 32. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, et al.
594 (1998) Rapid and coordinated switch in chemokine receptor
595 expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28:
596 2760–2769. doi:10.1002/(SICI)1521-
597 4141(199809)28:09<2760::AID-
598 IMMU2760>3.0.CO;2-N.
- 599 33. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and its
600 ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677–
601 704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- 602 34. Krupnick AS, Gelman AE, Barchet W, Richardson S, Kreisel FH,
603 et al. (2005) Murine vascular endothelium activates and induces
604 the generation of allogeneic CD4⁺25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.
605 *J Immunol* 175: 6265–6270.
- 606 35. Martínez VG, Hidalgo L, Valencia J, Hernández-López C, Entrena
607 A, et al. (2014) Autocrine activation of canonical BMP signaling
608 regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells.
609 *Eur J Immunol* 44: 1031–1038. doi:10.1002/eji.201343693.
- 610 36. Woltman a M, van der Kooij SW, de Fijter JW, van Kooten C
611 (2006) Maturation-resistant dendritic cells induce
612 hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA⁺ and CD45RO⁺ T-
613 cell populations. *Am J Transplant* 6: 2580–2591.
614 doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01520.x.
- 615 37. Unger WWJ, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO
616 (2009) Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by

- 617 vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur J*
618 *Immunol* 39: 3147–3159. doi:10.1002/eji.200839103.
- 619 38. Gong Y, Huang Y, Li Y, Han G, Li Y, et al. (2011) Experimental
620 study of the mechanism of tolerance induction in
621 dexamethasone-treated dendritic cells. *Med Sci Monit* 17:
622 BR125–31.
- 623 39. Lewkowich IP, Lajoie S, Stoffers SL, Suzuki Y, Richgels PK, et al.
624 (2013) PD-L2 modulates asthma severity by directly decreasing
625 dendritic cell IL-12 production. *Mucosal Immunol* 6: 728–739.
626 doi:10.1038/mi.2012.111.
- 627 40. Walker C, Zuany-Amorim C (2001) New trends in
628 immunotherapy to prevent atopic diseases. *Trends Pharmacol*
629 *Sci* 22: 84–90.
- 630 41. Wohlleben G, Erb KJ (2001) Atopic disorders: a vaccine around
631 the corner? *Trends Immunol* 22: 618–626.
- 632 42. Kunicka JE, Talle MA, Denhardt GH, Brown M, Prince LA, et al.
633 (1993) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of
634 production of multiple lymphokines by in vivo administration of
635 dexamethasone. *Cell Immunol* 149: 39–49.
636 doi:10.1006/cimm.1993.1134.
- 637 43. Kandeel M, Balaha M, Inagaki N, Kitade Y (2013) Current and
638 future asthma therapies. *Drugs Today (Barc)* 49: 325–339.
639 doi:10.1358/dot.2013.49.5.1950149.
- 640 44. Page CP, Spina D (n.d.) Beta2-agonists and bronchial
641 hyperresponsiveness. *Clin Rev Allergy Immunol* 31: 143–162.
642 doi:10.1385/CRIAI:31:2:143.
- 643 45. Kon OM, Sihra BS, Loh LC, Barkans J, Compton CH, et al.
644 (2001) The effects of an anti-CD4 monoclonal antibody,
645 keliximab, on peripheral blood CD4+ T-cells in asthma. *Eur*
646 *Respir J* 18: 45–52.
- 647 46. Gervais FG, Sawyer N, Stocco R, Hamel M, Krawczyk C, et al.
648 (2011) Pharmacological characterization of MK-7246, a potent
649 and selective CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous
650 molecule expressed on T-helper type 2 cells) antagonist. *Mol*
651 *Pharmacol* 79: 69–76. doi:10.1124/mol.110.068585.
- 652 47. Wenzel SE, Barnes PJ, Bleecker ER, Bousquet J, Busse W, et al.
653 (2009) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of
654 tumor necrosis factor-alpha blockade in severe persistent

- 655 asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 549–558.
656 doi:10.1164/rccm.200809-1512OC.
- 657 48. Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, et al.
658 (2012) Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a
659 multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 380:
660 651–659. doi:10.1016/S0140-6736(12)60988-X.
- 661 49. Manechotesuwan K, Yao X, Ito K, Jazrawi E, Usmani OS, et al.
662 (2009) Suppression of GATA-3 nuclear import and
663 phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in
664 allergic disease. *PLoS Med* 6: e1000076.
665 doi:10.1371/journal.pmed.1000076.
- 666 50. Zhang-Hoover J, Finn P, Stein-Streilein J (2005) Modulation of
667 ovalbumin-induced airway inflammation and hyperreactivity by
668 tolerogenic APC. *J Immunol* 175: 7117–7124.
- 669 51. Koya T, Matsuda H, Takeda K, Matsubara S, Miyahara N, et al.
670 (2007) IL-10-treated dendritic cells decrease airway
671 hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *J Allergy
672 Clin Immunol* 119: 1241–1250. doi:10.1016/j.jaci.2007.01.039.
- 673 52. Nayyar A, Dawicki W, Huang H, Lu M, Zhang X, et al. (2012)
674 Induction of prolonged asthma tolerance by IL-10-differentiated
675 dendritic cells: differential impact on airway
676 hyperresponsiveness and the Th2 immunoinflammatory
677 response. *J Immunol* 189: 72–79.
678 doi:10.4049/jimmunol.1103286.
- 679 53. Lu M, Dawicki W, Zhang X, Huang H, Nayyar A, et al. (2011)
680 Therapeutic induction of tolerance by IL-10-differentiated
681 dendritic cells in a mouse model of house dust mite-asthma.
682 *Allergy* 66: 612–620. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02526.x.
- 683 54. Boks M a, Kager-Groenland JR, Haasjes MSP, Zwaginga JJ, van
684 Ham SM, et al. (2012) IL-10-generated tolerogenic dendritic
685 cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a
686 comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin
687 Immunol* 142: 332–342. doi:10.1016/j.clim.2011.11.011.
- 688 55. Van Duivenvoorde LM, Han WGH, Bakker AM, Louis-Plence P,
689 Charbonnier L-M, et al. (2007) Immunomodulatory dendritic
690 cells inhibit Th1 responses and arthritis via different
691 mechanisms. *J Immunol* 179: 1506–1515.
- 692 56. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A,
693 Steinbrink K, et al. (2013) Costimulatory molecules on

- 694 immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front*
695 *Immunol* 4: 82. doi:10.3389/fimmu.2013.00082.
- 696 57. Roca L, Di Paolo S, Petruzzelli V, Grandaliano G, Ranieri E, et al.
697 (n.d.) Dexamethasone modulates interleukin-12 production by
698 inducing monocyte chemoattractant protein-1 in human
699 dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 85: 610–616.
700 doi:10.1038/sj.icb.7100108.
- 701 58. Wojas-Krawczyk K, Krawczyk P, Buczkowski J, Walkowska A,
702 Jankowska O, et al. (2012) Immunotherapy of lung
703 adenocarcinoma patient with Peptide-pulsed dendritic cells: a
704 case report. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 60: 69–77.
705 doi:10.1007/s00005-011-0157-7.
- 706 59. Krupnick AS, Gelman AE, Barchet W, Richardson S, Kreisel FH,
707 et al. (2005) Murine vascular endothelium activates and induces
708 the generation of allogeneic CD4+25+FoXP3+ regulatory T cells.
709 *J Immunol* 175: 6265–6270.
- 710 60. Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH (1997)
711 Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J*
712 *Immunol* 159: 4772–4780.
- 713 61. Henry E, Desmet CJ, Garzé V, Fiévez L, Bedoret D, et al. (2008)
714 Dendritic cells genetically engineered to express IL-10 induce
715 long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma. *J*
716 *Immunol* 181: 7230–7242.

717

718 **FIGURE LEGENDS**

719

720

721 **Figure 1. Immunophenotype of dendritic cells differentiated**
722 **from bone marrow cells in the presence of dexamethasone.**

723 The cells were further incubated with bacterial lipopolysaccharide
724 (DC-DexaLPS). Control cells were left to differentiate in the absence
725 of dexamethasone (DC-LPS). The cells were stained with antibodies
726 against surface markers as indicated. Debris and dead cells were
727 excluded on the basis of forward-scatter and side-scatter. (A)
728 Representative dot plots depicting the percentages of CD11c⁺ CD11b⁺

729 cells. (B-G) Fluorescence histogram of PD-L1⁺ (B), PD-L2⁺ (C), CD80⁺
 730 (D), CD86⁺ (E), CD40⁺ (F), MHC-II⁺ (G) cells gated on CD11c⁺
 731 CD11b⁺ double positive cells. DC-LPS are represented by filled gray
 732 histograms and DC-DexaLPS by black lines; negative controls,
 733 consisting of unlabelled cells, are shown by dotted gray lines. Results
 734 are representative of three independent experiments. (H) Amounts of
 735 CD11c⁺ CD11b⁺ MHC-II⁺ cells in cultures of DC-DexaLPS and DC-LPS,
 736 showing lower amounts of MHC-II^{high} cells in DC-DexaLPS cultures
 737 than in DC-LPS cultures (p = 0.0079, Mann-Whitney test). The data
 738 represented are the mean and standard error of the mean of 6
 739 independent experiments.

