



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Isabella Lima Siman

**Atividade bloqueadora de anticorpos IgG específicos purificados
de soros de pacientes atópicos a ácaros sobre a reatividade de IgE
a *Dermatophagoides pteronyssinus* por ELISA inibição**

Isabella Lima Siman

**Atividade bloqueadora de anticorpos IgG específicos purificados
de soros de pacientes atópicos a ácaros sobre a reatividade de IgE
a *Dermatophagoides pteronyssinus* por ELISA inibição**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Orientador

Uberlândia - MG
Junho – 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S588a Siman, Isabella Lima, 1987-
2013 Atividade bloqueadora de anticorpos IgG específicos purificados de soros de pacientes atópicos a ácaros sobre a reatividade de IgE a *Dermatophagoides pteronyssinus* por ELISA inibição / Isabella Lima Siman. -- 2013.
79 f.
- Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.
1. Ciências médicas - Teses. 2. Ácaro - Teses. 3. *Dermatophagoides pteronyssinus* - Teses. 4. Imunoglobulinas - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 215/PPCSA

Data: 22 de junho de 2013 /Área de concentração: Ciências da Saúde

Discente aluna **ISABELLA LIMA SIMAN** – Matrícula nº 11112CSD014

Título do Trabalho: ***“Atividade Bloqueadora de Anticorpos IgG específicos purificados de soros de pacientes atópicos a ácaros sobre a reatividade de IgE a Dermatophagoides pteronyssinus por ELISA inibição”***. Às 09:00 horas do dia 22 de junho do ano de 2013, no Anfiteatro do Bloco 4G - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Profa. Dra. Rosângela Maria Rodrigues (UFG), Profa. Dra. Neide Maria da Silva (UFU), Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi (UFU) – orientador da discente. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa o Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi (UFU) apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata aprovada. Esta defesa Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 13:00 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi _____

Profa. Dra. Rosângela Maria Rodrigues _____

Profa. Dra. Neide Maria da Silva _____

*Aos meus pais, Carlos e Sonia, meus
maiores incentivadores e exemplos de
amor, integridade e perseverança.*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, com apoio financeiro das agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, as quais possibilitaram a aquisição dos equipamentos e materiais fundamentais para o desenvolvimento do mesmo.

AGRADECIMENTOS

“Cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós”. São muitos aos quais devo eterna gratidão, por mais esse projeto concluído.

Agradeço a Deus, por iluminar minha jornada e me dar forças para seguir sempre em frente;

À minha família, em especial aos meus pais Carlos e Sonia, e aos meus irmãos Carlos Bernard e Gabriel, por entenderem minha ausência em vários momentos e pelo apoio e dedicação constantes.

Ao meu querido namorado e companheiro de trabalho, Dr. Leandro Ynoue, pelos preciosos ensinamentos, carinho, paciência e dedicação em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, pela confiança e oportunidade de crescimento pessoal e profissional durante este período;

À Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, minha querida “mãe científica”, pela atenção, generosidade e auxílio científico/pessoal imensurável;

Ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, pelas palavras de incentivo e sugestões valiosas;

Às Profas. Dras. Rosângela Maria Rodrigues e Neide Maria Silva, por disporem do seu tempo e terem aceitado compor a Banca Examinadora, contribuindo para o aprimoramento do trabalho;

Aos pacientes e a todos os outros voluntários pela atitude altruísta em aceitarem participar do estudo;

À Lais Aquino, pela amizade, ajuda, alegrias e frustrações compartilhadas a cada resultado, durante toda a execução do trabalho;

Aos que já passaram e aos que ainda compõem o grupo da Alergia: Bárbara Godoi, Bianca Uliana, Daniela Beraldo, Helena Maria (Bia) Acerbi, Juliana Miranda, Karine Almeida, Laura Fontes, Letícia Delfini, Meimei Queirós, Núbia Araújo, Vinícius Caraschi; e também ao Grupo da Imunoparasitologia, em especial à Dra. Ana Cláudia Pajuaba, pelos momentos compartilhados e também pela amizade e disponibilidade em auxiliar e colaborar de maneira significativa com a realização do trabalho;

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia: Edilge, Max, Marley e Zilda, pela atenção e auxílio de grande valia;

A todos os amigos queridos, em especial à Maria Clara Alcântara, Moara Lima, Naiara Baranzeli e Vívian Rezende; agradeço pelo incentivo, energia positiva, conselhos e força nas dificuldades;

Às companheiras de república: Aline Tolardo, Aline Sicari, Juliana Helou e Mariana Alves, pelo carinho e amizade sincera adquiridos nesses anos de convivência próxima;

Aos colegas de graduação da 1ª turma de Biomedicina: Bruna Barbosa, Caroline Martins, Everton Ribeiro, Marcela Davoli, Patrícia Terra e Sabrina Royer, por todos esses anos de muita luta, alegrias, amizade verdadeira e companheirismo.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Gisele e Viviane, pela eficiência, atenção e pronto atendimento durante todo o mestrado.

“Se fiz descobertas valiosas foi mais por ter paciência do que qualquer outro talento.”
(Isaac Newton)

RESUMO

Uma das propostas da imunoterapia alérgeno específica é a de modular a resposta imune humoral contra alérgenos, com aumento significativo nos níveis de IgG1 e IgG4 específicos. Esses anticorpos estão associados com uma atividade bloqueadora, impedindo a ligação de anticorpos IgE ao alérgeno e levando a uma redução nas respostas inflamatórias. Esse estudo objetivou investigar a atividade bloqueadora, *in vitro*, de anticorpos IgG específicos sobre a reatividade de IgE a *D. pteronyssinus* (Dpt) em soros de pacientes atópicos. Anticorpos IgG específicos foram obtidos de soros de pacientes atópicos, e IgG irrelevante a partir de soros de não atópicos, e depois purificados por precipitação com sulfato de amônio, seguido de cromatografia de afinidade em Proteína G-agarose. A pureza desses anticorpos foi avaliada por SDS-PAGE, a imunoreatividade por ensaios de *slot-blot* e *immunoblot*, e a atividade bloqueadora por ELISA inibição. O perfil eletroforético, após precipitação com sulfato de amônio, mostrou um enriquecimento de proteínas de alto peso molecular na fração precipitada, e bandas fortemente coradas na fração ligante após a cromatografia, compatíveis com o peso molecular de IgG humana. Foi detectada uma forte imunoreatividade para IgG, leve para IgA, e nenhuma reatividade para IgE e IgM. A Fração IgG específica foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IgE anti-Dpt, resultando em 35-51% de inibição da reatividade de IgE a Dpt em *pools* de soros de pacientes atópicos. Anticorpos IgG específicos purificados, através de uma metodologia disponível e padronizada, são capazes de inibir a reatividade de IgE ao extrato alérgênico Dpt. Além da melhoria da sintomatologia clínica, considerada um parâmetro subjetivo, essa abordagem reforça que a avaliação intermitente de anticorpos IgG alérgeno-específicos pode ser uma ferramenta importante, auxiliando especialistas a acompanharem seus pacientes em processo de imunoterapia específica.

Palavras-chave: ácaros da poeira domiciliar, *Dermatophagoides pteronyssinus*, anticorpos bloqueadores, IgG1, IgG4, IgE.

ABSTRACT

One of the purposes of allergen-specific immunotherapy (SIT) is to modulate the humoral immune response against allergens with significant increases in allergen-specific IgG1 and IgG4 levels. These antibodies are associated with blocking activity by preventing IgE binding to allergen and leading to reduced inflammatory responses. This study aimed to investigate *in vitro* blocking activity of allergen-specific IgG antibodies on IgE reactivity to *D. pteronyssinus* (Dpt) in sera from atopic patients. Dpt-specific IgG antibodies were obtained from atopic sera and irrelevant IgG from non-atopic sera. IgG antibodies were purified by ammonium sulfate precipitation followed by Protein-G affinity chromatography and evaluated with regards to purity by SDS-PAGE and immunoreactivity by slot-blot and immunoblot assays. The blocking activity was evaluated by inhibition ELISA. The electrophoretical profile after salting-out precipitation showed an enrichment of high molecular weight proteins in the precipitated fraction and strongly stained bands in the ligand fraction after chromatography, compatible with molecular weight of human IgG. It was detected strong immunoreactivity to IgG, negligible to IgA, and no reactivity to IgE and IgM. Dpt-specific IgG fraction was capable to significantly reduce levels of IgE anti-Dpt, resulting in 35-51% inhibition of IgE reactivity to Dpt in atopic patient sera. Allergen-specific IgG antibodies purified using available and standardized methodology are able to inhibit IgE reactivity to Dpt allergen extract. In addition to the clinical symptoms improvement (subjective parameter), this approach reinforces that the intermittent measurement of serum allergen-specific IgG antibodies will be an important objective laboratorial parameter that will help specialists to follow their patients under SIT.

Keywords: house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, blocking antibodies, IgG1, IgG4, IgE.

