



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZOASAMI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

MARCELA ARAÚJO PEREIRA

**NANOVACINAS ALERGÊNICAS PARA IMUNOTERAPIA EM
ALERGIA A CASTANHA DE CAJU**

Recife

2018

MARCELA ARAÚJO PEREIRA

**NANOVACINAS ALERGÊNICAS PARA IMUNOTERAPIA EM ALERGIA A
CASTANHA DE CAJU**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde (PPGBAS), como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Juliana de Souza Rebouças

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Pereira, Marcela Araújo

Nanovacinas alergênicas para imunoterapia em alergia a castanha de caju / Marcela Araújo Pereira - 2018.

109 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientadora: Juliana de Souza Rebouças

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Castanha de caju 2. Nanopartículas 3. Polianidrido

I. Magalhães, Nereide Stela Santos (orient.) II. Rebouças, Juliana de Souza (coorient.) III. Título

615.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-098

MARCELA ARAÚJO PEREIRA

**NANOVACINAS ALERGÊNICAS PARA IMUNOTERAPIA EM ALERGIA A
CASTANHA DE CAJU**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde (PPGBAS), como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de Concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 26/02/2018

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Nereide Stela Santos Magalhães – UFPE
(Orientadora)

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto
(Titular – Membro interno)

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Ida Brodskyn
(Titular – Membro externo)

Prof^ª. Dr^ª. Juliana de Souza Rebouças
(Titular – Membro externo)

Prof. Dr. Fabio Rocha Formiga
(Titular – Membro externo)

Aos meus pais, Jaqueline e Sérgio, pelo amor, cuidado e dedicação imensuráveis; e a Fernando, por me dar forças quando elas me faltaram.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cumprir todas as promessas dele em minha vida, e permitir a realização de mais essa etapa.

Aos meus pais, por perdoarem minha ausência ao longo dessa jornada. Todos os abraços, carinho, conselhos e suporte foram os alicerces da construção desse trabalho.

À minha irmã, Daniela, que, mesmo ausente fisicamente, sempre se fez presente com o seu amor incondicional.

A Fernando, palavras nunca poderiam descrever o meu sentimento de gratidão. Um ombro amigo e companheiro fiel. Muito obrigada por me consolar nos momentos de tristeza, por me fazer sentir especial nos momentos de solidão e, acima de tudo, por me erguer quando já não tinha forças.

À minha Orientadora, Prof.^a. Dr.^a. Nereide Magalhães, por me acolher em seu grupo de pesquisa desde cedo, por me dar a oportunidade de fazer o que eu amo e, por me guiar quando não sabia por onde seguir.

À minha coorientadora, Prof.^a. Dra. Juliana Rebouças. Os sonhos começam antes mesmo da gente pensar em sonhar. Agradeço a você por ter me dado o presente de fazer esse projeto, por ter me iniciado no mundo da imunologia, por confiar em mim, pela paciência e por todo o apoio, ensinamentos e experiências. Nunca pensei conseguir realizar tanto e, devo isso, em grande parte, a você.

Ao Prof. Dr. Juan Manuel Irache, por ter me acolhido tão bem e ter me dado a liberdade de fazer ciência, de fato, buscando as respostas dos “por quês”.

Ao Prof. Dr. Carlos Gamazo. Você é meu exemplo de equilíbrio. Sempre tranquilo, mas inquieto por respostas. Você realmente sabe despertar o melhor lado dos seus alunos e incentiva o desenvolvimento da “intuição” de cientista.

À Profa. Dra. Claudia Brodskyn, por abraçar esse projeto como seu e investir em mim como uma própria aluna. E, antes de tudo, pela confiança em mim depositada.

Aos meus amigos, Péxy, Rafa, Nessita, Julay, vocês são os irmãos que Deus me permitiu escolher ao longo da vida. Mesmo de longe, sempre me incentivaram e enviaram todo o carinho.

Ao grupo SLC. Minha segunda família. Toda família tem seus problemas, mas ela é imperfeitamente perfeita assim. Meus dias se tornaram mais leves quando divididos com vocês.

Um agradecimento especial à Rafa. Amiga, irmã e, às vezes, mãe. Nunca hesitou em arregañar as mangas e trabalhar. Nunca me negou ajuda. Sei que nunca estarei sozinha, pois você sempre estará lá torcendo, incentivando e dividindo.

Á Lais, minha roommate preferida. Esses últimos meses foram vivenciados intensamente e, só nos duas sabemos de tudo o que passamos e como fomos vitoriosas por matar todos os leões, um por vez.

À Mi, Bella, Helena, Lari, Sarita e Clarete. Vocês são as florzinhas que embelezaram o meu jardim ao longo desses anos.

À minha querida e amada Ilminha. Meus cafés da manhã foram momentos que realmente disfrutei ao seu lado. MUITÍSSIMO obrigada pelos conselhos, puxões de orelha e apoio. Você é a essência do LIKA.

Aos meus queridos Nanogalenic amigos. A Espanha só se tornou uma experiência mágica por ter dividido com vocês. Meu doutorado não teria sido o mesmo.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunopatologia Keiso-Asami (LIKA), por todo suporte e colaboração na realização do projeto.

À Pri e Mila, que tornaram a Bahia um lugar bem mais amável, divertido e animado. Com certeza, vocês fizeram meus dias mais alegres.

Ao CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.
(BEAUVOIR, 1958, p. 243)

RESUMO

As alergias alimentares afetam entre 6-8% da população infantil e 3-4% dos adultos em todo o mundo. No Brasil, apesar da inexistência de dados epidemiológicos robustos, estudos relatam a prevalência de até 23% de alergia alimentar. Entre as alergias alimentares, a alergia aos frutos secos (castanha de caju, amendoim, avelã, nozes, entre outros) é relativamente frequente em países em que o seu consumo é elevado, como é o caso do Brasil. Entre elas, a alergia à castanha de caju (*A. occidentale*) está descrita como a segunda mais comumente capaz de induzir reações adversas severas, como a anafilaxia, o que demonstra sua alta capacidade alergênica. Entretanto, ainda não existe tratamento efetivo disponível no âmbito clínico que seja capaz de reverter a resposta alérgica induzida pela castanha de caju. Uma alternativa promissora para modificar a resposta do paciente é a imunoterapia alérgeno-específica (SIT) com o uso de sistemas nanoestruturados de liberação controlada. Dentre eles, as nanopartículas poliméricas foram empregadas na SIT por serem capazes de modular e potencializar a resposta imune em direção a uma resposta protetora mais duradoura e eficaz. Neste sentido, podemos destacar os polímeros polianidridos e zeína para a preparação de nanopartículas para SIT por via oral. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas poliméricas de polianidrido (NPg) e zeína (NPz) contendo o extrato da castanha de caju encapsulado, para posterior avaliação do efeito imunomodulador e eficácia terapêutica, através da realização de estudos *in vitro* e *in vivo*. As nanopartículas foram produzidas com êxito pelo método de nanoprecipitação (deslocamento do solvente), com tamanho de ≈ 200 nm, PDI de $\approx 0,2$ e potencial zeta de ≈ -40 mV. Ensaio de estabilidade e liberação *in vitro* demonstraram que as nanopartículas são estáveis em meio gástrico simulado, permitindo que o conteúdo proteico seja liberado apenas no meio intestinal. Macrófagos Raw 264.7 previamente tratados com NPg e NPz apresentaram manutenção de viabilidade celular, acompanhada por uma redução significativa na produção de IL-6 e TNF- α . Após imunização oral e intradérmica com NPg e NPz de camundongos Balb/c, verificou-se um aumento significativo na produção de citocinas secretadas por células Th1 (IL-12 e INF- γ) e diminuição significativa na produção das citocinas secretadas por células Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Também foi observada um incremento na ativação de células T reguladoras (T_{reg}) nos linfonodos mesentéricos, com aumento na produção de células T_{reg} CD4⁺ Foxp3⁺ e CD4⁺ LAP⁺ e citocinas T_{reg} (IL-10 e TGF- β 1), avaliadas por citometria de fluxo. Diante dos resultados obtidos, a imunização de animais com NPg e NPz foi responsável pela indução de uma resposta imune de perfil Th1 e T_{reg}, de maneira mais acentuada com NPg, em ambas as vias de administração, comprovando assim suas propriedades imunomoduladoras.

Desta forma, estes sistemas poliméricos nanoestruturados se apresentam como alternativas terapêuticas promissoras para o tratamento clínico da alergia à castanha de caju.

Palavras-chave: Nanopartículas. Polianidrido. Zeína. Castanha de caju. Imunização.

ABSTRACT

Food allergies affects 6-8% of children and 3-4% of adults worldwide. In Brazil, despite the lack of robust epidemiological data, studies reported that the prevalence is up to 23% of food allergy. Among food allergies, allergy to nuts (cashew nuts, peanuts, hazelnuts, etc., among others) is relatively frequent in countries where consumption is high, as is the case in Brazil. Among them, the allergy to cashew nut (*A. occidentale*) is described as the second most commonly food allergy capable of inducing severe adverse reactions, such as anaphylaxis, which demonstrates its high allergenic potential. However, there is still no effective treatment available in the clinical that is capable of reverse the allergic response induced by cashew nuts. A promising alternative able to modify the allergic patient response is allergen-specific immunotherapy (SIT) with the use of nanostructured controlled release systems. Among them, polymer nanoparticles were employed in SIT because they are able to modulate and potentiate the immune response towards a more durable and effective protective response. In this sense, we can highlight the poly(anhydride) and zein polymers for the preparation of nanoparticles for SIT oral administration. In this context, the objective of this work was to develop polymeric nanoparticles of poly(anhydride) (NPg) and zein (NPz) containing the cashew nut extract, for further evaluation of the immunomodulatory effect and therapeutic efficacy, through *in vitro* and *in vivo* studies. The nanoparticles were successfully produced by the nanoprecipitation (solvent displacement) method, with a size of ≈ 200 nm, a PDI of ≈ 0.2 and a zeta potential of ≈ -40 mV. *In vitro* stability and release kinetics assay showed that the nanoparticles are stable in simulated gastric media, allowing the protein content to be released only in the intestinal environment. Raw 264.7 macrophages previously treated with NPg and NPz showed cell viability maintenance, accompanied by a significant reduction in the production of IL-6 and TNF- α . After oral and intradermal immunization with NPg and NPz of BALB/c mice, there was a significant increase in the production of cytokines secreted by Th1 cells (IL-12 and INF- γ) and a significant decrease in the production of cytokines secreted by Th2 cells (IL-4, IL-5 and IL-13). An increase in the activation of regulatory T cells (Treg) in mesenteric lymph nodes was also observed, with increased production of CD4⁺ Foxp3⁺ and CD4⁺ LAP⁺ Treg cells and Treg cytokines (IL-10 and TGF- β 1) evaluated by flow cytometry. According to these results, the immunization of animals with NPg and NPz was responsible for the induction of an immune response of Th1 and Treg profile, more pronounced with NPg, in both administration routes, thus confirming its immunomodulatory properties. Thus, these nanostructured polymer systems

are presented as promising therapeutic approaches for the clinical treatment of cashew nut allergy.

Keywords: Nanoparticles. Poly(anhydride). Zein. Cashew nuts. Immunization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Mecanismos imunológicos envolvidos na sensibilização alérgica. Durante a sensibilização alérgica, as células dendríticas (DCs) presentes na mucosa capturam, processam e transportam os alérgenos para os linfonodos circulantes mais próximos para promover a geração de células Th2 alérgeno-específicas (um processo que depende parcialmente da IL-4). Ocorre a expansão clonal e ativação de células Th2 alérgeno-específicas, produzindo IL-4 e IL-13, favorecendo a ativação das células B e mudança de classe de anticorpo para IgE. Os anticorpos IgE-alérgeno específicos se ligam à superfície das células efectoras (mastócitos e basófilos) através de receptores de alta afinidade por IgE (FcεRI), ocorrendo a sensibilização do paciente. Um pool de memória de células Th2 alérgeno-específicas e células B são gerados. Modificada de PALOMARES et al., 2017..... 24
- Figura 2 Fase efetora característica das reações alérgicas. Ocorre a ligação de moléculas de IgE a receptores de alta afinidade FcεRI, levando à liberação de aminas vasoativas (como a histamina), mediadores lipídicos (como prostaglandina D, fator ativador de plaquetas, leucotrieno C4 (LTC4), LTD4 e LTE4), quimiocinas (CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL4 e CCL5) e outras citocinas (como IL-4, IL-5 e IL-13), dando origem aos sintomas imediatos das doenças alérgicas. Modificado de LARCHÉ et al., 2006..... 25
- Figura 3 Fase tardia da reação alérgica. Após a migração para os locais de exposição ao alérgenos, sob a influência de quimiocinas e outras citocinas, as células T alérgenos-específicas são reativadas e ocorre a expansão clonal. A produção local de IgE é vista na rinite alérgica e asma, mas não nas dermatites atópicas. As células Th1, que produzem interferon-γ (IFNγ) e o factor de necrose tumoral (TNF), contribuem para a ativação e apoptose de queratinócitos

(na pele), células epiteliais brônquicas e células do músculo liso pulmonar. Ativação de mastócitos e basófilos, que liberam histamina, quimiocinas e outras citocinas, também contribuem para a reação alérgica tardia. Modificado de LARCHÉ et al., 2006. 26

Figura 4	Os dois principais tipos de nanopartículas poliméricas conhecidas como nanoesferas (sistema matriz) e nanocápsulas (sistema reservatórios) com diferentes modalidades de carregamento de princípios ativos. Modificado de AWAD et al., 2017.....	43
----------	--	----

Figura 5	Mecanismos imunológicos da imunoterapia alérgênica com base no uso de nanopartículas carreadoras de alérgenos. Modificada de GAMAZO et al., 2017.....	45
----------	---	----

Tabela 1	Alérgenos proteicos presentes na castanha de caju.....	32
----------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
4	CAPÍTULO 1. POLY(ANHYDRIDE) NANOPARTICLES CONTAINING CASHEW NUT PROTEINS CAN INDUCE A STRONG TH1 AND TREG IMMUNE RESPONSE AFTER ORAL ADMINISTRATION.....	78
5	CAPÍTULO 2. TH1 AND T_{REG} IMMUNE RESPONSE INDUCED BY ORAL IMMUNIZATION WITH A SINGLE DOSE OF CASHEW NUT ALLERGENS-LOADED ZEIN NANOPARTICLES.....	81
6	CONCLUSÕES.....	85

1. INTRODUÇÃO

A alergia alimentar é definida como uma resposta imunológica adversa resultante do consumo ou exposição a um determinado alimento (JONES; BURKS, 2017). Estima-se que 220-520 milhões de pessoas, no mundo, possam sofrer de alergia alimentar. Elas afetam entre 6-8% da população infantil e 3-4% dos adultos em todo o mundo. No Brasil, apesar da inexistência de dados epidemiológicos robustos, estudos relatam a prevalência de 23% de alergia alimentar (LONGO et al., 2013; GONÇALVES et al., 2016; GAGETE et al., 2017).

De acordo com a Rede de Alergia e Anafilaxia de Alimentos (FAAN), a alergia a castanha de caju (*Anacardium occidentale*) é a segunda alergia mais comum, entre as nozes, nos Estados Unidos (BOYCE et al., 2010). Outro fato relevante é que a castanha de caju pode causar reações graves, podendo levar à anafilaxia, e, apresentam reatividade cruzada com pacientes alérgicos à amendoim (CLARK et al., 2007). Com o aumento da sua popularidade mundialmente e maior uso na culinária, o risco de exposição inadvertida a castanha de caju vem crescendo rapidamente (MATTISON et al., 2016). Ao longo dos anos, pelo menos três proteínas da castanha de caju foram relatadas como potenciais alérgenos, conhecidas por seu potencial de sensibilização e capacidade de induzir reações alérgicas: Ana o 1 (WANG et al., 2002b), Ana o 2 (WANG et al., 2003) e Ana o 3 (ROBOTHAM, JASON M. et al., 2005).

Apesar do alto potencial de indução de reações alérgicas, não há tratamento efetivo disponível para a alergia a castanha de caju. Pacientes diagnosticados com alergias alimentares mediadas por IgE podem receber medicamentos para reduzir seus sintomas (anti-histamínicos, anti-leucotrienos, epinefrina, anti-IgE). Estes medicamentos podem impedir a degranulação dos mastócitos e basófilos ou podem atuar nas células T, reduzindo a ativação de eosinófilos (Ex. fármacos esteroides, anti-IL5) (VALENTA et al., 2015). Entretanto, a eliminação completa dos alérgenos da dieta é a estratégia de manejo clínico mais relevante a longo prazo. Esta abordagem não exclui o fato de possíveis exposições acidentais, quando os alimentos são contaminados com alimentos alergênicos ou simplesmente incorretamente descritos ou rotulados (SILVA, DE et al., 2014).

A imunoterapia alérgênica específica (SIT) é, atualmente, o único tratamento específico capaz de modificar o curso da resposta alérgica. Esta terapia é caracterizada pela administração de doses crescentes dos alérgenos em solução, podendo ser administrada pelas vias oral, subcutânea e sublingual (BERNSTEIN et al., 2010). As vias subcutânea e sublingual são

escolhidas, principalmente, para tratar alergias respiratórias e, menos frequentemente, para tratar alergias alimentares, porque as vacinas padronizadas não estão disponíveis (VALENTA et al., 2015). No caso de alergias alimentares, o SIT é realizado por via oral, através da administração destes alimentos ao invés de uma vacina. Porém, doses mais altas do alérgeno são necessárias para induzir uma dessensibilização e, esta ingestão pode levar o paciente ao desenvolvimento de reações adversas fatais (CABRERA; URRÁ, 2015). Neste contexto, novas abordagens estão sendo investigadas no sentido de superar estas limitações clínicas do SIT.

O objetivo principal a ser alcançado no desenvolvimento da vacina alérgica é melhorar a eficácia clínica e a segurança do paciente. Assim, vacinas eficazes e seguras com dose reduzida de alérgenos vêm sendo utilizadas em associação com adjuvantes, substâncias que são capazes de aumentar a resposta imune (WANG; SINGH, 2011). Adjuvante é qualquer "substância" que possui a capacidade de aumentar a imunogenicidade do antígeno a ele acompanhado e/ou modular a qualidade da resposta imune induzida. Eles têm sido amplamente utilizados em vacinas profiláticas convencionais para prevenção de doenças infecciosas (MOINGEON, 2012).

Idealmente, os adjuvantes para a imunoterapia alérgica devem estimular uma resposta imune Th1 sem induzir auto-imunidade. Não devem ser mutagênicos, cancerígenos e teratogênicos. Além disso, os adjuvantes ideais precisam ser apirogênicos e estáveis para a formulação da vacina (FRANCIS; DURHAM, 2004). Muitos compostos e sistemas dispersos têm sido extensivamente estudados como adjuvantes. Dentre eles, os sais de alumínio e as emulsões são tradicionalmente utilizados como adjuvantes imunológicos no âmbito clínico. Entretanto, o uso destes adjuvantes ainda apresenta várias desvantagens, o que limita a sua utilização em vacinas humanas. Portanto, os benefícios e riscos relacionados ao seu uso na imunoterapia alérgica precisam ser contrabalançados (WHEELER; WORONIECKI, 2001).

Os sais de alumínio, principal adjuvante aprovado para uso em vacinas para alergias, potencializam a resposta imune de proteínas através de um forte efeito Th2, o que sugere que novos adjuvantes poderiam ser mais adequados para induzir uma resposta do tipo Th1, de maneira a contrabalancear a resposta Th2, exacerbada na reação alérgica (GUPTA, 1998). Sendo assim, vários novos adjuvantes para imunoterapia com alérgenos estão atualmente sendo investigados e desenvolvidos. Lipossomas, complexos imunoestimulantes (ISCOM), oligonucleótidos e adjuvantes derivados de microorganismos (por exemplo, MPL®) estão sendo avaliados como novos adjuvantes para ITE alérgica, tanto em fase experimental quanto

em fase clínica (WILCOCK et al., 2004; CRAMERI; RHYNER, 2006). Por outro lado, as novas formas farmacêuticas, sobretudo as nanopartículas poliméricas, têm sido descritas como adjuvantes de vacinas e sistemas de liberação de alérgenos promissores para imunoterapia alérgica (SOUZA REBOUÇAS, DE et al., 2012; DUSCHL, 2013; S. REBOUÇAS, DE et al., 2014; BROTONS-CANTO et al., 2017).

Diferentes tipos de polímeros e copolímeros são utilizados no desenvolvimento de nanopartículas. Entre eles, os polímeros biodegradáveis são os mais utilizados como grande promessa na área de sistemas de liberação controlada. Esses tipos de nanopartículas fornecem propriedades de liberação controlada, mantêm a integridade estrutural e a atividade dessas biomoléculas, protegendo-as da exposição a condições extremas de pH, secreções de bile e pancreática e aumenta o efeito imunopotenciador dos antígenos (SOUZA REBOUÇAS, DE et al., 2012). Além disso, para alcançar o efeito terapêutico desejado, é importante selecionar o polímero certo para ser usado, uma vez que sua natureza influencia significativamente o tamanho e o perfil de liberação das nanopartículas (BRAMWELL; PERRIE, 2006). Estes polímeros biodegradáveis podem ser de origem natural (zeína, quitosana, alginato, carragenina, albumina, gelatina, colágeno, entre outros) ou sintéticos (a partir de ácidos lácticos, PLA; copolímeros de ácido lático e glicólico, PLGA; polianidridos; poli(e-caprolactona), PCL; poli alquil-cianoacrilatos, PACA; e outros copolímeros) (SOUZA REBOUÇAS, DE et al., 2012).

Estudos anteriores descreveram o potencial das nanopartículas de polianidrido em incorporar alérgenos (como proteínas de amendoim (REBOUÇAS et al., 2012; S. REBOUÇAS, DE et al., 2014) e *Lolium perenne* (GÓMEZ et al., 2009)), a fim de induzir uma resposta imune protetora associada a um aumento de resposta Th1 (GAMAZO et al., 2015). Essas formulações poliméricas também possuem propriedades bioadesivas na mucosa intestinal, um fator importante para a indução de respostas imunes potentes nas mucosas após administração oral (IRACHE et al., 2005; SALMAN et al., 2008).

Outro polímero promissor, a zeína, é o produto proteico mais abundante extraído das sementes de milho. Ela foi investigada pelo seu potencial uso como excipiente farmacêutico, bem como um biomaterial em engenharia de tecidos (ANDERSON; LAMSA, 2011; IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO, 2017). Além disso, sendo de origem natural, é classificado como um dos excipientes mais seguros pelo órgão que regulamenta o uso de alimentos e fármacos nos Estados Unidos (FDA) (GEORGET et al., 2008). Vários estudos descreveram que a zeína apresenta uma característica promissora de liberação controlada de fármacos (PENALVA et

al., 2015, 2017; MORENO et al., 2017). Quando administrada oralmente, ela exibe um longo tempo de permanência no intestino, devido à sua resistência às enzimas digestivas (PATEL; VELIKOV, 2014), além da ausência de efeitos tóxicos (MORENO et al., 2017). A zeína já começou a despertar interesse por seu potencial adjuvante. Microesferas de zeína exibiram um potencial imunogênico, sendo uma ferramenta útil para a terapia com vacinas (HURTADO-LÓPEZ; MURDAN, 2006; HOFBAUER et al., 2016).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver dois tipos de formulações de nanopartículas poliméricas para a encapsulação de alérgenos da castanha de caju, e avaliar o potencial imunogênico destas formulações. Como polímeros, foram utilizados o polianidrido, polímero sintético bioadesivo, amplamente utilizado em vacinas para imunoterapia antialérgica; e a zeína, polímero de origem natural, extraído do milho, que possui características imunogênicas previamente relatadas. Estas formulações de nanopartículas foram caracterizadas quanto aos parâmetros físico-químicos previamente estabelecidos para sua possível utilização na imunoterapia clínica. Além disso, estudos *in vitro*, onde foram avaliados sua toxicidade e ativação de macrófagos foram realizados. Para determinação da eficácia e imunogenicidade destes sistemas na imunoterapia para a castanha de caju, foram utilizados camundongos BALB/c. Estudos de imunização, oral e intradérmica, foram desenvolvidos, a fim de avaliar o tipo de resposta imune desencadeado por uma única dose de nanopartículas, e a eficácia foi determinada em um modelo de animal alérgico à castanha de caju.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Desenvolver sistemas poliméricos nanoparticulados para encapsulação das proteínas alergênicas, Ana o1, Ana o2 e Ana o3, presentes na castanha de caju (*Anacardium occidentale*), como estratégia de vacinas alergênicas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparação e caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas para encapsulação de proteínas alergênicas da castanha de caju;
- Análise das interações proteínas alergênicas/polímeros;
- Determinação da estabilidade físico-química das nanopartículas através de testes de estabilidade acelerada e em longo prazo;
- Determinação da cinética de liberação *in vitro* das proteínas alergênicas encapsuladas nas formulações de nanopartículas;
- Avaliação da integridade estrutural e imunogenicidade das proteínas alergênicas liberadas das nanopartículas;
- Avaliação da biocompatibilidade e toxicidade *in vitro* das proteínas alergênicas encapsuladas em nanopartículas;
- Avaliação das propriedades imunomoduladoras, através da realização de estudos de imunogenicidade *in vivo* (determinação de anticorpos específicos, séricos e de mucosa) em modelo murino de experimentação;
- Avaliação da eficácia terapêutica das vacinas alergênicas nanoparticuladas, através da realização de estudos *in vivo* de proteção à anafilaxia induzida por castanha de caju, em modelo murino de experimentação.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. ALERGIAS ALIMENTARES

1.1. CONCEITO

A Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica (EAACI) denomina alergia alimentar a todas as reações às proteínas alimentares, nas quais os mecanismos imunológicos estão presentes. São reações mediadas por anticorpos IgE, em consequência da ingestão, contato ou inalação de um alimento ou aditivo contido no mesmo. As demais reações, sem a atuação do sistema imunitário, são denominadas intolerância alimentar (JOHANSSON et al., 2001). Em geral, uma vez diagnosticadas, as alergias alimentares tendem a persistir durante a vida inteira e estão associadas ao alto risco de indução de anafilaxia, a mais grave das condições alérgicas (BERNSTEIN et al., 2010).