740

741 **Figure 2. Anti-inflammatory cytokine production profile of**
 742 **dendritic cells differentiated from bone marrow cells in the**
 743 **presence of dexamethasone.** The cells were further incubated with

744 bacterial lipopolysaccharide (DC-DexaLPS). Control cells were left to
 745 differentiate in the absence of dexamethasone (DC-LPS). The
 746 supernatants of DC were harvested 24 hours after the activation with
 747 lipopolysaccharide . The cytokines were quantified by sandwich
 748 ELISA. (A) Levels of TNF- α in DC-DexaLPS and DC-LPS cultures. (B)
 749 IL-12p70 was downregulated to nondetectable levels (less than 15
 750 pg/mL). (C) Levels of IL-1 β in DC-DexaLPS and DC-LPS cultures. (D)
 751 Levels of MCP-1 in DC-DexaLPS and DC-LPS cultures. (E) Levels of
 752 IL-10 in DC-DexaLPS and DC-LPS cultures. The data represented are
 753 the median with range of 4 (TNF- α , IL-12p70, and IL-1 β), 7 (MCP-1),
 754 and 6 (IL-10) independent experiments. *p = 0.0143; **p = 0.0147;
 755 Mann-Whitney test.

756

757 **Figure 3. Protocol used to test the effect of dendritic cells**
 758 **differentiated from bone marrow cells in the presence of**
 759 **dexamethasone on the development of airway inflammation.**

760 Mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with those cells pre-

761 activated in vitro with bacterial lipopolysaccharide and pulsed
762 overnight with *Blomia tropicalis* extract (DC-DexaBtE) or with
763 ovalbumin (DC-DexaOVA), or saline, in the indicated day. Airway
764 inflammation was induced in animals through the intraperitoneal
765 injection of *Blomia tropicalis* extract (BtE) adsorbed to aluminium
766 hydroxide.

767

768 **Figure 4. Total leukocytes and eosinophyls in the**
769 **bronchoalveolar alveolar lavage fluid (BALF) and eosinophyl**
770 **peroxidase activity in BALF and lung tissue of mice treated**
771 **with dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells.** Mice
772 were treated with saline (Saline) or with one inoculation of *Blomia*
773 *tropicalis* extract-pulsed dexamethasone-induced tolerogenic dendritic
774 cells (DC-Dexa^{BtE}) or OVA-pulsed dexamethasone-induced tolerogenic
775 dendritic cells (DC-Dexa^{OVA}). Airway inflammation was subsequently
776 induced, the animals were challenged with *Blomia tropicalis* extract
777 (BtE), euthanized one day later and the BALF and lung extract were
778 obtained as described in the Materials and Methods. Negative control
779 mice (- Ctrl) received only saline (in place of DCs, of the sensitization
780 preparation and of the BtE in the intranasal challenge). (A) Total
781 number of cells in BALF. (B) Percentage of eosinophils in BALF. (C)
782 Eosinophil peroxidase activity in BALF and lung tissue. Each symbol
783 represents the result obtained from a single animal. Horizontal lines
784 represent the median (A) or mean (B and C) values for groups of six
785 animals. Comparisons among groups were performed by Dunn's
786 multiple comparison test (A) or Bonferroni's multiple comparison test
787 (B and C). *p < 0.05; **p < 0.01.

788

789 **Figure 5. Cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid**
790 **(BALF) of mice treated with dexamethasone-induced**
791 **tolerogenic dendritic cells.** The mice received one inoculation of
792 saline (Saline), *Blomia tropicalis* extract-pulsed dexamethasone-

793 induced tolerogenic dendritic cells (DC-Dexa^{BtE}) or OVA-pulsed
794 dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells (DC-Dexa^{OVA}).
795 Airway inflammation was subsequently induced, the animals were
796 challenged with *Blomia tropicalis* extract (BtE), euthanized one day
797 later and the BALF was obtained as described in the Materials and
798 Methods. Negative control mice (- Ctrl) received only saline (in place
799 of DCs, of the sensitization preparation and of the BtE in the
800 intranasal challenge). (A), levels of IL-5. (B), levels of IL-13. (C),
801 levels of IFN- γ . The results are representative of three independent
802 experiments. Each symbol represents the result obtained from a
803 single animal. Horizontal lines represent the mean values for each
804 group of 5-9 animals. Comparisons among groups were performed by
805 Bonferroni's multiple comparison test. *p < 0.05.

806

807 **Figure 6. Dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells**
808 **reduce allergic airway inflammation.** The mice received one
809 inoculation of saline (Saline), *Blomia tropicalis* extract-pulsed
810 dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells (DC-Dexa^{BtE}) or
811 OVA-pulsed dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells (DC-
812 Dexa^{OVA}). Airway inflammation was subsequently induced, the
813 animals were challenged with *Blomia tropicalis* extract (BtE), and
814 euthanized one day later as described in the Materials and Methods.
815 Negative control mice (- Ctrl) received only saline (in place of DCs, of
816 the sensitization preparation and of the BtE in the intranasal
817 challenge). (A) Score of peribronchial infiltration by inflammatory
818 cells. (B) Score of perivascular infiltration of inflammatory cells. Data
819 represent the percentage of polymorphonuclear cells corrected by the
820 extent of infiltration which was determined from an arbitrary score of
821 0–3, as explained in the Material and Methods. (C) Percentage of
822 mucus-producing cells. Each symbol corresponds to the result
823 obtained from an individual animal. (D-G) Representative
824 hematoxylin and eosin-stained sections of the lungs of A/J mice. (D)

825 Normal tissue of an untreated animal, depicting a branch bronchus
826 and an arteriole in the center. (E) Inflammatory infiltrate with a
827 predominance of neutrophils around a bronchus and an arteriole in
828 tissue from an animal of the positive control group (BtE-sensitized).
829 (F) Infiltrate with predominance of neutrophils around a bronchus, in
830 a BtE-sensitized animal pre-treated with DC-Dexa^{BtE}. (G) Infiltrate
831 with predominance of neutrophils around a vessel and bronchus, in a
832 BtE-sensitized animal pre-treated with DC-Dexa^{OVA}. (H&E, 200X). The
833 data are representative of three independent experiments. *p < 0.05
834 and **p < 0.01; Dunn's multiple comparison test.

835

836 **Figure 7. Inhibition of IgE antibody production by**
837 **dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells.** The mice
838 received one inoculation of saline (Saline), *Blomia tropicalis* extract-
839 pulsed dexamethasone-induced tolerogenic dendritic cells (DC-
840 Dexa^{BtE}) or OVA-pulsed dexamethasone-induced tolerogenic dendritic
841 cells (DC-Dexa^{OVA}). Airway inflammation was subsequently induced,
842 the animals were challenged with *Blomia tropicalis* extract (BtE), and
843 euthanized one day later as described in the Materials and Methods.
844 Negative control mice (- Ctrl) received only saline (in place of DCs, of
845 the sensitization preparation and of the BtE in the intranasal
846 challenge). Anti-*Blomia tropicalis* IgE antibody levels were assessed
847 in serum samples by ELISA. Data are representative of three
848 independent experiments. Each symbol represents the result obtained
849 from a single animal. Horizontal lines represent the mean values for
850 each group of ten animals. Comparisons of groups were performed by
851 Bonferroni's multiple comparison test. *p < 0.001.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

