

## **Resumo / Summary**



## **Resumo**

A presente dissertação assentou no desenvolvimento de cinco capítulos que se resumem:

### **I. Fundamentos Teóricos**

A fundamentação teórica foi consubstanciada na análise de publicações científicas consideradas relevantes para o trabalho experimental realizado.

#### **A. Inflamação alérgica mediada por IgE**

Foi efectuada uma descrição sumária do sistema imune, nomeadamente quanto às funções biológicas, órgãos centrais, órgãos secundários e das particularidades dos distintos tecidos linfóides mucosos. Este enquadramento é imprescindível para a compreensão dos distintos mecanismos subjacentes aos pressupostos fisiopatológicos da resposta alérgica mediada por IgE. Para esse fim, definimos os conceitos de hipersensibilidade, atopia e alergia, bem como os pressupostos em que se baseiam as reacções de Hipersensibilidade de Gell e Coombs, particularmente o tipo I.

Desenvolveram-se os principais mecanismos indutores de sensibilização alérgica mediada por IgE, bem como os acontecimentos fisiopatológicos decorrentes da resposta ao alergénio e as repercussões da própria apresentação antigénica no contexto IgE. Caracterizaram-se as células efectoras da reacção alérgica nos distintos aspectos biológicos favorecedores da reacção. Salientaram-se as características fisiopatológicas da designada resposta imediata e da resposta celular, enquadrada na reacção tardia à exposição a alergénios.

Foram evidenciados os mecanismos de regulação da resposta a alergénios mediada por IgE, nomeadamente os principais mecanismos de tolerância, em particular a intervenção de distintas células com perfil regulador.

Abordando os distintos mecanismos fisiopatogénicos e de regulação imune resultantes da exposição a aeroalergénios, foram enfatizados alguns estudos epidemiológicos da doença alérgica respiratória, com particular enfoque nos resultados obtidos no nosso país.

## **B. Imunoterapia específica**

Constituindo esta abordagem terapêutica um fulcro da presente investigação, realizou-se a uma breve resenha histórica, reportando alguns marcos relevantes que determinaram o próprio percurso desta forma de tratamento específico da doença alérgica de mediação IgE.

Procedeu-se à descrição das actuais duas formas de administração terapêutica (subcutânea e sublingual), com plena confirmação de eficácia em estudos científicos baseados em evidência médica. Realçaram-se os tipos de extractos disponíveis para tratamento, bem como as dificuldades presentes que resultam de diferentes metodologias de padronização dos extractos terapêuticos.

Foram salientados os aspectos clínicos que suportam a eficácia clínica, actualmente indiscutível para esta terapêutica nas vias de administração preconizadas, para tratamento de alergia respiratória a ácaros, poléns, alguns fungos e fâneros de animais domésticos. Os aspectos de segurança da IT, frequentemente relatados, foram objecto de reflexão e de descrição. Explanaram-se, assim, os factores implicados em efeitos adversos, francamente minimizados se forem cumpridos todos os critérios referentes à própria prescrição e à necessidade de uma administração correcta em centros, com natural diferenciação científica.

Igualmente se pormenorizaram os principais mecanismos subjacentes à IT, em especial a modulação na resposta a anticorpos, modulação celular Th2/Th1, na própria regulação de linfócitos T, com singular importância na indução de células T reguladoras. Outros mecanismos implicados na imunomodulação terapêutica foram, também, explicitados: a modulação da resposta da célula APC e de outras células envolvidas na resposta alérgica. Embora a utilização da SLIT tenha um tempo substancialmente menor que a ITSC, procurou-se apresentar alguns dos efeitos imunofarmacológicos que sustentam um idêntico mecanismo e eficácia clínica.

Os estudos dinâmicos na IT são muito escassos, mas possuem uma notável relevância na compreensão dos mecanismos indutores da tolerância imune, obtida por efeito terapêutico, constituindo, por conseguinte, um dos motivos do desenvolvimento do presente projecto de investigação. A informação decorrente destes estudos, será do maior alcance no desenvolvimento de novas estratégias e perspectivas de tratamento com novos extractos alergénicos em desenvolvimento.

## II. Introdução à investigação realizada

Decidimos incluir este capítulo para justificar algumas opções subjacentes à experimentação humana e animal, como forma de não converter a descrição metodológica demasiado alargada, pouco linear e, porventura, fastidiosa, porque necessitaria de fundamentação e explanação.

Nos estudos dinâmicos da reacção alérgica e da imunoterapia, a marcação simultânea de várias proteínas alergénicas seria impeditiva do modelo de estudo desenvolvido. Assim, optámos pela técnica de marcação de leucócitos com  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO, metodologia com enorme sensibilidade e especificidade no estudo funcional de patologia inflamatória. A reinjecção síncrona destas células autólogas com a aplicação das proteínas alergénicas de provocação ou do extracto terapêutico superou a limitação metodológica restrita exclusivamente a uma só ligação proteica ao radiofármaco. Não só o efeito da agressão alérgica é dependente dos distintos alergénios presentes num determinado extracto, mas também o potencial efeito modulador actual é conseguido com várias proteínas contidas no extracto. Para além disso, a técnica de Medicina Nuclear empregue garantiu a marcação de todas as populações de leucócitos em circulação, todos eles com eventuais implicações na alergia e no efeito subsequente à IT.

Na experimentação humana, foi seleccionado o *Dermatophagoides pteronyssinus*, uma vez que se trata da sensibilização mais frequentemente implicada em alergia respiratória e permite níveis de exposição razoavelmente controlados e mantidos ao longo do tempo de estudo.