1.2. PREVALÊNCIA

Determinações precisas da prevalência de alergia alimentar são difíceis porque fatores como: definições de alergia, populações de estudo, metodologias, variações geográficas, idades, exposições dietéticas e outros fatores influenciam diretamente as estimativas (SICHERER, 2015).

Uma série de estudos recentes fornecem estimativas de alergia alimentar. Gupta e colaboradores utilizaram uma pesquisa eletrônica domiciliar dos EUA (número de pacientes 538,480) em 2009 e 2010. Foi estimado que 8% das crianças têm algum tipo de alergia alimentar; 2,4% têm múltiplas alergias alimentares e, aproximadamente, 3% já chegaram a desenvolver reações graves (GUPTA et al., 2011). Soller e colaboradores pesquisaram a presença de alergia alimentar auto relatada em 9667 indivíduos, de 10 províncias canadenses. Eles encontraram uma taxa global de 8% de incidência. Quando excluíram os adultos que relatavam alergias improváveis e ajustaram-se aos que não responderam, as estimativas finais foram de 6,7% na população geral, com 7,1% das crianças e 6,6% dos adultos. Os alérgenos mais comuns em crianças foram: leite de vaca (2,2%), amendoim (1,8%) e nozes (1,7%). Já em adultos, os alérgenos mais presentes foram: mariscos (1,9%), frutas (1,6%) e vegetais (1,3%) (SOLLER et al., 2012).

A Revista Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES) dos Estados Unidos, avaliaram resultados de IgE séricos específicos de alérgenos alimentares (sIgE) e consultas sobre alergias

alimentares auto relatadas, obtidos de 2007 a 2010, com 20.686 participantes. No geral, 8,96% relataram alergia alimentar, com 6,53% entre as crianças (MCGOWAN; KEET, 2013). Osborne e colaboradores avaliaram realizaram um estudo de coorte baseado na população de 2848 (73% de taxa de participação), com 1 ano de idade em Melbourne, Austrália. Esse estudo encontrou uma prevalência estimada de: amendoim, 3,0%; ovo cru, 8,9%; e gergelim, 0,8% (OSBORNE et al., 2011).

No Brasil, apesar da inexistência de dados epidemiológicos confiáveis, se estimam que as cifras de prevalência sejam similares. Apesar de qualquer alimento poder induzir alergia, estudos relatam que os alimentos que produzem alergia com maior frequência estão diretamente relacionados com os hábitos alimentares da população. Assim, as alergias alimentares mais frequentes na infância são ao leite, ovo e peixe, assim como a cereais, legumes e frutas. Já na idade adulta, destacam-se a alergia a frutos secos e a frutos do mar (ALVARADO IZQUIERDO; PEREZ, 2006; SOLÉ et al., 2012; MA et al., 2014; NWARU et al., 2014; GAGETE et al., 2017).

1.3. MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NAS REAÇÕES ALÉRGICAS

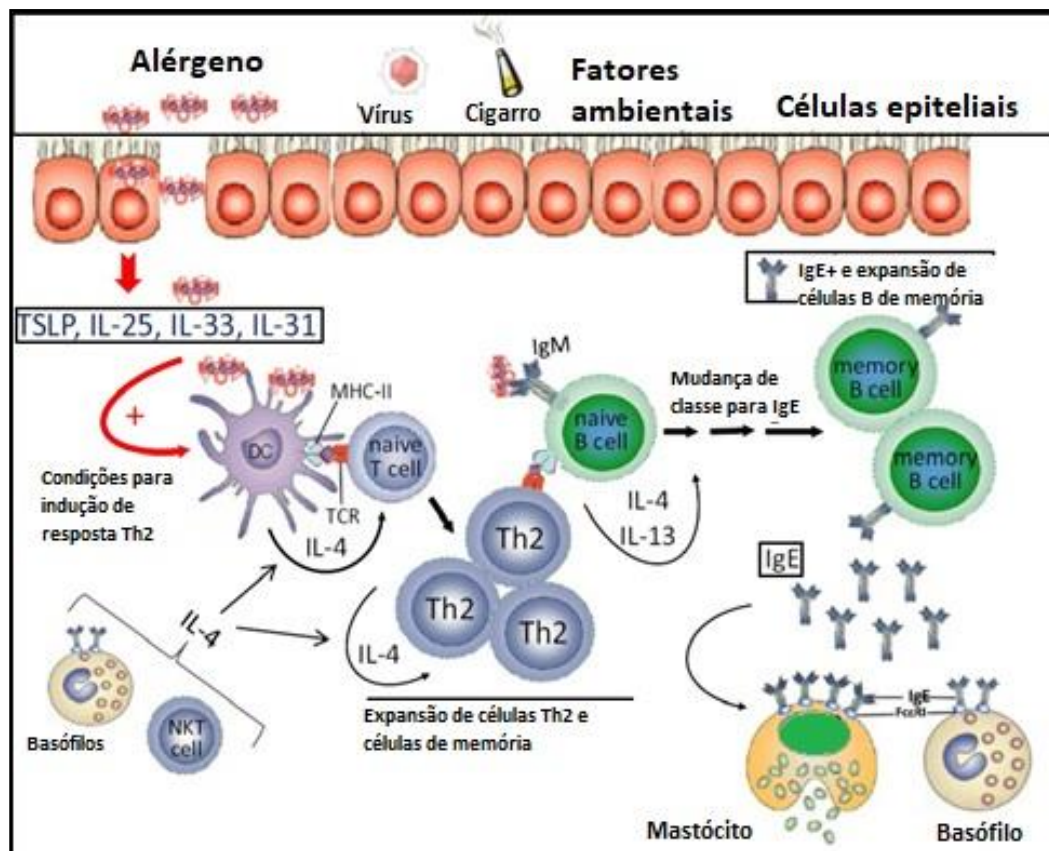
A fisiopatologia das doenças alérgicas consiste na interação entre as respostas das células do tecido residente e uma rede complexa de eventos imunológicos que interagem para o desenvolvimento da inflamação, lesão tecidual e perda de função orgânica. Dentro de uma rede complexa de mecanismos imunológicos de doenças alérgicas, a resposta imune do tipo 2 representa a maior e clinicamente mais relevante em doenças alérgicas. Geralmente, considera-se que uma resposta imune de tipo 2 está presente na asma alérgica, dermatite atópica, rinossinusite crônica com pólipos nasais e rinite alérgica. A resposta imune de tipo 2 envolve células Th2, células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2), células B, uma pequena fração de células NK (*natural killer*) secretoras de IL-4, basófilos, eosinófilos e mastócitos e suas principais citocinas (AKDIS et al., 2016). De uma rede complexa de citocinas, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 são, principalmente, secretadas das células do sistema imune e IL-25, IL-31, IL-33 e TSLP a partir de mastócitos, macrófagos e células epiteliais (EC) (AGACHE; AKDIS, 2016).

Os mecanismos imunológicos que atuam nas doenças alérgicas podem ser divididos em duas principais fases: (i) sensibilização e memória e (ii) fase efetora. Durante a sensibilização do paciente (Figura 1), os alérgenos são capturados nas vias aéreas, intestino ou pele pelas células dendríticas (DCs) residentes na mucosa. As DCs internalizam e transportam o antígeno para os linfonodos drenantes. Estes antígenos são processados e apresentados como peptídeos

associados a moléculas de MHC de classe II a células T CD4⁺ *naïves*, levando à geração de células Th2 CD4⁺ alérgenos específicas. Estas células Th2 produzem altos níveis de IL-4 e IL-13, que iniciam a ativação das células B, promovendo sua mudança de classe de anticorpo para IgE. As células B de memória IgE amadurecem e diferenciam-se em células plasmáticas, produzindo grandes quantidades de anticorpos IgE-alérgeno específicos, que se ligam com alta afinidade à fração FCεRI, presente na superfície dos mastócitos e basófilos, levando assim à sensibilização de indivíduos com IgE contra alérgenos (GALLI; TSAI, 2013).

Estudos recentes demonstraram que células do tecido residente também podem contribuir para a sensibilização alérgica. As células epiteliais (ECs) são uma barreira impermeável, e representam a primeira linha de defesa agressões. Em pacientes alérgicos, sua função de barreira se encontra alterada, permitindo a penetração de alérgenos, patógenos e outras partículas na submucosa, o que favorece a sensibilização alérgica e inflamação crônica (WAWRZY尼亚K et al., 2016). As ECs não devem ser consideradas apenas barreiras físicas, mas também importante células imunoregulatórias capazes de produzir diferentes citocinas após estimulação, tais como: IL-25, IL-33, IL-31, TSLP (que atua sobre DCs) e ILC2 (contribuindo para a geração Th2 e sensibilização alérgicas) (HAMMAD; LAMBRECHT, 2015).

Figura 1. Mecanismos imunológicos envolvidos na sensibilização alérgica. Durante a sensibilização alérgica, as células dendríticas (DCs) presentes na mucosa capturam, processam e transportam os alérgenos para os linfonodos circulantes mais próximos para promover a geração de células Th2 alérgeno-específicas (um processo que depende parcialmente da IL-4). Ocorre a expansão clonal e ativação de células Th2 alérgeno-específicas, produzindo IL-4 e IL-13, favorecendo o a ativação das células B e mudança de classe de anticorpo para IgE. Os anticorpos IgE-alérgeno específicos se ligam à superfície das células efetoras (mastócitos e basófilos) através de receptores de alta afinidade por IgE (FcεRI), ocorrendo a sensibilização do paciente. Um pool de memória de células Th2 alérgeno-específicas e células B são gerados.



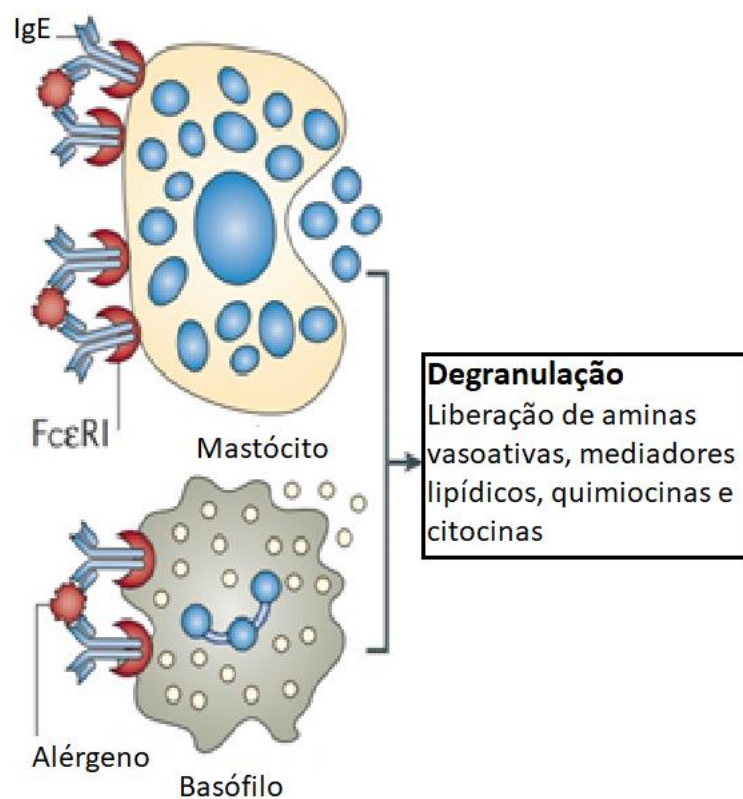
Fonte: Modificada de (PALOMARES et al., 2017).

A fase efetora da reação alérgica (Figura 2) é semelhante a uma reação de hipersensibilidade do tipo I, iniciada quando uma reexposição ao alérgeno provoca a ligação da IgE com os receptores FcεRI em basófilos e mastócitos sensibilizados.

A IgE ligada, desencadeia ativação e liberação de mediadores da anafilaxia, como histamina, heparina ou proteases; promove a síntese de novos mediadores lipídicos, tais como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas. Estes, são responsáveis pelos sintomas da fase imediata e inflamação aguda. Reações de fase tardia (Figura 3) ocorrem em tecidos quando

ocorre infiltração ou exposição de pele, com ativação de células T de memória e formação de tecidos linfáticos terciários.

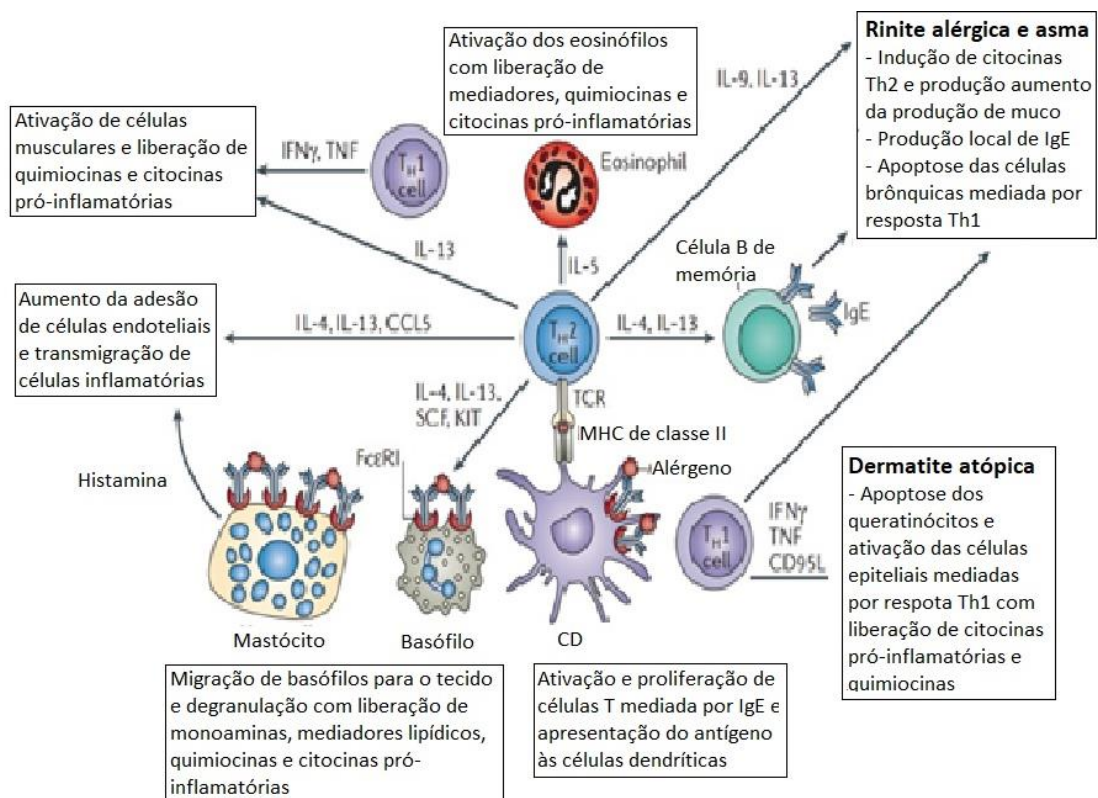
Figura 2. Fase efetora característica das reações alérgicas. Ocorre a ligação de moléculas de IgE a receptores de alta afinidade FcεRI, levando à liberação de aminas vasoativas (como a histamina), mediadores lipídicos (como prostaglandina D, fator ativador de plaquetas), leucotrieno C4, D4 e E4 (LTC4, LTD4 e LTE4), quimiocinas (CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL4 e CCL5) e outras citocinas (como IL-4, IL-5 e IL-13), dando origem aos sintomas imediatos das doenças alérgicas.



Fonte: Modificado de (LARCHÉ et al., 2006).

A etiologia da resposta imune alérgica é muito complexa e é diretamente influenciada por vários fatores, tais como: (1) equilíbrio do sistema imune (balanço Th1/Th2); (2) exposição precoce a endotoxinas bacterianas e outros imunoestimulantes microbianos (teoria da higiene) e (3) a interação entre fatores genéticos e ambientais. Além disso, outros fatores, como asma e exposição precoce a alérgenos alimentares, também foram relatados para influenciar o desenvolvimento da atopia (JANEWAY et al., 2001).

Figura 3. Fase tardia da reação alérgica. Após a migração para os locais de exposição ao alérgenos, sob a influência de quimiocinas e outras citocinas, as células T alérgenos-específicas são reativadas e ocorre a expansão clonal. A produção local de IgE é vista na rinite alérgica e asma, mas não nas dermatites atópicas. As células Th1, que produzem interferon- γ (IFN γ) e o factor de necrose tumoral (TNF), contribuem para a ativação e apoptose de queratinócitos (na pele), células epiteliais brônquicas e células do músculo liso pulmonar. Ativação de mastócitos e basófilos, que liberam histamina, quimiocinas e outras citocinas, também contribuem para a reação alérgica tardia.



Fonte: Modificado de (LARCHÉ et al., 2006).

1.3.1. Equilíbrio do sistema imune (balanço Th1/Th2)

Ambos os subconjuntos celulares Th1 e Th2 são produzidos a partir de uma população precursora não diferenciada de células T - células T *naive*. A diferenciação ocorre em alguns dias após o contato direto das células T *naive* com as células apresentadoras de antígenos (APCs). Este processo é conhecido como polarização celular. As células T *naive* podem passar

por um estado transiente, de pré-ativação (T0) antes de se tornarem células Th1 ou Th2. Existem evidências de que a polarização do tipo 1 ou tipo 2 já começa a partir do primeiro contato das células com os antígenos, incluindo as DCs, monócitos e macrófagos, e outras APCs. Este processo de polarização é impulsionado, principalmente, por citocinas. O microambiente de citocinas das células T, é uma matriz dinâmica de sinalização, que interage com receptores presentes nas superfícies das células para determinar se a célula irá se diferenciar em Th1, Th2 ou outro tipo de célula T diferenciada (DONG; FLAVELL, 2000). Fatores como quimiocinas, eicosanóides, radicais livres de oxigênio e vários mediadores inflamatórios contribuem para a matriz de sinalização e influenciam o resultado final. As quimiocinas são substâncias que atraem células para migrar em uma direção particular (quimiotaxia). Como citocinas, elas atuam via ligação aos receptores presentes na superfície externa das células imunes. As várias quimiocinas também têm efeitos sobrepostos nas células alvo. Quando comparamos os dois tipos celulares, Th1 e Th2, podemos observar que eles expressam receptores de quimiocinas diferentes nas superfícies de suas células, e elas estão envolvidas no início e ativação das respostas do tipo 1 e 2 (MUQAKU et al., 2015).

O papel desempenhado pelas células T auxiliares (Th) na amplificação da resposta imune já foi bem esclarecido. As células Th1 induzem a produção de interferon-gama (IFN- γ) e, em menor grau, interleucina-2 (IL-2) e interleucina-12 (IL-12). As células Th2 dependem mais fortemente da interleucina-4 (IL-4) e da interleucina-5 (IL-5). Funcionalmente, as células Th1 atuam no controle contra patógenos intracelulares ou contra células tumorais; Pelo contrário, os linfócitos Th2 atuam em proteção contra patógenos extracelulares, incluindo parasitas eucarióticos (DONG; FLAVELL, 2000). Uma das principais características da hipótese é que as células Th1 e Th2 podem antagonizar as ações umas das outras, quer bloqueando a polarização celular ou bloqueando as funções de seus receptores. Alguns exemplos, IFN-gama secretado por células Th1 pode bloquear a proliferação de células Th2 e altas concentrações de IL-4 ou IL-6 podem bloquear a geração de células Th1, a partir de células T *naive*. Contudo, outros tipos de células imunes também podem intervir para bloquear a atividade Th1 ou Th2, ou ambas. Estes são as células T reguladoras (KIDD, 2003).

1.3.2. Teoria da higiene

Sabe-se que duas respostas imunes provocadas por antígenos distintos que ocorrem simultaneamente, tendem a inibir-se mutuamente. Numerosos mecanismos foram estudados

para explicar a concorrência antigênica que pode ser pertinente para a hipótese de higiene (HWANG; IM, 2012; KONDRASHOVA et al., 2013). O desenvolvimento de respostas imunes resistentes contra antígenos de agentes infecciosos pode inibir as respostas a antígenos "fracos", tais como os antígenos e alérgenos. Entre os mecanismos de competição antigênica, tem-se dado atenção a competição de linfócitos para citocinas, reconhecimento de complexos principais de histocompatibilidade (MHC)/complexos de auto peptídeos e fatores de crescimento necessários para a diferenciação e proliferação de células B e T, durante as respostas imunes dentro do equilíbrio de produção de linfócitos. Da mesma forma que a massa de glóbulos vermelhos, que é restaurada para níveis normais após uma hemorragia com a eritropoietina, os linfócitos T CD4 e CD8 são restaurados para níveis normais após uma linfopenia. Fatores homeostáticos que desempenham um papel equivalente ao da eritropoietina não foram completamente esclarecidos; no entanto, as citocinas como IL-2, IL-7 e IL-15 são conhecidas por desempenharem um papel crucial (KRAMER et al., 2013; LIU, 2015; UPHOFF et al., 2015).

A "Teoria da Higiene", postulada em 1989 por Strachan, sugere que a redução da exposição a agentes infecciosos durante a infância, como resultado do estilo de vida ocidental, contribui para o aumento da prevalência de doenças alérgicas. A redução no contato com agentes infecciosos pode levar à polarização da memória de células T específicas de antígenos para uma resposta imune tipo Th2 ao invés de Th1. Além disso, uma menor estimulação do sistema imunológico pode resultar em uma redução da ativação de células T reguladoras (OKADA et al., 2010; LIU, 2015).

Vários estudos epidemiológicos investigaram o efeito protetor de agentes infecciosos em doenças alérgicas e autoimunes. A presença de um, ou mais, irmãos mais velhos teve efeito protetor contra o desenvolvimento de febre do feno e asma (STRACHAN, 1989), assim como a frequência em creches durante os primeiros 6 meses de vida (no caso de dermatite atópica e asma) (LIU, 2015; UPHOFF et al., 2015). Curiosamente, a exposição à agricultura e aos estábulos no início da vida impede doenças atópicas, especialmente se a mãe é exposta durante a gravidez (EGE et al., 2006; KALLIOMÄKI, 2009). Também foi demonstrado que a exposição prolongada a altos níveis de endotoxinas, durante o primeiro ano de vida, protege de asma e atopia. No entanto, esses dados foram contraditórios, pois outros estudos mostraram uma maior prevalência de asma correlacionada com altos níveis de endotoxinas em habitação urbana (TAVERNIER et al., 2006; MATRICARDI, 2010). O nível das endotoxinas é maior nas

fazendas em comparação com as cidades, e os indivíduos estão em contato com uma maior variedade de compostos microbianos nas fazendas, o que poderia explicar essa discrepância. Dados epidemiológicos de estudos transversais revelaram que as infecções por *Schistosoma* têm um forte efeito protetor contra doenças autoimunes, conforme revisado recentemente (FLOHR et al., 2006; ROOK, 2009). Os ancilostomídeos, como o *Necator americanus*, também parece proteger contra a asma. Em contraste, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* têm um efeito significativo sobre estas doenças. As infecções parasitárias foram quase erradicadas nos países europeus desde a Segunda Guerra Mundial, concomitante com o aumento dos índices de desenvolvimento de alergia (OKADA et al., 2010; KONDRASHOVA et al., 2013; UPHOFF et al., 2015).

2. ALERGIA A CASTANHA DE CAJU

2.1. PRINCÍPIOS E PREVALÊNCIA

A castanha de caju foi descoberta pelos portugueses, no Nordeste do Brasil, no século XVI e, desde então, começaram a exporta-la para os outros continentes (OLOGUNDE et al., 2011). A castanha de caju (*Anacardium occidentale*) pertence à família Anacardiaceae. Botanicamente, a castanha de caju é, na verdade, uma semente e não uma noz, mas historicamente é referida como uma noz. Ela tem forma de rim e cresce no fundo do caju. É cercado por uma casca que contém uma camada de óleo tóxico. Devido à presença deste óleo tóxico, a castanha de caju deve ser assada antes de comer. Aproximadamente, 60 % das castanhas de caju são consumidas como lanche, e os 40% restantes são processados em produtos como manteigas, pestos, panquecas, doces, sorvetes e chocolates (AZAM-ALI; JUDGE, 2001). A castanha de caju é usada especialmente nas cozinhas indiana, tailandesa e chinesa. Na produção mundial de nozes comestíveis, a castanha de caju ocupa o terceiro lugar com o Vietnã, Nigéria, Índia e Brasil como os principais exportadores de castanha de caju. O cultivo de castanha de caju não é organizado numa escala de plantação na maioria dos países produtores. O preço das castanhas de caju é muito maior do que o amendoim e outras nozes, devido ao modo de processamento intensivo em mão-de-obra necessária para transformar a noz bruta na castanha de caju comestível (OLOGUNDE et al., 2011). A produção mundial de castanha de caju experimentou um crescimento rápido. Um aumento de dez vezes foi observado nos últimos 50 anos. A produção mundial foi de, aproximadamente, 1,24 milhões de toneladas em 2000 e

aumentou para aproximadamente 3,58 milhões de toneladas em 2010 (AZAM-ALI; JUDGE, 2001).