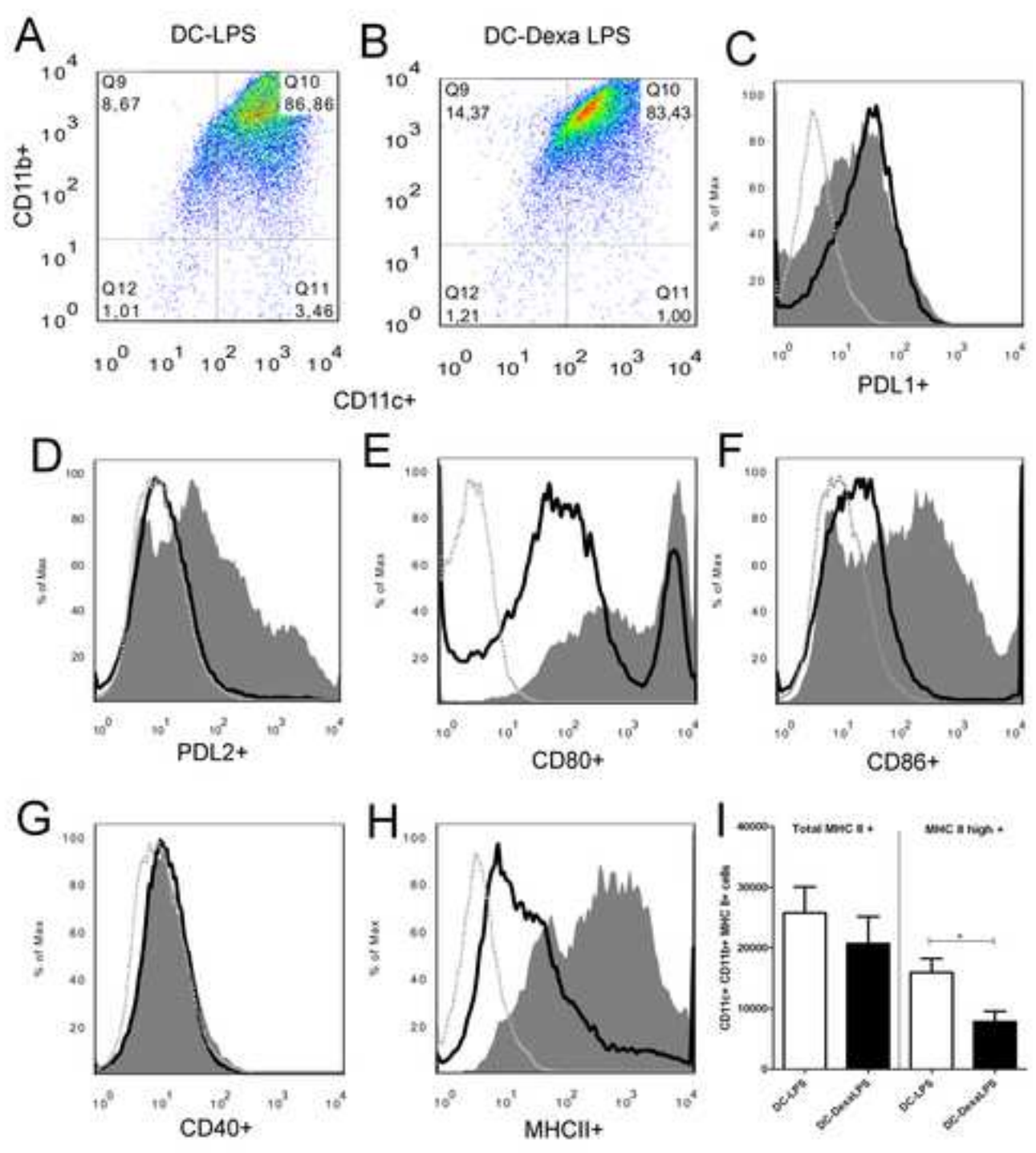


Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

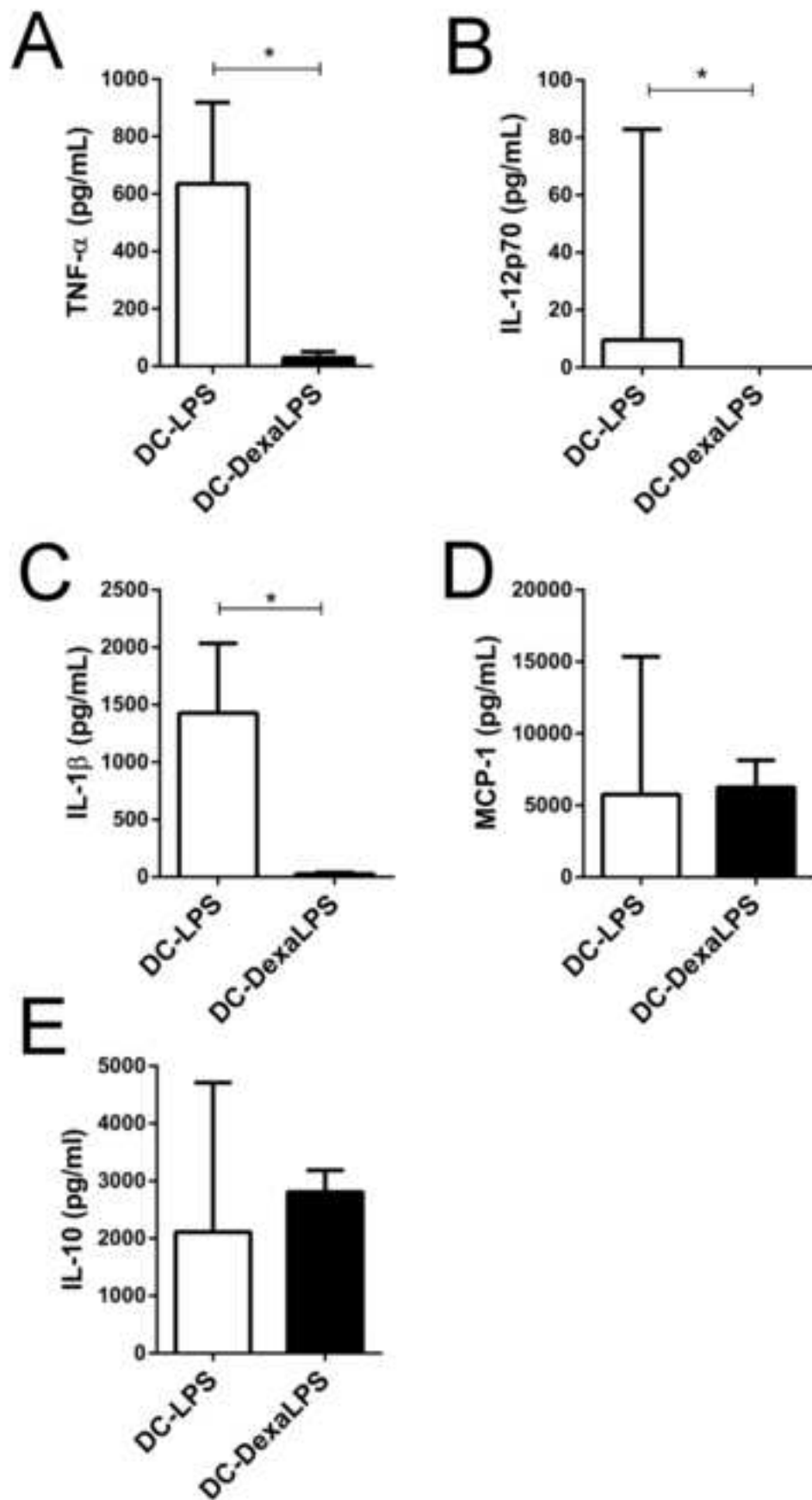


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

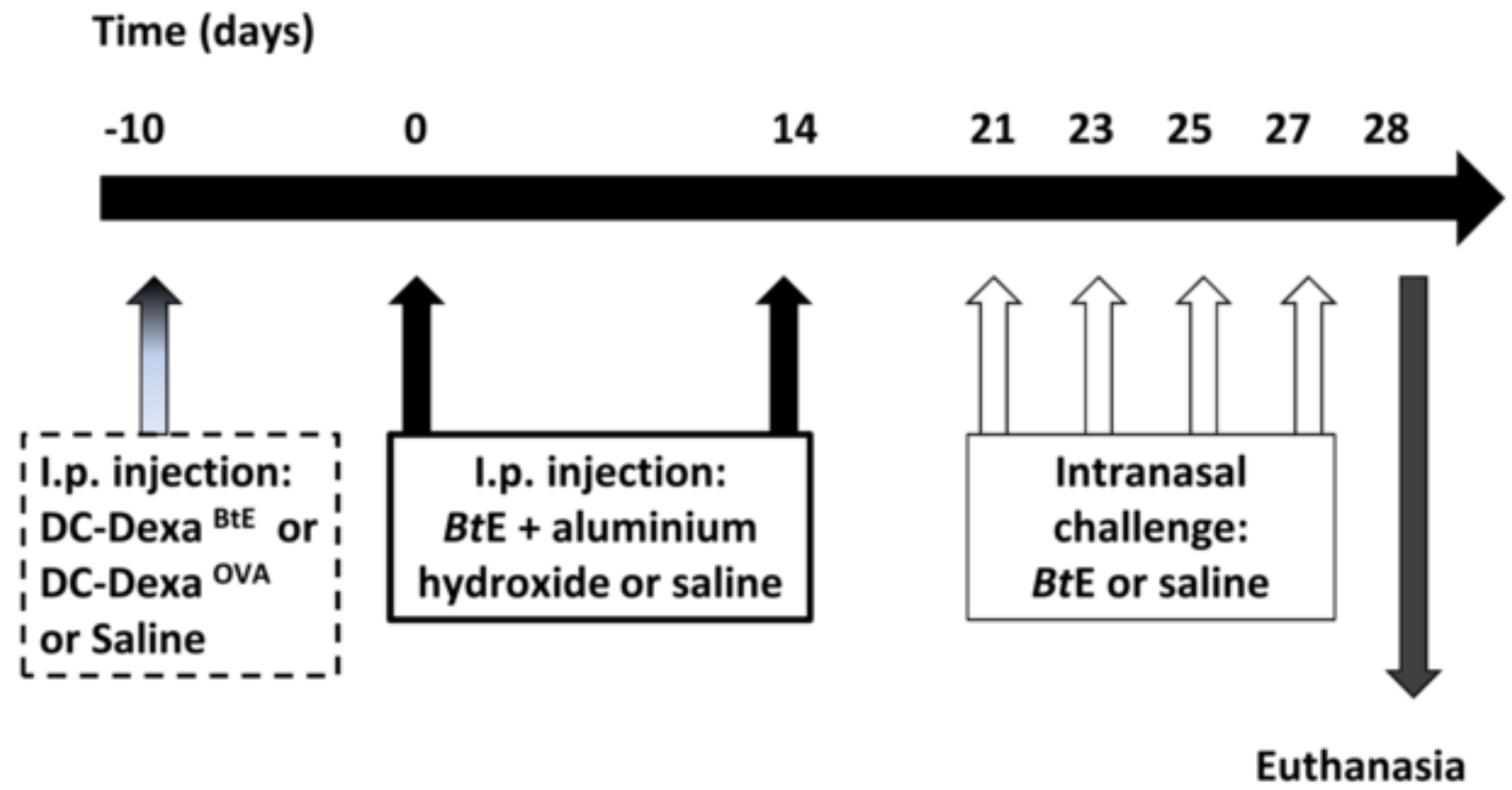


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

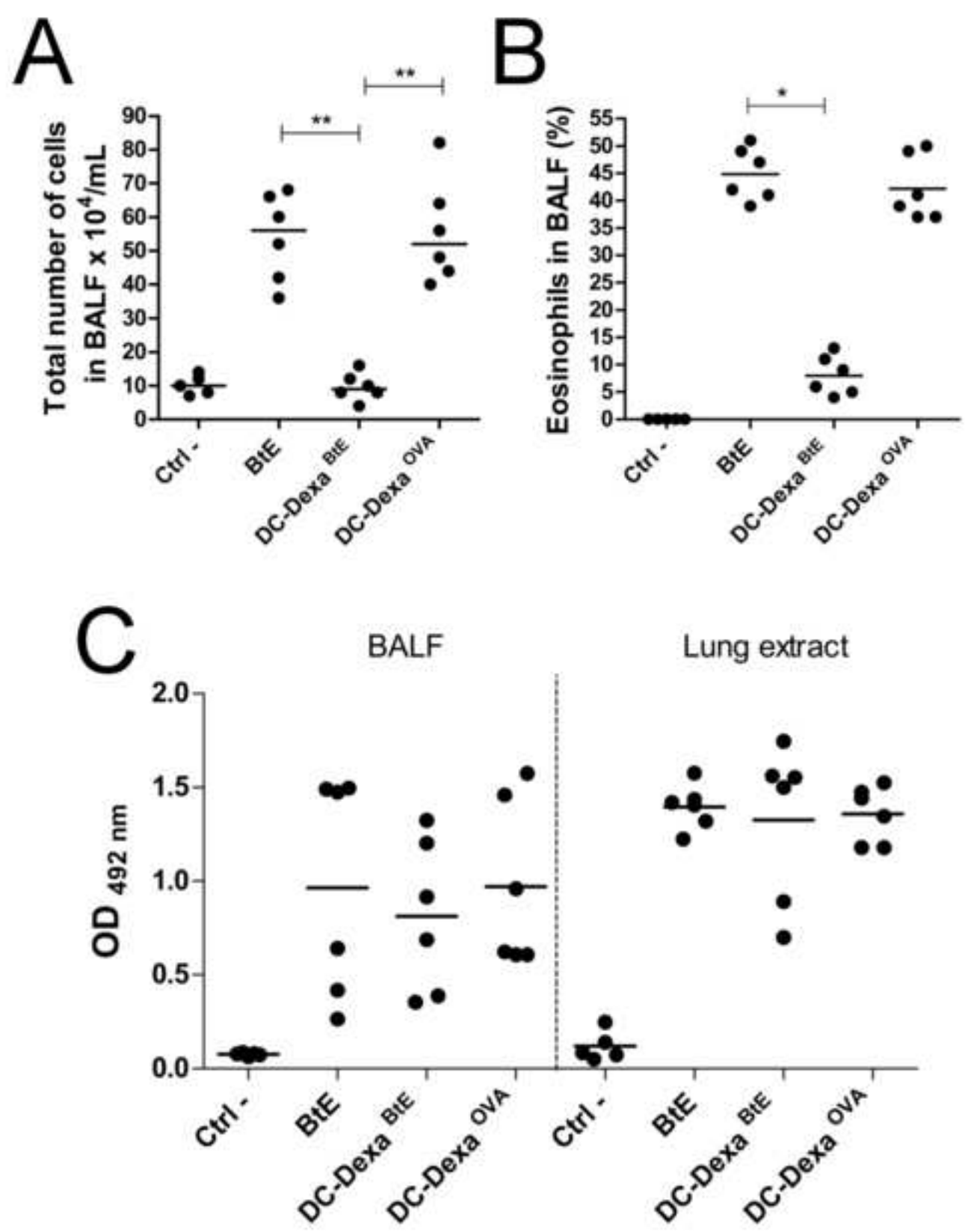
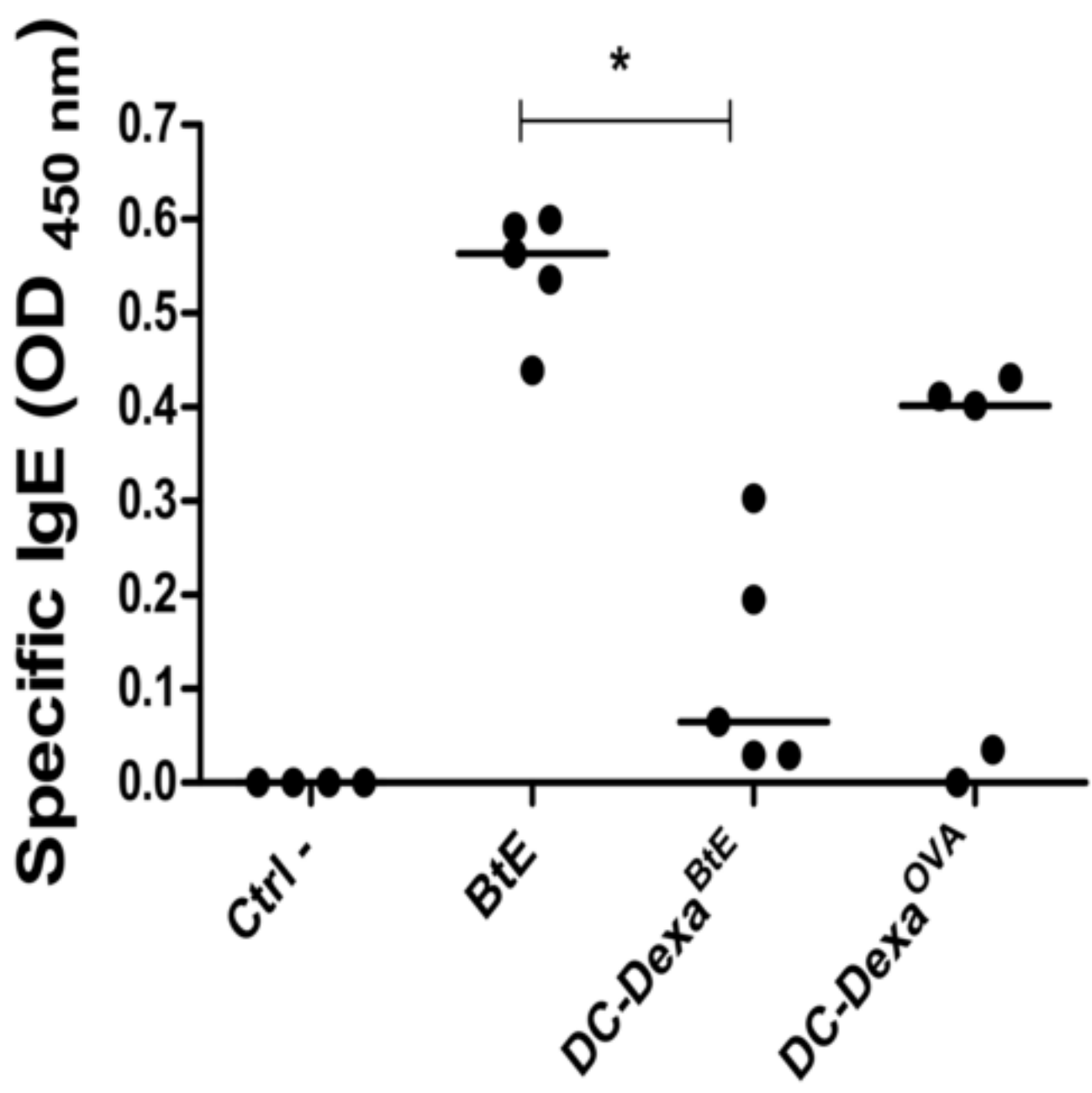


Figure 7

[Click here to download high resolution image](#)



5 MANUSCRITO 2- PRELIMINAR

TÍTULO: EFEITO DE DUAS DOSES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS SOBRE A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgE E SOBRE A INFLAMAÇÃO PULMONAR EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM EXTRATO DE *B. tropicalis*

CONSIDERAÇÕES:

Muitos protocolos terapêuticos para asma experimental (com DCs induzida com IL-10), e em um caso de terapia para adenocarcinoma pulmonar usando DCs apresentaram melhores resultados após doses de reforço (NAYYAR *et al.*, 2012; UNGER *et al.*, 2009; WOJAS-KRAWCZYK *et al.*, 2012). Desse modo, avaliamos se duas injeções de células dendríticas tolerogênicas seriam capazes de intensificar a proteção observada anteriormente com uma só dose dessas células sobre a produção de anticorpos IgE e sobre a inflamação pulmonar em camundongos imunizados com extrato de *B. tropicalis*.

5.1 METODOLOGIA