LISTA DE ILUTRAÇÕES

Fluxograma 1 - Ações de triagem dos pacientes e classificação das amostras em subgrupos para confecção de <i>pools</i> representativos.	31
Fluxograma 2 - Ações de isolamento das imunoglobulinas IgG.	31
Figura 1 – Níveis de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> determinados por ELISA em soros de pacientes atópicos e não atópicos, expressos em Índice ELISA (I.E).	42
Figura 2 – Comparação entre os níveis de IgG1 e IgG4 anti- <i>D. pteronyssinus</i> em soros de pacientes atópicos e não atópicos para seleção dos soros (n = 5) utilizados na constituição dos <i>pools</i> Dpt-específico e Dpt-inespecífico, respectivamente.	43
Figura 3 – Perfil da precipitação dos <i>pools</i> de soros por sulfato de amônio a 40%.	45
Figura 4 – Perfil da cromatografia de afinidade em Proteína G-agarose.	46
Figura 5 – <i>Immunoblot</i> para detecção das diferentes classes de anticorpos, após purificação de IgG humana total por cromatografia em Proteína G-agarose.	47
Figura 6 – Níveis de IgG1 (A), IgG4 (B) e IgE (C) específicos ao extrato alergênico de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Dpt) nas frações IgG específica (Espec.) e irrelevante (Irrelev.) purificadas obtidas a partir de <i>pools</i> de soros de pacientes atópicos e não atópicos, respectivamente, determinados por ELISA.	48
Figura 7 – Resultados do ELISA inibição mostrando a capacidade bloqueadora dos anticorpos IgG específico e irrelevante sobre a reatividade de IgE ao extrato alergênico de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Dpt) em pools de soros de pacientes atópicos.	50
Figura 8 – Níveis de citocinas IL-4 (A), IFN- γ (B) e IL-10 (C) determinados por CBA (BD Pharmingen) em sobrenadante de cultura de sangue total após 48 horas de incubação em três grupos de pacientes atópicos.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados clínicos e demográficos dos pacientes participante do estudo.	41
Tabela 2 – Perfil de reatividade para IgE, IgG1 e IgG4 específicos a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> em <i>pools</i> de soros de indivíduos atópicos (n=5) e não atópicos (n=5).	44
Tabela 3 – Perfil de reatividade de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> em três <i>pools</i> de soros (I, II e III) de pacientes atópicos com diferentes positivities para as classes de anticorpos.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3 etilbenzotiazolino-6 sulfônico (2,2'- <i>azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i>)
APC	Célula Apresentadora de Antígeno (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
APS	Persulfato de amônia
Bet v 1	Alérgeno de <i>Betula verrucosa</i> do grupo 1
BSA	Soro albumina bovina
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	Grupo de Diferenciação (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos
DAB	3,3' - diaminobenzidina
Der p	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Dpt	Extrato total de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
D.O.	Densidade óptica
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
Espec.	Fração IgG específica
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade do tipo I
FcεRII	Receptor de IgE de baixa afinidade do tipo II
FL	Fração ligante à proteína G
FNL	Fração não ligante à proteína G
FR	Fator Reumatóide
I.E.	Índice ELISA
IFN - γ	Interferon gamma
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da classe G subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina da classe G subclasse 4
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL	Interleucina
Irrelev.	Fração IgG irrelevante

ISAAC	Estudo Internacional da Asma e Alergias na Infância (<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
P 40%	Fração precipitada após precipitação com sulfato de amônio a 40%
Phl p 1	Alérgeno de <i>Phleum pratense</i> do grupo 1
PM	Peso molecular
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA a 1%
PBS-T-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e leite desnatado em pó a 5%
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i> (Fitohemaglutinina)
RA	Rinite alérgica
S 40%	Fração sobrenadante após precipitação com sulfato de amônio a 40%
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TCLE	Termo do Consentimento Livre e Esclarecido
TCP	Teste cutâneo de puntura
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina
Tfh	Linfócito T <i>helper</i> folicular
TGF	Fator de transformação de crescimento (<i>Transforming Growth Factor</i>)
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
Th9	Linfócito T <i>helper</i> 9
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
Treg	Linfócito T regulador
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Hidroximetil-aminometano contendo HCl

Tween 20	Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
vs	Versus
WAO	<i>World Allergy Organization</i>

SUMÁRIO

1	Introdução	19
1.1	Doenças alérgicas	19
1.2	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> : principal ácaro da poeira domiciliar	20
1.3	Fisiopatologia da resposta alérgica.....	21
1.4	Imunoterapia e anticorpos bloqueadores	22
2	Objetivos.....	25
3	Material e Métodos	27
3.1	Aspectos éticos e normas de biossegurança	28
3.2	Pacientes e indivíduos controle	28
3.3	Teste cutâneo de puntura (TCP)	29
3.4	Coleta de sangue.....	29
3.5	Teste para fator reumatóide	29
3.6	Fluxograma do trabalho.....	30
3.7	Dosagem proteica e detecção e quantificação de alérgenos no extrato de <i>D. pteronyssinus</i>	32
3.7.1	Dosagem proteica total do extrato comercial de <i>D. pteronyssinus</i>	32
3.7.2	Detecção e quantificação dos alérgenos principais de <i>D. pteronyssinus</i> , Der p 1 e Der p 2, no extrato comercial	32
3.8	ELISA para detecção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos para <i>D. pteronyssinus</i>	33
3.9	Preparação dos <i>pools</i>	34
3.9.1	Purificação da fração gama e beta globulinas por precipitação por sulfato de amônio 40%	35
3.9.2	<i>Slot-blot</i> para análise da presença de imunoglobulinas IgG, IgA, IgE e IgM nas frações sobrenadante e precipitado após precipitação por sulfato de amônio 40%.....	35
3.10	Cromatografia de afinidade em coluna de Proteína G.....	36
3.11	Eletroforese SDS-PAGE e <i>immunoblot</i> para confirmação da purificação de IgG, IgA, IgE e IgM total nas frações obtidas após a cromatografia.....	37
3.11.1	Eletroforese SDS-PAGE.....	37
3.11.2	<i>Immunoblot</i>	38
3.12	Determinação das concentrações ótimas das frações IgG específica e irrelevante	38
3.13	ELISA inibição	39
3.14	Análise estatística	39
4	Resultados.....	40
4.1	Dados clínicos e demográficos dos indivíduos do estudo	41
4.2	Dosagem proteica total e quantificação de alérgenos no extrato de <i>D. pteronyssinus</i> ...	42
4.3	Avaliação dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos a <i>D. pteronyssinus</i>	42

4.4 Seleção dos soros para constituir os <i>pools</i> e purificação das frações gama e beta globulinas	43
4.4.1 Purificação parcial de imunoglobulinas por precipitação com sulfato de amônio ..	44
4.5 Cromatografia de afinidade em coluna de Proteína G-agarose	46
4.5.1 <i>Immunoblot</i>	46
4.6 Níveis de IgG1, IgG4 e IgE específicos a <i>D. pteronyssinus</i> nas frações purificadas	47
4.7 ELISA Inibição	49
5 Discussão	51
6 Conclusões	56
7 Perspectivas futuras	58
7.1 Cultura de sangue total para dosagem de citocinas no sobrenadante por citometria de fluxo 59	
7.2 Análise da detecção de histamina intracelular por citometria de fluxo	60
7.3 Resultados preliminares	61
8 Referências bibliográficas	63
ANEXO A	71
ANEXO B	75
ANEXO C	77

1 Introdução



1.1 Doenças alérgicas

As alergias estão entre as doenças mais prevalentes no mundo, sendo resultado de um rompimento na tolerância imune que os indivíduos normalmente possuem à exposição natural aos antígenos ambientais (CALDERÓN et al., 2010). Dados recentes da Organização Mundial de Alergia (*World Allergy Organization – WAO*) apontam centenas de milhões de pessoas com rinite alérgica no mundo, e estima-se que 300 milhões sofram de asma (PAWANKAR et al., 2012).

A terminologia utilizada para definir conceitos importantes no âmbito das doenças alérgicas ainda é confusa. Faz-se necessário a constante revisão e a colaboração de diversos comitês para a padronização da nomenclatura a ser utilizada não somente por médicos, mas por outros profissionais da saúde, para pesquisa, educação, e até mesmo para o melhor entendimento pelos próprios pacientes e pessoas interessadas em alergia (JOHANSSON et al., 2003).

Sendo assim, a hipersensibilidade pode ser definida como os sintomas ou sinais iniciados após uma exposição a um determinado estímulo cuja dose seria tolerada em pessoas normais. O termo alergia é considerado uma reação de hipersensibilidade, iniciada por mecanismos imunológicos específicos. Pode ser mediada por anticorpos, particularmente do tipo IgE, ou mediada por células, principalmente linfócitos alérgeno-específicos. Em relação à atopia, quando existe uma tendência pessoal e/ou familiar a se tornar sensibilizado, e portanto, há uma produção de anticorpos IgE em resposta à exposição a alérgenos comuns, diz-se que o indivíduo é atópico. Como consequência, esses indivíduos podem desenvolver sintomas característicos de asma, rinoconjuntivite ou eczema, afetando diretamente em sua qualidade de vida e de seus familiares (JOHANSSON et al., 2003).

É importante destacar a relevância de uma adequada história clínica durante a anamnese do paciente no diagnóstico das doenças alérgicas, especialmente as que acometem as vias respiratórias, com destaque para a rinite alérgica e asma.

Clinicamente, a rinite alérgica (RA) é uma doença sintomática das vias aéreas superiores, caracterizada por inflamação mediada por IgE após exposição a um alérgeno através da mucosa nasal (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001). A prevalência de RA no Brasil, de acordo com dados do estudo ISAAC (*International Study on Allergic Diseases in Childhood*), entre crianças com 6 a 7 anos de idade é de 25,7% e, em adolescentes, 29,6%. Os sintomas clássicos são crises de espirro, prurido nasal, obstrução e coriza hialina (CASTRO, 2012).

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores que, em indivíduos susceptíveis, causa episódios recorrentes de sibilância, dispneia, opressão torácica, tosse, particularmente à noite e/ou pela manhã. (LEMANSKE JUNIOR; BUSSE, 2003). No Brasil, estima-se a prevalência da asma em aproximadamente 10%. Em 2012, conforme o DATASUS, cerca de 147 mil internações hospitalares pelo SUS foram devidas à asma.

Os estímulos responsáveis pelas manifestações clínicas ocorrem especialmente contra componentes estranhos ao organismo, de origem proteica em sua maioria, mas podem ser glicoproteínas ou até mesmo carboidratos isolados, comumente conhecidos como alérgenos (HUBY; DEARMAN; KIMBER, 2000; JOHANSSON et al., 2003; MEYER; CO MINH; DEMOLY, 2004). Suas fontes são diversas: alimentos, drogas, venenos de insetos, contactantes (látex, por exemplo), com destaque para os aeroalérgenos, designação esta por serem transportados pelo ar (SMITH et al., 1998), em especial aos antígenos derivados da poeira domiciliar, provenientes de ácaros, baratas, pelos de animais e fungos.

1.2 *Dermatophagoides pteronyssinus*: principal ácaro da poeira domiciliar

Como principal fonte de aeroalérgenos no mundo, estão os ácaros da poeira domiciliar, responsáveis pela sensibilização de mais de 50% dos pacientes alérgicos a esses componentes, em especial os pertencentes à família Pyroglyphidae, do gênero *Dermatophagoides*, destacando-se as espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (BESSOT; PAULI, 2011; JACQUET, 2010).

Geralmente, os alérgenos de ácaros são enzimas associadas ao seu trato digestivo e são encontradas em grande quantidade no corpo e nas partículas fecais (COLLOFF et al., 1992). Entre os alérgenos principais de *D. pteronyssinus* está Der p 1, com reatividade de IgE específica entre 50 a 70% em pacientes alérgicos ao extrato bruto de Dpt, porcentagens essas podendo variar dependendo da região geográfica (BESSOT; PAULI, 2011).