Estudos publicados relataram a prevalência de alergia às nozes em geral. Embora a alergia a castanha de caju seja relatada como uma alergia comum entre as nozes, apenas alguns estudos abordam sobre a prevalência de alergia a castanha de caju (SICHERER et al., 2001). Pesquisas sugerem um aumento da alergia a castanha de caju em crianças e um maior reconhecimento da alergia à castanha de caju na prática clínica (RANCÉ et al., 2003; DAVOREN; PEAKE, 2005). Tariq e colaboradores relataram que 0,08% das crianças com menos de 4 anos, no Reino Unido, foram sensibilizadas para castanha de caju (TARIQ et al., 1996). Moneret-Vautrin e colaboradores verificaram que 41% dos pacientes alérgicos a nozes na França foram sensibilizados para castanha de caju (MONERET-VAUTRIN et al., 1998). Hasegawa e colaboradores observaram que há, relativamente, mais alergia a castanha de caju em adultos do sexo feminino (HASEGAWA et al., 2009a). O estudo de York e colaboradores constatou que a alergia a castanha de caju pode ser mais prevalente na população asiática. De 100 pacientes de uma clínica de alergia pediátrica multicultural em Leicester (Reino Unido), que relataram histórico clínico sugestivo de alergia a castanha de caju, 41 deles eram de origem asiática/asiática britânica, em comparação com apenas 21% com história sugestiva de alergia a outras nozes. Uma possível explicação para esta descoberta é que as crianças asiáticas têm uma exposição anterior às castanhas de caju por causa de práticas alimentares que levam a mais alergias a castanha de caju, em comparação com outras populações (BOYE, 2012).

No Brasil, há uma escassez de dados epidemiológicos relacionados a alergias alimentares. Baldaçara e colaboradores, verificaram, em um estudo realizado com pacientes de 1 – 15 anos de idade, em Palmas, Tocantins, uma incidência de alergia alimentar de 28,9 % (BALDACARA et al., 2013). Já Gonçalves e colaboradores, em um estudo realizado em Uberlândia, Minas Gerais, encontraram uma prevalência de alergia alimentar de 23,5 % entre adolescentes, e 17,6 % entre crianças (GONÇALVES et al., 2016). Uma pesquisa realizada por Solé e colaboradores, constatou que, entre os pacientes de 12 a 17 anos que apresentaram episódios de anafilaxia em países latino-americanos, cerca de 26,7 % desenvolveram reações alérgicas graves às nozes, em geral (SOLÉ et al., 2012). Apesar de não haver dados de prevalência nacionais, e considerando-se o alto perfil de consumo, estima-se uma alta incidência de alergia a castanha de caju, principalmente em adultos. Além do aumento no número de casos de alergia induzidos, a castanha de caju vem sendo descrita como um alimento

como alto potencial de induzir reações alérgicas graves, que podem levar ao óbito (RANCÉ et al., 2003). Gagete e colaboradores verificaram que Brasil possui valores de anafilaxia semelhantes a outras partes do mundo (6,2 %) e não existem medicamentos disponíveis para evitar esta condição, uma vez que a epinefrina injetável não está disponível para compra (GAGETE et al., 2017).

2.2. ALÉRGENOS PRESENTES NA CASTANHA DE CAJU

Atualmente, três proteínas presentes na castanha de caju apresentam potencial sensibilizante, sendo descritas como responsáveis pela capacidade de indução de reação alérgica do alimento (Tabela 1) (TEUBER et al., 2002; VALK, VAN DER et al., 2014). O primeiro alérgeno identificado, o Ana o 1, apresenta duas isoformas – Ana o 1.0101 e Ana o 1.0102 - de aproximadamente 50 kDa. São proteínas da família das 7S vicilinas, que demonstraram induzir IgE específica em até 50% dos pacientes alérgicos (WANG et al., 2002a). Posteriormente, se identificou outro alérgeno da castanha de caju, o Ana o 2, uma globulina com uma banda predominante de 33 kDa e outra minoritária de 53 kDa. Wang e colaboradores identificaram anticorpos IgE específicos em 62% (16/21) dos pacientes estudados (ROBOTHAM et al., 2003). O Ana o 3, último alérgenos descrito, pertence à família das albuminas. Apresenta três isoformas, de pesos moleculares compreendidos entre 6 e 10 kDa. Robotham e colaboradores estudaram 26 pacientes alérgicos à castanha de caju, dos quais 21 (81%) apresentaram IgE específica para Ana o 3, sendo este alérgenos também considerado que grande relevância clínica (ROBOTHAM, JASON M et al., 2005).

Tabela 1. Alérgenos proteicos presentes na castanha de caju.

Alérgenos	Família	Peso molecular	Referência
Ana o1	7S vicilina	50 kDa	(WANG et al., 2002b)
Ana o2	11S globulina	33 – 53 kDa	(WANG et al., 2003)
Ana o3	2S albumina	6 – 10 kDa	(ROBOTHAM, JASON M et al., 2005)

Fonte: Autoria própria.

A castanha de caju, bem como a noz do pistache (*Pistacia vera*) e a manga (*Mangifera indica*) pertencem à família Anacardiaceae e, portanto, são botanicamente relacionadas. Um alto grau de reatividade cruzada sorológica foi estabelecido entre a castanha de caju e o pistache (Pis v 1, Pis v 2 e Pis v 3) por testes de inibição de IgE específica. Isso pode ser explicado pela estrutura primária e tridimensional altamente conservada desses pares de homólogos de alérgenos, presentes tanto na castanha de caju quanto no pistache (NOORBAKHS et al., 2011). A reatividade cruzada clínica entre castanha de caju e pistache também foi relatada por Willison e colaboradores (WILLISON, L N et al., 2008), Garcia e colaboradores (GARCIA et al., 2000) e Quercia e colaboradores (FERNANDEZ et al., 1995). A reatividade cruzada entre pistache e semente de manga também foi estabelecida por testes de inalação de sIgE. Alérgenos com alto grau de homologia com castanha de caju em suas proteínas alergênicas incluem avelã, mostarda, amendoim, pistache, gergelim, soja e noz (WILLISON, L. N. et al., 2008; BARRE et al., 2008; ROBOTHAM et al., 2010). A co-sensibilização é vista entre a castanha de caju e a amêndoa, avelã, semente de laranja, pistache, amendoim, pectina e noz (GARCIA et al., 2000; RANCÉ et al., 2003; DAVOREN; PEAKE, 2005; HASEGAWA et al., 2009b; O’SULLIVAN; SOMERVILLE, 2011).

3. DIAGNÓSTICO

Para se obter um diagnóstico fechado, é necessário obter o histórico detalhado do paciente, ligado a uma compreensão das manifestações clínicas, compreensão da epidemiologia e da causa imune, e incorporação e interpretação de testes adequados. O histórico familiar detalhado com a gama de distúrbios alérgicos alimentares e sua fisiopatologia é necessária para alcançar um diagnóstico bem-sucedido (JONES; BURKS, 2017).

A abordagem geral para o diagnóstico de alergia alimentar foi revisada. As recomendações das Diretrizes do Painel de Especialistas de 2010 incluem: histórico médico e exame físico, dietas de eliminação, testes cutâneos de sensibilização, medições de IgE específica e desafios orais. Entre os testes não para uso de rotina foram testes intradérmicos, medições de IgE séricas totais, testes de contato atópico e o uso destes em combinação. Além de uma série de testes não padronizados e não provados foram especificamente não recomendados, incluindo a medição da liberação de histamina basófila, cinesiologia aplicada, medição de IgG4 específica, testes eletrodérmicos e outros (NIAID, 2010; LUYT et al., 2016).

O histórico médico é usado para estimar a chance (probabilidade anterior) de alergia alimentar e possíveis alérgenos. Quando apropriadamente selecionados e interpretados, são usados testes minimamente invasivos para chegar a uma probabilidade pós-prova de alergia (SICHERER; WOOD, 2013; PATEL; VOLCHECK, 2015). Após a chegada à uma conclusão, pode ser necessário um desafio oral para um diagnóstico final. Os alergologistas evitam a realização de desafios orais devido ao risco, ao custo, ao tempo e a outros fatores. É importante garantir que uma parcela completa dos alimentos testados seja ingerida com sucesso para reduzir o risco de que o desafio oral ocorra sem intercorrências e seja seguido por uma ingestão crescente de alérgenos (PONGRACIC et al., 2012; TURNBULL et al., 2015).

A crescente disponibilidade do diagnóstico por proteínas recombinantes específicas está refinando o diagnóstico de alergia mediada por IgE. Os motivos pelos quais a avaliação da ligação de IgE a proteínas específicas dentro de um alimento pode fornecer informações de diagnóstico adicionais, incluindo as seguintes possibilidades: (1) o reconhecimento de proteínas específicas que se comportam como alérgenos potentes (ou seja, estáveis à digestão) podem ser relevantes em comparação com o reconhecimento de proteínas que são termicamente instáveis ou homólogas ao pólen; (2) a ligação de múltiplas proteínas dentro de um mesmo alérgeno pode ter significância diagnóstica; e (3) a diferenciação dos graus de ligação às proteínas componentes pode revelar reatividade relevante. No entanto, estes métodos apresentam

limitações semelhantes aos testes padrões. Por exemplo, o grau de ligação é relevante, as plataformas de teste específicas podem variar e podem haver diferenças por localização, idade e reatividade de órgãos alvo. Mais estudos são necessários para correlacionar os resultados do teste com os resultados clínicos em várias populações de pacientes, mas a prova do conceito foi atingida em alimentos, incluindo ovos (BARTNIKAS et al., 2013), leite (SICHERER; WOOD, 2013), trigo (PAHR et al., 2013), soja (EBISAWA et al., 2013), frutos (KOLLMANN et al., 2013), camarões (SICHERER; WOOD, 2013), avelãs (MASTHOFF et al., 2013), amendoim (SICHERER; WOOD, 2013) e outros.

4. TRATAMENTO

Nas últimas décadas, a alergia alimentar surgiu como um importante problema de saúde pública em países com estilos de vida ocidentais. O padrão de cuidados atual para o gerenciamento de alergias alimentares é a prevenção rigorosa e completa exclusão do alérgenos da dieta e a disponibilidade pronta de epinefrina auto-injetável (KULIS et al., 2015). Esses princípios de tratamento exigem uma educação significativa do paciente. Os aspectos do cuidado que foram revisados recentemente incluem: circunstâncias que justificam a prescrição de epinefrina auto-injetável, a importância da educação sobre o tratamento pré-hospitalar de reações, educação sobre exclusão (por exemplo, contato cruzado, viagens, restaurantes, questões escolares e leitura de rótulos), legislação sobre rotulagem, fabricação de alimentos e aumento do acesso à epinefrina, disponibilidade de organizações de advocacia e numerosos recursos para a educação desenvolvidos por vários grupos eleitorais (MURARO; AGACHE; et al., 2014; SICHERER; SAMPSON, 2014). A recomendação de evitar potenciais alimentos sensibilizadores cruzados deve ser avaliada para o paciente, levando em consideração seu nível de risco, presença de asma e as implicações nutricionais da restrição extra. A lista final de alimentos para eliminar precisa ser expandida para incluir outros alimentos que podem conter esses ingredientes primários. O paciente e sua família precisarão de conselhos sobre como verificar os rótulos dos alimentos, uma lista de termos alternativos utilizados para o seu alérgeno (como a caseína para o leite) e conselhos sobre se a criança pode tolerar formas cozidas ou formas processadas da comida (TURNBULL et al., 2015). Alguns estudos sugerem que a exclusão prolongada dos alérgenos específicos não é protetora e pode ser um fator de risco em relação a atopia ou a prevenção de alergia alimentar (FLEISCHER et al., 2013).

Os pacientes e suas famílias devem estar conscientes de que, apesar de suas medidas cuidadosas, correm o risco de uma exposição acidental. Pequenas quantidades de alimentos

podem ser suficientes para causar uma reação grave, como a anafilaxia (SIMONS et al., 2014; WORM et al., 2014). As reações significativas durante os desafios alimentares ocorrem com apenas 1 mg de amendoim, 1 mg de ovo, 0,02 mL de leite, 5 mg de peixe e 1 mg de mostarda. As ingestões acidentais dos alérgenos são comuns. Isso pode ser devido a suposições incorretas sobre os conteúdos, a leitura incorreta de rótulos e a alimentação de um outro adulto (TAYLOR et al., 2004).

Os medicamentos apropriados podem, até certo ponto, ajudar a aliviar os sintomas de condições alérgicas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Os anti-histamínicos têm um papel de apoio no tratamento da anafilaxia. Eles reduzem o prurido e urticária, mas não são capazes de reverter um quadro de reação alérgica grave. Desta forma, não devem atrasar a injeção de adrenalina. A injeção intravenosa de anti-histamínicos pode causar hipotensão. Os glicocorticoides também não são semelhantes à adrenalina, mas sua ação adiada pode reduzir as reações bifásicas e prolongadas (SIMONS et al., 2013, 2014).

Atualmente, o único tratamento capaz de reverter o curso da reação alérgica é a imunoterapia. A imunoterapia significa "agir especificamente" para dessensibilizar o paciente para um alérgeno específico. Em outras palavras, o paciente desenvolve uma "tolerância" a esse alérgeno. Assim, para uma dessensibilização bem sucedida seria necessária uma maior quantidade de alérgenos para induzir uma reação alérgica ou que o alérgeno não induza mais uma reação (AKDIS; AKDIS, 2009; DHAMI et al., 2016). Dessa forma, há um século, Leonard Noon começou a usar injeções subcutâneas de um extrato de pólen de capim para tratar febre do feno (NOON, 2017). Porém, a imunoterapia é um tratamento longo, e as injeções subcutâneas estão associadas a efeitos colaterais alérgicos locais e sistêmicos. Novos métodos de imunoterapia com alérgenos foram posteriormente introduzidos para melhorar o perfil de segurança desta técnica. As vias de administração e o número de injeções foram modificados em alguns casos. Em outros casos, foram introduzidas modificações nos extratos alergênicos (GAMAZO et al., 2017).

Em relação as vias de administração, a imunoterapia subcutânea é o método mais bem estabelecido. No entanto, apesar da sua eficácia, existem limitações para o seu uso, como: reações alérgicas locais, anafilaxia (ocasionalmente) e reações quase fatais (raramente) (AMIN et al., 2006; NELSON et al., 2016). Além disso, é recomendado, pelo menos, de 3 a 5 anos de tratamento, a fim de obter uma resposta imunológica a longo prazo, o que exige uma boa adesão do paciente. Outra desvantagem é que alguns pacientes possuem "medo de agulhas e os riscos

associados ao uso deles” (CDC, 2011). O uso de imunoterapia sublingual (SLIT) tornou-se mais comum ao passar dos anos. Em geral, o risco de reação anafilática é menor, em comparação com SCIT e, portanto, pacientes podem se auto-administrar em casa. Porém, a imunoterapia sublingual é menos eficaz que a imunoterapia subcutânea. A necessidade de administração diária ou várias vezes na semana também resulta em baixa adesão ao tratamento (NELSON et al., 2016; MOINGEON; MASCARELL, 2017).

A imunoterapia oral (OIT) foi introduzida com bons resultados em termos de eficácia, mas com reações adversas sistêmicas mais frequentes, como sintomas gastrointestinais, urticárias e anafilaxia (NOWAK-WEGRZYN; ALBIN, 2015). No entanto, ela está sendo usada para tratar pacientes alérgicos a alimentos, especialmente para alergias ao leite, ovo ou amendoim. Ela está estabelecida em uma fase de escalonamento da dose, em que uma dose oral crescente é administrada semanalmente no hospital, seguida de uma fase de manutenção, na qual a dose máxima (se for bem tolerada) é administrada diariamente em casa. A OIT é agora utilizada em protocolos de pesquisa e pode induzir a dessensibilização (o alimento é tolerado enquanto recebe tratamento) ou, em alguns pacientes, uma falta de resposta sustentada após a descontinuação (DHAMI et al., 2016).

Estudos de OIT dão esperança de que um tratamento não intervencionista eficaz para alergia alimentar esteja ao alcance. Resultados preliminares sugerem um efeito de tratamento benéfico; no entanto, não pode haver uma declaração definitiva sobre a eficácia. Além disso, as reações adversas significativas à imunoterapia oral são comuns. As metanálises que abordam imunoterapia a alergia ao leite, ovo e amendoim indicaram limitações significativas dos estudos publicados (DHAMI et al., 2016). Burks e colaboradores verificaram que uma alta proporção de pacientes foi capaz de enfrentar um desafio alimentar oral à proteína do ovo após 1 a 4 anos de duração, com um aumento de 20 a 100 vezes no limiar de reatividade e na ingestão diária de doses de manutenção elevadas (300 - 4000 mg) da proteína alimentar. No entanto, a taxa de reações sistêmicas que necessitaram do uso de epinefrina, observada em até 25% dos participantes, especialmente aqueles que utilizam alimentos crus, ainda é muito alta para recomendar a OIT na prática diária (BURKS et al., 2012). Jones e colaboradores alcançaram uma dessensibilização clínica (definida como a capacidade de tolerar 3,9 g de proteína do amendoim durante um desafio alimentar oral) para 27 das 29 crianças que completou pelo menos oito meses de tratamento. A regulação descendente da resposta de Th2 ao amendoim foi documentada: de 6 a 12 meses, o tamanho do teste de punção cutânea de amendoim (SPT)

diminuiu, a diminuição da ativação de basófilos pelo amendoim e a produção de citocinas a partir de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com o amendoim foi modulada e, por 12 a 18 meses, aumentou a IgE e a IgG4 específicas para amendoim. Eles também demonstraram o alto risco de eventos adversos associados à OIT (JONES et al., 2009). Keet e colaboradores demonstraram que, embora a maioria dos pacientes com alergia a leite, mesmo severa, foram capazes de ser dessensibilizados com a imunoterapia oral e subcutânea a leite. Ademais, embora a maioria dos eventos adversos experimentados pelos participantes do estudo fosse leve, houve reações multi-sistêmicas ocasionais, mesmo em doses que foram toleradas por algum tempo sem reação (KEET et al., 2012).

Apesar da eficácia comprovada em muitos estudos clínicos, preocupações quanto à eficácia a longo prazo e à segurança da SIT limitam seu uso clínico. Como ela requer a aplicação de altas doses de alérgenos e injeções repetidas, podem ocorrer efeitos secundários locais, mas também reações alérgicas sistêmicas com risco de anafilaxia grave ou fatal. Para reduzir a dose administrada de alérgenos, eles podem ser aplicados em combinação com um adjuvante, para aumentar a resposta imunológica em relação ao alérgeno em solução (WANG; SINGH, 2011).

5. ADJUVANTES

Como muitos avanços médicos importantes, a descoberta dos efeitos imunológicos do uso de adjuvantes em vacinas foi casual. Gaston Ramon, um veterinário francês, observou que o rendimento de anti-soros do tétano e da difteria era maior em animais que desenvolveram um abscesso no local da injeção [24]. Ao ingerir amido, pão ralado ou tapioca, ele induziu abscessos estéreis no local de injeção com toxina inativada e, assim, conseguiu aumentar a produção de anti-soro, confirmando a hipótese de que substâncias capazes de induzir inflamação local no local da injeção também pudessem aumentar o rendimento anti-soro (PASQUALE et al., 2015).

No início do século XX, Glenny e colaboradores mostraram que a toxina da *Corynebacterium diphtheriae* precipitada pelo alumínio era mais imunogênica em animais de laboratório do que a mesma toxina apresentada na forma aquosa (GLENNY; POPE, 1926). Desde então, os compostos de alumínio vêm sendo amplamente utilizados como adjuvantes imunológicos em vacinas, tais como aqueles usados para proteger contra a difteria, o tétano, a febre tifoide, a coqueluche e imunoterapias e são substâncias amplamente utilizadas para esse fim (JENSEN-JAROLIM, 2015).

Os adjuvantes são tradicionalmente adicionados às vacinas para reduzir a frequência de injeções e/ou a dose de antígeno devido à sua capacidade de potencializar e sustentar a resposta imune contra patógenos (MURARO; WERFEL; et al., 2014). Adjuvante é qualquer composto ou substância que possui a capacidade de aumentar a imunogenicidade do antígeno a ele associado e/ou modular a qualidade da resposta imune induzida. Desta forma, eles podem ser selecionados de acordo com a ação desejada, podendo favorecer o desenvolvimento de qualquer um dos tipos específicos de células do sistema imune. Consequentemente, eles estão sendo introduzidos na produção de vacinas alérgicas, a fim de melhorar e simplificar os protocolos de imunização, além de melhorar o perfil de segurança de tratamentos de imunoterapia alérgica (MOINGEON, 2012; GAMAZO et al., 2017).

A nível celular, sabe-se que a vacinação com alérgenos em solução induz a diferenciação de células T não-diferenciadas em células Thelper (Th1, Th2, Tregs etc.). Na alergia, a co-administração de antígenos (alérgenos) com adjuvantes pode conduzir as respostas do tipo Th1, para competir com as reações de hipersensibilidade (mediadas por respostas do tipo Th2), suprimindo ativamente a inflamação do tipo Th2 (PETROVSKY; AGUILAR, 2004; AWATE et al., 2013). A escolha do adjuvante depende fundamentalmente do antígeno (alérgeno), bem como a via de imunização e é limitada pela extensão das reações adversas em resposta à combinação escolhida. De maneira ideal, um adjuvante deve ser rentável, biodegradável, não tóxico, ter alta estabilidade *in vivo* e induzir uma resposta imune apropriada (PFAAR et al., 2012). No entanto, o seu uso também levar ao aparecimento de efeitos adversos tais como.... (CHESNÉ et al., 2016), aumentando as preocupações sobre sua utilização na clínica. Avanços no desenvolvimento de novas formas de adjuvantes para imunoterapia têm se concentrado na redução de seus potenciais riscos, ao mesmo tempo em que melhoram a sua modulação na imunogenicidade da imunoterapia alérgica (BREHLER, 2017).

5.1. MECANISMOS DE AÇÃO DOS ADJUVANTES

O objetivo primordial da imunoterapia é a indução de uma resposta imunológica protetora e, em alguns casos, este alvo pode ser alcançado pela adição de adjuvantes. Diversas classes de compostos foram estudadas e testadas como adjuvantes, incluindo sais minerais, produtos microbianos, emulsões, saponinas, citocinas, micropartículas, nanopartículas e lipossomas (GUY, 2007; PASQUALE et al., 2015). Apesar do extenso uso de adjuvantes de vacinas, os mecanismos de ação pelos quais potencializam as respostas imunes não estão bem elucidados.

Os estudos atuais disponíveis sugerem que os adjuvantes desempenham um ou mais dos seguintes mecanismos para induzir respostas imunes: (1) liberação de antígenos no local de injeção (efeito de depósito), (2) estimulação da produção de citocinas e quimiocinas, (3) recrutamento celular no local da injeção, (4) aumento da captação e apresentação do antígeno às células apresentadoras de antígenos (APC), (5) ativação e maturação da APC [complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II e moléculas co-estimuladoras expressão] e migração para os gânglios linfáticos drenantes e (6) ativação de inflamossomas (WANG; SINGH, 2011; AWATE et al., 2013; MOJSILOVIĆ, 2017)

5.2. TIPOS DE ADJUVANTES

5.2.1. Sais de alumínio

O hidróxido de alumínio ou o fosfato de alumínio são os adjuvantes mais amplamente utilizados na imunoterapia alérgica para potencializar as respostas imunes aos alérgenos injetados (JENSEN-JAROLIM, 2015). Aproximadamente, 75% de todas as terapias baseadas no uso de adjuvantes, incluem um tipo de sal de alumínio (EXLEY, 2014). A vacina é composta, principalmente, por aglomerados de partículas de tamanho micrométrico do sal de alumínio, ao qual o antígeno é adsorvido (KRAMER; HEATH, 2014). A aplicação de alérgenos adsorvidos ao alumínio provou ser eficaz e segura em uma variedade de estudos que abordavam a imunoterapia alérgica subcutânea e outras rotas parenterais (EXLEY, 2014). Várias hipóteses sobre os mecanismos de ação dos sais de alumínio foram propostas (HOGENESCH, 2012). A primeira imunização com o alérgeno adsorvido ao sal de alumínio demonstrou induzir uma resposta precoce na produção de citocinas, incluindo a IL-18, facilitando a produção de IL-4 (KOOL et al., 2008; ARAGON et al., 2009). Após repetidas imunizações, estudos provaram que os sais de alumínio apresentaram uma mudança na resposta imune, aumentando a resposta do tipo Treg/Th1, e diminuindo a resposta do tipo Th2, com produção de anticorpos IgG bloqueadores de IgE (HOGENESCH, 2012). Assim, o uso de sais de alumínio na imunoterapia como adjuvantes, é uma ferramenta útil para estimular uma resposta imune modificada de Th2, com perfil protetor (WILCOCK et al., 2004). Até o momento, o uso de extratos alérgicos adsorvidos aos sais de alumínio tem melhorado os sintomas nos casos de aeroalérgenos e alérgenos de venenos. No entanto, estes sais possuem algumas importantes limitações, particularmente no que se refere aos seus efeitos em uma tendência a resposta Th2 e sua potencial implicação em patologias neurológicas (SOLE, DE et al., 2013; KRAMER; HEATH,

2014). A indução de resposta Th2 é considerada um efeito colateral indesejável, possivelmente relacionado a um aumento IgE-alérgeno específico, logo após o início da imunoterapia. Com o seguimento do tratamento, ocorre uma diminuição da resposta Th2. Estudos na área de imunoterapia visam desenvolver novas formas de adjuvantes capazes de induzir tolerância, evitando a indução ou amplificação de respostas do tipo Th2 (CHESNÉ et al., 2016; MOJSILOVIĆ, 2017).