Para realização desse experimento, células dendríticas mielóides foram obtidas dos fêmures de camundongos A/J de 6 a 8 semanas de idade e cultivadas na presença de GM-CSF e dexametasona 10^{-6} M (Decadron, Laboratório Prodome, Campinas, SP, Brasil), a partir de protocolo adaptado de Anderson e colaboradores (2008) (ANDERSON, A. E. *et al.*, 2008). Dexametasona foi inserida na cultura após o terceiro dia, após troca parcial do meio de cultura por meio novo. No sexto dia, as células dendríticas foram incubadas com 100 µg/mL de extrato de *B. tropicalis* (BtE) por 16 horas e após remoção do excesso de antígeno por centrifugação a 130 g por 10 minutos a 4° C, as células (DC-Dexa^{BtE}) foram ativadas por 24 horas com 1 µg/mL de LPS. As culturas foram incubadas por um período de oito dias, em estufa a 37° C, com atmosfera de 5% de CO₂.

Grupos de dez camundongos A/J fêmeas receberam injeções intraperitoneais das células dendríticas pulsadas com extrato de *B. tropicalis*, em uma dose dez dias antes (DC-Dexa^{BtE} 1x), ou em duas doses, dez e cinco dias antes da indução de alergia respiratória experimental (DC-Dexa^{BtE} 2x), ou salina (controle negativo da tolerização). Esses grupos, e o grupo controle positivo, receberam uma solução contendo 100 µg de extrato de *B. tropicalis*

adsorvido em 1,6 mg de hidróxido de alumínio para indução de alergia respiratória seguido de quatro desafios intranasais com 10 µg de extrato, enquanto o controle negativo recebeu apenas salina em todas as intervenções (Tabela 1 e Figura 8).