A provocação nasal, necessária nos doentes a incluir no estudo, tinha claras limitações, pois não seria possível um incremento de doses, nem uma monitorização rinofuncional em paralelo. Assim, a partir do extracto alergénico desenvolvido especificamente para este projecto, foi determinada a resposta cutânea com diluições sucessivas em cada doente. A concentração de provocação foi definida como a que induziu uma pápula com o mesmo diâmetro da histamina em teste de picada (*Prick*). Num grupo restrito de alérgicos comprovou-se que esta metodologia permitia a indução de sintomatologia clínica, embora de reduzida magnitude, e possibilitava a relativa imobilidade do doente durante posteriores aquisições cintigráficas. Não existindo uma completa padronização da prova de provocação nasal específica, optou-se pela administração do alergénio em solução aquosa pulverizada no meato nasal, dado ser uma metodologia menos susceptível de indução de hiper-reatividade nasal inespecífica.

Relativamente à investigação experimental, porque o recurso a uma metodologia semelhante à aplicada no humano requeria um significativo volume sanguíneo para marcação celular, apenas animais de grande porte reuniriam estas condições pelo que, limitava, enormemente, a disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos para estudo laboratorial. Assim, face a esta inexequibilidade, elegeu-se o ratinho da estirpe BALBc, com profusa manipulação em estudos experimentais e com facilidade na indução de sensibilização alérgica.

Para a sensibilização animal, optou-se por pólen de *Parietaria judaica*, uma vez que é um alérgico muito implicado em alergia respiratória e permite uma objectiva evicção no ambiente do biotério. Para a sensibilização da amostra pertencente a uma mesma ninhada, solicitámos externamente essa manipulação a Laboratório com certificação internacional, no sentido de otimizar a experimentação e minimizar os riscos acidentais que limitassem o número requerido do total da amostra. A sensibilização por via intraperitoneal foi obtida com duas injecções que garantiram a indução de IgE específica sérica. Toda a amostra foi manipulada após a 8ª semana de vida e num tempo inferior a 2 semanas após a recepção. Numa subamostra, foi realizado um teste de picada específico *in vivo* para confirmação da sensibilização.

A prova de provocação inalatória foi efectuada com a mesma solução alérgica empregue para a sensibilização, por aerossolização ultra-sónica, segundo a metodologia comum a outros trabalhos experimentais.

O modelo animal seleccionado, com reduzidas dimensões, limita as próprias amostras biológicas requeridas para estudo experimental. A medula óssea e as estruturas linfóides mediastínicas e tímicas constituem o alvo central do estudo. A exiguidade da amostra impôs uma selecção criteriosa dos anticorpos monoclonais para posterior estudo em citometria de fluxo. A caracterização dos antigénios de membrana para célula T, CD3, bem como para a população CD4 e CD8 eram, obviamente, prioritários; para além disso, procurou-se o estudo de um marcador de activação celular, CD25. No estudo da celularidade medular, o antigénio de superfície panleucocitário, CD45, foi considerado de extrema pertinência. Face à larguíssima experiência do Centro onde foram realizados os estudos laboratoriais a identificação de diferentes populações com base nas características de dispersão da luz (FSC/SSC) relacionadas com o tamanho e granularidade da célula, atendendo à expressão de CD45, permitia uma caracterização de distintas populações celulares, já que no plano económico e de disponibilidade biológica da amostra era impossível um espectro alargado de anticorpos monoclonais específicos. Neste

atendendo a esta identificação indirecta, o estudo da expressão de CD86, molécula de co-estimulação muito relevante na alergia e na asma, em particular, foi considerado muito pertinente.

### **III. Investigação Humana**

Neste projecto estudámos doentes alérgicos, tendo em consideração a dinâmica da resposta à exposição a alérgenos e à administração de imunoterapia específica em fase de manutenção.

#### **1. Dinâmica da resposta alérgica mediada por IgE**

Foram seleccionados doentes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* reunidos em grupos: 6 com rinite alérgica sem compromisso brônquico associado, 17 com asma brônquica e rinite alérgicas, 5 dos quais em tratamento de manutenção com ITSC. Foram, ainda, seleccionados 2 doentes controlos em cada um dos dois grupos. Em todos foi excluída a patologia sistémica concomitante, nomeadamente patologia inflamatória.

Relativamente à metodologia de estudo, todos os indivíduos foram submetidos a punção venosa para recolha de um volume de 50cc de sangue total. A posterior manipulação da amostra permitiu o isolamento de um *pellet* de leucócitos que foram marcados com radiofármaco,  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO.

A reinjecção dos leucócitos autólogos marcados ocorreu simultaneamente à pulverização, no meato nasal, de 160 $\mu\text{l}$  de uma solução aquosa de *D pt*, na diluição previamente definida individualmente para cada doente, mas que, curiosamente, foi a mesma em toda a amostra. Os estudos cintigráficos foram processados numa câmara de raios gama com colimador de baixa energia e de orifícios paralelos, acoplada a uma unidade de aquisição Camstar e a uma unidade de processamento eNTEGRA. A aquisição dinâmica foi obtida em visão anterior da cabeça e pescoço, para matrizes de 64x64 elementos de resolução, durante 60 minutos (120 imagens x 30 segundos) seguida de estudo estático aos 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos, durante 5 minutos para cada aquisição (256 x 256 elementos de resolução). As imagens estáticas foram obtidas em vista anterior e posterior para as seguintes projecções: cabeça e pescoço; tórax e abdómen.