Estudo recente reportou os níveis de exposição em locais públicos e de trabalho a esses ácaros, como hospitais, escritórios, carros, ônibus, hotéis, cinemas, etc. em vários países, apontando que são diversas as fontes (MACAN; KANCELJAK-MACAN; MILKOVIĆ-KRAUS, 2012). Ainda que o ambiente domiciliar seja a principal fonte de ácaros dessa família, fatores como a facilidade do transporte, seja através da pele ou cabelos, umidade, temperatura e condições de alimentação desses locais podem criar um novo

ambiente favorável para o crescimento dos mesmos (MACAN; KANCELJAK-MACAN; MILKOVIĆ-KRAUS, 2012).

No Brasil, na região do Triângulo Mineiro, estudos realizados pelo Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) demonstraram níveis significativos de alérgenos de ácaros da poeira domiciliar em residências (SOPELETE et al., 2000; TERRA et al., 2004), veículos de transporte público (PEREIRA et al., 2005; TAKETOMI et al., 2006), carros particulares (JUSTINO et al., 2005) e hotéis (SIMPLÍCIO et al., 2007).

1.3 Fisiopatologia da resposta alérgica

O tecido epitelial funciona como barreira primária entre o alérgeno e o sistema imune, sendo o primeiro contato, na maioria das vezes, auxiliado por neutrófilos, macrófagos e IgA secretora, os quais atuam como neutralizadores do antígeno na mucosa. Componentes alergênicos remanescentes são então capturados pelas células dendríticas imaturas ou pelas células B, designadas de Células Apresentadoras de Antígenos (do inglês, APC) (FOKKENS, 1999). Nos indivíduos saudáveis, a presença destes componentes induz tolerância imunológica, caracterizada pela ausência de reatividade. Já naqueles que apresentam predisposição genética para desenvolver alergia, este evento pode resultar na polarização dos linfócitos T CD4⁺ *naive* para células T-helper (Th) tipo 2, ou Th2.

O perfil de resposta Th2 é comumente associado à inflamação, no contexto de infecções por helmintos e alergias, mas também induzido por venenos e adjuvantes de vacinas, como o alumínio (COFFMAN et al., 2010). Como características principais da ativação das células Th2 estão a produção de interleucinas (IL), tais como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. As IL-4 e IL-13 ativam as células B induzindo a formação do fator nuclear GATA-3 e se transformam em plasmócitos secretores de IgE. A IgE por sua vez, através da formação de complexos imunes, se liga a receptores de alta afinidade (FcεRI) presentes na superfícies de basófilos e mastócitos, ativando-os. Essas células ativadas passam a secretar diversas citocinas e mediadores inflamatórios tais como histamina, heparina e serotonina, os quais exercem o recrutamento de macrófagos e granulócitos ativados, aumentam a contratilidade do músculo liso e a secreção de muco (PULENDRAN; ARTIS, 2012).

Por mais de uma década e meia, a dicotomia entre os perfis Th1/Th2 prevaleceu. A diferença entre eles seria devido principalmente às citocinas produzidas e moléculas expressas

nas superfícies das células. Classicamente, o perfil Th1 é identificado como produtor de IFN- γ e TNF- β , mas também produz IL-2. Já as células Th2 são reconhecidas por produzirem principalmente IL-4, IL-5 e IL-13, mas também produzem IL-9 (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

Outra subpopulação de células T bem caracterizada é a chamada Treg (células T reguladoras) que são caracterizadas por sua capacidade de secreção de IL-10 e TGF- β . Elas possuem a habilidade de controlar e modificar o desenvolvimento das doenças alérgicas alterando algumas das principais vias de sensibilização bem como as fases efetoras da resposta (PALOMARES, et al., 2010). Acredita-se que Treg contribui para controlar a resposta imune inflamatória alérgica de vários modos: supressão de APCs indutoras de células T efectoras; supressão de células Th2 e Th1; supressão de mastócitos, basófilos e eosinófilos; supressão da síntese de anticorpos IgE e indução de anticorpos IgG4 (AKDIS; AKDIS, 2007; MEILER et al., 2008; NANDAKUMAR; MILLER; KUMARAGURU, 2009).

A população de células T CD4 produtoras de IL-17A, IL-17F, e IL-22 é designada como Th17, importante para as reações imunes mediadas por neutrófilos contra microrganismos extracelulares e na patogênese de várias doenças autoimunes. A ativação das células Th17 está relacionada com a gravidade da doença alérgica, isto é, quanto maior a reação da resposta Th17/Th2 maior é a gravidade da doença (WANG; WILLS-KARP, 2011). As células Th9 foram recentemente identificadas como produtoras de IL-9, contribuindo para a indução da ativação de mastócitos na mucosa intestinal (KUREBAYASHI et al., 2013), e aumentando a produção de muco por meio da ativação das células caliciformes (KAPLAN, 2013). Já as células T *helper* foliculares (Tfh), produzem IL-21 e fornecem auxílio essencial para a maturação de células B, o *switch* de classes e geração de células B de memória e plasmócitos no centro germinativo dos linfonodos (CANNONS; LU; SCHWARTZBERG, 2013; LIU; NURIEVA; DONG, 2013).

1.4 Imunoterapia e anticorpos bloqueadores

Com o aumento da prevalência das doenças alérgicas, vêm-se procurando alternativas para o tratamento das mesmas, visando amenizar os sintomas desencadeados por respostas exacerbadas do organismo frente aos alérgenos e reduzindo o uso de farmacoterápicos (SCHEI; HESSEN; LUND, 2002).

A imunoterapia alérgeno-específica é considerada a principal e única terapia empregada para o tratamento específico das alergias (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998) e envolve, de forma geral, os mecanismos como a indução de anticorpos bloqueadores, mudança da resposta imune do tipo Th2 para Th1 e indução de tolerância pela geração de células Treg (DURHAM; TILL, 1998; VALENTA, 2002).

Curiosamente, a técnica de imunoterapia começou a ser empregada no início do século XX, antes mesmo da descoberta e caracterização dos anticorpos do tipo IgE, e baseia-se na administração de pequenas doses do alérgeno causador da reação de hipersensibilidade (NOON, 1911). Em um trabalho considerado clássico, Cooke e colaboradores (1935) demonstraram que pacientes alérgicos, submetidos à imunoterapia alérgeno-específica, desenvolveram anticorpos capazes de bloquear a reação inflamatória de hipersensibilidade.

Em 1968, Lichtenstein e colaboradores analisaram o soro de pacientes alérgicos a um tipo de gramínea, submetidos à imunoterapia, e observaram que fração do soro contendo IgG era a fração contendo os anticorpos bloqueadores. Outro estudo realizado, apontou anticorpos IgA com capacidade bloqueadora (PLATTS-MILLS et al., 1976). Considerando-se que o contato do alérgeno com o organismo e a resposta inflamatória ocorrem, na maioria das vezes, em regiões de mucosas, onde caracteristicamente estão presentes imunoglobulinas do tipo IgA, também têm-se discutido o papel desta imunoglobulina como fator protetor contra alérgenos (FAGARASAN, 2003).

Sabe-se que a imunoterapia induz altos níveis de anticorpos IgG, principalmente IgG1 e IgG4 alérgeno-específicas (GELHAR et al., 1999), atuando como agentes bloqueadores do alérgeno, seja competindo com a IgE pela ligação do alérgeno, bloqueando a ativação de mastócitos e basófilos dependente de IgE, e/ou inibindo a inflamação alérgica (DURHAM; TILL, 1998; KOWALSKI; JUTEL, 1998; LARCHÉ et al., 2006).

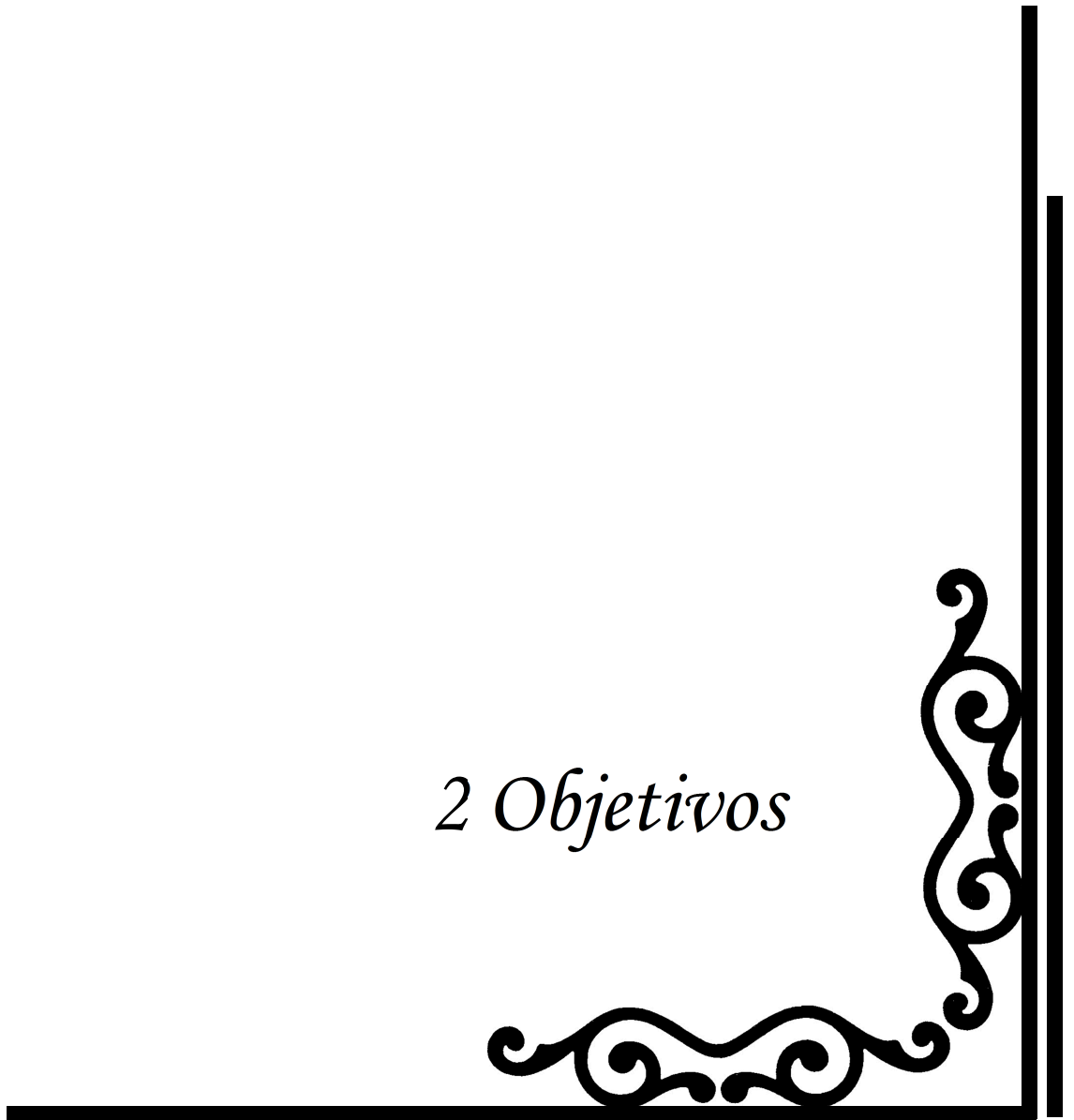
Alguns pesquisadores têm atribuído uma atividade protetora às subclasses de IgG, particularmente IgG4, como resultado após uma longa exposição antigênica, que atuaria como um fator inibitório da reação de hipersensibilidade mediada por IgE. Assim, anticorpos IgG4 poderiam neutralizar o antígeno ou competir pelos sítios de ligação da IgE (VAN NEERVEN et al., 1999; FLICKER et al., 2002; JACKOLA et al., 2002). Por outro lado, Mothes e colaboradores (2003) apontaram que níveis séricos consideráveis de imunoglobulinas IgG2 e IgG3 não são detectados após o tratamento.