Tabela 1 - Grupos experimentais

Tolerização	Imunização	Sensibilização
Salina	Salina	Salina
Salina	EBt + Alum	EBt + Alum
DC pulsada com EBt 1x	EBt + Alum	EBt + Alum
DC pulsada com EBt 2x	EBt + Alum	EBt + Alum

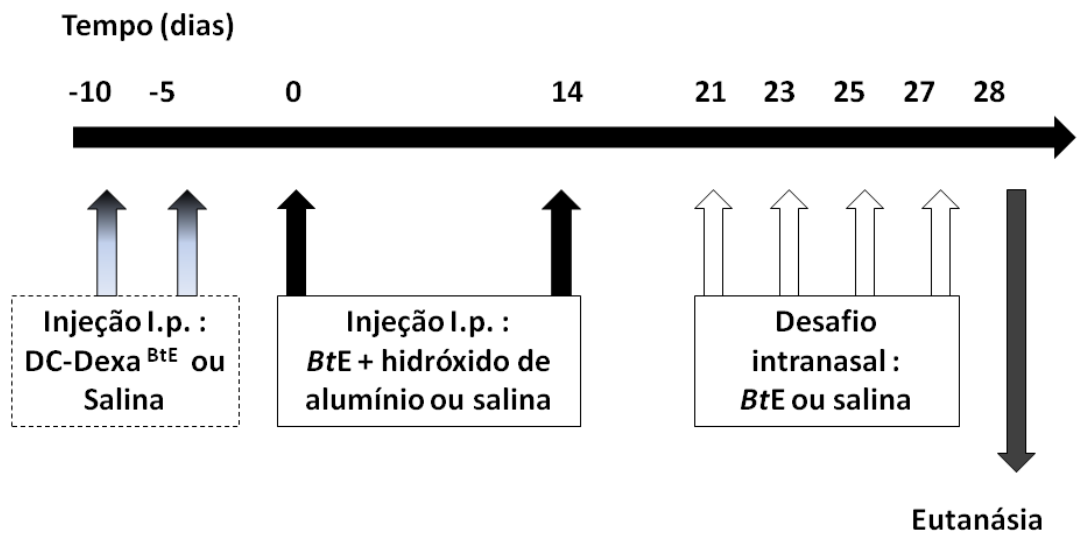


Figura 8. Protocolo utilizado para avaliar o efeito de duas doses de células dendríticas no desenvolvimento de inflamação das vias aéreas. Os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal (ip) com as células, pré-ativadas *in vitro* com LPS, pulsadas com extrato de *B. tropicalis* (DC-Dexa^{BtE}), ou com solução salina, nos dias indicados. A inflamação das vias aéreas respiratórias foi induzida por meio de injeção intraperitoneal do extrato *B. tropicalis* (BtE) adsorvido a hidróxido de alumínio, seguido de quatro desafios intranasais. A eutanásia ocorreu 24 horas após o último desafio.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Grande quantidade de eosinófilos podem ser recuperadas do escarro ou do lavado broncoalveolar de indivíduos com asma, e existe correlação positiva entre o percentual de células e a gravidade da doença (ATHARI; ATHARI, 2014). Observou-se uma redução significativa no número total de células no lavado broncoalveolar (Figura 9, A) e na porcentagem de eosinófilos (Figura 9, C) nos animais tratados com uma dose. Este efeito foi mais acentuado quando duas doses de DC-Dexa^{BtE} foram inoculadas.

Uma melhora na resposta tolerogênica a injeções repetidas foi observada também no trabalho de Zhang e colaboradores em modelo de alergia utilizando ovalbumina (NAYYAR *et al.*, 2012).

Embora sem diferenças estatisticamente significativas, a inoculação de duas doses de DC-Dexa^{BtE} resultou em redução na produção de peroxidase no lavado broncoalveolar e no extrato de pulmão na maioria dos camundongos (Figura 9, B), bem como as concentrações de IL-13 no lavado broncoalveolar (figura 10, B). O aumento na porcentagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar de animais do grupo DC-Dexa^{BtE} 1x (Figura 9, D) pode explicar o aumento da concentração de peroxidase pulmonar neste grupo (Figura 9, B).

Apenas uma inoculação de CD-Dexa^{BtE} inibiu a produção basal de IL-5 no lavado broncoalveolar (Figura 10, A). Apesar de esse resultado indicar que as CDs são capazes de inibir a produção de IL-5, essa redução da produção basal dessa citocina provavelmente não teve relevância no modelo experimental estudado, visto que esta citocina foi detectada apenas em quantidades mínimas, e não houve diferença entre o grupo controle positivo e o grupo controle negativo. Concentrações baixas dessa citocina também foram observadas na maioria dos animais tratados com duas doses de células. Alguns trabalhos demonstram que, mesmo na ausência de IL-5, os eosinófilos podem ser ativados por GM-CSF e liberar leucotrieno C4, indutor de constrição de músculo liso e permeabilidade vascular (COWBURN *et al.*, 1998; NAKAGOME; NAGATA, 2011). Não houve diferença na produção de IFN- γ e IL-17A no lavado broncoalveolar nos grupos tratados (Figura 10, C-D) ou na produção de citocinas no extrato pulmonar (dados não mostrados).

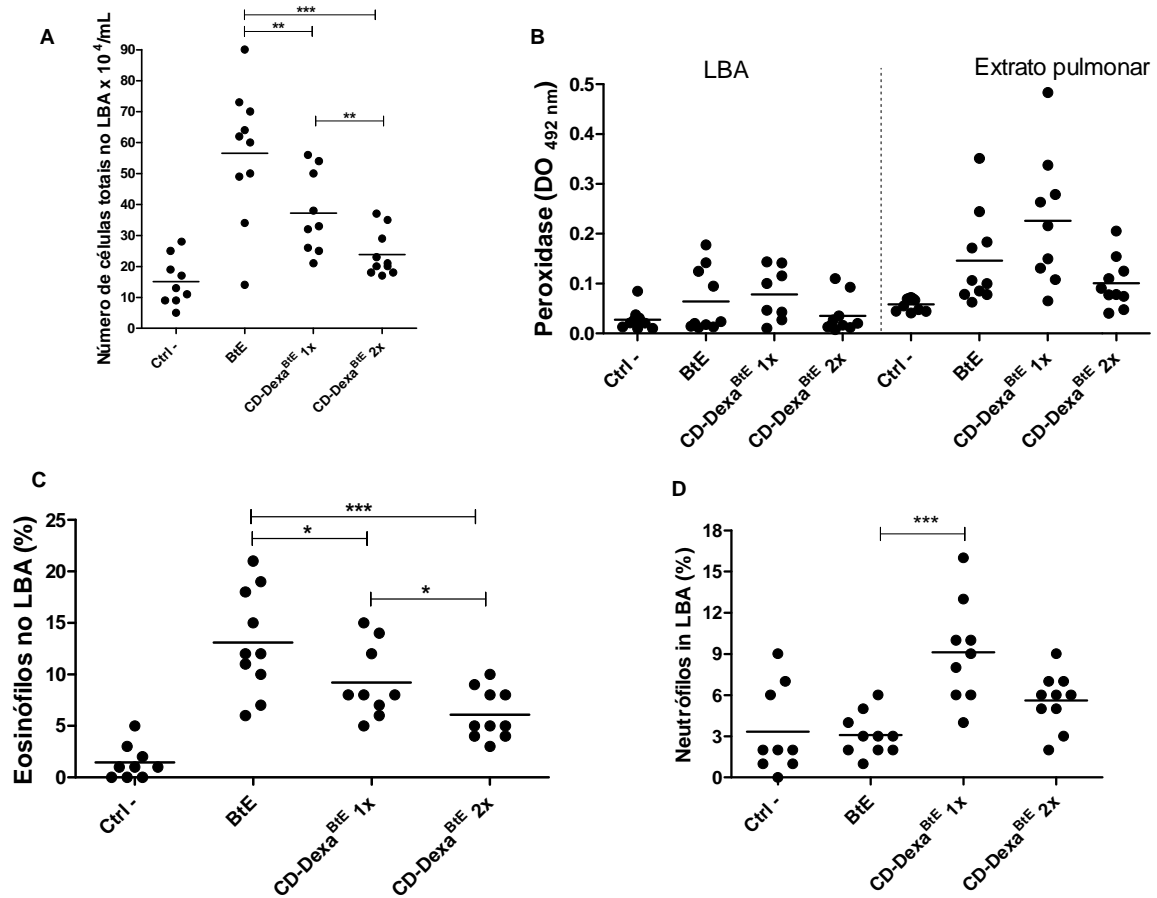


Figura 9. Efeito da inoculação de duas doses de células dendríticas pulsadas com extrato de *B. tropicalis* sobre a celularidade do fluido do lavado broncoalveolar e sobre a atividade de peroxidase do eosinófilo no fluido do lavado broncoalveolar e no pulmão. Camundongos A/J foram tratados com solução salina ou com uma inoculação (DC-Dexa^{BtE} 1x) ou duas inoculações (DC-Dexa^{BtE} 2x) de células dendríticas pulsadas com extrato de *B. tropicalis* (BtE). A inflamação das vias respiratórias foi induzida e os animais foram desafiados com BtE. Após 24 horas foram eutanasiados e fluido do lavado broncoalveolar e extrato de pulmão foram obtidos. A, Número total de leucócitos no fluido do lavado broncoalveolar. B, Atividade de peroxidase no fluido do lavado broncoalveolar e no extrato pulmonar. C, Eosinófilos. D, Neutrófilos. Cada símbolo representa o resultado obtido a partir de um único animal. As linhas horizontais representam os valores médios para cada grupo. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