Procedeu-se a avaliação qualitativa das imagens quer na região de administração do extracto alérgico de diagnóstico quer em distintas ROIs nas aquisições

dinâmicas e estáticas. Para a análise quantitativa procedeu-se a contagens nas diferentes áreas definidas como em áreas de fundo ou background em cada umas das projecções consideradas. Para comparação dos resultados foi estabelecido um coeficiente de captação corrigido dependente dessa área de *background*, uma vez que a actividade radioactiva administrada foi, naturalmente, muito diferente entre cada doente. Calculou-se, ainda, a velocidade de crescimento e de decréscimo da reacção, atendendo ao tempo e ao máximo valor de UCC obtido nas distintas ROIs consideradas.

O início da demonstração de actividade inflamatória na região nasal, local da provocação alérgica, ocorreu aos 3 minutos da prova. Apesar da dose proteica muito reduzida, foi possível demonstrar tanto a precocidade da actividade inflamatória local como o envolvimento sistémico, dependente de recirculação de leucócitos marcados radioactivamente. Genericamente, não observámos diferenças significativas no perfil dinâmico entre os grupos considerados relativamente à associação concomitante com asma, embora nos doentes em tratamento de manutenção simultânea com ITSC, os UCCs tenham apresentado valores mais reduzidos.

Nos nossos doentes, foi possível demonstrar o envolvimento precoce de regiões anatómicas relacionadas com a presença de tecido imune de órgãos centrais, nomeadamente medula óssea e tecido funcional tímico. A actividade inflamatória reportada nestas focalizações, dependente de recirculação celular, revelou um incremento ao longo das 6 horas de observação, facto que nos leva a concluir que existe a participação global de todo o sistema imune no decurso de uma reacção alérgica específica mediada por IgE, mesmo com dose reduzida de alérgeno. Para além do envolvimento destas estruturas, foi comprovada a actividade inflamatória em áreas relativas ao tecido imune secundário mucoso, designadamente pulmão, intestino, mediastino e estruturas vasculolinfáticas cervicais.

Estes resultados corroboram o carácter, efectivamente, sistémico da alergia, com visualização do envolvimento dessa actividade e sustentam a relevante participação celular e precocidade do envolvimento desde o início da reacção. Os nossos resultados não apoiam a clássica descrição de resposta imediata e resposta celular, ainda que restrita ao plano clínico, do mecanismo de hipersensibilidade do tipo I, reportada à alergia mediada por IgE.

Nos doentes com asma e rinite em tratamento prévio com ITSC, a actividade inflamatória nasal e, particularmente, na ROI pulmonar, foi mais reduzida que nos doentes sem tratamento. Também a actividade reportada nas áreas medulares



ósseas e no tecido funcional tímico determinou UCCs mais baixos no grupo sob tratamento, significativo de uma clara limitação local e sistémica na resposta específica a alergénios.

Quanto à velocidade de crescimento da reacção alérgica, observou-se, claramente, um aumento relativamente aos controlos, sendo que os valores mais elevados foram obtidos no grupo de doentes com asma associada, quando comparados com os doentes com clínica exclusiva de rinite.

Os nossos resultados levam-nos, ainda, a objectivar a actividade sistémica induzida pela administração de imunomoduladores inespecíficos (extractos bacterianos), mas com um perfil nitidamente distinto da resposta clínica a alergénios.

## **2. Dinâmica da resposta à Imunoterapia Específica**

Foram estudados 15 doentes alérgicos em tratamento de manutenção com IT, 3 dos quais submetidos a SLIT e os restantes em ITSC. Nos doentes submetidos a tratamento injectável, 6 deles encontravam-se em terapêutica com extractos aquosos para tratamento de anafilaxia, 4, com extractos *dépôt* e 2, com extractos modificados *alergóides* para tratamento de alergia respiratória, à semelhança dos sujeitos a extractos sublinguais.

O procedimento metodológico foi semelhante ao realizado nos doentes estudados após provocação nasal específica. A administração do extracto terapêutico e a reinjecção dos leucócitos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO foram concretizadas em simultâneo e, as aquisições cintigráficas processaram-se da mesma forma, assim como a análise dos resultados qualitativos, quantitativos e a dinâmica da velocidade da reacção.

Foram, ainda, estudados dois doentes alérgicos controlos submetidos a injecção de SSF e EB por via subcutânea.

Nos doentes submetidos a ITSC, o início da actividade no local da administração do extracto terapêutico ocorreu após os 35 minutos, sendo mais precoce nos doentes com extractos aquosos. O envolvimento sistémico foi, no entanto, mais célere, demonstrando o envolvimento de estruturas anatómicas dependentes da recirculação de células inflamatórias leucocitárias. Nos doentes em SLIT, o começo da actividade inflamatória local aconteceu aos 3 minutos e condicionou, também, o envolvimento sistémico precoce em distintas estruturas anatómicas, tal como nos doentes em terapêutica injectável.

Os nossos resultados sustentam as repercussões locais e sistémicas muito precoces e que este efeito denota ser, claramente, dependente do tempo decorrido desde a disponibilidade do extracto. Igualmente, tais resultados sugerem que a via de administração, embora condicione um padrão local distinto, vem demonstrar um idêntico efeito loco-regional e sistémico. As focalizações anatómicas reportadas a órgãos imunes centrais, medula óssea e tecido funcional tímico, parecem constituir os alvos preferenciais do mecanismo imunomodulador desta forma de tratamento específico da doença alérgica mediada por IgE. Relativamente a estruturas imunes secundárias, se é patente o envolvimento de tecido ganglionar loco-regional e pulmonar, o tecido linfóide intestinal apenas parece ser comprometido de forma ocasional nos doentes em ITSC.