Existem trabalhos que sugerem ainda a capacidade desses anticorpos bloqueadoras de inibir a liberação de histamina por basófilos, impedir a ligação do complexo alérgeno-IgE via receptores de IgE de baixa afinidade (FcεRII), presentes em células B, e consequentemente, a

apresentação do alérgeno às células T (MOTHES et al., 2003; WACHHOLZ et al., 2003; PIPET et al., 2009).

Diante do impacto das doenças alérgicas na sociedade moderna, é importante o aprimoramento de estudos que envolvam novas estratégias para o tratamento dessas, isto é, conhecer o papel e os mecanismos de ação dos anticorpos bloqueadores, pode possibilitar a melhoria e o desenvolvimento de novas técnicas de imunoterapia específica (NEERVEN et al., 2006).

2 Objetivos



- ❖ Caracterizar o perfil dos anticorpos IgE, IgG1, IgG4 a partir do soro de indivíduos atópicos e não atópicos ao ácaro *D. pteronyssinus*;
- ❖ Purificar as frações séricas contendo as imunoglobulinas da classe IgG;
- ❖ Verificar a capacidade bloqueadora das imunoglobulinas IgG frente à interação IgE-alérgeno.

3 Material e Métodos



3.1 Aspectos éticos e normas de biossegurança

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU) de maneira a assegurar a regulamentação ética necessária para sua realização, sendo aprovado sem restrições sob o número de parecer 47894 (Anexo A).

Os pacientes que concordaram em participar do estudo, os quais tiveram o livre arbítrio de aceitarem ou não, sem necessidade de explicação, ou prejuízo ao seu atendimento atual ou futuro pelos médicos/pesquisadores envolvidos, o fizeram através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

Todos os procedimentos realizados respeitaram as normas de biossegurança necessárias para a manipulação segura de amostras biológicas e utilização de reagentes e equipamentos, segundo manual de biossegurança próprio do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica - UFU.

3.2 Pacientes e indivíduos controle

Foram triados para o estudo 36 indivíduos adultos com história clínica de alergia respiratória e teste cutâneo de puntura (TCP) positivo, pelo menos, ao extrato total de *D. pteronyssinus* (Dpt), atendidos no Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica, Hospital das Clínicas – UFU, e consistiram no grupo atópico. O responsável pelo Ambulatório (Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi) acompanhou o atendimento dos pacientes, realizado pelos residentes, e supervisionou a execução do teste cutâneo. Foram aplicados o TCLE e o Questionário Clínico (Anexo C) elaborado segundo ISAAC (1998), com algumas modificações, com as devidas explicações e esclarecimentos àqueles indivíduos que aceitaram participar da pesquisa.

Como grupo controle, 15 indivíduos adultos sem sintomas ou história clínica de doenças alérgicas respiratórias e com TCP negativo a um painel de aeroalérgenos padronizados, voluntariamente foram recrutados entre alunos, professores e funcionários da UFU, e consistiram no grupo não atópico. Também foram aplicados o TCLE e o Questionário Clínico.

Como critérios de exclusão foram considerados o uso de anti-histamínicos na semana anterior à realização do teste ou imunoterapia alérgeno-específica prévia.

3.3 Teste cutâneo de puntura (TCP)

A hipersensibilidade imediata foi avaliada pelo TCP de acordo com as normas recomendadas pela *European Academy of Allergology and Clinical Immunology* (EAACI) (MALLING, 1993). Para a realização do teste, foram utilizados extratos alergênicos comerciais (FDA Allergenic Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) de ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*), epitélio de cão (*Canis familiaris*), epitélio de gato (*Felis domesticus*), baratas (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*) e fungo (*Alternaria alternata*). O controle positivo da reação consistiu de solução de histamina (10 mg/mL) e o controle negativo foi realizado com o diluente da preparação alergênica tamponado com glicerol a 50%.

Após antisepsia com álcool 70%, microgotas (aproximadamente 30 µL) de cada extrato alergênico foram depositadas na face interna do antebraço e as punturas realizadas com auxílio de lancetas apropriadas (ALK-Abelló, Horsholm, Dinamarca), mantendo-se uma distância de 3 cm entre os extratos. A leitura do teste foi realizada após 15 minutos, medindo-se o tamanho médio da pápula em mm, calculado a partir do maior diâmetro e o seu correspondente perpendicular. O critério de positividade para o TCP foi um tamanho médio de pápula superior a 3,0 mm, subtraindo o valor da média obtida para o controle negativo.

3.4 Coleta de sangue

Foram coletadas amostras de sangue (volume de 10mL) de todos os indivíduos, através de punção venosa na região do antebraço utilizando-se tubos de coleta a vácuo de 5 mL e agulhas 21G1 (*Vacutainer® - Becton Dickson Vacutainer Systems*, Franklin Lakes, EUA). As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1.000 x g e os soros obtidos foram armazenados a -20°C no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU até a realização dos ensaios.

3.5 Teste para fator reumatóide

Fator reumatóide (FR) consiste de auto-anticorpos das classes IgG, IgM e IgA com capacidade de reagir com diferentes epítomos da porção Fc da IgG humana, dificultando assim sua purificação. O teste foi realizado, portanto, para descartar a possibilidade de um paciente

incluído no estudo possuir altos títulos de FR que possam manter-se ligados à IgG durante o processo de cromatografia.

A realização dos testes para triagem da ocorrência de FR seguiu o protocolo fornecido pelo fabricante do Kit de Teste Rápido para Fator Reumatoide (Bio Látex FR, Bioclin).

O método fundamenta-se em uma reação de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com IgG humana. A aglutinação é visível em amostra com concentração de FR igual ou superior a 8 UI/mL, de acordo com as referências estabelecidas pelos Padrões Internacionais da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Foi utilizada uma lâmina com fundo escuro, fornecida pelo kit, contendo três sítios diferentes para reações, onde foram adicionados 20 µL da amostra, controle positivo ou negativo, e 20 µL do reagente Látex FR fornecido. Após homogeneização, a lâmina foi submetida à agitação leve, com movimentos circulares, por dois minutos.

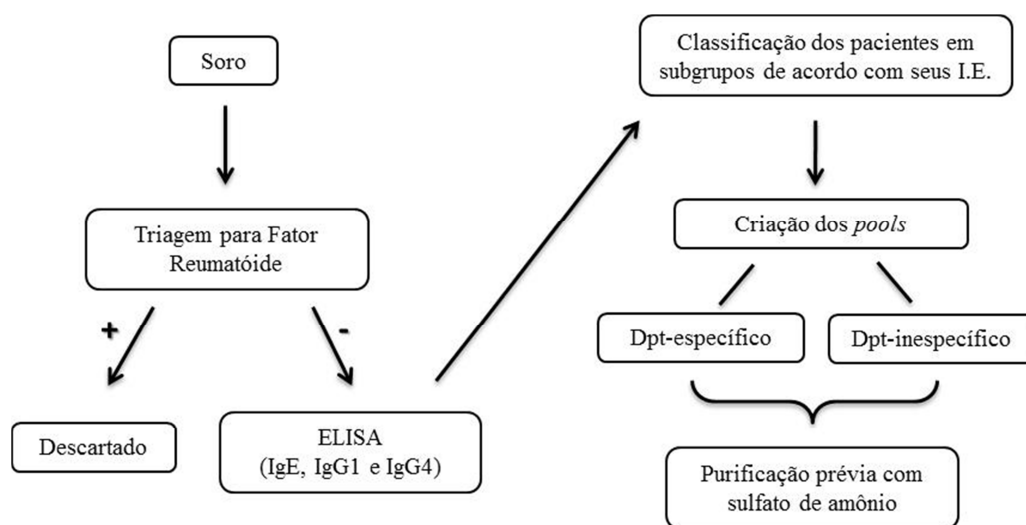
A leitura foi realizada em luz artificial, a olho nu. Uma aglutinação clara indica a presença de FR numa concentração igual ou superior a 8 UI/mL. A positividade da amostra na pesquisa de Fator Reumatóide foi considerada critério para exclusão do paciente da pesquisa.

3.6 Fluxograma do trabalho

O soro coletado foi submetido à triagem para descarte da possibilidade de presença de Fator Reumatóide e testado através do ensaio imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos para *D. pteronyssinus*.