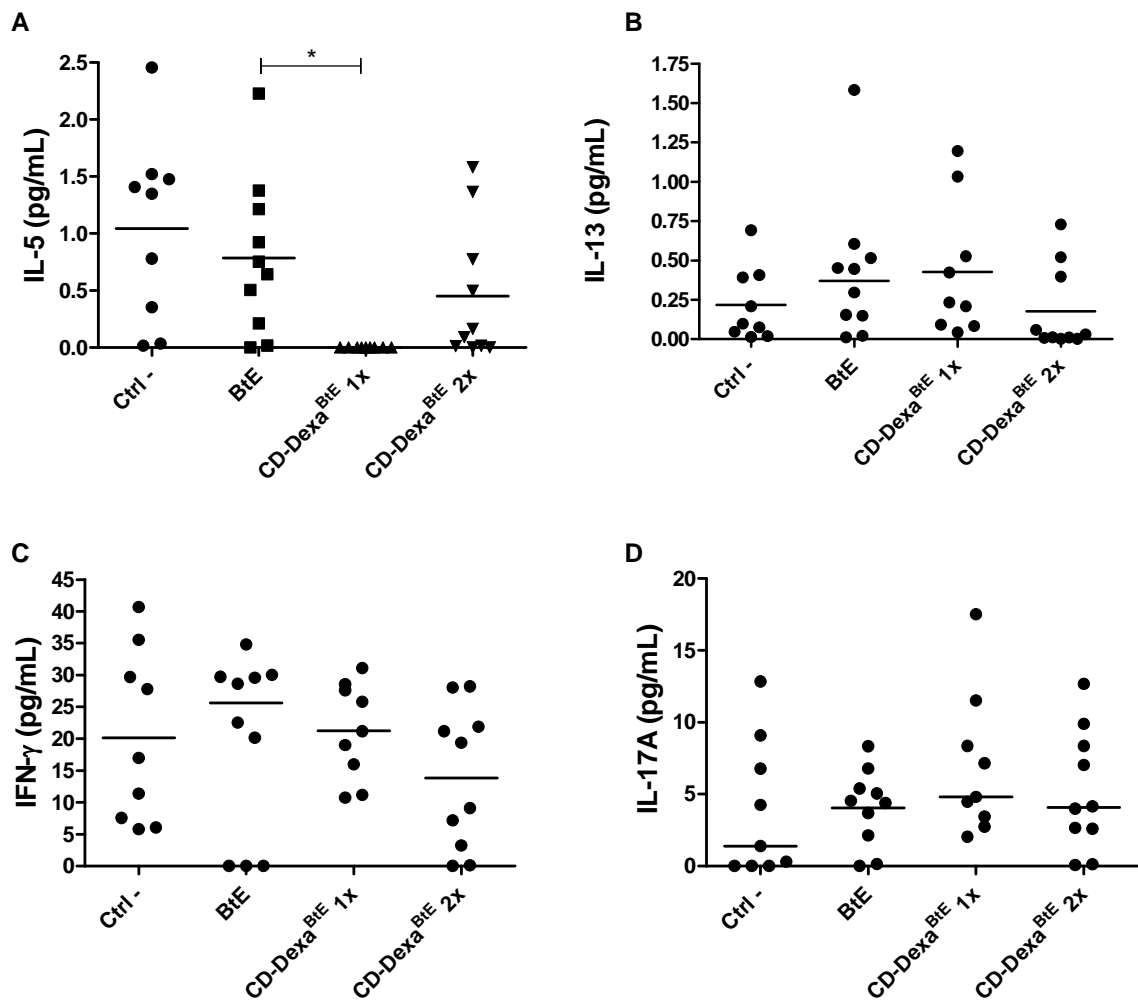


Figura 10. Concentração de citocinas em fluido de lavado broncoalveolar. As concentrações de IL-5 (A), IL-13 (B), IFN- γ (C), e IL-17A (D) foram avaliadas no sobrenadante do fluido do lavado broncoalveolar de camundongos A/J nos quais alergia respiratória foi induzida pré-tratados com uma inoculação (DC-Dexa^{BtE} 1x) ou duas inoculações (DC-Dexa^{BtE} 2x) de células dendríticas pulsadas com extrato de *B. tropicalis* (BtE). Cada símbolo representa o resultado obtido a partir de um único animal. As linhas horizontais representam os valores médios para cada grupo. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * P < 0,05.

Embora tenha sido observada redução na produção de IgG2a e IgE anti-*B.tropicalis*, não houve, entretanto diferenças entre o efeito de uma ou duas inoculações de DC-Dexa^{BtE} sobre a resposta de anticorpos específicos anti-*Blomia* (Figura 11).

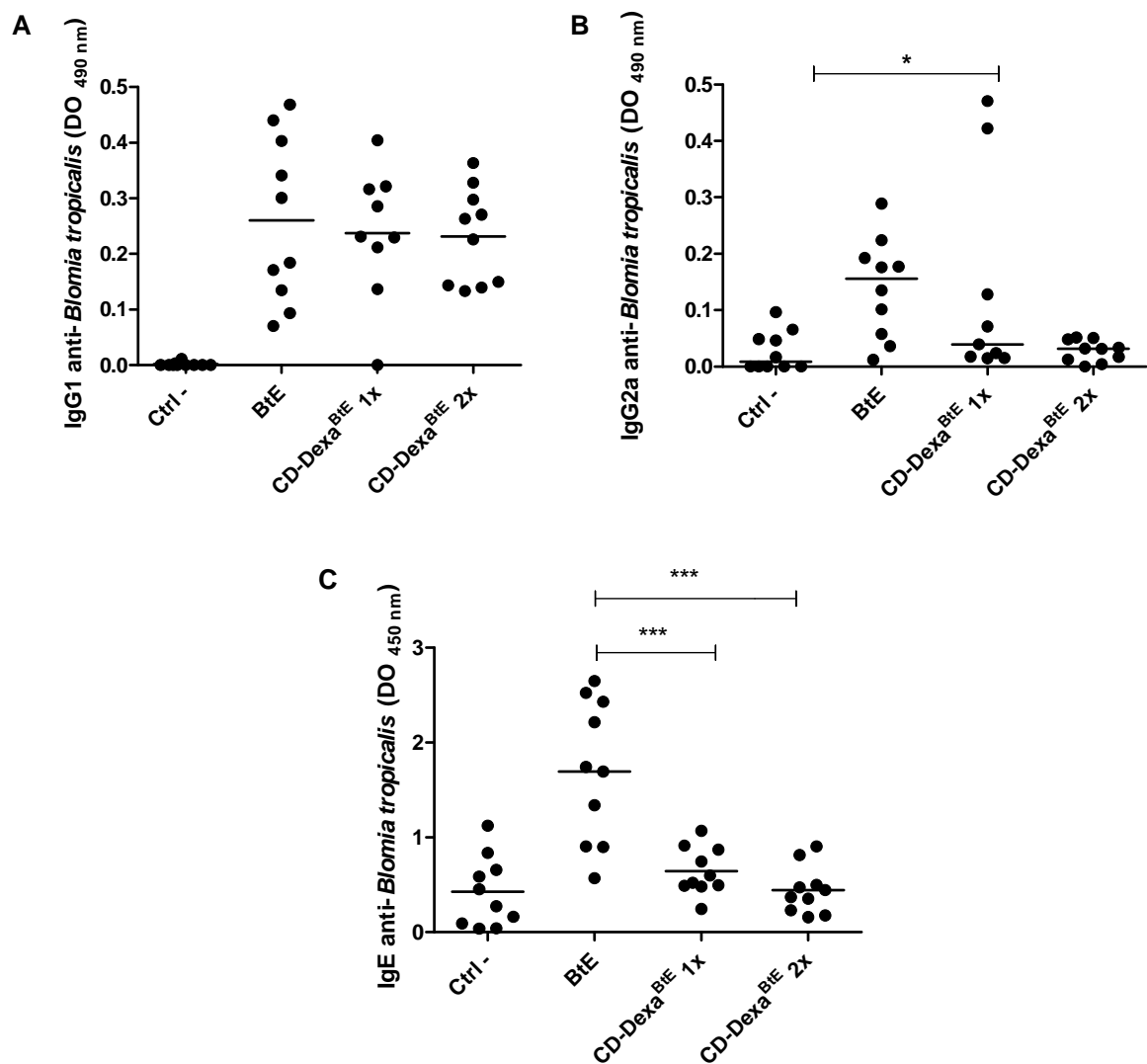


Figura 11. Concentração de anticorpos no soro dos camundongos alérgicos tratados com protocolo preventivo de tolerância imunológica. A concentração sérica de IgG1 (A), IgG2a (B) e IgE (C) anti-*Blomia tropicalis* foi determinada através de ELISA. Cada símbolo representa o resultado obtido a partir de um único animal. As linhas horizontais representam os valores médios para cada grupo. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo utilizado nesse trabalho para geração de células dendríticas derivadas de medula óssea, na presença de GM-CSF e dexametasona, foi capaz de induzir células com perfil tolerogênico cuja utilização em modelo experimental de inflamação das vias aéreas induzido por sensibilização a *B. tropicalis* reduziu o infiltrado inflamatório pulmonar, o influxo de eosinófilos para o lavado broncoalveolar, assim como a produção de IgE específica. Esse resultado foi mais marcante com o aumento do número de doses utilizadas. Embora características fundamentais da resposta alérgica tenham sido afetadas, em nosso modelo experimental não foram detectadas quantidades aumentadas de citocinas Th2 no fluido do lavado broncoalveolar, de modo que o efeito das DCs sobre a produção dessas citocinas não pode ser estudado.