Embora não seja possível esclarecer que tipo e que perfil de expressão de activação leucocitária estão implicados nas várias regiões consideradas, a re-circulação de células marcadas pressupõem um influxo e o trânsito entre o compartimento venoso e os diferentes tecidos e estruturas que manifestaram focalização. A análise dos resultados faz-nos inferir que em ambas as vias de administração, para além do influxo celular local, ocorrerá uma migração posterior, presumivelmente linfática, a estruturas ganglionares que amplificam o processo. Em paralelo, julgamos ainda que mediadores biológicos produzidos localmente possam exercer condicionalismos em leucócitos circulantes na vasculatura adjacente, com naturais efeitos sistémicos e nos órgãos imunes centrais.

#### **IV. Investigação Animal**

A amostra foi constituída por 44 ratinhos da estirpe BALBc, machos, provenientes da mesma ninhada. Em 39 espécimes, foi induzida sensibilização alérgica por injeção peritoneal com pólen de *Parietaria judaica*, os 5 restantes constituíram o grupo controlo.

O grupo activo de estudo foi subdividido em 3 subgrupos formados por 9 elementos cada um, dependendo do tempo subsequente à posterior manipulação; foi também reunido um quarto grupo de 6 ratinhos para avaliação da resposta imediata à exposição específica de alergénio. Finalmente, além do grupo controlo não alérgico, foi, ainda, composto um outro grupo controlo de 6 animais sensibilizados, mas não submetidos a posterior manipulação.

O grupo activo de estudo foi submetido a exposição inalatória específica com aerossolização da mesma solução alergénica utilizada na sensibilização. Procedeu-se ao posterior sacrifício da amostra constituída pelos 3 grupos activos de estudo, uma, duas e quatro horas após a provocação inalatória específica. Para o estudo da resposta imediata foram manipulados dois de 6 espécimes imediatamente após o *terminus* da aerossolização, após 20 e 30 minutos. Toda a experimentação decorreu num período de dez dias para manter a homogeneidade da amostra relativamente às características biológicas.

Após o sacrifício, foram obtidas amostras biológicas de sangue venoso, de estruturas ósseas e de estruturas ganglionares e mediastínicas, incluindo timo. As amostras foram de imediato manipuladas para obtenção de células para estudo em citometria de fluxo. Para tal fim, face à exiguidade das amostras, utilizámos os seguintes anticorpos monoclonais: anti-mouse CD3, CD4, CD8, CD45, CD4APC, CD25 e CD86. A identificação de células foi estabelecida pela marcação específica dos Ac monoclonais empregues, bem como, para a restante população leucocitária e de, precursores, pelas especificidades de dispersão da luz (FSC/SSC), com base na expressão de CD45. Os resultados foram expressos em valor percentual em relação à população marcada especificamente.

Na medula óssea, pudemos observar repercussões precoces nas sucessivas avaliações, determinadas 1, 2 e 4 horas após a exposição específica de alergénio. Confrontando os grupos controlos não submetidos a agressão inalatória, observou-se uma redução de neutrófilos, mas um aumento do valor percentual de linfócitos T, eosinófilos, Dcs e, muito significativamente, de monócitos. Quanto aos linfócitos T, observou-se um aumento da população CD8<sup>+</sup>, mas as células activadas CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reduzem-se, no ambiente medular ósseo, durante as primeiras 4 horas subsequentes à exposição específica a alergénios. A expressão de molécula de co-estimulação CD86 aumenta em monócitos, mas não apresenta alterações na DC. Observou-se, ainda, um aumento precoce da população de precursores blásticos com predomínio da linhagem mielóide.

Na área mediastínica, que incluiu timo e estruturas ganglionares, foi observado um aumento precoce da população de linfócitos T, em especial da população CD8<sup>+</sup> e das células activadas CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

No sangue periférico, nas primeiras 4 horas após a exposição alergénica específica, registou-se uma redução de neutrófilos e eosinófilos e um aumento de monócitos circulantes. Não se verificaram alterações nas restantes populações leucocitárias circulantes, nomeadamente DCs e linfócitos T. Porém, relativamente a esta última

população, constatámos um aumento circulante de  $CD8^+CD25^+$  e uma redução de  $CD4^+CD25^+$ . Monócitos e DCs circulantes expressando molécula de co-estimulação CD86 incrementam ao longo do tempo subsequente à exposição a alérgenos durante as primeiras 4 horas.

Na avaliação da resposta imediata a alérgenos ao longo dos primeiros 30 minutos, apesar de a amostra ser muito reduzida os resultados indiciam um compromisso muito precoce em estruturas envolvidas com órgãos imunes centrais, na dependência eventual de estímulos biológicos produzidos na árvore respiratória resultantes da exposição específica.

Estes resultados, apesar da dimensão da amostra, sustentam a participação de estruturas centrais que regulam precocemente a resposta imunológica, confirmada pelas alterações da celularidade em análise.

## **V. Discussão e conclusões do estudo**

Os resultados da experimentação animal não possibilitam, naturalmente, uma transcrição dos resultados obtidos para o modelo humano. Porém, no estudo dinâmico *in vivo* nos doentes submetidos a provocação alérgica específica, apesar da dose muito reduzida de alérgeno, são bastantes para concluir que na reacção mediada por IgE o efeito sistémico inicia-se muito precocemente e decorre em simultâneo à inflamação induzida localmente. Admitimos que os mediadores biológicos aí produzidos tenham uma intervenção nas estruturas endoteliais subjacentes, condicionando e modulando as células leucocitárias em circulação, influxo local, mas também exercem um efectivo efeito sistémico.