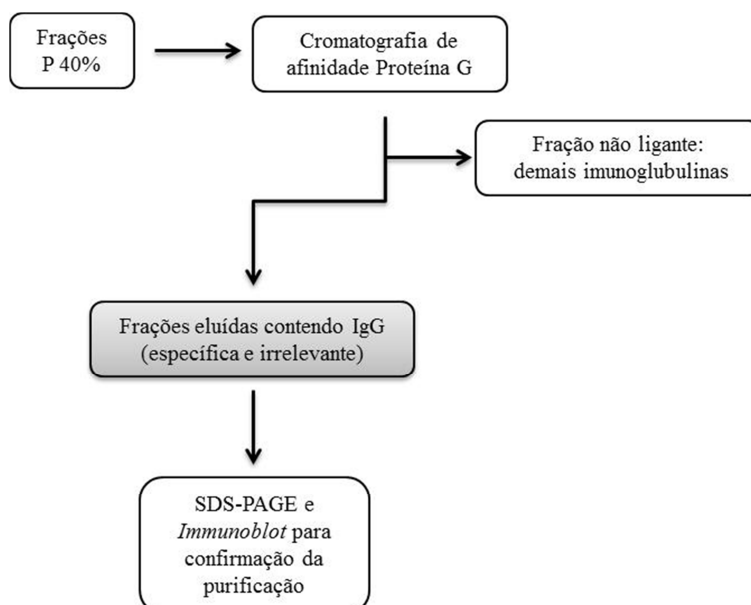
Em seguida, os pacientes foram classificados de acordo com seus índices ELISA para cada subclasse de anticorpo analisada, de forma que pacientes que apresentaram os maiores e menores índices para IgG1 e IgG4 específicos, foram agrupados em diferentes *pools*. A partir dessa classificação, foi possível a preparação de dois *pools*: Dpt-específico e Dpt-inespecífico, que foram utilizados na etapa seguinte, que consistiu na purificação parcial por precipitação com sulfato de amônio (Fluxograma 1).

Fluxograma 1 – Ações de triagem dos pacientes e classificação das amostras em subgrupos para confecção de *pools* representativos.



As frações precipitadas (P 40%) foram submetidas à cromatografia de afinidade, em colunas constituídas por matriz de agarose ligada covalentemente à Proteína G, para isolamento das imunoglobulinas da classe IgG. Foi realizada eletroforese SDS-PAGE e *immunoblot* para confirmação da purificação das imunoglobulinas nas frações obtidas (Fluxograma 2).

Fluxograma 2 – Ações de isolamento das imunoglobulinas IgG.



3.7 Dosagem proteica e detecção e quantificação de alérgenos no extrato de *D. pteronyssinus*

3.7.1 Dosagem proteica total do extrato comercial de *D. pteronyssinus*

A concentração proteica total do extrato comercial de *D. pteronyssinus* (Hollister-Stier Laboratories LLC, Spokane, WA, EUA) foi determinada conforme descrito por Lowry e colaboradores (1951). A curva de calibração foi realizada com soroalbumina bovina (BSA, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em diluições duplas seriadas de 500 a 15,6 µg/mL. Os valores da densidade óptica (D.O.) a 650 nm das amostras analisadas foram obtidos e comparados à curva de calibração, utilizando o programa Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), para o cálculo da concentração proteica das amostras.

3.7.2 Detecção e quantificação dos alérgenos principais de *D. pteronyssinus*, Der p 1 e Der p 2, no extrato comercial

A dosagem dos principais alérgenos de *D. pteronyssinus* presentes no extrato comercial utilizado foi realizada segundo Simplicio e colaboradores (2007).

Placas de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, NY, EUA) contendo 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura anti-Der p 1, (clone 5H8 – Indoor Biotechnologies Inc., Charlottesville, VA, EUA) ou anticorpo monoclonal de captura anti-Der p 2 (clone 1D8, Indoor) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) na proporção 1:1000 por 18 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M pH 7,2 (PBS) contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T). Os sítios inespecíficos dos poços foram bloqueados (150 µL/poço) com PBS-T e 1% soroalbumina bovina (PBS-T+BSA) por 1 hora à temperatura ambiente.

Após novo ciclo de três lavagens, as placas foram incubadas, com o extrato comercial de *D. pteronyssinus* (Hollister-Stier), em duplicata e diferentes concentrações, utilizando-se uma curva de diluição dupla com o primeiro ponto de diluição na proporção 1:250 em PBS-T+BSA, por 1 hora à temperatura ambiente. Paralelamente, amostras padrões de Der p 1 e Der p 2 (Indoor Biotechnologies) foram incubadas, em duplicata, em diluição seriada variando de 500 a 0,4 µg/mL.

As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e foram adicionados anticorpos monoclonais biotinilados (anticorpos de detecção) específicos ao grupo 1 (clone 4C1, Universidade de Virginia, EUA) ou ao grupo 2 (clone 7A1, Universidade de Virginia, EUA) na proporção 1:3000 em PBS-T-BSA (50 µL/poço) por 1 hora em temperatura ambiente.

Após novo ciclo de três lavagens com PBS-T, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) (1:1000) em PBS-T-BSA (50 µL/poço) e incubado à temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos.

Foi realizado um último ciclo de três lavagens com PBS-T, sendo as placas reveladas com o substrato enzimático comercial ABTS (ABTS[®] Peroxidase Substrate System, Kirkegaard and Perry Laboratories Inc. - KPL, Gaithersburg, MD, EUA).

A densidade óptica (D.O.) foi determinada por espectrofotometria em leitor de placas (Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System, Biotek, Winooski, VT, EUA) a 405 nm, e a média dos valores de D.O. obtidos das amostras foi convertida em µg/mL, tendo como referência os valores da curva padrão. Os dados foram analisados pelo *software* Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad).

3.8 ELISA para detecção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos para *D. pteronyssinus*

Para detecção e quantificação de anticorpos IgE sérico foi utilizado o ensaio imunoenzimático ELISA indireto (QUEIRÓS et al., 2008; MIRANDA, 2008).

Placas de alta afinidade (Costar, Corning Laboratories Inc) contendo 96 poços foram sensibilizadas com extrato alergênico de *D. pteronyssinus* diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) na concentração proteica total de 2 µg/poço por 18 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Os sítios inespecíficos dos poços foram então bloqueados (150 µL/poço) com PBS-T-BSA por 1 hora à temperatura ambiente.

Após novo ciclo de três lavagens das placas, as amostras de soro diluídas em PBS-T+BSA na proporção de 1:2 foram adicionadas em duplicata (50 µL/poço).

Após incubação a 37°C por 2 horas, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgE humana biotinilado (KPL) diluído a 1:1000 em PBS-T-BSA (50 µL/poço) por 1 hora a 37°C.

Após novo ciclo de seis lavagens com PBS-T, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluído a 1:1000 em PBS-T-BSA (50 µL/poço) e incubado à temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos.

As reações foram reveladas com o substrato enzimático comercial ABTS® (KPL) e a D.O. foi determinada por espectrofotometria em leitor de placas (Epoch) a 405 nm. Os resultados foram expressos em Índice ELISA (I.E.) de acordo com a seguinte fórmula:

$$I. E. = \frac{D. O.}{D. O. \text{ controle} + 3\delta}$$

onde, D.O. = média da densidade óptica da amostra testada; D.O. controle = média das densidades ópticas de soros controles negativos; δ = desvio-padrão das densidades ópticas das amostras de soros controles negativas. Valores de I.E. > 1,2 foram considerados positivos para excluir valores limítrofes de reatividade próximos a I.E. = 1,0.

O ensaio imunoenzimático ELISA indireto para a detecção de anticorpos IgG1 e IgG4 foi feito segundo protocolo descrito por Queirós e colaboradores (2008). As etapas consistem basicamente das mesmas realizadas para a detecção de IgE, no entanto, para a realização do bloqueio e como diluente nas etapas subsequentes, foi utilizado PBS-T-BSA 0,1%. As diluições utilizadas para o soro foi de 1:10 (IgG1) e 1:5 (IgG4). O anticorpo secundário anti-IgG1 humana biotilado (Sigma) foi diluído 1:3000 enquanto o anticorpo anti-IgG4 humana biotilado (Sigma) foi diluído 1:1000.

3.9 Preparação dos *pools*

Foram preparados dois *pools* contendo soros de cinco pacientes, que apresentaram I.E. a *D. pteronyssinus*, como se segue:

- ❖ **Pool Dpt-específico** – Soros positivos e com altos I.E. (superiores a 4) de IgG1 e IgG4 específicos;
- ❖ **Pool Dpt-inespecífico** – Soros com I.E. negativo (inferior a 1,2) para IgG1 e IgG4 específicos.

Os *pools* foram submetidos à purificação parcial de imunoglobulinas por precipitação com solução de sulfato de amônio a 40%, técnica esta que permite a precipitação de gama e beta globulinas, correspondentes às classes de imunoglobulinas envolvidas no estudo,

resultando em uma separação prévia destas frente outras proteínas séricas, especialmente a soroalbumina, como forma de otimizar a cromatografia subsequente.

3.9.1 Purificação da fração gama e beta globulinas por precipitação por sulfato de amônio 40%

O volume de 1mL de cada *pool* de soros foi acondicionado em becker, em banho de gelo, sobre agitador magnético, e lentamente adicionou-se 1mL da solução saturada de sulfato de amônio 80%, obedecendo-se a concentração final da solução obtida de 40%.

Após incubação por 30 minutos a 4°C, a amostra foi centrifugada a 3.000 x g, 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e armazenado, e o precipitado ressuspensionado em 2mL de solução de sulfato de amônio 40%, seguindo-se nova centrifugação. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e após a centrifugação final, o precipitado foi ressuspensionado em 1mL de PBS.

Para remover o sulfato de amônio, as amostras foram dialisadas contra PBS, a 4°C, por meio do sistema de filtração Amicon® (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.9.2 Slot-blot para análise da presença de imunoglobulinas IgG, IgA, IgE e IgM nas frações sobrenadante e precipitado após precipitação por sulfato de amônio 40%

Membranas de nitrocelulose (0.45 µm; Bio-Rad) foram sensibilizadas em sistema Mini Protean II Multiscreen Apparatus (Bio-Rad), com *pool* de soros, as frações sobrenadante (S 40%) e precipitado (P 40%) após precipitação com sulfato de amônio 40% ou controle negativo (BSA). As membranas sensibilizadas com as diferentes amostras foram cortadas em tiras, as quais foram bloqueadas com PBS-T contendo leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) a 5% (PBS-T-M) por 2 horas em temperatura ambiente e posteriormente lavadas com PBS-T-M 1% por 5 minutos sob agitação leve.

Adicionou-se os anticorpos de detecção anti-IgE humana monoclonal (clone GE-1; Sigma), anti-IgA humana biotilado (Sigma), anti-IgM humana peroxidase (Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) ou anti-IgG humana peroxidase (Calbiochem) diluídos em PBS-T-M 1% nas respectivas proporções: 1:1000, 1:10000, 1:5000 e 1:5000. As

membranas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente e posteriormente lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS-T 0,1%.

No caso das membranas incubadas com anti-IgM e anti-IgG, seguiu-se a revelação com 3,3'-tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB, Sigma). Já para a membrana incubada com anti-IgE adicionou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo peroxidase (Oncogene Science, Cambridge, MA, EUA) na diluição 1:1000, e para a membrana incubada com anti-IgA, adicionou-se o complexo estreptavidina/peroxidase (Sigma) diluído 1:1000 em PBS-T-M 1%, por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem por 3 vezes por 5 minutos com PBS-T 0,1%, as duas membranas restantes foram reveladas com DAB.