5.2.2. Emulsões

Outro adjuvante clássico empregado na imunoterapia, o adjuvante de Freund completo (CFA), descoberto por Jules Freund em 1951, é uma emulsão composta por antígenos solúveis em óleo de parafina (emulsão água-em-óleo), com um surfactante e *Mycobacteria* inativada (MOJSILOVIĆ, 2017). Devido à sua alta potência e eficácia, era utilizado para induzir resposta imune em estudos experimentais, pois apresentava uma alta toxicidade para ser aplicado a humanos. Uma variante menos potente, e mais fácil para a preparação e aplicação, é a emulsão do tipo óleo-água, denominada adjuvante incompleto de Freund (IFA), pois não contém *Mycobacteria* inativada. No entanto, mesmo sem a presença da *Mycobactéria*, o adjuvante incompleto de Freund ainda é demasiado reatogênico para ser usado em vacinas humanas (COFFMAN et al., 2010; PASQUALE et al., 2015). Atualmente, existem dois adjuvantes de emulsão óleo-água licenciados para uso em vacinas humanas - MF59 (Novartis) e AS03 (GlaxoSmithKline). Ambos são baseados na utilização do esqualeno como o componente de óleo. O esqualeno é um óleo biodegradável, extraído do fígado do tubarão, e também é encontrado naturalmente nos tecidos humanos. Além disso, o MF59 contém surfactantes, como o polissorbato (Tween 80) e o sorbitol. Já o AS03, contém Tween 80 e alfa-tocoferol (vitamina E). Eles são usados em vacinas contra a gripe sazonal e pandêmica, uma vez que provocam um alto teor de anticorpos neutralizantes, bem como uma forte resposta de células T CD8⁺. Ambas as emulsões têm bons registros de segurança, permitem menos doses, além de diminuir a quantidade de doses de antígenos e geram respostas de memória marcadas, com fenótipos de células Th1 e Th2 mesclados (FOX; HAENSLER, 2013).

5.2.3. Agonistas-TLR (receptores *toll-like*)

Desde a descoberta dos receptores do tipo toll-like (TLR) e seu papel fundamental na imunidade inata, grande parte dos esforços são investidos no desenvolvimento de adjuvantes que direcionariam diretamente a esses receptores de reconhecimento padrão (PRR). Atualmente, apenas um adjuvante agonista-TLR foi licenciado, mas muitos estão em fases de

pesquisa pré-clínica ou ensaios clínicos. O monofosforil lipídio A (MPL), derivado de lipopolissacarídeo, é um agonista de TLR4, sendo 10.000 vezes melhor tolerado do que o lipídio original A (DIDIERLAURENT et al., 2009; KARCH; BURKHARD, 2016). Combinados aos sais de alumínio, o composto AS04, está atualmente aprovado para uso em uma das vacinas contra papilomavírus humano (Cervarix®). Foi demonstrado que ele possui a propriedade de aumentar os títulos de anticorpos e induzir uma forte resposta imune celular.

Os análogos sintéticos de ácidos nucleicos bacterianos e virais também são candidatos promissores para adjuvantes. Os oligodeoxinucleotídeos 5'-citosina-fosfato-guanina-3 sintéticos (CpG-ODN), são direcionados para TLR9. O CpG-ODN aumenta a resposta humoral e polariza fortemente a resposta celular Th para Th1 (BODE et al., 2011). Outro análogo sintético de ácido nucleico, poliinosínico:ácido poli (ácido poliédrico) (poli I:C), tem uma estrutura semelhante ao de alguns vírus. Este composto liga dois tipos de PRR-TLR3 e MDA5 (um receptor semelhante à RIG – gene I induzido pelo ácido retinóico). A ativação de ambos os receptores otimiza a magnitude e durabilidade da imunidade celular Th1 e CD8⁺, em comparação com qualquer via isolada (LONGHI et al., 2009). A flagelina bacteriana, um agonista de TLR5, também pode ser usada como adjuvante, seja em uma mistura com um antígeno ou quando sintetizada como uma única proteína recombinante (HULEATT et al., 2007). Ao contrário de muitos dos outros agonistas de TLR que polarizam fortemente a resposta das células Th1, ela tende a produzir respostas de células Th1 e Th2 (MOJSILOVIĆ, 2017).

5.2.4. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas que está envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas de liberação controlada em escala nanométrica. Esta tecnologia surgiu na década de 60, com o desenvolvimento da microencapsulação, técnica de transformação de líquidos (polímeros e outras substâncias) em pó com tamanho das partículas em escala micrométrica. A microencapsulação é bastante utilizada nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética por permitir a proteção de substâncias lábeis e voláteis, o controle da liberação do fármaco, contribuindo para a melhoria da biodisponibilidade e redução da dose terapêutica e toxicidade. A microencapsulação serviu de modelo para técnicas mais sofisticadas, agora em escala nanométrica, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas e nanoesferas (PIMENTEL et al., 2007; PARK, 2015).

Os sistemas de liberação controlada oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos, dentre elas destacam-se: a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, promovendo manutenção de níveis plasmáticos em concentração constante; o aumento da eficácia terapêutica; a liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (sensíveis a variação de pH ou de temperatura); a diminuição expressiva da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima; a diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis; a possibilidade de direcionamento a alvos específicos (sítioespecificidade); a possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos dispositivos; a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações e aumento da aceitação da terapia pelo paciente (PIMENTEL et al., 2007; TORCHILIN, 2008, 2014).

Nas formas de administração convencionais (spray, injeção, pílulas), a concentração do princípio ativo na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Desde que cada princípio ativo possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fator é limitante quando a dose terapêutica é próxima à dose tóxica. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (TIWARI et al., 2012).

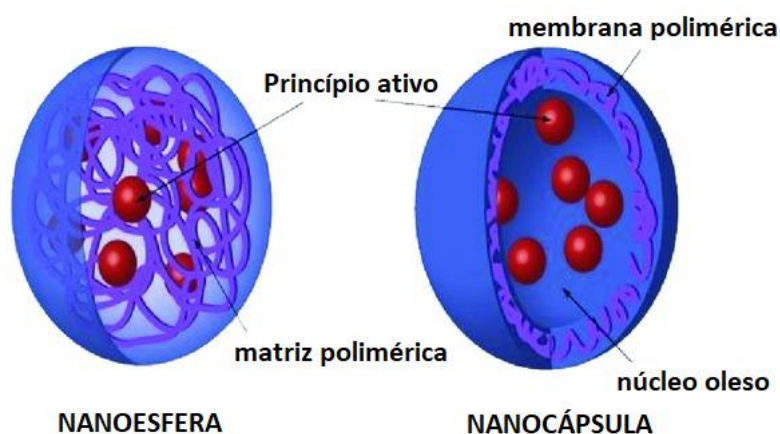
Além disso, os sistemas de liberação controlada são considerados adjuvantes, pois são capazes de potencializar a ação das células apresentadoras de antígeno, aumentando a duração de contato entre o alérgeno e a mucosa do paciente. Eles são capazes de estender a duração do contato através de diferentes mecanismos. Um desses mecanismos se deve a utilização de nanopartículas constituídas por polímeros mucoadesivos que aumentam o influxo de células apresentadoras de antígeno para o local da injeção, no caso da imunoterapia subcutânea. Os sistemas de liberação controlada também mostraram ser eficazes em modelos animais que visavam a imunoterapia através de vias de administração parenterais (SCHÖLL et al., 2004; SANDERS et al., 2005; POHLIT et al., 2017).

5.2.4.1. Nanopartículas

As nanopartículas são partículas esféricas, variando em tamanho de 10 a 1000nm, que podem ser produzidas a partir de copolímeros bio-compatíveis e biodegradáveis, naturais ou

sintéticos, com baixa solubilidade em água. Elas podem ser divididas em duas categorias: nanocápsulas e nanoesferas. As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o fármaco é encapsulado em uma cavidade cercada por uma membrana de polímero com um núcleo oleoso, enquanto as nanoesferas são uma matriz polimérica em que o fármaco está disperso fisicamente e uniformemente na malha polimérica (Figura 4). (COUVREUR et al., 2002; ZHAO et al., 2014).

Figura 4. Os dois principais tipos de nanopartículas poliméricas conhecidas como nanoesferas (sistema matriz) e nanocápsulas (sistema reservatórios) com diferentes modalidades de carregamento de princípios ativos.



Fonte: Modificado de (AWWAD et al., 2017).

As nanopartículas oferecem as seguintes vantagens como carreadores de alérgenos (RIEUX, DES et al., 2006; DACOBA et al., 2017):

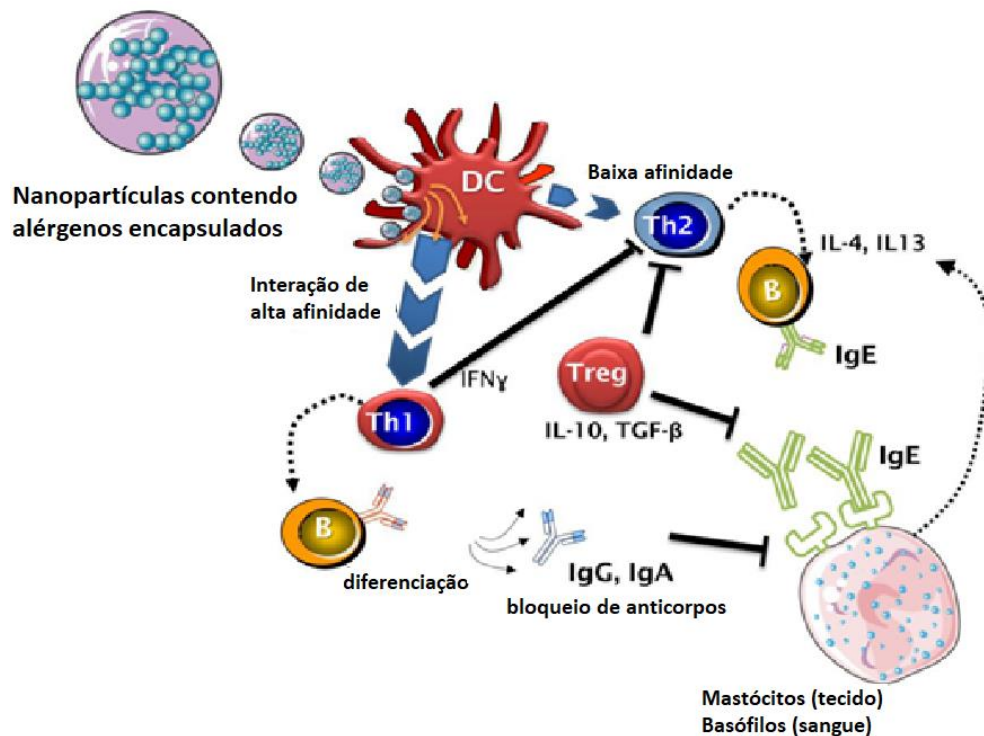
- (i) Proteção contra hidrólise e/ou degradação enzimática;
- (ii) Propriedades de liberação controlada de alérgenos;
- (iii) Co-encapsulação de alérgenos e imunopotenciadores (LPS);
- (iv) O aumento da biodisponibilidade;
- (v) A redução de efeitos adversos e toxicidade.
- (vi) Atuam como adjuvantes, sendo capazes de modular a resposta imune.

Sabe-se que as propriedades das nanopartículas como tamanho, carga de superfície, hidrofobicidade/hidrofilicidade e efeitos estéreis do revestimento de partículas pode determinar

sua compatibilidade com o sistema imunológico (SOUZA REBOUÇAS, DE et al., 2012). Além disso, as nanopartículas também podem ser projetadas para provocarem uma resposta imune, quer por imunoestimulação direta de células apresentadoras de antígenos quanto por fornecimento de antígenos a compartimentos celulares específicos (KALKANIDIS et al., 2006). Para alcançar o efeito terapêutico desejado, é importante, selecionar o polímero certo para ser usado como agente encapsulador, uma vez que sua natureza influencia significativamente o tamanho e o perfil de liberação das nanopartículas (CRAPARO; BONDI, 2012).

As propriedades adjuvantes das nanopartículas poliméricas ocorrem através de diferentes mecanismos: efeito de depósito, recrutamento de células apresentadoras de antígenos (APCs) e modulação do sistema imunológico (Figura 5). A formação de depósito aprisiona os alérgenos e permite sua lenta liberação a partir da matriz polimérica. A maior permanência do antígeno no organismo aumenta o recrutamento de células apresentadoras de antígeno maduras para o local da administração, desencadeando uma resposta inflamatória prolongada, seguida por recrutamento de células competentes do sistema imunológico inato e adaptativo (REBOUÇAS et al., 2012; GAMAZO et al., 2017). Neste sentido, na última década, uma grande variedade de polímeros vem sendo empregada na fabricação de nanopartículas para a encapsulação de proteínas alergênicas (SOUZA REBOUÇAS, DE et al., 2012).

Figura 5. Mecanismos imunológicos da imunoterapia alérgênica com base no uso de nanopartículas carreadoras de alérgenos.



Fonte: Modificada de (GAMAZO et al., 2017).

5.2.4.2. Nanovacinas

As nanopartículas vêm sendo exploradas com sucesso a fim de criar novas gerações de medicamentos profiláticos versáteis e potentes, com o objetivo de fornecer proteção a curto ou longo prazo (GAMAZO et al., 2017). Quando utilizadas como estimulantes imunes inatos, e capaz de fornecer proteção a curto prazo contra a transmissão de patógenos, em caso de exposição potencial conhecida, isto é, no trato reprodutivo feminino (CU; SALTZMAN, 2009; HAM et al., 2009). Para proteção a longo prazo, estratégias de vacinação podem ser seguidas visando induzir respostas de memória imunológica para prevenir infecções ou desenvolvimento de tumores. Para gerar imunidade celular, a apresentação do antígeno no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I ganha importância e a natureza particulada das nanopartículas possui propriedades que são capazes de facilitar a apresentação do antígeno. Vários métodos foram explorados a fim de aprimorar a apresentação do antígeno mediada por nanopartículas (KWON et al., 2005; FLANARY et al., 2009). O direcionamento de nanopartículas de forma específica a populações de células dendríticas especializadas pode ser

realizado através dos mecanismos de captura natural destes sistemas, isto é, por endocitose ou pinocitose, ou até pelo desenvolvimento de nanopartículas com modificações na sua superfície, tais como anticorpos, polissacarídeos, péptidos e fármacos, que permitem um reconhecimento específico por receptores de superfície celular presentes nas células dendríticas (REDDY et al., 2006; KLIPPSTEIN; POZO, 2010).

Shen e colaboradores mostraram que as nanopartículas PLGA melhoraram a apresentação e liberação de ovalbumina (OVA) pela classe MHC I, quando comparado ao antígeno solúvel (SHEN et al., 2006). Baba e colaboradores desenvolveram nanopartículas de g-PGA biodegradáveis com a subunidade p24 do capsídeo de HIV encapsuladas a fim de aumentar as respostas imunes celulares em uma vacina contra o HIV, provocando uma melhor resposta das células T, quando comparadas a um adjuvante conhecido e potente, como adjuvante completo de Freund (CFA) (WANG et al., 2007; BOBEK et al., 2010). Da mesma forma, a imunização intranasal de camundongos com nanopartículas de g-PGA que encapsulam a proteína de envenenamento de HIV gp120 induziu respostas de células T de efector e memória CD8 específicas de antígeno (WANG et al., 2007). Para superar a estratégia de evasão imunológica da variabilidade antigênica, as nanopartículas podem ser produzidas para vacinar com uma combinação de múltiplos antígenos, utilizando uma vacina multivalente. Uma vacina multi-antigénica do HIV foi realizada a partir da adsorção de proteínas do HIV-1 p24 e gp120 na superfície das nanopartículas de PLA que, após a administração em camundongos, induziram altos títulos de anticorpos contra ambos os antígenos (ATAMAN-ÖNAL et al., 2006; LAMALLE-BERNARD et al., 2006). Sabe-se que o uso de nanomateriais pode facilitar a administração de genes intracelulares, além de melhorar a apresentação do antígeno no MHC de classe I (CRAPARO; BONDÌ, 2012).

Broos e colaboradores descreveram o potencial das nanopartículas de g-PGA como potentes sistemas de libertação de alérgenos para células dendríticas humanas. Foi demonstrado que estas partículas foram internalizadas eficientemente por células dendríticas derivadas de monócitos imaturos e estimulam fortemente a produção de quimiocinas, bem como interleucinas (BROOS et al., 2010). Recentemente, Scholl e colaboradores descreveram a otimização da formulação de alérgenos parenterais através do uso de nanopartículas PLGA, sugerindo que essas partículas podem ser ferramentas úteis para a terapia de alergia tipo I. Em particular, o alérgeno do pólen de videiro (Bet v 1) foi encapsulado em nanopartículas de PLGA alteração na sua antigenicidade. Além disso, resultados demonstraram que a aplicação

subcutânea das nanopartículas contendo Bet v 1 encapsulado tende a modificar a resposta imune em direção a uma resposta do tipo Th1 em camundongos alérgicos (reduzindo o predomínio da resposta Th2) e, não desencadeou a formação de granulomas em camundongos e em voluntários humanos (SCHÖLL et al., 2004, 2006). Outros autores relataram resultados obtidos com nanopartículas produzidas com polianidridos, tais como o copolímero obtido entre metil vinil éter e anidrido maléico (PVM/MA) (ARBÓS et al., 2002; GÓMEZ et al., 2009; CAMACHO et al., 2013; S. REBOUÇAS, DE et al., 2014; BROTONS-CANTO et al., 2017).

5.2.4.2.1. *Polímeros*

5.2.4.2.1.1. Poliésteres

Poliéster é uma categoria de polímeros que contém o grupo funcional éster na sua cadeia principal. Os polímeros de poliésteres são os mais utilizados como sistemas de administração de fármacos e atraíram considerável atenção como devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (SOPPIMATH et al., 2001; WASHINGTON et al., 2017).

Para fins de vacinação, os poliésteres, como o PLA e o PLGA (de peso molecular variável) foram os materiais mais populares para a preparação de nanopartículas. Devido à sua bem documentada biocompatibilidade, segurança e biodegradabilidade, estes polímeros são aprovados pela FDA para várias aplicações clínicas em seres humanos (LA FUENTE, DE et al., 2008). Apesar do seu interesse como adjuvantes nanoparticulados e sistemas de liberação controlada para imunoterapia, o uso destes polímeros como carreadores de peptídeos ou proteína pode afetar negativamente a estabilidade do composto carregado devido ao mecanismo de degradação em massa do polímero e aos produtos obtidos pela degradação ácida. Outra limitação desse polímero é a sua insuficiente estabilidade e capacidade de penetração na administração mucosa (GREGORY et al., 2013).

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster biocompatível, biodegradável, semicristalino que pode ser utilizado para a formulação de nanopartículas (IRACHE et al., 2011). Devido à semicristalinidade e à hidrofobicidade, a degradação *in vivo* do PCL é muito mais lenta do que o PLGA, tornando-o mais adequado para sistemas de entrega a longo prazo, que se estendem ao longo de mais de um ano. Além disso, as partículas de PCL, ao contrário das poliláticas, não geram um ambiente ácido que possa afetar negativamente a antigenicidade dos antígenos ou alérgenos encapsulados. No entanto, a maioria dos estudos PCL encontrados no campo de imunoterapia foram realizados utilizando micropartículas/microesferas de PCL. Estudos que

utilizam este polímero como nanopartículas para imunoterapia com alérgenos não foram encontrados e tem sido pouco utilizado como sistema de liberação controlada para o desenvolvimento de vacinas (SINHA et al., 2004; FLORINDO et al., 2008, 2009).

Os poliésteres, como o PLGA (ácido poli láctico-co-glicólico) e o PLA (poli ácido láctico), aprovados pelo Órgão de administração de alimentos (FDA) para uso humano em diferentes aplicações clínicas, vêm sendo utilizados para a encapsulação de alérgenos (PÉAN et al., 1998; SCHÖLL et al., 2006; FECZKÓ et al., 2011; FAIRLEY et al., 2013). Schöll e colaboradores descreveram a preparação de nanopartículas de PLGA contendo Bet v 1 (principal alérgeno do pólen) e demonstraram uma redução na resposta alérgica Th2 em camundongos (BALB/c) que receberam os alérgenos encapsulados nas nanopartículas (SCHÖLL et al., 2004). Além disso, o PLGA também é utilizado na obtenção de micropartículas para a encapsulação de alérgenos. Batanero e colaboradores empregaram micropartículas de PLGA contendo Ole e 1 (principal alérgeno do pólen de oliveira, *Olea europaea* L.) no desenvolvimento de uma vacina alérgeno específica (BATANERO et al., 2002). Além disso, outros trabalhos demonstraram que a modificação da superfície das nanopartículas de PLGA e PLA, principalmente através da associação com PEG (poli etileno-glicol), é capaz de aumentar a potência vacinal, já que aumenta o seu tempo de permanência no organismo, favorecendo a indução de respostas imunitárias protetoras (VILA et al., 2002, 2004, 2005; BHARALI et al., 2008).

Outros poliésteres, como a PCL (Poli- ϵ -caprolactona), podem ser utilizados na preparação de sistemas carreadores de antígenos e proteínas para o desenvolvimento de vacinas (JESUS et al., 2016). O PCL é um polímero biodegradável e biocompatível, que apresenta degradação in vivo consideravelmente mais lenta que o PLGA. Além disso, partículas de PCL, ao contrário dos poliláticos, não geram acidificação do meio, favorecendo a conservação da antigenicidade dos antígenos e proteínas encapsulados (SINHA et al., 2004; GARG et al., 2017). Estudos anteriores obtiveram resultados satisfatórios empregando nanoesferas de PCL recobertas com polímeros mucoadesivos (alginato e quitosana) como adjuvante de antígenos (*S. equi*) (FLORINDO et al., 2009), o que sugere que as nanopartículas de PCL também possuem um amplo potencial para imunoterapia alérgica.

5.2.4.2.1.2. Polissacarídeos

O polissacarídeo mais utilizado para a administração de vacinas orais é a quitosana, poli (D-glucosamina). A quitosana é solúvel em soluções ácidas fracas, resultando na formação de um polímero catiônico com alta densidade de carga e, portanto, pode formar complexos de polieletrólitos com uma grande variedade de polímeros aniônicos (SOPPIMATH et al., 2001). Além disso, devido à presença de grupos amino altamente reativos ao longo de sua estrutura, a quitosana é susceptível à funcionalização química ou biológica e a preparação de nanopartículas de quitosana pode ser facilmente feita sem o uso de solventes orgânicos, o que é interessante para manter a imunogenicidade dos antígenos (ILLUM et al., 2001; JAYAKUMAR et al., 2007). A quitosana possui outras propriedades vantajosas tais como: baixos custos de produção, biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade que, juntamente com sua capacidade de aumentar a penetração de macromoléculas nas barreiras intestinais e nasais, a tornam uma candidata adequada para o desenvolvimento de formulações de vacinas mucosas. No entanto, apesar de todas as vantagens descritas, este polímero possui uma limitação importante: sua baixa solubilidade em pH fisiológico e, portanto, perde sua capacidade de aumentar a permeabilidade e a absorção de compostos bioativos (LUBBEN, VAN DER et al., 2001).

5.2.4.2.1.3. Polianidridos

Em contraste com as nanopartículas de ácidos polilácticos, os produtos de degradação dos polianidridos são não citotóxicos além de serem menos ácidos que os de poliésteres, o que pode melhorar a estabilidade do antígeno encapsulado (MALLAPRAGADA; NARASIMHAN, 2008). Os copolímeros de éter metilvinílico e anidrido maleico (PVM/MA) são um bom exemplo. Devido à presença de grupos de anidrido reativos que não necessitam de ativação química, este copolímero permite a produção prática de nanopartículas através do método de deslocamento de solvente. Além disso, estudos recentes concluíram que nanopartículas de polianidrido preparadas com uma quantidade reduzida de solvente orgânico (acetona) facilita a encapsulação de antígenos (VANDAMME et al., 2011). Uma das propriedades mais importantes das nanopartículas de polianidrido é a capacidade de desenvolver fortes interações bioadesivas com componentes da mucosa intestinal (SALMAN et al., 2008). Além disso, a sua superfície pode ser facilmente modificada por incubação simples com excipientes ou ligantes diferentes, a fim de melhorar a sua distribuição *in vivo* e até mesmo aumentar a sua afinidade pela mucosa intestinal (YONCHEVA et al., 2005). Isso faz das nanopartículas de polianidrido boas candidatas para tratamentos de imunoterapia oral, que dispõem de muitas vantagens evidentes (conformidade do paciente, via mais segura, rota menos dispendiosa etc.).

Os polianidridos e seus copolímeros também vêm sendo amplamente estudados para o desenvolvimento de vacinas para alergias. Dentre eles, o polianidrido maleico (PVM/MA), comercializado como Gantrez® AN 119 (ISP, Barcelona, Espanha), é um copolímero que tem sido amplamente utilizado para a encapsulação de fármacos, antígenos bacterianos e alérgenos. O PVM/MA é um polímero biocompatível e de baixo custo, que permite a preparação de nanopartículas através do método do deslocamento do dissolvente (precipitação), com resultados reproduzíveis e homogêneos. Além disso, apresenta uma baixa toxicidade oral ($DL50 > 2\text{g/Kg}$ (OJER et al., 2012)). Devido à extrema reatividade do PMV/MA, devido a seus grupos anidridos, permite que fármacos antitumorais (AGÜEROS et al., 2010), antígenos bacterianos (OCHOA et al., 2007; CAMACHO; COSTA MARTINS, DA; et al., 2011) e alérgenos protéicos (GÓMEZ et al., 2006, 2009) sejam satisfatoriamente encapsulados. Além disso, as características estruturais do PVM/MA favorecem interações bioadesivas ao longo do trato gastrointestinal, que podem ser incrementadas através do revestimento das nanopartículas com diferentes ligandos de superfície (ARBÓS et al., 2002). De fato, estudos prévios demonstraram que, quando administradas por via oral, as nanopartículas de polianidrido se aderem às placas de *Peyer* presentes no intestino, confirmando o seu potencial como veículo para administração de moléculas através de mucosas (oral, nasal e conjuntival) (ARBÓS et al., 2003; SALMAN et al., 2005, 2008).