Na metodologia por nós desenvolvida, não podemos aquilatar da população e do fenotipo celular que precocemente migra ao local de administração do extracto alérgico, mas face ao actual conhecimento e à versatilidade do sistema imune e perante os resultados obtidos na experimentação disponível na literatura e os resultados da nossa experimentação animal, presumimos que nas fases iniciais da agressão alérgica possa ocorrer um influxo de DCs e de monócitos circulantes, com posterior diferenciação em APCs, que estabelecem uma cooperação com linfócitos T e prossecução do mecanismo imune.

Assim, considera-se que no mecanismo de hipersensibilidade do tipo I, mediado por IgE, a intervenção celular cursa, em paralelo, à desgranulação mastocitária. A recirculação de células inflamatórias leucocitárias ocorre precocemente, muito

antes da potencial e eventual resposta tardia celular. Admitimos, ainda, a existência de uma activação da medula óssea e do tecido funcional tímico, em fases muito iniciais da reacção alérgica ocorrida à distância, e uma ocasional participação precoce de linfócitos do tipo CD8.

No nosso estudo, pudemos visualizar, por método imagiológico funcional, a activação do sistema imune, subsequente à reacção alérgica com dose reduzida de alergénio. Tivemos, ainda, oportunidade de visualizar e confirmar o efeito sistémico da IT.

Apesar do avanço no conhecimento do mecanismo da IT, os nossos resultados permitem sustentar o envolvimento de estruturas reportadas ao sistema imune central, capazes de fomentar o efeito farmacológico modulador e modificador na própria história natural da doença alérgica.

Quanto às vias de administração, a via subcutânea e sublingual terão mecanismos de actuação assentes em populações celulares distintas, mas capazes de condicionar um idêntico efeito sistémico nos órgãos imunes centrais.

Os nossos resultados dão solidez à necessidade de implementação de linhas de investigação farmacológicas mais electivas, recentrando a função charneira da medula óssea no tratamento desta doença sistémica. A visualização do tecido funcional tímico com uma metodologia dinâmico-funcional parece vital no desenvolvimento de estratégias terapêuticas moduladoras de distúrbios imunes de que a reacção alérgica é um exemplo.

## Summary

This Dissertation was divided into five chapters which are summarized on the next pages.

### I Theoretical Fundamentals

The theoretical fundamentals on which the elaboration of this research was based, were gathered from relevant scientific papers already published, in order to sustain the experimental study developed.

#### A. IgE mediated allergic inflammation

A summarized description of the immune system was done, namely the biological function, central organs, secondary organs and the specificity of distinct mucosal lymphoid tissues. This was considered important to the understanding of the different mechanisms involved on the IgE mediated allergic response. Hypersensitivity, atopy and allergy were also defined, as were the basic mechanisms under Gell and Coombs type I hypersensitivity.

The major mechanisms related to allergic sensitization were described, as well as the major physiopathologic events after allergen exposure and the contribution of APC under IgE influence. The biological and phenotypical aspects of the effector cells involved on allergic response were characterized. We also described the biological events of the immediate phase and cellular response to allergen exposure in the context of the late phase response.

The major mechanisms of regulation of IgE mediated allergen response to allergens were described; namely the main tolerance mechanisms, and the intervention of the regulatory cells.

Finally we focused on some relevant epidemiologic data regarding respiratory allergic disease, particularly those concerning the Portuguese population.

#### B. Allergen specific immunotherapy

Specific immunotherapy (SIT) is one of the main hub of the present investigation, so we made some brief historical notes, focusing on the relevant steps in the progress of this kind of specific treatment of allergic IgE mediated disease.

We described the two current types of SIT (subcutaneous and sublingual). Both have confirmed clinical efficacy documented by medical evidence.

We stressed the distinct therapeutic allergen extracts available and the current problems regarding different methods of standardization, which make it difficult to compare the extracts. The clinical features that sustain the clinical efficacy of this kind of treatment were described. This therapeutic option is unquestionable nowadays for the treatment of respiratory allergy for house dust mites, pollens, some moulds and animal epithelium was described.

The safety parameters of SIT, usually reported in this kind of therapy were also analysed. We described the most important factors responsible for adverse effects. If all the criteria of prescription and correct administration by differentiated personal in certified clinical departments are met, these adverse effects can be minimized.

We described the most important known mechanisms of SIT, namely the modulation of response to antibodies, the modulation of Th2/Th1 switch mechanism and regulatory T lymphocyte response with particular relevance in the induction of Treg cells. Other mechanisms implicated in immune modulation were also focused, such as modulation of APC and other cells involved on allergic response. Even though there is a shorter body of experience with SLIT has been administered for a shorter period of time compared with subcutaneous SIT, we described some of the immunopharmacological effects of this therapy. Both SLIT and SIT share similar mechanism of action and identical efficacy.

The IT dynamic studies are scarce, but had enormous relevance on the understanding of the mechanisms of tolerance induction. This was one of the reasons for the development of this particular project. We believe that the information obtained from this kind of studies will be highly relevant for the development of new strategies of treatment with new allergenic extracts currently under investigation.

## **II. Introduction to the developed research**

This chapter aim to justify some of the options made, concerning to human and animal experiments. The goal was to reduce the description of methodology that otherwise could be too long, and fastidious.