Utilizou-se o fotodocumentador ImageQuant 300® (GE Healthcare, Waukesha, WI, EUA) para obter as imagens das membranas, em escala de cinza, após finalizada a reação, e a análise foi realizada com auxílio do *software* Image J 1.46 (National Institute of Mental Health, Bethesda, MA, EUA).

3.10 Cromatografia de afinidade em coluna de Proteína G

A purificação de IgG por cromatografia de afinidade foi realizada de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante da resina (Pierce® Protein G Agarose, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, EUA). A resina foi montada na coluna (Econo-column 1.0 x 5cm, Bio-Rad) e equilibrada através de lavagem com 25mL de tampão de ligação constituído de fosfato de sódio, 20mM, pH 8,0. As frações P 40% foram diluídas na proporção 1:1 em tampão de ligação, e centrifugadas a 10000 x g por 20 minutos a 4°C. Cada fração foi purificada separadamente, iniciando-se pela fração P 40% proveniente do *pool* Dpt-inspecífico, seguindo-se pela fração P 40% proveniente do *pool* Dpt-específico.

Após equilibrada a coluna, a amostra foi aplicada à resina, sendo este conteúdo inicial reaplicado por três vezes a fim de garantir a retenção completa dos anticorpos da classe IgG.

Prosseguiu-se com a lavagem da coluna com tampão de ligação, acompanhada da verificação parcial da presença de proteínas na fração não-ligante por reação de Bradford (colorimétrica), até o momento em que verificou-se a ausência de proteínas (coloração semelhante àquela obtida na presença somente do tampão de ligação). Utilizou-se 80 µL do Reagente de Bradford acrescidos de 40µL de amostra para este teste.

Para eluir a IgG ligada à coluna, foi usado tampão de eluição glicina 0,1M, pH 2,6, novamente acompanhando-se a presença de proteínas no eluato por reação de Bradford, até

que a coloração observada fosse semelhante à aquela obtida na presença somente do tampão de eluição.

As frações eluídas contendo IgG foram coletadas e tiveram seu pH neutralizado com adição de tampão Tris 1M, pH 9,0. Após confirmação de quais frações coletadas continham IgG, por eletroforese SDS-PAGE, as mesmas foram unidas e prosseguiu-se com diálise e concentração contra PBS através de sistema de filtração Amicon®. As frações foram armazenadas a -20°C até serem utilizadas nos testes posteriores.

Após finalizada a lavagem com tampão de eluição, foram adicionados 5mL de azida sódica a 0,02% à coluna e a mesma foi então armazenada a 4°C.

Durante todo o procedimento de cromatografia, as frações não-ligante, da lavagem, e do eluato foram coletadas em tubos de congelamento, em alíquotas de 1 mL, para a posterior construção do perfil cromatográfico a partir da absorbância de cada amostra a 280 nm.

3.11 Eletroforese SDS-PAGE e *immunoblot* para confirmação da purificação de IgG, IgA, IgE e IgM total nas frações obtidas após a cromatografia

3.11.1 Eletroforese SDS-PAGE

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 8% na presença do agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) para visualização das frações obtidas após a cromatografia.

Primeiramente foi preparado o gel de separação a 8%, composto por Tris-HCl 0,373M (pH 8,8), SDS a 0,1%, acrilamida-bis na proporção 30:0,8, N,N,N,N,-tetrametiletilenodiamina (TEMED) a 0,125%, persulfato de amônia (APS) a 0,125%, diluídos em água deionizada de acordo com as concentrações do gel. O gel de empilhamento a 3% foi preparado utilizando Tris-HCl 0,122 M (pH 6,8), SDS 0,1%, acrilamida-bis a 30:1,6, TEMED a 0,125% e APS a 0,125%. Todos os reagentes utilizados na preparação dos géis foram obtidos da Bio-Rad. O processo de polimerização teve um tempo médio de 1 hora para o gel de separação e 1 hora para o gel de empilhamento.

Previamente à aplicação nos géis, as frações obtidas após a cromatografia foram diluídas em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8), SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% e glicerol 20%. As amostras foram então aquecidas a 95°C em banho seco (Termobath ALB64 – Finemould Precision Ind., Co., Seul, Coreia do Sul) por 5 minutos, para desnaturação proteica completa.

A corrida foi realizada sob corrente de 20 mA por aproximadamente 1 hora e 15 minutos em sistema de eletroforese mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad).

O gel foi corado por imersão em solução corante de *Blue Silver* como anteriormente descrito (CANDIANO et al., 2004), efetuando-se trocas do corante até a perfeita visualização das bandas. Todo este processo foi realizado sob agitação lenta e constante à temperatura ambiente.

Após visualização das bandas, as frações eluídas foram agrupadas, dialisadas e concentradas contra PBS através de sistema de filtração Amicon®, e tiveram seu conteúdo proteico determinado pelo método de Lowry. Foram obtidas as frações IgG específica, proveniente do *pool* Dpt-específico, e IgG irrelevante, proveniente do *pool* Dpt-inespecífico.

3.11.2 Immunoblot

A pureza das frações IgG obtidas por cromatografia foi confirmada com a realização de *immunoblot* para detecção da presença das classes de imunoglobulinas IgG, IgA, IgE e IgM total nas amostras.

Após a realização de SDS-PAGE representativo da cromatografia, excetuando-se o passo para coloração do gel, foi realizada a transferência para membranas de nitrocelulose (0.45 µm; Bio-Rad) sob voltagem constante de 25 V por 1 hora, em sistema de transferência Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad).

A seguir, as membranas foram submetidas aos mesmos passos da reação descritos para o *slot blot*, item 3.9.12.

3.12 Determinação das concentrações ótimas das frações IgG específica e irrelevante

Um ELISA indireto foi realizado para determinar a concentração ótima das frações IgG específica e irrelevante através da detecção de IgG1 e IgG4 anti-Dpt, bem como IgE específica residual, conforme previamente descrito, com modificações (MIRANDA, 2011; QUEIRÓS, 2008).

Resumidamente, placas de alta afinidade (Costar, Corning Laboratories Inc.) foram sensibilizadas com Dpt (2µg/poço), bloqueadas com PBS-T-BSA 0,1% e posteriormente incubadas com as frações IgG específica e irrelevante diluídas de 40 a 2,5µg/poço. Os passos

subsequentes foram semelhantes ao ELISA para detecção de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a Dpt como descritos acima, item 3.8.

3.13 ELISA inibição

Para avaliar a atividade bloqueadora das frações IgG sobre a reatividade de IgE ao extrato Dpt, foi realizado um ELISA inibição utilizando três *pools* de soros de pacientes atópicos com diferentes positivities para as classes de anticorpos específicas a Dpt, como segue: *pool* I (IgE+, IgG1+, IgG4-); *pool* II (IgE+, IgG1-, IgG4+); and *pool* III (IgE+, IgG1+, IgG4+).

Placas de alta afinidade (Costar, Corning Laboratories Inc.) foram sensibilizadas com Dpt (2µg/poço), bloqueadas com PBS-T-BSA e incubadas com a concentração ótima da fração IgG específica ou IgG irrelevante, por 1 hora à 37°C. Os *pools* de soros de pacientes atópicos foram diluídos 1:2, incubados por 1 hora à 37°C e seguidos da incubação com anti-IgE humana biotinizada (1:1000; KPL). Os passos subsequentes foram semelhantes ao ELISA para detecção de IgE anti-Dpt conforme descrito acima (item 3.8). Os resultados foram expressos em valores de absorbância a 405nm e porcentagem de inibição, em que: % inibição = $1 - (\text{D.O. inibido} / \text{D.O não inibido}) \times 100$ (AHMAD; MOINUDDIN; ALI, 2012).

3.14 Análise estatística

A análise estatística e confecção dos gráficos foram realizadas pelo *software* GraphPad Prism, versão 5.0 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, EUA).

A comparação entre os grupos em relação ao gênero e dados de positividade no TCP no grupo atópico foram determinadas pelo teste exato de Fisher. A comparação entre os níveis de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a Dpt, entre os grupos, foi determinada pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças entre os grupos em relação à idade e nos dados obtidos a partir dos *slot-blots* foram determinadas pelo Teste *t* de Student. Diferenças entre os grupos (reatividade de IgE e ELISA inibição) foram analisadas por meio do teste ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 Resultados



4.1 Dados clínicos e demográficos dos indivíduos do estudo

Os dados referentes à faixa etária, gênero e quadro clínico dos indivíduos selecionados para o estudo estão apresentados na Tabela 1.

Dentre os 51 participantes do estudo, 36 (70,59%) apresentaram história clínica apenas de rinite alérgica relacionada com exposição a ácaros da poeira domiciliar, sem qualquer sintoma de asma, e TCP positivo a extratos de aeroalérgenos, compondo assim o grupo atópico. Foi observada maior sensibilização concomitante aos ácaros da poeira domiciliar, *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (97%), do que a *Blomia tropicalis* (64%) e a outros aeroalérgenos (< 54%) ($p < 0,0001$).

Os 15 indivíduos (29,41%) que apresentaram resultado negativo no TCP aos aeroalérgenos testados compuseram o grupo não atópico e não tinham história clínica de doença alérgica respiratória.

O número de participantes do sexo feminino (70,59%) foi superior ao do sexo masculino (29,41%) e a média de idade dos indivíduos foi de 24,6 e 28 anos para os grupos atópico e não atópico, respectivamente, sem diferença significativa entre eles.

Tabela 1 – Dados clínicos e demográficos dos pacientes participante do estudo.

Característica	Grupos		Valor de p
	Atópico	Não atópico	
Número de indivíduos	36	15	-
Idade (média \pm desvio-padrão)	24,6 \pm 5,8	28 \pm 11,68	0,1725 (N.S.) ^a
Gênero (Masculino / Feminino)	13/23	2/ 13	0,1770 (N.S.) ^b
TCP positivo (n, %)			
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	36 (100%)	-	<0,0001 ^b
<i>Dermatophagoides farinae</i>	35 (97%)	-	<0,0001 ^b
<i>Blomia tropicalis</i>	23 (64%)	-	<0,0001 ^b
<i>Blatella germanica</i>	10 (28%)	-	0,0009 ^b
<i>Periplaneta americana</i>	9 (25%)	-	0,0022 ^b
<i>Alternaria alternata</i>	2 (6%)	-	0,4930 (N.S.) ^b
<i>Felis domesticus</i>	19 (53%)	-	<0,0001 ^b
<i>Canis familiaris</i>	14 (39%)	-	<0,0001 ^b

a Teste *t* de Student; b Teste exato de Fisher ($p < 0,05$); N.S.: não significativo.