Esses resultados indicam que a utilização de DCs tolerogênicas é uma metodologia promissora e deve ser investigada como uma possível estratégia terapêutica para o controle da inflamação das vias aéreas desencadeada por alérgeno.

7 PERSPECTIVAS

1 Determinar se DCs tratadas com extrato de *B. tropicalis* são capazes de reverter a alergia respiratória experimental;

2 Avaliar se a terapia com DCs tratadas com *B. tropicalis* é capaz de induzir Tregs no pulmão dos animais tratados.

3 Investigar a migração das DCs injetadas *in vivo* através da marcação dessas células com corante PKH.

4 Estudar o efeito de células dendríticas tolerogênicas derivadas de PBMC sensibilizadas com antígenos dos ácaros (extrato bruto e recombinantes) sobre a resposta de leucócitos de indivíduos com alergia respiratória *in vitro*;

5 Avaliar a capacidade tolerogênica de células dendríticas mielóides pulsadas com antígenos recombinantes de *B. tropicalis* em modelo experimental de alergia;

6 Determinar se as tolDCs podem ser eficazmente substituídas por vesículas extracelulares delas derivadas.

REFERÊNCIAS

- AKDIS, C. A. Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 718–726, dez. 2006.
- ALBERT, M. L.; JEGATHESAN, M.; DARNELL, R. B. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. **Nature Immunology**, v. 2, n. 11, p. 1010–1017, nov. 2001.
- ANDERSON, A. E. *et al.* Differential regulation of naïve and memory CD4+ T cells by alternatively activated dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 1, p. 124–133, jul. 2008.
- ANDERSON, G.; JENKINSON, E. J. Investigating central tolerance with reaggregate thymus organ cultures. **Methods in Molecular Biology**, v. 380, p. 185–196, jan. 2007.
- ARRUDA, L. K. *et al.* Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 155, n. 1, p. 343–350, jan. 1997.
- ATHARI, S. S.; ATHARI, S. M. The importance of eosinophil, platelet and dendritic cell in asthma. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. Suppl 1, p. S41–S47, 2014.
- BAQUEIRO, T. *et al.* Asthma and rhinitis symptoms in individuals from different socioeconomic levels in a Brazilian city. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 28, n. 3, p. 362–367, 2007.
- BAQUEIRO, T. *et al.* Dust mite species and allergen concentrations in beds of individuals belonging to different urban socioeconomic groups in Brazil. **The Journal of Asthma**, v. 43, n. 2, p. 101–105, mar. 2006.
- BAQUEIRO, T. *et al.* Respiratory allergy to *Blomia tropicalis*: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model. **Respiratory Research**, v. 11, p. 51, jan. 2010.
- BARBOZA, R. *et al.* Endotoxin Exposure during Sensitization to *Blomia tropicalis* Allergens Shifts TH2 Immunity Towards a TH17-Mediated Airway Neutrophilic Inflammation: Role of TLR4 and TLR2. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67115, jan. 2013.
- BATES, E. E. *et al.* CD40L activation of dendritic cells down-regulates DORA, a novel member of the immunoglobulin superfamily. **Molecular Immunology**, v. 35, n. 9, p. 513–524, jun. 1998.
- BEL, E.; TEN BRINKE, A. A rational approach to the management of severe refractory asthma. **Treatments in Respiratory Medicine**, v. 4, n. 6, p. 365–379, jan. 2005.

BODEY, B.; SIEGEL, S. E.; KAISER, H. E. Antigen presentation by dendritic cells and their significance in antineoplastic immunotherapy. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 18, n. 1, p. 81–100, 2004.

BOKS, M. A. *et al.* IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC. **Clinical Immunology**, v. 142, n. 3, p. 332–342, mar. 2012.

BORISH, L. Genetics of allergy and asthma. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 82, n. 5, p. 413–424, maio. 1999.

CARVALHO, A. F. *et al.* *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* mites evoke distinct patterns of airway cellular influx in type I hypersensitivity murine model. **Journal of Clinical Immunology**, v. 24, n. 5, p. 533–541, set. 2004.

CASTRO ALMARALES, R. L. *et al.* Correlation between skin tests to *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* in Cuban asthmatics. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 34, n. 1, p. 23–26, 2006.

CHEW, F. T. *et al.* Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, n. 7, p. 982–988, jul. 1999.

CHIPPS, B. E. Determinants of asthma and its clinical course. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 93, n. 4, p. 309–315, 380, out. 2004.

COLLAZO, M. E.; DÍAZ, A. M. Monoclonal antibodies against whole body extract of the dust mite *Blomia tropicalis*. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 22, n. 4, p. 345–351, dez. 2003.

COSTA, R. S. *et al.* *Ocimum gratissimum* Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 126–134, maio 2012.

COWBURN, A. S. *et al.* Overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 834–846, 15 fev. 1998.

CRETICOS, P. S. The consideration of immunotherapy in the treatment of allergic asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 2 Pt 2, p. S559–S574, fev. 2000.

CROCE, M. *et al.* House dust mites in the city of Lima, Peru. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 10, n. 5, p. 286–288, 2000.

DAVIS, B. E.; TODD, D. C.; COCKCROFT, D. W. Effect of combined montelukast and desloratadine on the early asthmatic response to inhaled allergen. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 4, p. 768–772, out. 2005.

- DE HEER, H. J. *et al.* Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 1, p. 89–98, 5 jul. 2004.
- FERNÁNDEZ-CALDAS, E. *et al.* House dust mite allergy in Florida. Mite survey in households of mite-sensitive individuals in Tampa, Florida. **Allergy Proceedings**, v. 11, n. 6, p. 263–267, 1990.
- FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; PUERTA, L.; CARABALLO, L. Mites and allergy. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 100, p. 234–242, jan. 2014.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445–454, 24 jul. 2008.
- GANESH, B. B. *et al.* GM-CSF-induced CD11c+CD8a--dendritic cells facilitate Foxp3+ and IL-10+ regulatory T cell expansion resulting in suppression of autoimmune thyroiditis. **International Immunology**, v. 21, n. 3, p. 269–282, mar. 2009.
- GERVAIS, F. G. *et al.* Pharmacological characterization of MK-7246, a potent and selective CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T-helper type 2 cells) antagonist. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n. 1, p. 69–76, jan. 2011.
- GILL, M. A. The role of dendritic cells in asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 4, p. 889–901, abr. 2012.
- GODAVA, M.; VRTEL, R.; VODICKA, R. STAT6 - polymorphisms, haplotypes and epistasis in relation to atopy and asthma. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 157, n. 2, p. 172–180, jun. 2013.
- GONG, Y. *et al.* Experimental study of the mechanism of tolerance induction in dexamethasone-treated dendritic cells. **Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 17, n. 5, p. BR125–31, maio 2011.
- GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 515–548, jan. 2005.
- GREGORI, S. *et al.* Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 4, p. 1945–1953, 15 ago. 2001.
- GUERRA, S.; MARTINEZ, F. D. Asthma genetics: from linear to multifactorial approaches. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 327–341, jan. 2008.
- HACKSTEIN, H. *et al.* Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7053–7062, 15 jun. 2001.
- HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 2, p. 331–336, ago. 2006.

- HANANIA, N. A. *et al.* Omalizumab in severe allergic asthma inadequately controlled with standard therapy: a randomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 154, n. 9, p. 573–582, 3 maio 2011.
- HENRY, E. *et al.* Dendritic cells genetically engineered to express IL-10 induce long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 10, p. 7230–7242, 15 nov. 2008.
- HOLGATE, S. T. *et al.* A new look at the pathogenesis of asthma. **Clinical Science**, v. 118, n. 7, p. 439–450, abr. 2010.
- HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 673–683, maio 2012.
- HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews. Immunology**, v. 8, n. 3, p. 218–230, mar. 2008.
- HORIBE, E. K. *et al.* Rapamycin-conditioned, alloantigen-pulsed dendritic cells promote indefinite survival of vascularized skin allografts in association with T regulatory cell expansion. **Transplant Immunology**, v. 18, n. 4, p. 307–318, mar. 2008.
- HU, J.; WAN, Y. Tolerogenic dendritic cells and their potential applications. **Immunology**, v. 132, n. 3, p. 307–314, mar. 2011.
- HUANG, H.-W. *et al.* Distribution of allergens in children with different atopic disorders in central Taiwan. **Acta Paediatrica Taiwanica = Taiwan er Ke Yi Xue Hui Za Zhi**, v. 47, n. 3, p. 127–134, 2006.
- HUBO, M. *et al.* Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. **Frontiers In Immunology**, v. 4, p. 82, jan. 2013.
- IOM. **Clearing the air: Asthma and indoor air exposures**. Washington, DC:National Academy Press, 2000.
- KAMRADT, T.; MITCHISON, N. A. Tolerance and autoimmunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 9, p. 655–664, mar. 2001.
- KANDEEL, M. *et al.* Current and future asthma therapies. **Drugs of Today**, v. 49, n. 5, p. 325–339, maio 2013.
- KON, O. M. *et al.* The effects of an anti-CD4 monoclonal antibody, keliximab, on peripheral blood CD4+ T-cells in asthma. **The European Respiratory Journal**, v. 18, n. 1, p. 45–52, jul. 2001.
- KOYA, T. *et al.* IL-10-treated dendritic cells decrease airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 5, p. 1241–1250, maio 2007.