On dynamic studies of allergic reaction and SIT, the simultaneous labelling of several allergenic proteins would not allow the methodological model defined for this project. So, we decided to use the leukocyte labelling technique with  $^{99m}\text{Tc}$ -

HMPAO. This method has high sensitivity and specificity for the functional study of inflammatory disease. The reinjection of autologous leukocyte cells simultaneously with the administration of allergen on challenge test or the therapeutic extract, allowed us to bypass the methodological constraint of just labelling one protein.

In fact, the biological effect of the allergic aggression is dependent on different allergens present on a on a specific extract, and the potential modulator effect is due to several proteins in the extract. Additionally, this Nuclear Medicine technique guaranteed the labelling of all leukocyte populations present in circulation, all of them potentially involved on the physiopathology of allergy and the effect of SIT.

For the human study we selected *Dermatophagoides pteronyssinus*, because it is the most frequently responsible allergen in respiratory allergy. It also allows well controlled levels of exposition, maintained during the study.

The nasal challenge test required for the study had obviously same limitations; it is not possible to have neither a dose increment, nor the monitoring of nasal function during the test period. We evaluated the patient skin reactivity performing skin prick tests with increasing concentrations of a *Dermatophagoides pteronyssinus* extract specifically developed for this study. The extract concentration used in the challenge test was the one that induced a wheal diameter similar to that obtained with histamine solution in skin prick tests. We had proved in a restrict group of patients that the concentration obtained with this method was able to induce clinical symptoms, which allowed a reasonable immobilization of the patient during future scintigraphic acquisitions because of their reduced magnitude. Since the nasal allergen specific challenge test is not fully standardized, we decided to administer an aqueous solution of allergen using a pulverization device on the nasal *meatus*, a method with less implications on non-specific nasal hyperreactivity than other techniques.

It was not feasible to apply the same methodology used in humans. Only if we had large animals available in the experimental setting, coul we obtain the blood volume required to the radioactive labeling of leukocytes. That would require exceptional logistic conditions and also had limitations regarding the monoclonal antibodies available on the market for laboratorial studies. So, taking into consideration these limitations we decided to develop the investigation on BALBc mouse, a specimen widely used in experimental studies in which the allergic sensitization is easily induced.



*Parietaria judaica* pollen was the allergen selected to sensitize the animals, because is an important cause of respiratory allergic disease, and also by the possibility of a strict environmental eviction in the experimental setting. The sensitization was performed by an international certified lab in order to optimize the experiment, and to minimize the potential accidental risks that could reduce the number of animals available for the project.

Inbred male BALBc mice were sensitized by 2 intraperitoneal injections in order to induce serum specific IgE response. The entire sample was then manipulated after 8 weeks of life, during the 2 weeks after reception. In a subgroup of animals we performed skin prick test with the specific allergen in order to confirm the allergic sensitization.

The inhalatory challenge test was performed with the same allergenic solution used to sensitize the animals, by ultrasonic aerosol, a method already used in other experimental studies.

The animal model selected, because of its reduced size, limits the quantity of biological samples obtained. Bone marrow and the mediastinum lymphoid structures including thymus were the targets of the study. The exiguity of the samples determined a criterious selection of the monoclonal antibodies to the flow cytometry study. The characterization of membrane antigens specific of T cell, CD3 and also CD4 and CD8 was a priority. An activation marker of T cell was studied by the expression of CD25. Analysis of bone marrow cells was made with the membrane panleukocyte antigen, CD45. The samples were analysed in the Histocompatibility Center, a lab with a huge experience in cell tissue flow cytometry. The identification of different cell populations was based on light dispersion (FSC/SSC) related to the dimension and granularity of each cell, according to the expression of CD45. The economical limitations and the reduced biological volume of the tissue samples did not allow the study of all the cells present on the marrow environment with a wide range of monoclonal antibodies. In this circumstance of indirect identification, the study of CD86 expression, was imperative, for this is a co-stimulatory molecule very important in allergy and particularly in asthma.

### **III. Human Investigation**

In this project we performed the study of allergic patients, observing the dynamics of the response not only to allergen exposure but also to the administration of a maintenance dose of specific immunotherapy.

### **1. Dynamic of IgE mediated allergic response**

We selected patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and distributed them into different groups: 6 patients having allergic rhinitis without associated bronchial hyperreactivity; 12 patients with allergic bronchial asthma and rhinitis, 5 patients under maintenance dose treatment of subcutaneous SIT. We also selected 2 additional control patients for each group. Patients with concomitant systemic diseases, namely inflammatory diseases, were excluded in the whole sample.

50 cc of blood were drawn from each patient. The subsequent manipulation of the sample allowed the isolation of a *pellet* of leukocytes that were labelled with  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO.

The reinjection of autologous labelled leukocytes occurred simultaneously to the nasal *meatus* pulverization with 160ml of aqueous solution of D pt in a concentration previously defined for each patient. Curiously it was the same for all patients.

The scintigraphic studies were acquired by a large field of view digital gamma-camera interfaced with a Camstar acquisition unit and an eNTEGRA processing unit, equipped with a parallel low-energy general purpose collimator.

A dynamic acquisition was obtained in anterior view of head and neck level to 64x64 matrix during 60 minutes (120 frames x 30 seconds) followed by static images for a period of 5 minutes, at 60, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes after administration of the radiolabeled leukocytes and the allergen (256x256 matrix).

These static images were obtained in anterior and posterior views at head and neck, thoracic and abdominal levels projection.