4.2 Dosagem proteica total e quantificação de alérgenos no extrato de *D. pteronyssinus*

A concentração proteica total do extrato comercial de *D. pteronyssinus* (Hollister-Stier) correspondeu a 4.500 µg/mL. A concentração dos alérgenos principais Der p 1 e Der p 2 no extrato Dpt correspondeu a 230 µg/mL e 356 µg/mL, respectivamente.

Estes valores foram considerados para posterior utilização do extrato nas reações de ELISA.

4.3 Avaliação dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos a *D. pteronyssinus*

Os índices de reatividade dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos a *D. pteronyssinus* determinados por ELISA em amostras de soros dos pacientes atópicos e não atópicos estão demonstrados na Figura 1.

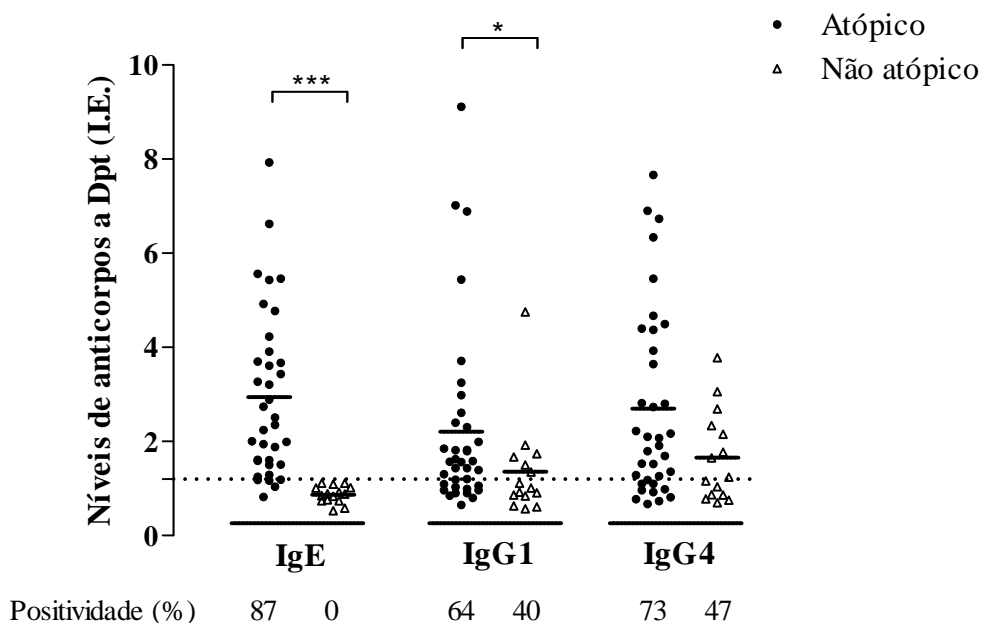


Figura 1 – Níveis de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* determinados por ELISA em soros de pacientes atópicos e não atópicos, expressos em Índice ELISA (I.E.). As barras horizontais indicam a média e a linha pontilhada representa o limiar de positividade (I.E. >1,2). Porcentagens de amostras positivas também estão indicadas. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney (*p < 0.05; *** p < 0.0001).

Níveis de IgE ao extrato Dpt foram maiores nos pacientes atópicos que nos indivíduos não atópicos ($p < 0,0001$), com 87% de positividade no grupo atópico e nenhuma positividade no grupo não atópico. Da mesma forma, os níveis de IgG1 anti-Dpt foram maiores nos atópicos que nos não atópicos ($p < 0,05$), com positividade de 64% e 40%, respectivamente. Em contraste, os níveis de IgG4 anti-Dpt não foi significativamente diferente entre os grupos (positividade de 73% vs 47%).

4.4 Seleção dos soros para constituir os *pools* e purificação das frações gama e beta globulinas

Para selecionar as amostras de soros com as maiores e menores reatividades concomitante a IgG1 e IgG4 específicos a Dpt dentro dos grupos atópico e não atópico, respectivamente, os níveis de IgG1 e IgG4 foram comparados como mostra a figura 2.

Cinco soros dentro de cada grupo foram selecionados para constituir o *pool* Dpt-específico e o *pool* Dpt-inespecífico, respectivamente. O perfil de reatividade de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a Dpt em cada *pool* de soros mostrou I.E médio acima de 4,2 para as três classes de anticorpos no grupo atópico e abaixo de 1,0 no grupo não atópico, como representado na tabela 2. Os soros selecionados foram submetidos ao teste para avaliar a presença de fator reumatóide, e obtiveram resultado negativo.

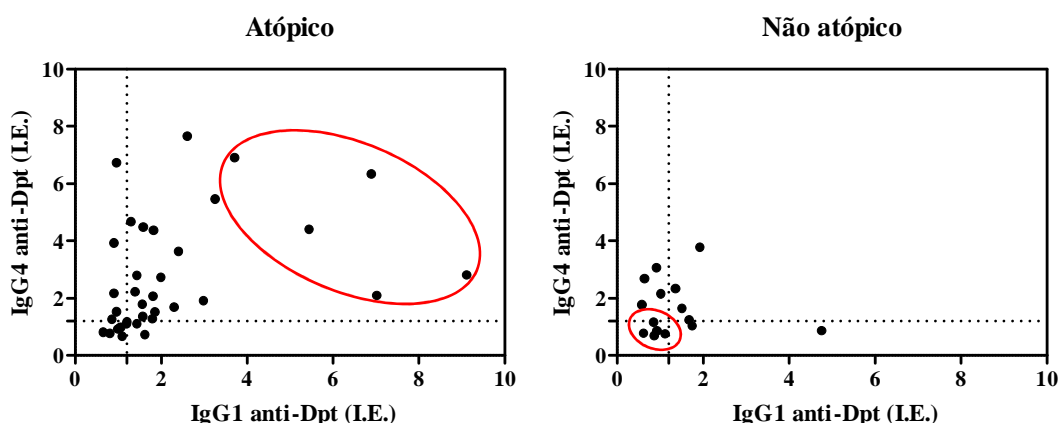


Figura 2 – Comparação entre os níveis de IgG1 e IgG4 anti-*D. pteronyssinus* em soros de pacientes atópicos e não atópicos para seleção dos soros ($n = 5$) utilizados na constituição dos *pools* Dpt-específico e Dpt-inespecífico, respectivamente. A linha pontilhada representa o limiar de positividade (I.E.>1,2). Os soros selecionados estão indicados por elipses vermelhas.

Tabela 2 – Perfil de reatividade para IgE, IgG1 e IgG4 específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* em *pools* de soros de indivíduos atópicos (n=5) e não atópicos (n=5)

Níveis de anticorpos Dpt-específico	Grupos	
	Atópico	Não atópico
	<i>Pool</i> Dpt-específico	<i>Pool</i> Dpt-inespecífico
IgE (media I.E. \pm desvio-padrão)	4,28 \pm 1,73	1,06 \pm 0,54
IgG1 (media I.E. \pm desvio-padrão)	6,43 \pm 2,00	0,85 \pm 0,17
IgG4 (media I.E. \pm desvio-padrão)	4,51 \pm 2,11	0,85 \pm 0,19

Dpt: Extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus*; I.E.: índice ELISA.

4.4.1 Purificação parcial de imunoglobulinas por precipitação com sulfato de amônio

O perfil eletroforético representativo após a precipitação dos *pools* de soros com sulfato de amônio a 40% esta representado na figura 3A. Foi observado um enriquecimento de proteínas de alto peso molecular na fração precipitada (P 40%), especialmente em torno de 150 kDa, provavelmente correspondendo à classe da IgG. Foi verificado ainda a presença de uma forte banda na fração sobrenadante (S 40%) migrando em torno de 66 kDa, provavelmente correspondendo à soroalbumina, enquanto na fração P 40% sua presença foi bastante discreta.

Para analisar o perfil de imunoglobulinas nas frações S 40% e P 40% foi realizado um *slot-blot*. Todas as classes analisadas (IgG, IgA, IgE e IgM) estiveram mais concentradas na fração P 40% que na S 40% ($p < 0,01$), como mostrado na figura 3B-C.