Por outro lado, as nanopartículas de PMV/MA apresentam propriedades imunomoduladoras, que são diretamente influenciadas pelo método de preparação (liofilização ou spray-dryer) (REBOUÇAS et al., 2012). Além de induzir a resposta humoral, estas nanopartículas demonstraram ser capazes de ativar a imunidade inata através da ativação do sistema complemento (CAMACHO; SOUZA, DE; et al., 2011) e de receptores toll-like (TLR) (TAMAYO et al., 2010), etapas essenciais para a indução de respostas imunitárias eficazes.

Estudos prévios descreveram a encapsulação de alérgenos alimentares em nanopartículas de polianidrido. Gómez e colaboradores demonstraram um aumento na produção de anticorpos IgG1 e IgG2a (marcadores Th2 e Th1, respectivamente) depois da administração oral de nanopartículas de Gantrez® contendo ovalbumina (OVA, principal alérgeno do ovo) e recobertas com lipopolissacarídeo de *B. ovis* (GÓMEZ et al., 2006). Além disso, os autores provaram que a incorporação da OVA nas nanopartículas é capaz de proteger do choque anafilático animais (BALB/c) previamente sensibilizados. Recentemente, os alérgenos do amendoim (*A. hypogaea*) foram encapsulados em nanopartículas de polianidrido e, quando

administrados em camundongos (C57Bl/6J) por via intradérmica, foram capazes de exercer efeitos imunomoduladores e adjuvantes (REBOUÇAS et al., 2012; S. REBOUÇAS, DE et al., 2014). Adicionalmente, os autores também conseguiram reduzir os sinais e sintomas de anafilaxia em um modelo animal de alergia a amendoim (SUN et al., 2007; BROTONS-CANTO et al., 2017).

5.2.4.2.1.4. Zeína

A zeína é o produto proteico mais abundante extraído das sementes de milho. Ela foi investigada pelo seu potencial uso como excipiente farmacêutico, bem como um biomaterial em engenharia de tecidos. Além disso, sendo de origem natural, é classificado como um dos excipientes mais seguros pelo órgão que regulamenta o uso de alimentos e fármacos nos Estados Unidos (FDA) (GEORGET et al., 2008).

As propriedades da zeína, determinadas pela sua estrutura, variam amplamente dependendo da fração protéica, processamento, condições ambientais, modificações químicas e grau de degradação (IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO, 2017). Atualmente, a zeína é usada em comprimidos e revestimentos farmacêuticos e é considerada a mais promissora para aplicações em embalagens e revestimentos comestíveis e biodegradáveis, além de aplicações biomédicas. Ela mostrou um grande potencial no campo da nanotecnologia farmacêutica, pois possui potencial para uma ampla gama de possíveis modificações, excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (BARTKOWIAK et al., 2017).

Vários estudos descreveram que a zeína apresenta uma característica promissora de liberação controlada de fármacos (PENALVA et al., 2015, 2017; MORENO et al., 2017), pois foi visto que, quando administrada oralmente, ela exibe um longo tempo de permanência no intestino, devido à sua resistência às enzimas digestivas (PATEL; VELIKOV, 2014; LEE et al., 2016), além da ausência de efeitos tóxicos (MORENO et al., 2017). A zeína já começou a despertar interesse por seu potencial adjuvante, uma vez que microesferas de zeína exibiram um potencial imunogênico, sendo uma ferramenta útil para a terapia com vacinas (HURTADO-LÓPEZ; MURDAN, 2006; HOFBAUER et al., 2016).

Hurtado-Lopez e Murdan realizaram uma série de estudos que investigaram o potencial da zeína como portador de drogas e vacinas. Eles primeiro caracterizaram amplamente os efeitos da proporção de zeína em albumina, a proporção de estabilizadores e a concentração de hidróxido de sódio, pois esses fatores tiveram o maior impacto no tamanho das partículas e no

grau de formação das partículas. A evidência do potencial da modulação da propriedade da partícula, a liberação por erosão lenta e a manutenção da integridade da albumina encapsulada levaram a estudos subseqüentes que investigaram a degradação, adjuvanticidade e imunogenicidade dessas partículas. Estudos de degradação na ausência de enzimas explicaram a liberação lenta de ovalbumina anteriormente observada em PBS, pois a zeína era muito resistente à degradação; no entanto, na presença de pepsina e pancreatina, sua degradação foi mais acelerada. As nanopartículas brancas e contendo ovalbumina encapsuladas foram administradas por via intramuscular e oral. Os anticorpos de séricos dos camundongos imunizados com partículas vazias indicaram que a zeína provocou a produção de anticorpos anti-zeína (HURTADO-LÓPEZ; MURDAN, 2006).

Desta forma, as nanopartículas de zeína são opções seguras e sistemas de liberação controlada por via oral para uma variedade de compostos, de ingredientes alimentares e nutracêuticos. Suas propriedades mucoadesivas, seu caráter hidrofóbico, bem como a sua resistência relativa às enzimas digestivas, pode ser exploradas com sucesso para estratégias de liberação controlada.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo desenvolver dois tipos de formulações de nanopartículas poliméricas para a encapsulação de alérgenos da castanha de caju, e avaliar o potencial imunogênico destas formulações. Como polímeros escolhidos, utilizamos o polianidrido, polímero sintético biodegradável, bioadesivo e amplamente utilizado em vacinas para imunoterapia antialérgica; e a zeína, polímero de origem natural, extraído do milho, que possui características imunogênicas previamente relatadas.

REFERÊNCIAS

AGACHE, I.; AKDIS, C. A. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. **Allergology International**, v. 65, n. 3, p. 243–252, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.alit.2016.04.011>>. .

AGÜEROS, M.; ZABALETA, V.; ESPUELAS, S.; CAMPANERO, M. A.; IRACHE, J. M. Increased oral bioavailability of paclitaxel by its encapsulation through complex formation with cyclodextrins in poly(anhydride) nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 1, p. 2–8, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.012>>. .

AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 4, p. 735–746, 2009.

AKDIS, M.; AAB, A.; ALTUNBULAKLI, C.; et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 4, p. 984–1010, 2016.

ALVARADO IZQUIERDO, M. I.; PEREZ, M. Study of food allergy on Spanish population. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 34, n. 5, p. 185–193, 2006. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L44875055%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1157/13094025%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASSE&issn=03010546&id=doi:10.1157/13094025&atitle=Study+of+food+allergy+on+Spanish+population&st>>. .

AMIN, H. S.; LISS, G. M.; BERNSTEIN, D. I. Evaluation of near-fatal reactions to allergen immunotherapy injections. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 1, p. 169–175, 2006.

ANDERSON, T. J.; LAMSA, B. P. Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: A review. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 159–173, 2011.

ARAGON, A.; IMANI, R.; BLACKBURN, V. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 1, p. 57–65, 2009. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685108002594>>. .

ARBÓS, P.; CAMPANERO, M. A.; ARANGO, M. A.; RENEDO, M. J.; IRACHE, J. M. Influence of the surface characteristics of PVM/MA nanoparticles on their bioadhesive properties. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 1, p. 19–30, 2003.

ARBÓS, P.; WIRTH, M.; ARANGO, M. A.; GABOR, F.; IRACHE, J. M. Gantrez AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates. **Journal of Controlled Release**, v. 83, n. 3, p. 321–330, 2002.

ATAMAN-ÖNAL, Y.; MUNIER, S.; GANÉE, A.; et al. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. **Journal of Controlled Release**, v. 112, n. 2, p. 175–185, 2006.

AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of action of adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAY, p. 1–10, 2013.

AWWAD, S.; AHMED, A.; SHARMA, G.; et al. ‘**Principles of Pharmacology in the Eye.**’ 2017.

AZAM-ALI, S.; JUDGE, E. Small-scale cashew nut processing. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, , n. Schumacher Centre for Technology and Development, p. 1–70, 2001. Disponível em: <http://www.anacardium.info/IMG/pdf/Small-scale_Cashew_Nut_Processing_-_FAO_2001.pdf>. .

BALDACARA, R. P. DE C.; FERNANDES, M. DE F. M.; BALDACARA, L.; et al. Prevalence of allergen sensitization, most important allergens and factors associated with atopy in children. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 131, n. 5, p. 301–308, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802013000500301&lng=en&tlng=en>. .

BARRE, A.; SORDET, C.; CULERRIER, R.; et al. Vicilin allergens of peanut and tree nuts (walnut, hazelnut and cashew nut) share structurally related IgE-binding epitopes. **Molecular immunology**, v. 45, n. 5, p. 1231–40, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589007007687>>. Acesso em: 22/3/2016.

BARTKOWIAK, A.; SOBECKA, K.; KRUDOS, A. Tailor-made novel polymers for hydrogel encapsulation processes. **New Polymers for Encapsulation of Nutraceutical Compounds**, p.1–34, 2017. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9781119227625.ch1>>. .

BARTNIKAS, L. M.; SHEEHAN, W. J.; LARABEE, K. S.; et al. Ovomucoid is not superior to egg white testing in predicting tolerance to baked egg. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 1, n. 4, p. 354–360, 2013.

BATANERO, E.; BARRAL, P.; VILLALBA, M.; RODRÍGUEZ, R. Biodegradable poly (DL-lactide glycolide) microparticles as a vehicle for allergen-specific vaccines: A study performed with Ole e 1, the main allergen of olive pollen. **Journal of Immunological Methods**, v. 259, n. 1–2, p. 87–94, 2002.

BERNSTEIN, D. I.; EPSTEIN, T.; MURPHY-BERENDTS, K.; LISS, G. M. Surveillance of systemic reactions to subcutaneous immunotherapy injections: year 1 outcomes of the ACAAI and AAAAI Collaborative Study. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 104, n. 6, p. 530–535, 2010. Ann. Allergy Asthma Immunol. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2010.04.008>>. .

BHARALI, D. J.; PRADHAN, V.; ELKIN, G.; et al. Novel nanoparticles for the delivery of recombinant hepatitis B vaccine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 4, n. 4, p. 311–317, 2008. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2008.05.006>>. .

BOBEK, V.; KOLOSTOVA, K.; PINTEROVA, D.; et al. A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 4799–4804, 2010.

BODE, C.; ZHAO, G.; STEINHAGEN, F.; KINJO, T.; KLINMAN, D. M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 499–511, 2011.

BOYCE, J. A.; ASSA'AD, A.; BURKS, A. W.; et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, n. 6 0, p. S1-58, 2010.

BOYE, J. I. Food allergies in developing and emerging economies: need for comprehensive data on prevalence rates. **Clinical and Translational Allergy**, v. 2, n. 1, p. 25, 2012. Clinical

and Translational Allergy. Disponível em:

<<http://ctajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-7022-2-25>>. .

BRAMWELL, V. W.; PERRIE, Y. Particulate delivery systems for vaccines: what can we expect? **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 6, p. 717–728, 2006. England.

BREHLER, R. Adjuvanzien. **Der Hautarzt**, v. 68, n. 4, p. 292–296, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00105-017-3935-2>>. .

BROOS, S.; LUNDBERG, K.; AKAGI, T.; et al. Immunomodulatory nanoparticles as adjuvants and allergen-delivery system to human dendritic cells: Implications for specific immunotherapy. **Vaccine**, v. 28, n. 31, p. 5075–5085, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.004>>. .

BROTONS-CANTO, A.; GAMAZO, C.; MARTÍN-ARBELLA, N.; et al. Evaluation of nanoparticles as oral vehicles for immunotherapy against experimental peanut allergy. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.109>>. .

BURKS, A. W.; JONES, S. M.; WOOD, R. A.; et al. Oral Immunotherapy for Treatment of Egg Allergy in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 3, p. 233–243, 2012. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1200435>>. .

CABRERA, C. M.; URRÁ, J. M. Food allergy and the oral immunotherapy approach. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 63, n. 1, p. 31–39, 2015.

CAMACHO, A. I.; COSTA MARTINS, R. DA; TAMAYO, I.; et al. Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as innate immune system activators. **Vaccine**, v. 29, n. 41, p. 7130–7135, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.072>>. .

CAMACHO, A. I.; IRACHE, J. M.; SOUZA, J. DE; SÁNCHEZ-GÓMEZ, S.; GAMAZO, C. Nanoparticle-based vaccine for mucosal protection against *Shigella flexneri* in mice. **Vaccine**, v. 31, n. 32, p. 3288–3294, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.020>>. .

CAMACHO, A. I.; SOUZA, J. DE; SÁNCHEZ-GÓMEZ, S.; et al. Mucosal immunization

with *Shigella flexneri* outer membrane vesicles induced protection in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 46, p. 8222–8229, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.121>>. .

CDC. General Recommendations on Immunization - Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Centers for Disease Control and Prevention. **Mmwr**, v. 60, n. 2, 2011. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6002.pdf>>. .

CHESNÉ, J.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; ESSER VON-BIEREN, J. The Use of Adjuvants for Enhancing Allergen Immunotherapy Efficacy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 125–145, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.iac.2015.08.009>>. .

CLARK, A. T.; ANAGNOSTOU, K.; EWAN, P. W. Cashew nut causes more severe reactions than peanut: Case-matched comparison in 141 children. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 62, n. 8, p. 913–916, 2007.

COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: Putting inna immunity to work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 492–503, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>>. .

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 19, n. 2, p. 99–134, 2002. United States.

CRAMERI, R.; RHYNER, C. Novel vaccines and adjuvants for allergen-specific immunotherapy. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 761–768, 2006.

CRAPARO, E. F.; BONDI, M. L. Application of polymeric nanoparticles in immunotherapy. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 12, n. 6, p. 658–664, 2012. United States.

CRAPARO, E. F.; BONDI, M. L. Application of polymeric nanoparticles in immunotherapy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 12, n. 6, p. 658–664, 2012.

CU, Y.; SALTZMAN, W. M. Controlled Surface Modification with Poly(Ethylene)Glycol Enhance Diffusion of PLGA Nanoparticles in Human Cervical Mucus. **Molecular pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 173–81, 2009. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2637413&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

DACOBÁ, T. G.; OLIVERA, A.; TORRES, D.; CRECENTE-CAMPO, J.; ALONSO, M. J. Modulating the immune system through nanotechnology. **Seminars in Immunology**, v. 34, n. Supplement C, p. 78–102, 2017. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532317300362>>. .

DAVOREN, M.; PEAKE, J. Cashew nut allergy is associated with a high risk of anaphylaxis. **Archives of disease in childhood**, v. 90, n. 10, p. 1084–1085, 2005.

DHAMI, S.; NURMATOV, U.; PAJNO, G. B.; et al. Allergen immunotherapy for IgE-mediated food allergy: protocol for a systematic review. **Clinical and Translational Allergy**, v. 6, n. 1, p. 24, 2016. BioMed Central. Disponível em:

<<http://ctajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13601-016-0113-z>>. .

DIDIERLAURENT, A. M.; MOREL, S.; LOCKMAN, L.; et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6186–6197, 2009. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0901474>>. .

DONG, C.; FLAVELL, R. A. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. **Arthritis research**, v. 2, n. 3, p. 179–188, 2000. Disponível em:

<<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11094427&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1186/ar85>>. .

DUSCHL, A. Nanoparticles and Allergy. In: D. Boraschi; A. Duschl (Eds.); **Nanoparticles and the Immune System: Safety and Effects**. 1st Editio ed., p.55–68, 2013. Cambridge, Massachusetts, EUA: Academic Press.

EBISAWA, M.; BROSTEDT, P.; SJÖLANDER, S.; et al. Gly m 2S albumin is a major allergen with a high diagnostic value in soybean-allergic children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 4, 2013.

EGE, M. J.; BIELI, C.; FREI, R.; et al. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 4, p. 817–823, 2006.

- EXLEY, C. Aluminium adjuvants and adverse events in sub-cutaneous allergy immunotherapy. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 2014.
- FAIRLEY, S. J.; SINGH, S. R.; YILMA, A. N.; et al. Chlamydia trachomatis recombinant MOMP encapsulated in PLGA nanoparticles triggers primarily T helper 1 cellular and antibody immune responses in mice: A desirable candidate nanovaccine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2085–2099, 2013.
- FECZKÓ, T.; TÓTH, J.; DÓSA, G.; GYENIS, J. Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 50, n. 8, p. 757–765, 2011.
- FERNANDEZ, C.; FIANDOR, A.; MARTINEZ-GARATE, A.; QUESADA, J. M. Allergy to pistachio: crossre activity between pistachio nut and other Anacardiaceae. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 25, n. 12, p. 1254–1259, 1995. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.1995.tb03050.x>>. .
- FLANARY, S.; HOFFMAN, A. S.; STAYTON, P. S. Antigen delivery with poly(propylacrylic acid) conjugation enhances MHC-1 presentation and T-Cell activation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 241–248, 2009.
- FLEISCHER, D. M.; SPERGEL, J. M.; ASSA'AD, A. H.; PONGRACIC, J. A. Primary prevention of allergic disease through nutritional interventions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 1, n. 1, p. 29–36, 2013. United States.
- FLOHR, C.; TUYEN, L. N.; LEWIS, S.; et al. Poor sanitation and helminth infection protect against skin sensitization in Vietnamese children: A cross-sectional study. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 6, p. 1305–1311, 2006.
- FLORINDO, H. F.; PANDIT, S.; GONÇALVES, L. M. D.; ALPAR, H. O.; ALMEIDA, A. J. Streptococcus equi antigens adsorbed onto surface modified poly-ε-caprolactone microspheres induce humoral and cellular specific immune responses. **Vaccine**, v. 26, n. 33, p. 4168–4177, 2008.
- FLORINDO, H. F.; PANDIT, S.; LACERDA, L.; et al. The enhancement of the immune response against S. equi antigens through the intranasal administration of poly-ε-caprolactone-based nanoparticles. **Biomaterials**, v. 30, n. 5, p. 879–891, 2009.

FOX, C. B.; HAENSLER, J. An update on safety and immunogenicity of vaccines containing emulsion-based adjuvants. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 7, p. 747–758, 2013.

FRANCIS, J. N.; DURHAM, S. R. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 4, n. 6, p. 543–8, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640697>>. .

GAGETE, E.; DELAZARI DOS SANTOS, L.; GOMES DE PONTES, L.; MORATO CASTRO, F. Who has anaphylaxis in Brazil? Validation of a questionnaire for population studies. **World Allergy Organization Journal**, v. 10, n. 1, p. 40, 2017. World Allergy Organization Journal. Disponível em: <<https://waojournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40413-017-0171-2>>. .

GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 693–704, 2013.

GAMAZO, C.; BUSSMANN, H.; GIEMSA, S.; et al. Interactions of poly (anhydride) nanoparticles with macrophages in light of their vaccine adjuvant properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 922–930, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.030>>. .

GAMAZO, C.; D'AMELIO, C.; GASTAMINZA, G.; FERRER, M.; IRACHE, J. M. Adjuvants for allergy immunotherapeutics. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 13, n. 10, p. 2416–2427, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28825867>%0Ahttps://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2017.1348447>. .

GARCIA, F.; MONEO, I.; FERNANDEZ, B.; et al. Allergy to Anacardiaceae: description of cashew and pistachio nut allergens. **Journal of investigational allergology & clinical immunology**, v. 10, n. 3, p. 173–177, 2000. Spain.

GARG, S. M.; VAKILI, M. R.; MOLAVI, O.; LAVASANIFAR, A. Self-Associating Poly(ethylene oxide)-block-poly(α -carboxyl- ϵ -caprolactone) Drug Conjugates for the Delivery of STAT3 Inhibitor JSI-124: Potential Application in Cancer Immunotherapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p. 2570–2584, 2017.

GEORGET, D. M. R.; BARKER, S. A.; BELTON, P. S. A study on maize proteins as a potential new tablet excipient. **European Journal of Pharmaceutics and**

Biopharmaceutics, v. 69, n. 2, p. 718–726, 2008.

GLENNY, A. T.; POPE, C. G. the Precipitation of Diphtheria Toxoid By Potash Alum . **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 29, p. 31–40, 1926.

GÓMEZ, S.; GAMAZO, C.; SAN ROMAN, B.; et al. Development of a novel vaccine delivery system based on Gantrez nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 6, n. 9–10, p. 3283–9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17048548>>. .

GÓMEZ, S.; GAMAZO, C.; SAN ROMAN, B.; et al. A novel nanoparticulate adjuvant for immunotherapy with *Lolium perenne*. **Journal of Immunological Methods**, v. 348, n. 1–2, p. 1–8, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.005>>. .

GONÇALVES, L. C. P.; GUIMARÃES, T. C. P.; SILVA, R. M.; et al. Prevalence of food allergy in infants and pre-schoolers in Brazil. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 44, n. 6, p. 497–503, 2016.

GREGORY, A. E.; TITBALL, R.; WILLIAMSON, D. Vaccine delivery using nanoparticles. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. March, p. 13, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3607064&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

GUPTA, R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 32, n. 3, p. 155–172, 1998.

GUPTA, R. S.; SPRINGSTON, E. E.; WARRIER, M. R.; et al. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. **Pediatrics**, v. 128, n. 1, p. e9–e17, 2011.

GUY, B. The perfect mix: Recent progress in adjuvant research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 505–517, 2007.

HAM, A. S.; COST, M. R.; SASSI, A. B.; DEZZUTTI, C. S.; ROHAN, L. C. Targeted delivery of PSC-RANTES for HIV-1 prevention using biodegradable nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 3, p. 502–511, 2009.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2

Immunity. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 29–40, 2015. Elsevier Inc. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.007>>. .

HASEGAWA, M.; INOMATA, N.; YAMAZAKI, H.; et al. Clinical features of four cases with cashew nut allergy and cross-reactivity between cashew nut and pistachio. **Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 58, n. 2, p. 209–15, 2009a. Elsevier Masson SAS. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19240380>>. .

HASEGAWA, M.; INOMATA, N.; YAMAZAKI, H.; et al. Clinical features of four cases with cashew nut allergy and cross-reactivity between cashew nut and pistachio. **Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 58, n. 2, p. 209–15, 2009b. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1323893015306997>>. Acesso em: 22/3/2016.

HOFBAUER, A.; MELNIK, S.; TSCHOFEN, M.; et al. The Encapsulation of Hemagglutinin in Protein Bodies Achieves a Stronger Immune Response in Mice than the Soluble Antigen.

Frontiers in Plant Science, v. 7, n. February, p. 1–9, 2016. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00142/abstract>>. .

HOGENESCH, H. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants.

Frontiers in Immunology, v. 3, n. JAN, p. 1–14, 2012.

HULEATT, J. W.; JACOBS, A. R.; TANG, J.; et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity.

Vaccine, v. 25, n. 4, p. 763–775, 2007.

HURTADO-LÓPEZ, P.; MURDAN, S. An investigation into the adjuvanticity and immunogenicity of zein microspheres being researched as drug and vaccine carriers. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, p. 769–774, 2006.

HWANG, J.; IM, C. Immune Disorders and Its Correlation with Gut Microbiome. , v. 12, n. 4, 2012.

ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; FISHER, A. N.; DAVIS, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced drug delivery reviews**, v. 51, n. 1–3, p. 81–96, 2001. Netherlands.

IRACHE, J. M.; ESPARZA, I.; GAMAZO, C.; AGÜEROS, M.; ESPUELAS, S. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1, p. 47–71, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711003815>>. .

IRACHE, J. M.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Zein nanoparticles as vehicles for oral delivery purposes. **Nanomedicine**, v. 12, n. 11, p. 1209–1211, 2017. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm-2017-0075>>. .

IRACHE, J. M.; HUICI, M.; KONECNY, M.; et al. Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. **Molecules**, v. 10, n. 1, p. 126–145, 2005.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology**. 2001.

JAYAKUMAR, R.; NWE, N.; TOKURA, S.; TAMURA, H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 3, p. 175–181, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813006002029>>. .

JENSEN-JAROLIM, E. Aluminium in Allergies and Allergen immunotherapy. **World Allergy Organization Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://waojournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40413-015-0060-5>>. .

JESUS, S.; SOARES, E.; COSTA, J.; BORCHARD, G.; BORGES, O. Immune response elicited by an intranasally delivered HBsAg low-dose adsorbed to poly- ϵ -caprolactone based nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 504, n. 1–2, p. 59–69, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.013>>. .

JOHANSSON, S. G.; HOURIHANE, J. O.; BOUSQUET, J.; et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, v. 56, n. 9, p. 813–824, 2001.

JONES, S. M.; BURKS, A. W. Food Allergy. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 12, p. 1168–1176, 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcp1611971>>. .

JONES, S. M.; PONS, L.; ROBERTS, J. L.; et al. Clinical efficacy and immune regulation

with peanut oral immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 2, p. 292–300.e97, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.022>>. .

KALKANIDIS, M.; PIETERSZ, G. A.; XIANG, S. D.; et al. Methods for nano-particle based vaccine formulation and evaluation of their immunogenicity. **Methods**, v. 40, n. 1, p. 20–29, 2006.

KALLIOMÄKI, M. The role of microbiota in allergy. **Annales Nestle**, v. 67, n. 1, p. 19–25, 2009.

KARCH, C. P.; BURKHARD, P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. **Biochemical Pharmacology**, v. 120, n. 6, p. 1–14, 2016.

KEET, C. A.; FRISCHMEYER-GUERRERIO, P. A.; WESSEL, F.; et al. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 20, n. 1, p. 66–67, 2012.