During the acquisitions, the visualized area was kept close to the gamma-camera collimator, and the patients were not allowed to move any part of the body, in order to maintain the geometry of the projections.

Qualitative analyses of the images obtained both with the dynamic and static protocol was made. The images obtained concerned not only the sites of allergenic extract administration but also different regions of interest (ROIs). For the quantitative analyses, counts in the different areas defined as background areas in each of the projections considered for study were done. For each ROI, the total counts, average counts per pixel and maximum counts were obtained, and decayed was corrected. With these values, uptake coefficients were calculated by the ratio between the maximum count rate at the target ROI and average counts at the background ROI. In order to normalise and to help with the interpretation of the

results an uptake coefficient of the background ROI was calculated and subtracted from the uptake coefficient of the target ROIs. We also calculated the velocity of increase and decrease of the reaction, according to the time and the maximum value of the UCC obtained in the different ROIs previously defined.

The inflammatory activity on nasal area, the site of the allergenic administration, started at 3 minutes after the challenge. Despite the low dose of allergenic protein administered it was possible to demonstrate the sudden local inflammatory activity as well as the systemic involvement, related to the recirculation of radioactive labelled leukocytes. In general, we did not observe any significant differences in the dynamic profile between the two patient groups: rhinitis exclusively and rhinitis associated with asthma. However the patients on SIT maintenance dose showed lower values of UCC.

It was possible to evidence the earlier involvement of anatomical areas related to the presence of central immune organs tissue, namely the bone marrow and functional tissue of thymus. This inflammatory activity dependent on recirculation of cells was time dependent and increased during the 6 hours following allergen exposure. This could reflect the overall involvement of the immune system in the earlier phases of IgE mediated allergic reaction even with small doses of allergen. Besides the involvement of these structures we also observed activity in areas related to mucosal secondary immune tissue, such as lung, gut, mediastinal and vascular-lymphatic cervical structures. In fact, our results confirm previous data regarding the systemic effects of allergy, by the visualization of this activity, and support the relevant and early cellular involvement immediately after allergen exposure. Our data did not support the classic description of an immediate response followed by a cellular phase, even if restricted to clinical complaints, related to the type I hypersensitivity IgE mechanism.

In allergic patients with asthma and rhinitis submitted to subcutaneous SIT on maintenance dose, the nasal inflammatory activity and particularly the activity on lung ROI were lower than in patients without this therapy.

Furthermore, the activity related to bone marrow and thymus functional tissue areas also induced lower UCC values in the group of patients under SIT than in allergic patients without SIT. These results could correspond to an obvious local and systemic impairment of the specific response to allergen exposure.

The allergic response increment velocity was higher in active patients compared with control patients. Values obtained in the patients with asthma were higher than those obtained in patients with isolated rhinitis complaints.

Our results could also demonstrated the systemic activity induced by the exposure to non-specific bacterial immune modulator agents, which had a diverse pattern of response to that elicited by allergens.

## **2. Dynamic response to allergen specific immunotherapy**

We selected 15 allergic patients submitted to SIT on maintenance dose: 3 patients by sublingual route and 12 patients by subcutaneous administration. In the group of patients on subcutaneous SIT, 6 patients were treated with an aqueous allergenic extract for anaphylaxis treatment, and the other patients were treated for respiratory allergic disease: 4 with *dépôt* allergenic extracts and 2 with chemically modified allergens (allergoids). The patients on sublingual SIT also had respiratory allergic disease.

The methodological procedure was similar to that used in the group of patients studied after specific nasal allergen challenge test. The therapeutic extract was administered simultaneously to the reinjection of the autologous  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO labelled leukocytes. The scintigraphic acquisition was performed according to the same methodology as well as the analysis of qualitative and quantitative results and the velocity of the reaction dynamics.

We also selected two additional allergic patients as a control group, and submitted them to the injection of aqueous saline (with phenol) and bacterial extracts by subcutaneous route.

In the group of patients submitted to subcutaneous SIT, the local inflammatory activity started 35 minutes after the administration of the therapeutic extract, and was earlier in those on treatment with aqueous extracts. However, the systemic activity started even earlier, supporting the involvement of anatomical structures dependent on inflammatory cell leucocytes recirculation.

The patients on SLIT treatment showed earlier local inflammatory activity, beginning approximately 3 minutes after the administration as well as earlier systemic activity in distinct anatomical structures, similar to patients under subcutaneous SIT.

Our results sustain both local and systemic early activity. This effect seems to be dependent on the lag period for the allergenic extract availability. They also suggest that despite the routes of administration leading to distinct local patterns of activity, they ultimately have a similar systemic effect.

The anatomical focalizations reported to immune central organs, bone marrow and thymus functional tissue seem to be the nuclear targets of the well known

mechanism of immune tolerance of this kind of specific treatment of IgE mediated allergic disease. Concerning the secondary immune structures involvement we observed activity on locoregional lymph node tissue and lung tissue, but the intestinal lymphoid structures were activated only in a few patients, and never in patients submitted to SLIT.

Our methodology didn't allow us to demonstrate which cell and specific phenotype were involved in the distinct ROIs on analysis. The recirculation of radiolabeled leukocytes implies an influx and transit of cells between the blood compartment and the tissues that showed activity. Our results suggest that the therapeutic extract induces a local cellular traffic, followed by a presumable lymphoid vessel migration to lymph node that is responsible for the amplification of the process. This occurs no matter the route of administration

We also believe that at the same time, biological mediators produced locally could influence circulatory leukocytes in adjacent vessels with effects not only on central immune organs but also on systemic effects.