KRIEGEL, M. A.; RATHINAM, C.; FLAVELL, R. A. Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c⁺ CD11b⁺ dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 109, n. 9, p. 3457–3462, 28 fev. 2012.

KUHLEN, J. L. *et al.* Identification of Asthma Phenotypes in a Tertiary Care Medical Center. **The American Journal of the Medical Sciences**, 14 out. 2014.

KUNICKA, J. E. *et al.* Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. **Cellular Immunology**, v. 149, n. 1, p. 39–49, jun. 1993.

LAN, Y. Y. *et al.* “Alternatively activated” dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3⁺CD4⁺ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 9, p. 5868–5677, 1 nov. 2006.

LARCHÉ, M. Regulatory T cells in allergy and asthma. **Chest**, v. 132, n. 3, p. 1007–1014, set. 2007.

LARCHÉ, M.; AKDIS, C. A.; VALENTA, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 10, p. 761–771, out. 2006.

LI, H. S.; WATOWICH, S. S. Diversification of dendritic cell subsets: Emerging roles for STAT proteins. **JAK-STAT**, v. 2, n. 4, p. e25112, out. 2013.

LI, X. *et al.* Induction of type 2 T helper cell allergen tolerance by IL-10-differentiated regulatory dendritic cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 42, n. 2, p. 190–199, fev. 2010.

MANEECHOTESUWAN, K. *et al.* Suppression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease. **PLoS medicine**, v. 6, n. 5, p. e1000076, maio 2009.

MASID-DE-BRITO, D. *et al.* Essential roles of endogenous glucocorticoids and TNF/TNFR1 in promoting bone-marrow eosinopoiesis in ovalbumin-sensitized, airway-challenged mice. **Life Sciences**, v. 94, n. 1, p. 74–82, jan. 2014.

MATHIS, D.; BENOIST, C. Back to central tolerance. **Immunity**, v. 20, n. 5, p. 509–516, maio 2004.

MEDEIROS JUNIOR, M. *et al.* Prevalência de alergia respiratória em indivíduos de área endêmica de *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 23, n. 4, p. 036, 2000.

MIZUTANI, N.; NABE, T.; YOSHINO, S. Interleukin-33 and alveolar macrophages contribute to the mechanisms underlying the exacerbation of IgE-mediated airway inflammation and remodelling in mice. **Immunology**, v. 139, n. 2, p. 205–218, jun. 2013.

MOORE, A. J.; ANDERSON, M. K. Dendritic cell development: a choose-your-own-adventure story. **Advances in Hematology**, v. 2013, p. 949513, jan. 2013.

MOSER, M. Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 5–8, jul. 2003.

MÜSKEN, H. *et al.* Sensitization to different mite species in German farmers: clinical aspects. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 10, n. 6, p. 346–351, 2000.

NAKAGOME, K.; NAGATA, M. Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma. **Auris, Nasus, Larynx**, v. 38, n. 5, p. 555–563, out. 2011.

NAKAJIMA, H.; TAKATSU, K. Role of cytokines in allergic airway inflammation. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 142, n. 4, p. 265–273, jan. 2007.

NAYYAR, A. *et al.* Induction of prolonged asthma tolerance by IL-10-differentiated dendritic cells: differential impact on airway hyperresponsiveness and the Th2 immunoinflammatory response. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 1, p. 72–79, jul. 2012.

OLIVEIRA, C. R. *et al.* Bystander effect in synergy to anergy in oral tolerance of *Blomia tropicalis* / ovalbumin murine co-immunization model. **Journal of Clinical Immunology** v. 25, n. 2, p. 153–161, 2005.

PAGE, C. P.; SPINA, D. Beta2-agonists and bronchial hyperresponsiveness. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 31, n. 2-3, p. 143–162, 2006.

PAGLIA, P. *et al.* Immortalized dendritic cell line fully competent in antigen presentation initiates primary T cell responses in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 6, p. 1893–1901, dez. 1993.

PAPADOPOULOS, N. G. *et al.* Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA. **Clinical and Translational Allergy**, v. 2, n. 1, p. 21, jan. 2012.

PAVORD, I. D. *et al.* Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 380, n. 9842, p. 651–659, ago. 2012.

PIEMONTE, L. *et al.* Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 9, p. 4443–4451, maio 2000.

PLATTS-MILLS, T. A. *et al.* Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, n. 6 Pt 1, p. S2–24, dez. 1997.

PONTE, J. C. *et al.* A study on the immunological basis of the dissociation between type I-hypersensitivity skin reactions to *Blomia tropicalis* antigens and serum anti-*B. tropicalis* IgE antibodies. **BMC Immunology**, v. 12, p. 34, jan. 2011.

RAMOS, J. D. A. *et al.* Production of monoclonal antibodies for immunoaffinity purification and quantitation of Blo t 1 allergen in mite and dust extracts. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, n. 4, p. 604–610, abr. 2004.

RAÍCH-REGUÉ, D. *et al.* Stable antigen-specific T-cell hyporesponsiveness induced by tolerogenic dendritic cells from multiple sclerosis patients. **European Journal Of Immunology**, v. 42, n. 3, p. 771–782, mar. 2012.

RIZZO, M. C. *et al.* IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in São Paulo, Brazil. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 7, n. 4, p. 242–248, 1997.

ROCA, L. *et al.* Dexamethasone modulates interleukin-12 production by inducing monocyte chemoattractant protein-1 in human dendritic cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 8, p. 610–616, 2007.

RODRIGUES, L. C. *et al.* Early infection with *Trichuris trichiura* and allergen skin test reactivity in later childhood. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 11, p. 1769–1777, nov. 2008.

ROTTE, A. *et al.* Cellular physiology biochemistry and biochemistr y influence of dexamethasone on Na⁺ / H⁺ Exchanger Activity in Dendritic Cells. **Cell Physiol Biochem**, v. 28, n.2, p. 305–314, 2011.

SATHE, P. *et al.* The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 9, p. 5184–5192, maio 2011.

SATO, M. N. *et al.* Oral tolerance induction to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis* in sensitized mice: occurrence of natural autoantibodies to immunoglobulin E. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, n. 11, p. 1667–1674, nov. 2002.

SHORTMAN, K.; HEATH, W. R. The CD8⁺ dendritic cell subset. **Immunological Reviews**, v. 234, n. 1, p. 18–31, mar. 2010.

STEINBRINK, K. *et al.* Myeloid dendritic cell: From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance? **Human Immunology**, v. 70, n. 5, p. 289–293, maio 2009.

STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. **Nature**, v. 449, n. 7161, p. 419–426, set. 2007.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 137, n. 5, p. 1142–1162, maio 1973.

SZEFLER, S. J. Advancing asthma care: the glass is only half full! **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 3, p. 485–494, set. 2011.

TAKEDA, F. *et al.* Intranasal sensitization with *Blomia tropicalis* antigens induces allergic responses in mice characterized by elevated antigen-specific and non-specific serum IgE and peripheral blood eosinophil counts. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 1, p. 1–8, 2004.

TANG, J. C. *et al.* Antigenic profile of *Blomia tropicalis*, *Aleuroglyphus ovatus* and *Glycycometus malaysiensis*. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 2, p. 223–236, ago. 2011.

- TISCH, R. Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation. **International Reviews of Immunology**, v. 29, n. 2, p. 111–118, abr. 2010.
- TSAI, J. J. *et al.* Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 115, n. 2, p. 144–149, fev. 1998.
- UNGER, W. W. J. *et al.* Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 11, p. 3147–3159, nov. 2009.
- VAN RIJT, L. S. *et al.* In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 6, p. 981–991, mar. 2005.
- VERGINIS, P.; LI, H. S.; CARAYANNIOTIS, G. Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7433–7439, jun. 2005.
- WALKER, C.; ZUANY-AMORIM, C. New trends in immunotherapy to prevent atopic diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 84–90, fev. 2001.
- WALKER, M. L. *et al.* Elucidation of pathways driving asthma pathogenesis: development of a systems-level analytic strategy. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 447, jan. 2014.
- WATANABE, H. *et al.* Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 22, n. 4, p. 407–412, abr. 2002.
- WENZEL, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 716–725, maio 2012.
- WILLS-KARP, M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 255–281, jan. 1999.
- WOHLLEBEN, G.; ERB, K. J. Atopic disorders: a vaccine around the corner? **Trends in Immunology**, v. 22, n. 11, p. 618–626, nov. 2001.
- WOJAS-KRAWCZYK, K. *et al.* Immunotherapy of lung adenocarcinoma patient with Peptide-pulsed dendritic cells: a case report. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 60, n. 1, p. 69–77, fev. 2012.
- XIAO-KUI HE, XIANG-LING WU, XIU-JUAN HE, BO LI, Y.-X. H. Dexamethasone impairs the differentiation and maturation of murine dendritic cells by Toll-like receptor 4-nuclear factor-kappaB pathway. **Chinese Medical Journal**, v. 123, n. 3, p. 344–350, 2010.
- YAMAZAKI, S.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 54, n. 2, p. 69–75, maio 2009.

YANG, S. *et al.* IL-10 gene modified dendritic cells induced antigen-specific tolerance in experimental autoimmune myocarditis. **Clinical Immunology**, v. 121, n. 1, p. 63–73, out. 2006.

ZHOU, Q. *et al.* GM-CSF-licensed CD11b⁺ lung dendritic cells orchestrate Th2 immunity to *Blomia tropicalis*. **Journal of Immunology**, v. 193, n. 2, p. 496–509, 15 jul. 2014.