KIDD, P. Th1 / Th2 Balance Th1 / Th2 Balance : The Hypothesis , its Limitations , and Implications for Health and Disease. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 223–242, 2003. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/profile/Parris_Kidd2/publication/10591467_Th1Th2_Balance_The_Hypothesis_its_Limitations_and_Implications_for_Health_and_Disease/links/56f9fe5e08ae7c1fda311e3c/Th1-Th2-Balance-The-Hypothesis-its-Limitations-and-Implications-for>. .

KLIPPSTEIN, R.; POZO, D. Nanotechnology-based manipulation of dendritic cells for enhanced immunotherapy strategies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 4, p. 523–529, 2010. Elsevier Inc. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2010.01.001>>. .

KOLLMANN, D.; GEROLDINGER-SIMIC, M.; KINACIYAN, T.; et al. Recombinant Mal d 1 is a reliable diagnostic tool for birch pollen allergen-associated apple allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 4, p. 1008–1010, 2013.

KONDRASHOVA, A.; SEISKARI, T.; ILONEN, J.; KNIP, M.; HYÖTY, H. The “Hygiene hypothesis” and the sharp gradient in the incidence of autoimmune and allergic diseases between Russian Karelia and Finland. **APMIS**, v. 121, n. 6, p. 478–493, 2013.

KOOL, M.; SOULLIÉ, T.; NIMWEGEN, M. VAN; et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 4, p. 869–882, 2008. Disponível em:

<<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20071087>>. .

KRAMER, A.; BEKESCHUS, S.; BR, B. M. Maintaining health by balancing microbial exposure and prevention of infection : the hygiene hypothesis versus the hypothesis of early immune challenge. , v. 83, p. 29–34, 2013.

KRAMER, M. F.; HEATH, M. D. Aluminium in allergen-specific subcutaneous immunotherapy - A German perspective. **Vaccine**, v. 32, n. 33, p. 4140–4148, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.063>>. .

KULIS, M.; WRIGHT, B. L.; JONES, S. M.; BURKS, A. W. Diagnosis, management, and investigational therapies for food allergies. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1132–1142, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.01.034>>. .

KWON, Y. J.; JAMES, E.; SHASTRI, N.; FRECHET, J. M. J. In vivo targeting of dendritic cells for activation of cellular immunity using vaccine carriers based on pH-responsive microparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18264–18268, 2005. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0509541102>>. .

LA FUENTE, M. DE; CSABA, N.; GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. Nanoparticles as protein and gene carriers to mucosal surfaces. **Nanomedicine**, v. 3, n. 6, p. 845–857, 2008. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17435889.3.6.845>>. .

LAMALLE-BERNARD, D.; MUNIER, S.; COMPAGNON, C.; et al. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 1, p. 57–67, 2006.

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

LEE, S.; KIM, Y. C.; PARK, J. H. Zein-alginate based oral drug delivery systems: Protection and release of therapeutic proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, n. 1–2, p. 300–306, 2016. Elsevier B.V. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.023>>. .

LIU, A. H. Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.012>>. .

LONGHI, M. P.; TRUMPFHELLER, C.; IDOYAGA, J.; et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 7, p. 1589–1602, 2009.

Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20090247>>. .

LONGO, G.; BERTI, I.; BURKS, A. W.; KRAUSS, B.; BARBI, E. IgE-mediated food allergy in children. **The Lancet**, v. 382, n. 9905, p. 1656–1664, 2013. Elsevier Ltd.

Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60309-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60309-8)>. .

LUBBEN, I. M. VAN DER; VERHOEF, J. C.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E.

Chitosan for mucosal vaccination. **Advanced drug delivery reviews**, v. 52, n. 2, p. 139–144, 2001. Netherlands.

LUYT, D.; BALL, H.; KIRK, K.; STIEFEL, G. Diagnosis and management of food allergy in children. **Paediatrics and Child Health**, 2016. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751722216000561>>. Acesso em: 22/3/2016.

MA, L.; DANOFF, T. M.; BORISH, L. Case fatality and population mortality associated with anaphylaxis in the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1075–1083, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.10.029>>. .

MALLAPRAGADA, S. K.; NARASIMHAN, B. Immunomodulatory biomaterials.

International Journal of Pharmaceutics, v. 364, n. 2, p. 265–271, 2008.

MASTHOFF, L. J. N.; MATTSSON, L.; ZUIDMEER-JONGEJAN, L.; et al. Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 2, p. 393–399, 2013.

MATRICARDI, P. M. 99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: Controversial aspects of the “hygiene hypothesis.” *Clinical and Experimental Immunology*. **Anais...** v. 160, p.98–105, 2010.

MATTISON, C. P.; BREN-MATTISON, Y.; VANT-HULL, B.; et al. Heat-induced alterations in cashew allergen solubility and IgE binding. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 244–251, 2016. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214750015300986>>. .

MCGOWAN, E. C.; KEET, C. A. Prevalence of self-reported food allergy in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 5, 2013.

MOINGEON, P. Adjuvants for allergy vaccines. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 8, n. 10, p. 1492–1498, 2012.

MOINGEON, P.; MASCARELL, L. Differences and similarities between sublingual immunotherapy of allergy and oral tolerance. **Seminars in Immunology**, v. 30, n. May, p. 52–60, 2017.

MOJSILOVIĆ, S. B. Immunological Effects of Adjuvants, Their Mechanisms, and Relevance to Vaccine Safety. **Pedijatrija Danas: Pediatrics Today**, v. 13, n. 1, p. 30–41, 2017.

MONERET-VAUTRIN; RANCE; KANNY; et al. Food allergy to peanuts in France—evaluation of 142 observations. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 28, n. 9, p. 1113–1119, 1998. Blackwell Science Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00370.x>>. .

MORENO, L. C. G. E I.; PUERTA, E.; SUÁREZ-SANTIAGO, J. E.; et al. Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 517, n. 1–2, p. 50–57, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316311243>>. .

MUQAKU, B.; SLANY, A.; BILECK, A.; KREUTZ, D.; GERNER, C. Quantification of cytokines secreted by primary human cells using multiple reaction monitoring: evaluation of analytical parameters. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 21, p. 6525–6536, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00216-015-8817-9>>. .

MURARO, A.; AGACHE, I.; CLARK, A.; et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Managing patients with food allergy in the community. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 8, p. 1046–1057, 2014.

MURARO, A.; WERFEL, T.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Diagnosis and management of food allergy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 8, p. 1008–1025, 2014.

NELSON, H. S.; MAKATSORI, M.; CALDERON, M. A. Subcutaneous Immunotherapy and Sublingual Immunotherapy: Comparative Efficacy, Current and Potential Indications, and Warnings--United States Versus Europe. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 13–24, 2016. United States.

NIAID. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States.

Clinical and Translational Allergy, v. 1, n. 5, p. 44, 2010. Disponível em:

<<http://www.nih.gov/about/index.html#mission.htm%5Cnhttp://www.biomedcentral.com/content/pdf/2045-7022-1-S1-S10.pdf>>. .

NOON, L. PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST HAY FEVER. **The Lancet**, v. 177, n. 4580, p. 1572–1573, 2017. Elsevier. Disponível em:

<[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)78276-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)78276-6)>. .

NOORBAKHSH, R.; MORTAZAVI, S. A.; SANKIAN, M.; et al. Pistachio Allergy-Prevalence and In vitro Cross-Reactivity with Other Nuts. **Allergology International**, v. 60, n. 4, p. 425–432, 2011.

NOWAK-WĘGRZYN, A.; ALBIN, S. Oral immunotherapy for food allergy: Mechanisms and role in management. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 45, n. 2, p. 368–383, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077670>>. .

NWARU, B. I.; HICKSTEIN, L.; PANESAR, S. S.; et al. Prevalence of common food allergies in Europe: A systematic review and meta-analysis. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 8, p. 992–1007, 2014.

O’SULLIVAN, M. D.; SOMERVILLE, C. Cosensitization to orange seed and cashew nut.

Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology, v. 107, n. 3, p. 282–3, 2011. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1081120611004248>>. Acesso em: 22/3/2016.

OCHOA, J.; IRACHE, J. M.; TAMAYO, I.; et al. Protective immunity of biodegradable nanoparticle-based vaccine against an experimental challenge with *Salmonella Enteritidis* in

mice. **Vaccine**, v. 25, n. 22, p. 4410–4419, 2007.

OJER, P.; CERAIN, A. L. DE; ARESES, P.; PENUELAS, I.; IRACHE, J. M. Toxicity studies of poly(anhydride) nanoparticles as carriers for oral drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 9, p. 2615–2627, 2012.

OKADA, H.; KUHN, C.; FEILLET, H.; BACH, J. F. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: An update. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 1, p. 1–9, 2010.

OLOGUNDE, M. O.; OMOSEBI, M. O.; ARIYO, O.; OLUNLADE, B. A.; ABOLAJI, R. A. **Preliminary nutritional evaluation of cashew nuts from different locations in Nigeria**. 2011.

OSBORNE, N. J.; KOPLIN, J. J.; MARTIN, P. E.; et al. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 668–676, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.039>>. .

PAHR, S.; CONSTANTIN, C.; PAPADOPOULOS, N. G.; et al. α -Purothionin, a new wheat allergen associated with severe allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 4, 2013.

PALOMARES, O.; AKDIS, M.; MARTÍN-FONTECHA, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. **Immunological Reviews**, v. 278, n. 1, p. 219–236, 2017.

PARK, K. The Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back. **J Control Release**, v. 28, n. 190, p. 3–8, 2015.

PASQUALE, A.; PREISS, S.; SILVA, F.; GARÇON, N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. **Vaccines**, v. 3, n. 2, p. 320–343, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-393X/3/2/320/>>. .

PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 450–458, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2014.08.001>>. .

PATEL, B. Y.; VOLCHECK, G. W. Food Allergy: Common Causes, Diagnosis, and

Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 10, p. 1411–1419, 2015. Elsevier Inc.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.07.012>>. .

PÉAN, J. M.; VENIER-JULIENNE, M. C.; FILMON, R.; et al. Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, n. 1, p. 105–115, 1998.

PENALVA, R.; ESPARZA, I.; LARRANETA, E.; et al. Zein-Based Nanoparticles Improve the Oral Bioavailability of Resveratrol and Its Anti-inflammatory Effects in a Mouse Model of Endotoxic Shock. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 5603–5611, 2015.

PENALVA, R.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J.; GAMAZO, C.; ESPARZA, I.; IRACHE, J. M. Zein nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 103–110, 2017. Elsevier Inc.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.033>>. .

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunology and Cell Biology**, v. 82, p. 488–496, 2004.

PFAAR, O.; CAZAN, D.; KLIMEK, L.; LARENAS-LINNEMANN, D.; CALDERON, M. A. Adjuvants for immunotherapy. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 12, n. 6, p. 648–657, 2012. United States.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503–514, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

POHLIT, H.; BELLINGHAUSEN, I.; FREY, H.; SALOGA, J. Recent advances in the use of nanoparticles for allergen-specific immunotherapy. **Allergy**, , n. April, p. 1461–1474, 2017.
Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/all.13199>>. .

PONGRACIC, J. A.; BOCK, S. A.; SICHERER, S. H. Oral food challenge practices among allergists in the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 2, p. 564–566, 2012.

RANCÉ, F.; BIDAT, E.; BOURRIER, T.; SABOURAUD, D. Cashew allergy: Observations of 42 children without associated peanut allergy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 58, n. 12, p. 1311–1314, 2003.

REBOUÇAS, J. D. S.; IRACHE, J. M.; CAMACHO, A. I.; et al. Development of poly(anhydride) nanoparticles loaded with peanut proteins: The influence of preparation method on the immunogenic properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 2, p. 241–249, 2012.

REDDY, S. T.; SWARTZ, M. A.; HUBBELL, J. A. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 12, p. 573–579, 2006.

RIEUX, A. DES; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER, Y. J.; PR??AT, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 1–27, 2006.

ROBOTHAM, J. M.; WANG, F.; SEAMON, V.; et al. Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 6, p. 1284–1290, 2005.

ROBOTHAM, J. M.; WANG, F.; SEAMON, V.; et al. Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 115, n. 6, p. 1284–90, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674905004227>>. Acesso em: 22/3/2016.

ROBOTHAM, J. M.; WANG, F.; TEUBER, S. S.; SATHE, S. K.; ROUX, K. H. Ana o 2, a major cashew nut allergen of the legumin family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. S249, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674903808849>>. Acesso em: 22/3/2016.

ROBOTHAM, J. M.; XIA, L.; WILLISON, L. N.; et al. Characterization of a cashew allergen, 11S globulin (Ana o 2), conformational epitope. **Molecular immunology**, v. 47, n. 9, p. 1830–8, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589009008657>>. Acesso em:

22/3/2016.

ROOK, G. A. W. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: The broader implications of the hygiene hypothesis. **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 3–11, 2009.

S. REBOUÇAS, J. DE; IRACHE, J. M.; CAMACHO, A. I.; et al. Immunogenicity of peanut proteins containing poly(anhydride) nanoparticles. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 8, p. 1106–1112, 2014.

SALMAN, H. H.; GAMAZO, C.; CAMPANERO, M. A.; IRACHE, J. M. Salmonella-like bioadhesive nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 106, n. 1–2, p. 1–13, 2005.

SALMAN, H. H.; GAMAZO, C.; SMIDT, P. C. DE; RUSSELL-JONES, G.; IRACHE, J. M. Evaluation of bioadhesive capacity and immunoadjuvant properties of vitamin B12-Gantrez nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 12, p. 2859–2868, 2008.

SANDERS, M. T.; BROWN, L. E.; DELIYANNIS, G.; PEARSE, M. J. ISCOM-based vaccines: the second decade. **Immunology and cell biology**, v. 83, n. 2, p. 119–128, 2005. England.

SCHÖLL, I.; KOPP, T.; BOHLE, B.; JENSEN-JAROLIM, E. Biodegradable PLGA Particles for Improved Systemic and Mucosal Treatment of Type I Allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 349–364, 2006.

SCHÖLL, I.; WEISSENBO, A.; FÖRSTER-WALDL, E.; et al. Allergen-loaded biodegradable poly (D , L -lactic-co-glycolic) acid nanoparticles down-regulate an ongoing Th2 response in the BALB / c mouse model. **Clin Exp Allergy**, p. 315–321, 2004.

SHEN, H.; ACKERMAN, A. L.; CODY, V.; et al. Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles. **Immunology**, v. 117, n. 1, p. 78–88, 2006.

SICHERER, S. H. Epidemiology of food allergy. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL**, v. 127, n. 3, p. 185–195, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <doi:10.1016/j.jaci.2010.11.044>. .

SICHERER, S. H.; FURLONG, T. J.; MUÑOZ-FURLONG, A.; BURKS, A. W.; SAMPSON, H. A. A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: Characteristics of the first 5149 registrants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 1, p. 128–

132, 2001.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 2, p. 291–307.e5, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.020>>. .

SICHERER, S. H.; WOOD, R. A. Advances in diagnosing peanut allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2012.10.004>>. .

SILVA, D. DE; GEROMI, M.; PANESAR, S. S.; et al. Acute and long-term management of food allergy: Systematic review. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 2, p. 159–167, 2014.

SIMONS, F. E. R.; ARDUSSO, L. R. F.; BILÒ, M. B.; et al. International consensus on (ICON) anaphylaxis. , p. 1–19, 2014.

SIMONS, F. E. R.; ARDUSSO, L. R. F.; DIMOV, V.; et al. World allergy organization anaphylaxis guidelines: 2013 update of the evidence base. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 162, n. 3, p. 193–204, 2013. World Allergy Organization Journal. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40413-015-0080-1>>. .

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-??-caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 2004.

SOLÉ, D.; IVANCEVICH, J. C.; BORGES, M. S.; et al. Anaphylaxis in Latin American children and adolescents: The Online Latin American Survey on Anaphylaxis (OLASA). **Allergologia et Immunopathologia**, v. 40, n. 6, p. 331–335, 2012.

SOLE, P. DE; ROSSI, C.; CHIARPOTTO, M.; et al. Possible relationship between Al/ferritin complex and Alzheimer's disease. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 1–2, p. 89–93, 2013. The Canadian Society of Clinical Chemists. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.10.023>>. .

SOLLER, L.; BEN-SHOSHAN, M.; HARRINGTON, D. W.; et al. Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 4, p. 986–988, 2012.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1, p. 1–20, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365900003394>>. .

SOUZA REBOUÇAS, J. DE; ESPARZA, I.; FERRER, M.; et al. Nanoparticulate adjuvants and delivery systems for allergen immunotherapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **Bmj**, v. 299, n. 6710, p. 1259–1260, 1989. Disponível em: <<http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.299.6710.1259>>. .

SUN, J.; ARIAS, K.; ALVAREZ, D.; et al. Impact of CD40 Ligand, B Cells, and Mast Cells in Peanut-Induced Anaphylactic Responses. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 10, p. 6696–6703, 2007. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/179/10/6696.full>>. .

TAMAYO, I.; IRACHE, J. M.; MANSILLA, C.; et al. Poly(anhydride) nanoparticles act as active Th1 adjuvants through toll-like receptor exploitation. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 9, p. 1356–1362, 2010.

TARIQ, S. M.; STEVENS, M.; MATTHEWS, S.; et al. Cohort study of peanut and tree nut sensitisation by age of 4 years. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 313, n. 7056, p. 514–7, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2351897&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

TAVERNIER, G.; FLETCHER, G.; GEE, I.; et al. IPEADAM study: Indoor endotoxin exposure, family status, and some housing characteristics in English children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 3, p. 656–662, 2006.

TAYLOR, S. L.; HEFLE, S. L.; BINDSLEV-JENSEN, C.; et al. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: How much is too much? **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, n. 5, p. 689–695, 2004.

TEUBER, S. S.; SATHE, S. K.; PETERSON, W. R.; ROUX, K. H. Characterization of the soluble allergenic proteins of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6543–6549, 2002.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; SRIWASTAWA, B.; et al. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 2–11, 2012. India: Medknow Publications & Media Pvt Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3465154/>>. .

TORCHILIN, V. Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers: Development of the Concept BT - Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers. In: V. Torchilin (Ed.); . p.1–32, 2008. New York, NY: Springer New York. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-76554-9_1>. .

TORCHILIN, V. P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 11, p. 813–827, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd4333>>. .

TURNBULL, J. L.; ADAMS, H. N.; GORARD, D. A. Review article: The diagnosis and management of food allergy and food intolerances. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 1, p. 3–25, 2015.

UPHOFF, E.; CABIESES, B.; PINART, M.; et al. A systematic review of socioeconomic position in relation to asthma and allergic diseases. **European Respiratory Journal**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00114514>>. .

VALENTA, R.; HOCHWALLNER, H.; LINHART, B.; PAHR, S. Food Allergies : The Basics. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1120–1131.e4, 2015. Elsevier, Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.02.006>>. .

VALK, J. P. M. VAN DER; J. DUBOIS, A. E.; GERTH VAN WIJK, R.; WICHERS, H. J.; JONG, N. W. DE. Systematic review on cashew nut allergy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 6, p. 692–698, 2014.

VANDAMME, K.; MELKEBEEK, V.; COX, E.; et al. Influence of polymer hydrolysis on adjuvant effect of Gantrez-AN nanoparticles: Implications for oral vaccination. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 392–398, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.05.005>>. .

VILA, A.; GILL, H.; MCCALLION, O.; ALONSO, M. J. Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: Effect of particle size and PEG coating density. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n. 2, p. 231–244, 2004.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; ÉVORA, C.; et al. PLA-PEG particles as nasal protein carriers: The influence of the particle size. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 292, n. 1–2, p. 43–52, 2005.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 78, n. 1–3, p. 15–24, 2002.

WANG, F.; ROBOTHAM, J. M.; TEUBER, S. S.; et al. Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidentale*) allergen of the vicilin seed storage protein family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 1, p. 160–166, 2002a.

WANG, F.; ROBOTHAM, J. M.; TEUBER, S. S.; et al. Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidentale*) allergen of the vicilin seed storage protein family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 1, p. 160–166, 2002b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674902000568>>. Acesso em: 22/3/2016.

WANG, F.; ROBOTHAM, J. M.; TEUBER, S. S.; SATHE, S. K.; ROUX, K. H. Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 132, n. 1, p. 27–39, 2003.

WANG, W.; SINGH, M. Selection of Adjuvants for Enhanced Vaccine Potency. **World Journal of Vaccines**, v. 01, n. 02, p. 33–78, 2011. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/wjv.2011.12007>>. .

WANG, X.; UTO, T.; AKAGI, T.; AKASHI, M.; BABA, M. Induction of potent CD8⁺ T-cell responses by novel biodegradable nanoparticles carrying human immunodeficiency virus type 1 gp120. **Journal of virology**, v. 81, n. 18, p. 10009–16, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2045421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

WASHINGTON, K. E.; KULARATNE, R. N.; KARMEGAM, V.; BIEWER, M. C.; STEFAN, M. C. Recent advances in aliphatic polyesters for drug delivery applications. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 9, n. 4, p. e1446–n/a, 2017. John Wiley & Sons, Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/wnan.1446>>. .

WAWRZYNIAK, P.; AKDIS, C. A.; FINKELMAN, F. D.; ROTHENBERG, M. E. Advances

and highlights in mechanisms of allergic disease in 2015. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 6, p. 1681–1696, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.010>>. .

WHEELER, A. W.; WORONIECKI, S. R. Immunological adjuvants in allergy vaccines: Past, present and future. **Allergology International**, v. 50, n. 4, p. 295–301, 2001. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1592.2001.00230.x>>. .

WILCOCK, L. K.; FRANCIS, J. N.; DURHAM, S. R. Aluminium hydroxide down-regulates T helper 2 responses by allergen-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, n. 9, p. 1373–1378, 2004. Blackwell Science Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02052.x>>. .

WILLISON, L. N.; TAWDE, P.; ROBOTHAM, J. M.; et al. Pistachio vicilin, Pis v 3, is immunoglobulin E-reactive and cross-reacts with the homologous cashew allergen, Ana o 1. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 7, p. 1229–1238, 2008.

WILLISON, L. N.; TAWDE, P.; ROBOTHAM, J. M.; et al. Pistachio vicilin, Pis v 3, is immunoglobulin E-reactive and cross-reacts with the homologous cashew allergen, Ana o 1. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 7, p. 1229–1238, 2008. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02998.x>>. .

WORM, M.; MONERET-VAUTRIN, A.; SCHERER, K.; et al. First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 10, p. 1397–1404, 2014.

YONCHEVA, K.; GOMEZ, S.; CAMPANERO, M. A.; GAMAZO, C.; IRACHE, J. M. Bioadhesive properties of pegylated nanoparticles. **Expert opinion on drug delivery**, v. 2, n. 2, p. 205–218, 2005. England.

ZHAO, L.; SETH, A.; WIBOWO, N.; et al. Nanoparticle vaccines. **Vaccine**, v. 32, n. 3, p. 327–337, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>>. .

CAPÍTULO 1

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 127 (2018) 51–60



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Research paper

Poly(anhydride) nanoparticles containing cashew nut proteins can induce a strong Th1 and Treg immune response after oral administration



Marcela Araújo Pereira^a, Juliana de Souza Rebouças^b, Rafaela de Siqueira Ferraz-Carvalho^a,
Inés Luis de Redín^c, Priscila Valera Guerra^d, Carlos Gamazo^c, Claudia Ida Brodskyn^d,
Juan M. Irache^{c,*}, Nereide Stela Santos-Magalhães^a

^a Immunopathology Kézo-Asami Laboratory, LIKA, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil^b Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife, Brazil^c Nanomedicines and Vaccines (NANO-VAC) Research Group, University of Navarra, Pamplona, Spain^d Laboratory of Parasite-host Interaction and Epidemiology, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Nanoparticles
Food allergy
Cashew nut
Oral
Immunization

ABSTRACT

Cashew nut allergy is the second most commonly reported tree nut allergy. Traditional allergen immunotherapy presents several clinical drawbacks that can be reduced by using nanoparticles-based allergen-delivery systems, modulating the immune response towards a protective one. In this context, the goal of this work was to assess the potential of poly(anhydride) nanoparticles (NP) for cashew nut oral immunization. Cashew nut allergens-loaded nanoparticles (CNE-NP) were prepared by solvent displacement method. After nanoparticles characterization, oral immunomodulation ability was evaluated in BALB/c mice. Our results demonstrated that CNE-NP induced a higher Th1/Th2 ratio in comparison with animals immunized with free cashew nut proteins. Indeed, a decrease in splenic Th2 cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13), and an enhancement of pro-Th1 (IL-12 and IFN- γ) and regulatory (IL-10) cytokines was observed. Furthermore, mice orally immunized with CNE-NP presented an increased expansion of CD4⁺ T regulatory cells, such as CD4⁺Foxp3⁺ and CD4⁺LAP⁺, in the mesenteric lymph nodes. In conclusion, oral immunization with a single dose of poly(anhydride) nanoparticles loaded with cashew nut proteins led to a pro-Th1 and Treg immune response. Furthermore, their immunomodulatory properties could be introduced as a new approach for management of cashew nut allergy.

Artigo ACEITO para publicação na revista **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutis**.

Fator de impacto: 4,159

Qualis: A2

Poly(anhydride) nanoparticles containing cashew nut proteins can induce a strong Th1 and Treg immune response after oral administration.

Marcela Araújo Pereira¹, Juliana de Souza Rebouças², Rafaela de Siqueira Ferraz Carvalho¹, Inés Luis de Redín³, Priscila Valera Guerra⁴, Carlos Gamazo³, Claudia Ida Brodskyn⁴, Juan M. Irache^{3,*}, Nereide Stela Santos-Magalhães¹

¹Immunopathology Keizo-Asami Laboratory, LIKA, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

²Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife, Brazil.