#### **IV. Experimental Investigation**

Our sample included 44 male inbred BALBc mice. Sensitization to *Parietaria judaica* pollen was induced, by peritoneal injection of the extract, in 39 specimens. The remaining 5 non-allergic mice were the control group.

The active group was subdivided into 3 groups with 9 animals each, depending on the time elapsed till the manipulation. A fourth group with 6 allergic mice was considered in order to evaluate the immediate response to allergens. Another control group with 6 sensitized mice, but not enrolled in further manipulations was considered.

The active group was submitted to specific inhalatory exposure by ultrasonic aerosol with the same allergenic aqueous solution used for sensitization. The mice of the main 3 groups were than sacrificed at 1, 2 and 4 hours after the challenge test. To study the immediate response to allergens, 6 mice were sacrificed after the challenge: two mice immediately, 2 mice at 20 minutes and 2 mice at 30 minutes. All the experiments were performed in a time period of 10 days, in order to keep the sample with biologic homogeneous characteristics.

After mice sacrifice biological samples were obtained from peripheral blood, bone structures and lymph nodes, from mediastinal area and thymus. The samples were immediately manipulated to isolate a cell pellet that was evaluated by flow cytometry study.

We used the following monoclonal antibodies: anti-mouse CD3, CD4, CD8, CD45, CD4APC, CD25, CD86. The cell identification was established by the specific affinity to the monoclonal antibodies. The other cell populations and precursors were identified according to specificities of light dispersion (FSC/SSC) and CD45 expression. The results were given in rate proportion related to the total population of cells present on the sample.

In bone marrow samples we could observe early repercussion after allergen exposure as documented in the successive evaluations at 1, 2 and 4 hours in the animals studied. We confirmed a reduced number of neutrophils in active groups compared to control groups (allergic and non-allergic) not submitted to inhalatory challenge. There was an increase in T cells, eosinophils, DC and significantly higher counts of monocytes.

Concerning T lymphocytes, we observed an increased number of the CD8<sup>+</sup> cell population after allergen challenge but with reduced expression of activated cells, namely CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> in bone marrow during the first 4 hours of the allergic reaction. The co-stimulatory molecule CD86 was increased in monocytes, but remained unchangeable in dendritic cells. An early increase on blastic populations, particularly the myeloid precursors was also observed.

Regarding the mediastinal area, including thymus and lymph nodes, we observed an earlier increase on T cell population, namely CD8<sup>+</sup> cells and also activated phenotypes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

During the firsts 4 hours after the specific allergen exposure we observed a decrease in neutrophils and eosinophils in peripheral blood, and an increase in the monocyte population. We did not observe changes in the other leukocyte populations namely DC and T cells, except an increase of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells and a reduction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells. The expression of CD86 increased over the first 4 hours of allergen exposure on circulatory monocytes and DCs.

In the evaluation of immediate response to allergens during the first 30 minutes, our results, even if concerning a reduced sample, suggest an early involvement of the central immune organs, possibly related to the biologic mediators produced by the respiratory mucosa, after specific exposure.

These results sustain the hypothesis of an early involvement of immune central structures on the regulation of the immunologic response.

## V. Discussion and conclusions of the study

The results of the experimental model obviously did not allow a linear transcription to the human model. However, the *in vivo* dynamic study of patients submitted to specific allergen challenge test, even with a reduced dose of allergen, allowed us to conclude that, during the IgE mediated response, the systemic involvement starts very early and is simultaneous with the local inflammatory response.

We presume that the biological mediators produced on the site of allergen exposure had an intervention on the nearby endothelial cells, having a modulator effect on circulatory leukocyte cells, cell migration, and also an effective systemic effect.

The methodology that we employed in this investigation did not allow the identification of the cell populations that were enrolled, and what specific phenotypes were able to promote the successive steps of the mechanism. However, taking into account the current knowledge on the immune system versatility, the results from other studies already published, and also the results from our own animal experiments, we are strongly believe that both DC and circulating monocytes are involved in the early events. It is now well established that monocytes could differentiate into APCs that could further initiate the cell cooperation with T cells in order to achieve an effective immune response.

So, it seems that in type I hypersensitivity mechanism mediated by IgE, the cellular intervention occurs at same time as mast cell degranulation. The leukocyte inflammatory cell recirculation occurs early, even before the potential and possible cellular late response. We also presume that an activation of the bone marrow and the thymus functional tissue occurs at early stages of allergic inflammation and an occasional rapid involvement of CD8<sup>+</sup> cells.

In our study, we could observe by functional imagiological methodology the immune system activation following the exposure to allergens in a sensitized patient, even with small amounts of allergenic protein. We also observed and confirmed the systemic effect of SIT.

Reinforcing the progress made on the elucidation of the mechanism of SIT, our results support the involvement of structures associated with central immune system, that could sustain a pharmacological modulatory effect and the modification of the natural course of allergic disease.

Regarding the routes of administration of the therapeutic extract, the subcutaneous and the sublingual routes will probably have mechanisms of action based on different cell populations, but capable of inducing a similar systemic effects on immune central organs.

Our results support the need for new and elective pharmacologic investigation strategies, focusing on the mainstay function of the central immune organs in the treatment of systemic inflammatory disease such as allergy.

The evaluation of thymus functional tissue with a dynamic and functional methodology seems to be critical to the future development of new modulatory therapeutic strategies to treat immune disorders, such as IgE mediated allergic disease.