³Nanomedicines and Vaccines (NANO-VAC) Research Group, University of Navarra, Pamplona, Spain.

⁴Laboratory of Parasite-host Interaction and Epidemiology, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Brazil.

***Corresponding author:**

Juan M. Irache
Nanomedicines and Vaccines (NANO-VAC) Research Group
Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology
University of Navarra
C/Irunlarrea 1
31008-Pamplona
Spain
Tel: +34 948 425600; Fax: +34 948 425649
e-mail: jmirache@unav.es

Abstract

Cashew nut allergy is the second most commonly reported tree nut allergy. Traditional allergen immunotherapy presents several clinical drawbacks that can be reduced by using nanoparticles-based allergen-delivery systems, modulating the immune response towards a protective one. In this context, the goal of this work was to assess the potential of poly(anhydride) nanoparticles (NP) for cashew nut oral immunization. Cashew nut allergens-loaded nanoparticles (CNE-NP) were prepared by solvent displacement method. After nanoparticles characterization, oral immunomodulation ability was evaluated in BALB/c mice. Our results demonstrated that CNE-NP induced a higher Th1/Th2 ratio in comparison with animals immunized with free cashew nut proteins. Indeed, a decrease in splenic Th2 cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13), and an enhancement of pro-Th1 (IL-12 and IFN- γ) and regulatory (IL-10) cytokines was observed. Furthermore, mice orally immunized with CNE-NP presented an increased expansion of CD4⁺ T regulatory cells, such as CD4⁺Foxp3⁺ and CD4⁺LAP⁺, in the mesenteric lymph nodes. In conclusion, oral immunization with a single dose of poly(anhydride) nanoparticles loaded with cashew nut proteins led to a pro-Th1 and Treg immune response. Furthermore, their immunomodulatory properties could be introduced as a new approach for management of cashew nut allergy.

Keywords: nanoparticles; food allergy; cashew nut; oral; immunization.

CAPÍTULO 2

**Th1 and T_{reg} immune response induced by oral immunization with a single dose of
cashew nut allergens-loaded zein nanoparticles**

Artigo a ser submetido à revista European Journal of Pharmaceutics

Fator de impacto: 3,649

Qualis: A2

**Th1 and T_{reg} immune response induced by oral immunization with a single dose of
cashew nut allergens-loaded zein nanoparticles**

Marcela Araújo Pereira¹, Juliana de Souza Rebouças^{1,2}, Rafaela de Siqueira Ferraz
Carvalho¹, Inés Luis de Redín², Priscila Valera Guerra², Carlos Gamazo³, Claudia Ida
Brodskyn², Nereide Stela Santos-Magalhães¹, Juan Manuel Irache^{4,*}

¹ Immunopathology Keizo-Asami Laboratory, LIKA, Federal University of Pernambuco, 50740-465, Recife, Brazil.

² Laboratory of Parasite-host Interaction and Epidemiology, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, 40296-710, Bahia, Brazil.

³ Department of Microbiology, 31008, University of Navarra, Pamplona, Spain.

⁴ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Navarra, 31008, Pamplona, Spain.

***Corresponding author:**

Juan M. Irache

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology

University of Navarra

31008, Pamplona

Spain

Tel: +34 948 425600; Fax: +34 948 425649

e-mail: jmirache@unav.es

ABSTRACT

IgE-mediated food allergy represents the major form of food allergy, causing immediate reactions and affects up to 2.5% of the adult population and 6% to 8% of children less than 3 years of age, being associated with significant morbidity and mortality. The prevalence for Cashew nut (*Anacardium occidentale*) is between 7% and 55%, of tree nuts, in Europe, and cashew nut allergy is the second most commonly reported tree nut allergy in the US. Despite of the high potential to induce allergic reactions, there is no effective treatment available to cashew nut allergy. Traditional allergen immunotherapy presents several clinical drawbacks and could even lead to life-threatening allergic reactions. These limitations can be reduced by using *nanoparticles-based allergen-delivery systems as adjuvants*, modulating the immune response toward a protective one. In this context, the aim of this work was to develop zein nanoparticles (NPz) for cashew nut oral immunization. NPz loaded with cashew nut proteins (CNE-NPz) were prepared by desolvation method and oral immunization studies were conducted with BALB/c. Our results showed that CNE-NPz induced a pro-Th1 response, in comparison with the animals orally immunized with a single dose of free cashew nut proteins (CNE), accompanied by a decrease in splenic Th2 cytokines. Furthermore, mice orally immunized with CNE-NPz showed a Treg cells stimulation, with higher levels of IL-10 and TGF- β 1, two important regulatory molecules. In conclusion, oral immunization with a single dose of zein nanoparticles loaded with cashew nut proteins led to a pro-Th1 and Treg immune response. Furthermore, their immunomodulatory properties could be introduced as a new approach for management of cashew nut allergy.

Keywords: Protein polymer, Nanoparticles, Food allergy, Cashew nut, Oral immunization.

RESUMO

A alergia alimentar mediada por IgE representa a principal forma de alergia alimentar, causando reações imediatas. Afeta até 2,5% da população adulta e 6% a 8% das crianças com menos de 3 anos de idade, estando associada a morbidade e mortalidade significativas. A prevalência da alergia à castanha de caju (*Anacardium occidentale*) está entre 7% e 55%, entre as nozes, na Europa, e é a segunda alergia a nozes mais comumente relatados nos EUA. Apesar do potencial elevado de induzir reações alérgicas, não há nenhum tratamento eficaz disponível à alergia à castanha de caju. A imunoterapia tradicional do alérgeno apresenta diversos obstáculos clínicos, que podem evoluir para reações alérgicas potencialmente graves, como a anafilaxia. Estas limitações podem ser minimizadas a partir do uso de sistemas de liberação controlada, utilizando nanopartículas como adjuvantes, modulando a resposta imune para uma ação protetora. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas de polímero proteico (NPz) para imunização oral de castanha de caju. NPz contendo com as proteínas da castanha de caju encapsuladas (CNE-NPZ) foram preparados pelo método de deslocamento do solvente e os estudos orais da imunização foram conduzidos com BALB/c. Nossos resultados mostraram que CNE-NPz induziu uma resposta pró-Th1, em comparação com os animais imunizados oralmente com uma dose única de proteínas de castanha de caju livres (CNE), acompanhada de uma diminuição nas citocinas Th2 esplénicas. Além disso, camundongos imunizados por via oral com CNE-NPz apresentaram estimulação de células Treg, com níveis mais altos de IL-10 e TGF- β 1, duas importantes moléculas regulatórias. Em conclusão, a imunização oral com uma única dose de nanopartículas proteicas carregadas com as proteínas da castanha de caju levaram a uma resposta imune pró-Th1 e de Treg. Além disso, suas propriedades imunomoduladoras poderiam ser introduzidas como uma nova alternativa para a terapia antialérgica frente à castanha de caju.

Palavras-chave: Polímero proteico, nanopartículas, alergia alimentar, castanha de caju, imunização oral.

CONCLUSÕES

As nanopartículas de polianidrido e proteicas, contendo os alérgenos da castanha de caju encapsulados, foram desenvolvidas com sucesso e caracterizadas. As mesmas, apresentaram características físico-químicas adequadas à aplicação na imunoterapia oral. Além disso, elas apresentaram maior estabilidade *in vitro*, em fluidos gastrointestinais simulados, e um perfil de liberação controlada dos alérgenos. Avaliação da integridade estrutural e imunogenicidade das proteínas alergênicas liberadas das NP;

O método de produção das nanopartículas, tanto as proteicas, quanto as de polianidrido, não afetou a integridade estrutural e a antigenicidade das proteínas de castanha de caju encapsuladas, mantendo suas características originais.

A encapsulação dos alérgenos de castanha de caju em nanopartículas promoveu um aumento na viabilidade celular, reduzindo o efeito dessas proteínas na célula, quando comparados ao extrato da castanha de caju livre. Além disso, o tratamento com estes sistemas foi capaz de induzir a ativação de macrófagos, reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Ademais, o presente trabalho demonstrou que a administração, oral e intradérmica, do extrato de castanha de caju encapsulados em nanopartículas de polianidrido e proteicas, foi capaz de modular a resposta imune humoral e celular, induzindo um aumento na resposta Th1, redução dos níveis de anticorpos e citocinas Th2 e ativação de células Treg.

Desta forma, nossos resultados sugerem que a encapsulação de alérgenos de castanha de caju em nanopartículas de polianidrido ou proteicas, pode ser uma alternativa promissora para a imunoterapia à de castanha de caju, devido às suas propriedades reguladoras pró-Th1 e Treg.

REFERÊNCIAS

- AGACHE, I.; AKDIS, C. A. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. **Allergology International**, v. 65, n. 3, p. 243–252, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.alit.2016.04.011>>. .
- AGÜEROS, M.; ZABALETA, V.; ESPUELAS, S.; CAMPANERO, M. A.; IRACHE, J. M. Increased oral bioavailability of paclitaxel by its encapsulation through complex formation with cyclodextrins in poly(anhydride) nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 1, p. 2–8, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.012>>. .
- AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 4, p. 735–746, 2009.
- AKDIS, M.; AAB, A.; ALTUNBULAKLI, C.; et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 4, p. 984–1010, 2016.
- ALVARADO IZQUIERDO, M. I.; PEREZ, M. Study of food allergy on Spanish population. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 34, n. 5, p. 185–193, 2006. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L44875055%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1157/13094025%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASSE&issn=03010546&id=doi:10.1157/13094025&atitle=Study+of+food+allergy+on+Spanish+population&st>>. .
- AMIN, H. S.; LISS, G. M.; BERNSTEIN, D. I. Evaluation of near-fatal reactions to allergen immunotherapy injections. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 1, p. 169–175, 2006.
- ANDERSON, T. J.; LAMSA, B. P. Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: A review. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 159–173, 2011.
- ARAGON, A.; IMANI, R.; BLACKBURN, V. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 1, p. 57–65, 2009. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685108002594>>. .

ARBÓS, P.; CAMPANERO, M. A.; ARANGO, M. A.; RENEDO, M. J.; IRACHE, J. M. Influence of the surface characteristics of PVM/MA nanoparticles on their bioadhesive properties. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 1, p. 19–30, 2003.

ARBÓS, P.; WIRTH, M.; ARANGO, M. A.; GABOR, F.; IRACHE, J. M. Gantrez AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates. **Journal of Controlled Release**, v. 83, n. 3, p. 321–330, 2002.

ATAMAN-ÖNAL, Y.; MUNIER, S.; GANÉE, A.; et al. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. **Journal of Controlled Release**, v. 112, n. 2, p. 175–185, 2006.

AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of action of adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAY, p. 1–10, 2013.

AWWAD, S.; AHMED, A.; SHARMA, G.; et al. ‘**Principles of Pharmacology in the Eye.**’ 2017.

AZAM-ALI, S.; JUDGE, E. Small-scale cashew nut processing. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, , n. Schumacher Centre for Technology and Development, p. 1–70, 2001. Disponível em: <http://www.anacardium.info/IMG/pdf/Small-scale_Cashew_Nut_Processing_-_FAO_2001.pdf>. .

BALDACARA, R. P. DE C.; FERNANDES, M. DE F. M.; BALDACARA, L.; et al. Prevalence of allergen sensitization, most important allergens and factors associated with atopy in children. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 131, n. 5, p. 301–308, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802013000500301&lng=en&tlng=en>. .

BARRE, A.; SORDET, C.; CULERRIER, R.; et al. Vicilin allergens of peanut and tree nuts (walnut, hazelnut and cashew nut) share structurally related IgE-binding epitopes. **Molecular immunology**, v. 45, n. 5, p. 1231–40, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589007007687>>. Acesso em: 22/3/2016.

BARTKOWIAK, A.; SOBECKA, K.; KRUDOS, A. Tailor-made novel polymers for hydrogel encapsulation processes. **New Polymers for Encapsulation of Nutraceutical Compounds**, p.1–34, 2017. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9781119227625.ch1>>. .

BARTNIKAS, L. M.; SHEEHAN, W. J.; LARABEE, K. S.; et al. Ovomucoid is not superior to egg white testing in predicting tolerance to baked egg. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 1, n. 4, p. 354–360, 2013.

BATANERO, E.; BARRAL, P.; VILLALBA, M.; RODRÍGUEZ, R. Biodegradable poly (DL-lactide glycolide) microparticles as a vehicle for allergen-specific vaccines: A study performed with Ole e 1, the main allergen of olive pollen. **Journal of Immunological Methods**, v. 259, n. 1–2, p. 87–94, 2002.

BERNSTEIN, D. I.; EPSTEIN, T.; MURPHY-BERENDTS, K.; LISS, G. M. Surveillance of systemic reactions to subcutaneous immunotherapy injections: year 1 outcomes of the ACAAI and AAAAI Collaborative Study. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 104, n. 6, p. 530–535, 2010. Ann. Allergy Asthma Immunol. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2010.04.008>>. .

BHARALI, D. J.; PRADHAN, V.; ELKIN, G.; et al. Novel nanoparticles for the delivery of recombinant hepatitis B vaccine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 4, n. 4, p. 311–317, 2008. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2008.05.006>>. .

BOBEK, V.; KOLOSTOVA, K.; PINTEROVA, D.; et al. A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 4799–4804, 2010.

BODE, C.; ZHAO, G.; STEINHAGEN, F.; KINJO, T.; KLINMAN, D. M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 499–511, 2011.

BOYCE, J. A.; ASSA'AD, A.; BURKS, A. W.; et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, n. 6 0, p. S1-58, 2010.

BOYE, J. I. Food allergies in developing and emerging economies: need for comprehensive data on prevalence rates. **Clinical and Translational Allergy**, v. 2, n. 1, p. 25, 2012. Clinical

and Translational Allergy. Disponível em:

<<http://ctajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-7022-2-25>>. .

BRAMWELL, V. W.; PERRIE, Y. Particulate delivery systems for vaccines: what can we expect? **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 6, p. 717–728, 2006. England.

BREHLER, R. Adjuvanzien. **Der Hautarzt**, v. 68, n. 4, p. 292–296, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00105-017-3935-2>>. .

BROOS, S.; LUNDBERG, K.; AKAGI, T.; et al. Immunomodulatory nanoparticles as adjuvants and allergen-delivery system to human dendritic cells: Implications for specific immunotherapy. **Vaccine**, v. 28, n. 31, p. 5075–5085, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.004>>. .

BROTOS-CANTO, A.; GAMAZO, C.; MARTÍN-ARBELLA, N.; et al. Evaluation of nanoparticles as oral vehicles for immunotherapy against experimental peanut allergy. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.109>>. .

BURKS, A. W.; JONES, S. M.; WOOD, R. A.; et al. Oral Immunotherapy for Treatment of Egg Allergy in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 3, p. 233–243, 2012. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1200435>>. .

CABRERA, C. M.; URRÁ, J. M. Food allergy and the oral immunotherapy approach. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 63, n. 1, p. 31–39, 2015.

CAMACHO, A. I.; COSTA MARTINS, R. DA; TAMAYO, I.; et al. Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as innate immune system activators. **Vaccine**, v. 29, n. 41, p. 7130–7135, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.072>>. .

CAMACHO, A. I.; IRACHE, J. M.; SOUZA, J. DE; SÁNCHEZ-GÓMEZ, S.; GAMAZO, C. Nanoparticle-based vaccine for mucosal protection against *Shigella flexneri* in mice. **Vaccine**, v. 31, n. 32, p. 3288–3294, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.020>>. .

CAMACHO, A. I.; SOUZA, J. DE; SÁNCHEZ-GÓMEZ, S.; et al. Mucosal immunization

with *Shigella flexneri* outer membrane vesicles induced protection in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 46, p. 8222–8229, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.121>>. .

CDC. General Recommendations on Immunization - Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Centers for Disease Control and Prevention. **Mmwr**, v. 60, n. 2, 2011. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6002.pdf>>. .

CHESNÉ, J.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; ESSER VON-BIEREN, J. The Use of Adjuvants for Enhancing Allergen Immunotherapy Efficacy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 125–145, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.iac.2015.08.009>>. .

CLARK, A. T.; ANAGNOSTOU, K.; EWAN, P. W. Cashew nut causes more severe reactions than peanut: Case-matched comparison in 141 children. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 62, n. 8, p. 913–916, 2007.

COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: Putting inna immunity to work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 492–503, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>>. .

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 19, n. 2, p. 99–134, 2002. United States.

CRAMERI, R.; RHYNER, C. Novel vaccines and adjuvants for allergen-specific immunotherapy. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 761–768, 2006.

CRAPARO, E. F.; BONDI, M. L. Application of polymeric nanoparticles in immunotherapy. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 12, n. 6, p. 658–664, 2012. United States.

CRAPARO, E. F.; BONDI, M. L. Application of polymeric nanoparticles in immunotherapy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 12, n. 6, p. 658–664, 2012.

CU, Y.; SALTZMAN, W. M. Controlled Surface Modification with Poly(Ethylene)Glycol Enhance Diffusion of PLGA Nanoparticles in Human Cervical Mucus. **Molecular pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 173–81, 2009. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2637413&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

DACOBÁ, T. G.; OLIVERA, A.; TORRES, D.; CRECENTE-CAMPO, J.; ALONSO, M. J. Modulating the immune system through nanotechnology. **Seminars in Immunology**, v. 34, n. Supplement C, p. 78–102, 2017. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532317300362>>. .

DAVOREN, M.; PEAKE, J. Cashew nut allergy is associated with a high risk of anaphylaxis. **Archives of disease in childhood**, v. 90, n. 10, p. 1084–1085, 2005.

DHAMI, S.; NURMATOV, U.; PAJNO, G. B.; et al. Allergen immunotherapy for IgE-mediated food allergy: protocol for a systematic review. **Clinical and Translational Allergy**, v. 6, n. 1, p. 24, 2016. BioMed Central. Disponível em:

<<http://ctajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13601-016-0113-z>>. .

DIDIERLAURENT, A. M.; MOREL, S.; LOCKMAN, L.; et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6186–6197, 2009. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0901474>>. .

DONG, C.; FLAVELL, R. A. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. **Arthritis research**, v. 2, n. 3, p. 179–188, 2000. Disponível em:

<<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11094427&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1186/ar85>>. .

DUSCHL, A. Nanoparticles and Allergy. In: D. Boraschi; A. Duschl (Eds.); **Nanoparticles and the Immune System: Safety and Effects**. 1st Editio ed., p.55–68, 2013. Cambridge, Massachusetts, EUA: Academic Press.

EBISAWA, M.; BROSTEDT, P.; SJÖLANDER, S.; et al. Gly m 2S albumin is a major allergen with a high diagnostic value in soybean-allergic children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 4, 2013.

EGE, M. J.; BIELI, C.; FREI, R.; et al. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 4, p. 817–823, 2006.

EXLEY, C. Aluminium adjuvants and adverse events in sub-cutaneous allergy immunotherapy. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 2014.

FAIRLEY, S. J.; SINGH, S. R.; YILMA, A. N.; et al. Chlamydia trachomatis recombinant MOMP encapsulated in PLGA nanoparticles triggers primarily T helper 1 cellular and antibody immune responses in mice: A desirable candidate nanovaccine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2085–2099, 2013.

FECZKÓ, T.; TÓTH, J.; DÓSA, G.; GYENIS, J. Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 50, n. 8, p. 757–765, 2011.

FERNANDEZ, C.; FIANDOR, A.; MARTINEZ-GARATE, A.; QUESADA, J. M. Allergy to pistachio: crossre activity between pistachio nut and other Anacardiaceae. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 25, n. 12, p. 1254–1259, 1995. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.1995.tb03050.x>>. .

FLANARY, S.; HOFFMAN, A. S.; STAYTON, P. S. Antigen delivery with poly(propylacrylic acid) conjugation enhances MHC-1 presentation and T-Cell activation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 241–248, 2009.

FLEISCHER, D. M.; SPERGEL, J. M.; ASSA'AD, A. H.; PONGRACIC, J. A. Primary prevention of allergic disease through nutritional interventions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 1, n. 1, p. 29–36, 2013. United States.

FLOHR, C.; TUYEN, L. N.; LEWIS, S.; et al. Poor sanitation and helminth infection protect against skin sensitization in Vietnamese children: A cross-sectional study. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 6, p. 1305–1311, 2006.

FLORINDO, H. F.; PANDIT, S.; GONÇALVES, L. M. D.; ALPAR, H. O.; ALMEIDA, A. J. Streptococcus equi antigens adsorbed onto surface modified poly-ε-caprolactone microspheres induce humoral and cellular specific immune responses. **Vaccine**, v. 26, n. 33, p. 4168–4177, 2008.

FLORINDO, H. F.; PANDIT, S.; LACERDA, L.; et al. The enhancement of the immune response against S. equi antigens through the intranasal administration of poly-ε-caprolactone-based nanoparticles. **Biomaterials**, v. 30, n. 5, p. 879–891, 2009.

FOX, C. B.; HAENSLER, J. An update on safety and immunogenicity of vaccines containing emulsion-based adjuvants. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 7, p. 747–758, 2013.

FRANCIS, J. N.; DURHAM, S. R. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 4, n. 6, p. 543–8, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640697>>. .

GAGETE, E.; DELAZARI DOS SANTOS, L.; GOMES DE PONTES, L.; MORATO CASTRO, F. Who has anaphylaxis in Brazil? Validation of a questionnaire for population studies. **World Allergy Organization Journal**, v. 10, n. 1, p. 40, 2017. World Allergy Organization Journal. Disponível em: <<https://waojournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40413-017-0171-2>>. .

GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 693–704, 2013.

GAMAZO, C.; BUSSMANN, H.; GIEMSA, S.; et al. Interactions of poly (anhydride) nanoparticles with macrophages in light of their vaccine adjuvant properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 922–930, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.030>>. .

GAMAZO, C.; D'AMELIO, C.; GASTAMINZA, G.; FERRER, M.; IRACHE, J. M. Adjuvants for allergy immunotherapeutics. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 13, n. 10, p. 2416–2427, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28825867>%0Ahttps://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2017.1348447>. .

GARCIA, F.; MONEO, I.; FERNANDEZ, B.; et al. Allergy to Anacardiaceae: description of cashew and pistachio nut allergens. **Journal of investigational allergology & clinical immunology**, v. 10, n. 3, p. 173–177, 2000. Spain.

GARG, S. M.; VAKILI, M. R.; MOLAVI, O.; LAVASANIFAR, A. Self-Associating Poly(ethylene oxide)-block-poly(α -carboxyl-e-caprolactone) Drug Conjugates for the Delivery of STAT3 Inhibitor JSI-124: Potential Application in Cancer Immunotherapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p. 2570–2584, 2017.

GEORGET, D. M. R.; BARKER, S. A.; BELTON, P. S. A study on maize proteins as a potential new tablet excipient. **European Journal of Pharmaceutics and**

Biopharmaceutics, v. 69, n. 2, p. 718–726, 2008.

GLENNY, A. T.; POPE, C. G. the Precipitation of Diphtheria Toxoid By Potash Alum . **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 29, p. 31–40, 1926.

GÓMEZ, S.; GAMAZO, C.; SAN ROMAN, B.; et al. Development of a novel vaccine delivery system based on Gantrez nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 6, n. 9–10, p. 3283–9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17048548>>. .

GÓMEZ, S.; GAMAZO, C.; SAN ROMAN, B.; et al. A novel nanoparticulate adjuvant for immunotherapy with *Lolium perenne*. **Journal of Immunological Methods**, v. 348, n. 1–2, p. 1–8, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.005>>. .

GONÇALVES, L. C. P.; GUIMARÃES, T. C. P.; SILVA, R. M.; et al. Prevalence of food allergy in infants and pre-schoolers in Brazil. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 44, n. 6, p. 497–503, 2016.

GREGORY, A. E.; TITBALL, R.; WILLIAMSON, D. Vaccine delivery using nanoparticles. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. March, p. 13, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3607064&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

GUPTA, R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 32, n. 3, p. 155–172, 1998.

GUPTA, R. S.; SPRINGSTON, E. E.; WARRIER, M. R.; et al. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. **Pediatrics**, v. 128, n. 1, p. e9–e17, 2011.

GUY, B. The perfect mix: Recent progress in adjuvant research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 505–517, 2007.

HAM, A. S.; COST, M. R.; SASSI, A. B.; DEZZUTTI, C. S.; ROHAN, L. C. Targeted delivery of PSC-RANTES for HIV-1 prevention using biodegradable nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 3, p. 502–511, 2009.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2

Immunity. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 29–40, 2015. Elsevier Inc. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.007>>. .

HASEGAWA, M.; INOMATA, N.; YAMAZAKI, H.; et al. Clinical features of four cases with cashew nut allergy and cross-reactivity between cashew nut and pistachio. **Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 58, n. 2, p. 209–15, 2009a. Elsevier Masson SAS. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19240380>>. .

HASEGAWA, M.; INOMATA, N.; YAMAZAKI, H.; et al. Clinical features of four cases with cashew nut allergy and cross-reactivity between cashew nut and pistachio. **Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 58, n. 2, p. 209–15, 2009b. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1323893015306997>>. Acesso em: 22/3/2016.

HOFBAUER, A.; MELNIK, S.; TSCHOFEN, M.; et al. The Encapsulation of Hemagglutinin in Protein Bodies Achieves a Stronger Immune Response in Mice than the Soluble Antigen.

Frontiers in Plant Science, v. 7, n. February, p. 1–9, 2016. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00142/abstract>>. .

HOGENESCH, H. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants.

Frontiers in Immunology, v. 3, n. JAN, p. 1–14, 2012.

HULEATT, J. W.; JACOBS, A. R.; TANG, J.; et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity.

Vaccine, v. 25, n. 4, p. 763–775, 2007.

HURTADO-LÓPEZ, P.; MURDAN, S. An investigation into the adjuvanticity and immunogenicity of zein microspheres being researched as drug and vaccine carriers. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, p. 769–774, 2006.

HWANG, J.; IM, C. Immune Disorders and Its Correlation with Gut Microbiome. , v. 12, n. 4, 2012.

ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; FISHER, A. N.; DAVIS, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced drug delivery reviews**, v. 51, n. 1–3, p. 81–96, 2001. Netherlands.

IRACHE, J. M.; ESPARZA, I.; GAMAZO, C.; AGÜEROS, M.; ESPUELAS, S. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1, p. 47–71, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711003815>>. .

IRACHE, J. M.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Zein nanoparticles as vehicles for oral delivery purposes. **Nanomedicine**, v. 12, n. 11, p. 1209–1211, 2017. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm-2017-0075>>. .

IRACHE, J. M.; HUICI, M.; KONECNY, M.; et al. Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. **Molecules**, v. 10, n. 1, p. 126–145, 2005.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology**. 2001.

JAYAKUMAR, R.; NWE, N.; TOKURA, S.; TAMURA, H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 3, p. 175–181, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813006002029>>. .

JENSEN-JAROLIM, E. Aluminium in Allergies and Allergen immunotherapy. **World Allergy Organization Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://waojournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40413-015-0060-5>>. .

JESUS, S.; SOARES, E.; COSTA, J.; BORCHARD, G.; BORGES, O. Immune response elicited by an intranasally delivered HBsAg low-dose adsorbed to poly- ϵ -caprolactone based nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 504, n. 1–2, p. 59–69, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.013>>. .

JOHANSSON, S. G.; HOURIHANE, J. O.; BOUSQUET, J.; et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, v. 56, n. 9, p. 813–824, 2001.

JONES, S. M.; BURKS, A. W. Food Allergy. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 12, p. 1168–1176, 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcp1611971>>. .

JONES, S. M.; PONS, L.; ROBERTS, J. L.; et al. Clinical efficacy and immune regulation

with peanut oral immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 2, p. 292–300.e97, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.022>>. .

KALKANIDIS, M.; PIETERSZ, G. A.; XIANG, S. D.; et al. Methods for nano-particle based vaccine formulation and evaluation of their immunogenicity. **Methods**, v. 40, n. 1, p. 20–29, 2006.

KALLIOMÄKI, M. The role of microbiota in allergy. **Annales Nestle**, v. 67, n. 1, p. 19–25, 2009.

KARCH, C. P.; BURKHARD, P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. **Biochemical Pharmacology**, v. 120, n. 6, p. 1–14, 2016.

KEET, C. A.; FRISCHMEYER-GUERRERIO, P. A.; WESSEL, F.; et al. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 20, n. 1, p. 66–67, 2012.

KIDD, P. Th1 / Th2 Balance Th1 / Th2 Balance : The Hypothesis , its Limitations , and Implications for Health and Disease. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 223–242, 2003. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/profile/Parris_Kidd2/publication/10591467_Th1Th2_Balance_The_Hypothesis_its_Limitations_and_Implications_for_Health_and_Disease/links/56f9fe5e08ae7c1fda311e3c/Th1-Th2-Balance-The-Hypothesis-its-Limitations-and-Implications-for>. .

KLIPPSTEIN, R.; POZO, D. Nanotechnology-based manipulation of dendritic cells for enhanced immunotherapy strategies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 4, p. 523–529, 2010. Elsevier Inc. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2010.01.001>>. .

KOLLMANN, D.; GEROLDINGER-SIMIC, M.; KINACIYAN, T.; et al. Recombinant Mal d 1 is a reliable diagnostic tool for birch pollen allergen-associated apple allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 4, p. 1008–1010, 2013.

KONDRASHOVA, A.; SEISKARI, T.; ILONEN, J.; KNIP, M.; HYÖTY, H. The “Hygiene hypothesis” and the sharp gradient in the incidence of autoimmune and allergic diseases between Russian Karelia and Finland. **APMIS**, v. 121, n. 6, p. 478–493, 2013.

KOOL, M.; SOULLIÉ, T.; NIMWEGEN, M. VAN; et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 4, p. 869–882, 2008. Disponível em:

<<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20071087>>. .

KRAMER, A.; BEKESCHUS, S.; BR, B. M. Maintaining health by balancing microbial exposure and prevention of infection : the hygiene hypothesis versus the hypothesis of early immune challenge. , v. 83, p. 29–34, 2013.

KRAMER, M. F.; HEATH, M. D. Aluminium in allergen-specific subcutaneous immunotherapy - A German perspective. **Vaccine**, v. 32, n. 33, p. 4140–4148, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.063>>. .

KULIS, M.; WRIGHT, B. L.; JONES, S. M.; BURKS, A. W. Diagnosis, management, and investigational therapies for food allergies. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1132–1142, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.01.034>>. .

KWON, Y. J.; JAMES, E.; SHASTRI, N.; FRECHET, J. M. J. In vivo targeting of dendritic cells for activation of cellular immunity using vaccine carriers based on pH-responsive microparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 51, p. 18264–18268, 2005. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0509541102>>. .

LA FUENTE, M. DE; CSABA, N.; GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. Nanoparticles as protein and gene carriers to mucosal surfaces. **Nanomedicine**, v. 3, n. 6, p. 845–857, 2008. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17435889.3.6.845>>. .

LAMALLE-BERNARD, D.; MUNIER, S.; COMPAGNON, C.; et al. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 1, p. 57–67, 2006.

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

LEE, S.; KIM, Y. C.; PARK, J. H. Zein-alginate based oral drug delivery systems: Protection and release of therapeutic proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, n. 1–2, p. 300–306, 2016. Elsevier B.V. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.023>>. .

LIU, A. H. Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.012>>. .

LONGHI, M. P.; TRUMPFHELLER, C.; IDOYAGA, J.; et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 7, p. 1589–1602, 2009.

Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20090247>>. .

LONGO, G.; BERTI, I.; BURKS, A. W.; KRAUSS, B.; BARBI, E. IgE-mediated food allergy in children. **The Lancet**, v. 382, n. 9905, p. 1656–1664, 2013. Elsevier Ltd.

Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60309-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60309-8)>. .

LUBBEN, I. M. VAN DER; VERHOEF, J. C.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E.

Chitosan for mucosal vaccination. **Advanced drug delivery reviews**, v. 52, n. 2, p. 139–144, 2001. Netherlands.

LUYT, D.; BALL, H.; KIRK, K.; STIEFEL, G. Diagnosis and management of food allergy in children. **Paediatrics and Child Health**, 2016. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751722216000561>>. Acesso em: 22/3/2016.

MA, L.; DANOFF, T. M.; BORISH, L. Case fatality and population mortality associated with anaphylaxis in the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1075–1083, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.10.029>>. .

MALLAPRAGADA, S. K.; NARASIMHAN, B. Immunomodulatory biomaterials.

International Journal of Pharmaceutics, v. 364, n. 2, p. 265–271, 2008.

MASTHOFF, L. J. N.; MATTSSON, L.; ZUIDMEER-JONGEJAN, L.; et al. Sensitization to Cor a 9 and Cor a 14 is highly specific for a hazelnut allergy with objective symptoms in Dutch children and adults. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 2, p. 393–399, 2013.

MATRICARDI, P. M. 99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: Controversial aspects of the “hygiene hypothesis.” *Clinical and Experimental Immunology*. **Anais...** . v. 160, p.98–105, 2010.

MATTISON, C. P.; BREN-MATTISON, Y.; VANT-HULL, B.; et al. Heat-induced alterations in cashew allergen solubility and IgE binding. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 244–251, 2016. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214750015300986>>. .

MCGOWAN, E. C.; KEET, C. A. Prevalence of self-reported food allergy in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 5, 2013.

MOINGEON, P. Adjuvants for allergy vaccines. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 8, n. 10, p. 1492–1498, 2012.

MOINGEON, P.; MASCARELL, L. Differences and similarities between sublingual immunotherapy of allergy and oral tolerance. **Seminars in Immunology**, v. 30, n. May, p. 52–60, 2017.

MOJSILOVIĆ, S. B. Immunological Effects of Adjuvants, Their Mechanisms, and Relevance to Vaccine Safety. **Pedijatrija Danas: Pediatrics Today**, v. 13, n. 1, p. 30–41, 2017.

MONERET-VAUTRIN; RANCE; KANNY; et al. Food allergy to peanuts in France—evaluation of 142 observations. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 28, n. 9, p. 1113–1119, 1998. Blackwell Science Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00370.x>>. .

MORENO, L. C. G. E I.; PUERTA, E.; SUÁREZ-SANTIAGO, J. E.; et al. Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 517, n. 1–2, p. 50–57, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517316311243>>. .

MUQAKU, B.; SLANY, A.; BILECK, A.; KREUTZ, D.; GERNER, C. Quantification of cytokines secreted by primary human cells using multiple reaction monitoring: evaluation of analytical parameters. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 21, p. 6525–6536, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00216-015-8817-9>>. .

MURARO, A.; AGACHE, I.; CLARK, A.; et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Managing patients with food allergy in the community. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 8, p. 1046–1057, 2014.

MURARO, A.; WERFEL, T.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Diagnosis and management of food allergy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 8, p. 1008–1025, 2014.

NELSON, H. S.; MAKATSORI, M.; CALDERON, M. A. Subcutaneous Immunotherapy and Sublingual Immunotherapy: Comparative Efficacy, Current and Potential Indications, and Warnings--United States Versus Europe. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 13–24, 2016. United States.

NIAID. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States.

Clinical and Translational Allergy, v. 1, n. 5, p. 44, 2010. Disponível em:

<<http://www.nih.gov/about/index.html#mission.htm%5Cnhttp://www.biomedcentral.com/content/pdf/2045-7022-1-S1-S10.pdf>>. .

NOON, L. PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST HAY FEVER. **The Lancet**, v. 177, n. 4580, p. 1572–1573, 2017. Elsevier. Disponível em:

<[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)78276-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)78276-6)>. .

NOORBAKHSH, R.; MORTAZAVI, S. A.; SANKIAN, M.; et al. Pistachio Allergy-Prevalence and In vitro Cross-Reactivity with Other Nuts. **Allergology International**, v. 60, n. 4, p. 425–432, 2011.

NOWAK-WĘGRZYN, A.; ALBIN, S. Oral immunotherapy for food allergy: Mechanisms and role in management. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 45, n. 2, p. 368–383, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077670>>. .

NWARU, B. I.; HICKSTEIN, L.; PANESAR, S. S.; et al. Prevalence of common food allergies in Europe: A systematic review and meta-analysis. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 8, p. 992–1007, 2014.

O’SULLIVAN, M. D.; SOMERVILLE, C. Cosensitization to orange seed and cashew nut. **Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 107, n. 3, p. 282–3, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1081120611004248>>. Acesso em: 22/3/2016.

OCHOA, J.; IRACHE, J. M.; TAMAYO, I.; et al. Protective immunity of biodegradable nanoparticle-based vaccine against an experimental challenge with *Salmonella Enteritidis* in

mice. **Vaccine**, v. 25, n. 22, p. 4410–4419, 2007.

OJER, P.; CERAIN, A. L. DE; ARESES, P.; PENUELAS, I.; IRACHE, J. M. Toxicity studies of poly(anhydride) nanoparticles as carriers for oral drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 9, p. 2615–2627, 2012.

OKADA, H.; KUHN, C.; FEILLET, H.; BACH, J. F. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: An update. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 1, p. 1–9, 2010.

OLOGUNDE, M. O.; OMOSEBI, M. O.; ARIYO, O.; OLUNLADE, B. A.; ABOLAJI, R. A. **Preliminary nutritional evaluation of cashew nuts from different locations in Nigeria**. 2011.

OSBORNE, N. J.; KOPLIN, J. J.; MARTIN, P. E.; et al. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 668–676, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.039>>. .

PAHR, S.; CONSTANTIN, C.; PAPADOPOULOS, N. G.; et al. α -Purothionin, a new wheat allergen associated with severe allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 4, 2013.

PALOMARES, O.; AKDIS, M.; MARTÍN-FONTECHA, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. **Immunological Reviews**, v. 278, n. 1, p. 219–236, 2017.

PARK, K. The Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back. **J Control Release**, v. 28, n. 190, p. 3–8, 2015.

PASQUALE, A.; PREISS, S.; SILVA, F.; GARÇON, N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. **Vaccines**, v. 3, n. 2, p. 320–343, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-393X/3/2/320/>>. .

PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 450–458, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2014.08.001>>. .

PATEL, B. Y.; VOLCHECK, G. W. Food Allergy: Common Causes, Diagnosis, and

Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 10, p. 1411–1419, 2015. Elsevier Inc.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.07.012>>. .

PÉAN, J. M.; VENIER-JULIENNE, M. C.; FILMON, R.; et al. Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, n. 1, p. 105–115, 1998.

PENALVA, R.; ESPARZA, I.; LARRANETA, E.; et al. Zein-Based Nanoparticles Improve the Oral Bioavailability of Resveratrol and Its Anti-inflammatory Effects in a Mouse Model of Endotoxic Shock. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 5603–5611, 2015.

PENALVA, R.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J.; GAMAZO, C.; ESPARZA, I.; IRACHE, J. M. Zein nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 103–110, 2017. Elsevier Inc.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.033>>. .

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunology and Cell Biology**, v. 82, p. 488–496, 2004.

PFAAR, O.; CAZAN, D.; KLIMEK, L.; LARENAS-LINNEMANN, D.; CALDERON, M. A. Adjuvants for immunotherapy. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 12, n. 6, p. 648–657, 2012. United States.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503–514, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000400003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. .

POHLIT, H.; BELLINGHAUSEN, I.; FREY, H.; SALOGA, J. Recent advances in the use of nanoparticles for allergen-specific immunotherapy. **Allergy**, , n. April, p. 1461–1474, 2017.
Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/all.13199>>. .

PONGRACIC, J. A.; BOCK, S. A.; SICHERER, S. H. Oral food challenge practices among allergists in the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 2, p. 564–566, 2012.

RANCÉ, F.; BIDAT, E.; BOURRIER, T.; SABOURAUD, D. Cashew allergy: Observations of 42 children without associated peanut allergy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 58, n. 12, p. 1311–1314, 2003.

REBOUÇAS, J. D. S.; IRACHE, J. M.; CAMACHO, A. I.; et al. Development of poly(anhydride) nanoparticles loaded with peanut proteins: The influence of preparation method on the immunogenic properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 2, p. 241–249, 2012.

REDDY, S. T.; SWARTZ, M. A.; HUBBELL, J. A. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 12, p. 573–579, 2006.

RIEUX, A. DES; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER, Y. J.; PR??AT, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 1–27, 2006.

ROBOTHAM, J. M.; WANG, F.; SEAMON, V.; et al. Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 6, p. 1284–1290, 2005.

ROBOTHAM, J. M.; WANG, F.; SEAMON, V.; et al. Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 115, n. 6, p. 1284–90, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674905004227>>. Acesso em: 22/3/2016.

ROBOTHAM, J. M.; WANG, F.; TEUBER, S. S.; SATHE, S. K.; ROUX, K. H. Ana o 2, a major cashew nut allergen of the legumin family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. S249, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674903808849>>. Acesso em: 22/3/2016.

ROBOTHAM, J. M.; XIA, L.; WILLISON, L. N.; et al. Characterization of a cashew allergen, 11S globulin (Ana o 2), conformational epitope. **Molecular immunology**, v. 47, n. 9, p. 1830–8, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589009008657>>. Acesso em:

22/3/2016.

ROOK, G. A. W. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: The broader implications of the hygiene hypothesis. **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 3–11, 2009.

S. REBOUÇAS, J. DE; IRACHE, J. M.; CAMACHO, A. I.; et al. Immunogenicity of peanut proteins containing poly(anhydride) nanoparticles. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 8, p. 1106–1112, 2014.

SALMAN, H. H.; GAMAZO, C.; CAMPANERO, M. A.; IRACHE, J. M. Salmonella-like bioadhesive nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 106, n. 1–2, p. 1–13, 2005.

SALMAN, H. H.; GAMAZO, C.; SMIDT, P. C. DE; RUSSELL-JONES, G.; IRACHE, J. M. Evaluation of bioadhesive capacity and immunoadjuvant properties of vitamin B12-Gantrez nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 12, p. 2859–2868, 2008.

SANDERS, M. T.; BROWN, L. E.; DELIYANNIS, G.; PEARSE, M. J. ISCOM-based vaccines: the second decade. **Immunology and cell biology**, v. 83, n. 2, p. 119–128, 2005. England.

SCHÖLL, I.; KOPP, T.; BOHLE, B.; JENSEN-JAROLIM, E. Biodegradable PLGA Particles for Improved Systemic and Mucosal Treatment of Type I Allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 349–364, 2006.

SCHÖLL, I.; WEISSENBO, A.; FÖRSTER-WALDL, E.; et al. Allergen-loaded biodegradable poly (D , L -lactic-co-glycolic) acid nanoparticles down-regulate an ongoing Th2 response in the BALB / c mouse model. **Clin Exp Allergy**, p. 315–321, 2004.

SHEN, H.; ACKERMAN, A. L.; CODY, V.; et al. Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles. **Immunology**, v. 117, n. 1, p. 78–88, 2006.

SICHERER, S. H. Epidemiology of food allergy. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL**, v. 127, n. 3, p. 185–195, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <doi:10.1016/j.jaci.2010.11.044>. .

SICHERER, S. H.; FURLONG, T. J.; MUÑOZ-FURLONG, A.; BURKS, A. W.; SAMPSON, H. A. A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: Characteristics of the first 5149 registrants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 1, p. 128–

132, 2001.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 2, p. 291–307.e5, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.020>>. .

SICHERER, S. H.; WOOD, R. A. Advances in diagnosing peanut allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2012.10.004>>. .

SILVA, D. DE; GEROMI, M.; PANESAR, S. S.; et al. Acute and long-term management of food allergy: Systematic review. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 2, p. 159–167, 2014.

SIMONS, F. E. R.; ARDUSSO, L. R. F.; BILÒ, M. B.; et al. International consensus on (ICON) anaphylaxis. , p. 1–19, 2014.

SIMONS, F. E. R.; ARDUSSO, L. R. F.; DIMOV, V.; et al. World allergy organization anaphylaxis guidelines: 2013 update of the evidence base. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 162, n. 3, p. 193–204, 2013. World Allergy Organization Journal. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40413-015-0080-1>>. .

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-??-caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 2004.

SOLÉ, D.; IVANCEVICH, J. C.; BORGES, M. S.; et al. Anaphylaxis in Latin American children and adolescents: The Online Latin American Survey on Anaphylaxis (OLASA). **Allergologia et Immunopathologia**, v. 40, n. 6, p. 331–335, 2012.

SOLE, P. DE; ROSSI, C.; CHIARPOTTO, M.; et al. Possible relationship between Al/ferritin complex and Alzheimer's disease. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 1–2, p. 89–93, 2013. The Canadian Society of Clinical Chemists. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.10.023>>. .

SOLLER, L.; BEN-SHOSHAN, M.; HARRINGTON, D. W.; et al. Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 4, p. 986–988, 2012.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1, p. 1–20, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365900003394>>. .

SOUZA REBOUÇAS, J. DE; ESPARZA, I.; FERRER, M.; et al. Nanoparticulate adjuvants and delivery systems for allergen immunotherapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **Bmj**, v. 299, n. 6710, p. 1259–1260, 1989. Disponível em: <<http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.299.6710.1259>>. .

SUN, J.; ARIAS, K.; ALVAREZ, D.; et al. Impact of CD40 Ligand, B Cells, and Mast Cells in Peanut-Induced Anaphylactic Responses. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 10, p. 6696–6703, 2007. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/179/10/6696.full>>. .

TAMAYO, I.; IRACHE, J. M.; MANSILLA, C.; et al. Poly(anhydride) nanoparticles act as active Th1 adjuvants through toll-like receptor exploitation. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 9, p. 1356–1362, 2010.

TARIQ, S. M.; STEVENS, M.; MATTHEWS, S.; et al. Cohort study of peanut and tree nut sensitisation by age of 4 years. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 313, n. 7056, p. 514–7, 1996. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2351897&tool=pmcentrez&render_type=abstract>. .

TAVERNIER, G.; FLETCHER, G.; GEE, I.; et al. IPEADAM study: Indoor endotoxin exposure, family status, and some housing characteristics in English children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 3, p. 656–662, 2006.

TAYLOR, S. L.; HEFLE, S. L.; BINDSLEV-JENSEN, C.; et al. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: How much is too much? **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, n. 5, p. 689–695, 2004.

TEUBER, S. S.; SATHE, S. K.; PETERSON, W. R.; ROUX, K. H. Characterization of the soluble allergenic proteins of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6543–6549, 2002.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; SRIWASTAWA, B.; et al. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 2–11, 2012. India: Medknow Publications & Media Pvt Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3465154/>>. .

TORCHILIN, V. Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers: Development of the Concept BT - Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers. In: V. Torchilin (Ed.); . p.1–32, 2008. New York, NY: Springer New York. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-76554-9_1>. .

TORCHILIN, V. P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 11, p. 813–827, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd4333>>. .

TURNBULL, J. L.; ADAMS, H. N.; GORARD, D. A. Review article: The diagnosis and management of food allergy and food intolerances. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 1, p. 3–25, 2015.

UPHOFF, E.; CABIESES, B.; PINART, M.; et al. A systematic review of socioeconomic position in relation to asthma and allergic diseases. **European Respiratory Journal**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00114514>>. .

VALENTA, R.; HOCHWALLNER, H.; LINHART, B.; PAHR, S. Food Allergies : The Basics. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1120–1131.e4, 2015. Elsevier, Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.02.006>>. .

VALK, J. P. M. VAN DER; J. DUBOIS, A. E.; GERTH VAN WIJK, R.; WICHERS, H. J.; JONG, N. W. DE. Systematic review on cashew nut allergy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 6, p. 692–698, 2014.

VANDAMME, K.; MELKEBEEK, V.; COX, E.; et al. Influence of polymer hydrolysis on adjuvant effect of Gantrez-AN nanoparticles: Implications for oral vaccination. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 392–398, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.05.005>>. .

VILA, A.; GILL, H.; MCCALLION, O.; ALONSO, M. J. Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: Effect of particle size and PEG coating density. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n. 2, p. 231–244, 2004.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; ÉVORA, C.; et al. PLA-PEG particles as nasal protein carriers: The influence of the particle size. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 292, n. 1–2, p. 43–52, 2005.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 78, n. 1–3, p. 15–24, 2002.

WANG, F.; ROBOTHAM, J. M.; TEUBER, S. S.; et al. Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidentale*) allergen of the vicilin seed storage protein family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 1, p. 160–166, 2002a.

WANG, F.; ROBOTHAM, J. M.; TEUBER, S. S.; et al. Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidentale*) allergen of the vicilin seed storage protein family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 1, p. 160–166, 2002b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674902000568>>. Acesso em: 22/3/2016.

WANG, F.; ROBOTHAM, J. M.; TEUBER, S. S.; SATHE, S. K.; ROUX, K. H. Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 132, n. 1, p. 27–39, 2003.

WANG, W.; SINGH, M. Selection of Adjuvants for Enhanced Vaccine Potency. **World Journal of Vaccines**, v. 01, n. 02, p. 33–78, 2011. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/wjv.2011.12007>>. .

WANG, X.; UTO, T.; AKAGI, T.; AKASHI, M.; BABA, M. Induction of potent CD8⁺ T-cell responses by novel biodegradable nanoparticles carrying human immunodeficiency virus type 1 gp120. **Journal of virology**, v. 81, n. 18, p. 10009–16, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2045421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

WASHINGTON, K. E.; KULARATNE, R. N.; KARMEGAM, V.; BIEWER, M. C.; STEFAN, M. C. Recent advances in aliphatic polyesters for drug delivery applications. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 9, n. 4, p. e1446–n/a, 2017. John Wiley & Sons, Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/wnan.1446>>. .

WAWRZYNIAK, P.; AKDIS, C. A.; FINKELMAN, F. D.; ROTHENBERG, M. E. Advances

and highlights in mechanisms of allergic disease in 2015. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 6, p. 1681–1696, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.010>>. .

WHEELER, A. W.; WORONIECKI, S. R. Immunological adjuvants in allergy vaccines: Past, present and future. **Allergology International**, v. 50, n. 4, p. 295–301, 2001. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1592.2001.00230.x>>. .

WILCOCK, L. K.; FRANCIS, J. N.; DURHAM, S. R. Aluminium hydroxide down-regulates T helper 2 responses by allergen-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, n. 9, p. 1373–1378, 2004. Blackwell Science Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02052.x>>. .

WILLISON, L. N.; TAWDE, P.; ROBOTHAM, J. M.; et al. Pistachio vicilin, Pis v 3, is immunoglobulin E-reactive and cross-reacts with the homologous cashew allergen, Ana o 1. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 7, p. 1229–1238, 2008.

WILLISON, L. N.; TAWDE, P.; ROBOTHAM, J. M.; et al. Pistachio vicilin, Pis v 3, is immunoglobulin E-reactive and cross-reacts with the homologous cashew allergen, Ana o 1. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 7, p. 1229–1238, 2008. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02998.x>>. .

WORM, M.; MONERET-VAUTRIN, A.; SCHERER, K.; et al. First European data from the network of severe allergic reactions (NORA). **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, n. 10, p. 1397–1404, 2014.

YONCHEVA, K.; GOMEZ, S.; CAMPANERO, M. A.; GAMAZO, C.; IRACHE, J. M. Bioadhesive properties of pegylated nanoparticles. **Expert opinion on drug delivery**, v. 2, n. 2, p. 205–218, 2005. England.

ZHAO, L.; SETH, A.; WIBOWO, N.; et al. Nanoparticle vaccines. **Vaccine**, v. 32, n. 3, p. 327–337, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>>. .