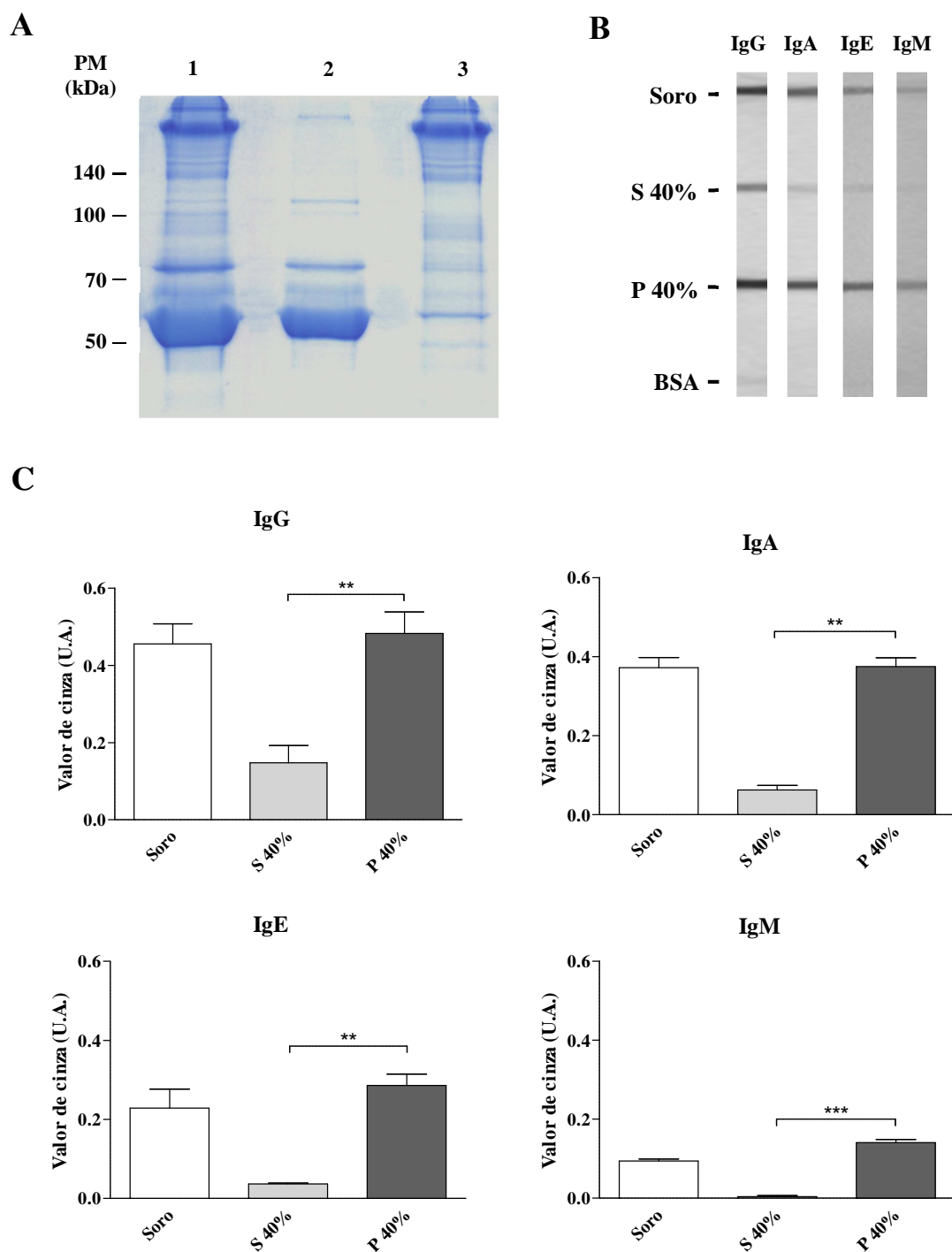


Figura 3 – Perfil da precipitação dos *pools* de soros por sulfato de amônio a 40%. **(A)** Eletroforese representativa do processo em gel de poliacrilamida 8% (SDS-PAGE) corado por *Blue Silver*. 1 – *pool* de soros; 2 – fração sobrenadante (S 40%) e 3 – fração precipitada (P 40%). Marcadores de peso molecular (PM) estão indicados na esquerda em kiloDaltons (kDa). **(B)** *Slot-blots* mostrando reatividade para IgG, IgA, IgE e IgM no soro, frações sobrenadante (S 40%) e precipitada (P 40%) obtidas a partir da precipitação com sulfato de amônio 40%, e soroalbumina bovina (BSA) como controle negativo. **(C)** Análise dos dados dos *slot-blots* por meio da intensidade das bandas em escala de cinza expressa em unidades arbitrárias (U.A.). Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo Teste *t* de Student (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.5 Cromatografia de afinidade em coluna de Proteína G-agarose

As frações P 40% de cada *pool* de soros (*pools* Dpt-específico e Dpt-inespecífico) foram aplicadas na coluna de Proteína G-agarose e o cromatograma representativo está ilustrado na figura 4A. O pico I (tubos 3 a 6) foi obtido durante a lavagem com tampão de ligação, representando a fração não ligante (FNL). O pico II (tubos 29 a 34) foi obtido após aplicação do tampão de eluição, correspondendo à fração ligante (FL).

Para verificar a purificação dessas frações, foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE a 8%. O perfil eletroforético representativo da cromatografia está apresentado na figura 4B. Observa-se a presença de bandas bem definidas e compatíveis com a classe de imunoglobulinas IgG, em torno de 160kDa, nas frações ligantes à proteína G.

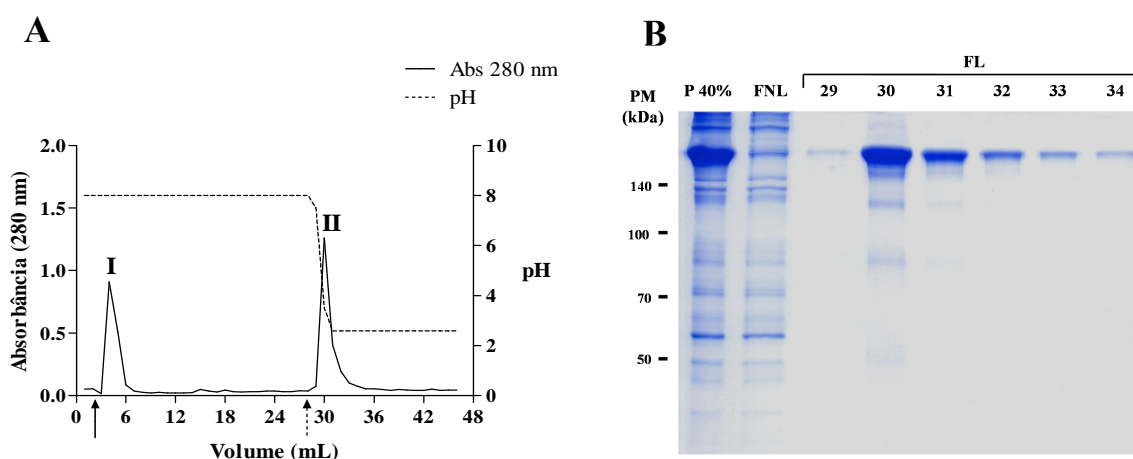


Figura 4 – Perfil da cromatografia de afinidade em Proteína G-agarose. (A) Cromatograma representativo da purificação de IgG humana. I – pico de eluição da fração não-ligante após lavagem com tampão fosfato 0,02M, pH 8,0 (seta preta); II – pico de eluição da fração ligante após lavagem com tampão glicina 0,1M, pH 2,6 (seta pontilhada). Dados estão expressos em absorbância a 280nm. Cada tubo eluído, correspondente a 1mL, teve seu pH determinado. (B) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 8% corado por *Blue Silver*. FNL – fração não ligante, FL – fração ligante, correspondente aos tubos 29-34. Marcadores de peso molecular (PM) estão indicados à esquerda em kiloDaltons (kDa).

4.5.1 Immunoblot

A imunoreatividade das frações ligantes à proteína G foi realizada por meio do ensaio *immunoblot*, no qual verificou-se uma forte marcação para IgG, leve marcação para IgA e ausência de marcação para IgE e IgM (Fig. 5).

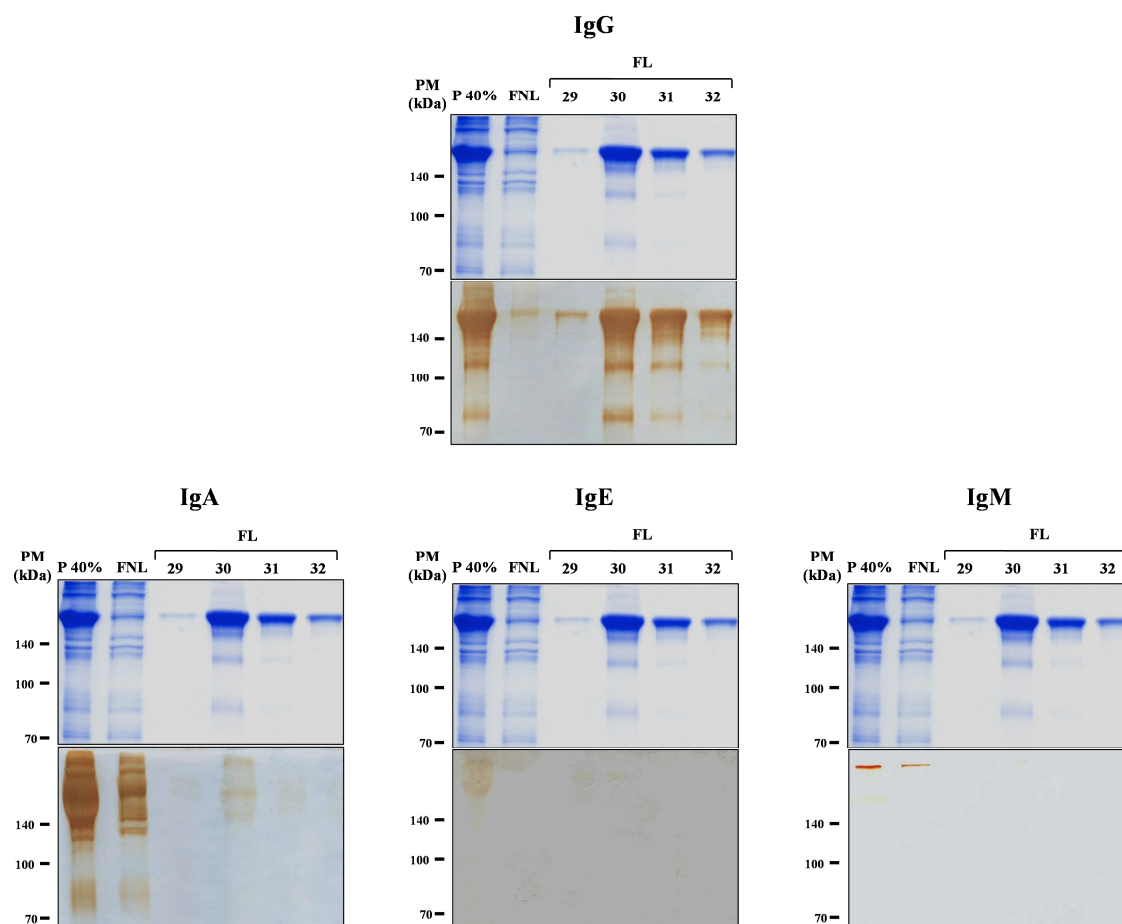


Figura 5 – *Immunoblot* para detecção das diferentes classes de anticorpos, após purificação de IgG humana total por cromatografia em Proteína G-agarose. P 40% - Fração precipitada do *pool* de soros com sulfato de amônio a 40% aplicada na coluna; FNL- Fração não ligante à proteína G-agarose; FL- Frações ligantes à proteína G-agarose eluídas com tampão glicina 0,1M, pH 2,6 correspondentes aos tubos 29-32. Marcadores de peso molecular (PM) estão indicados à esquerda em kiloDaltons (kDa).

4.6 Níveis de IgG1, IgG4 e IgE específicos a *D. pteronyssinus* nas frações purificadas

A concentração ótima das frações IgG específica e irrelevante foi determinada por ELISA indireto. Como mostrado pelos níveis de IgG1 e IgG4 anti-Dpt, a maior distinção entre as duas frações foi encontrada quando 40µg/poço de cada uma delas foi utilizada (Fig. 6A-B). Vale ressaltar que a reatividade para IgE em ambas as frações foi limítrofe ou abaixo do *cut off* (Fig. 6C).

RESULTADOS

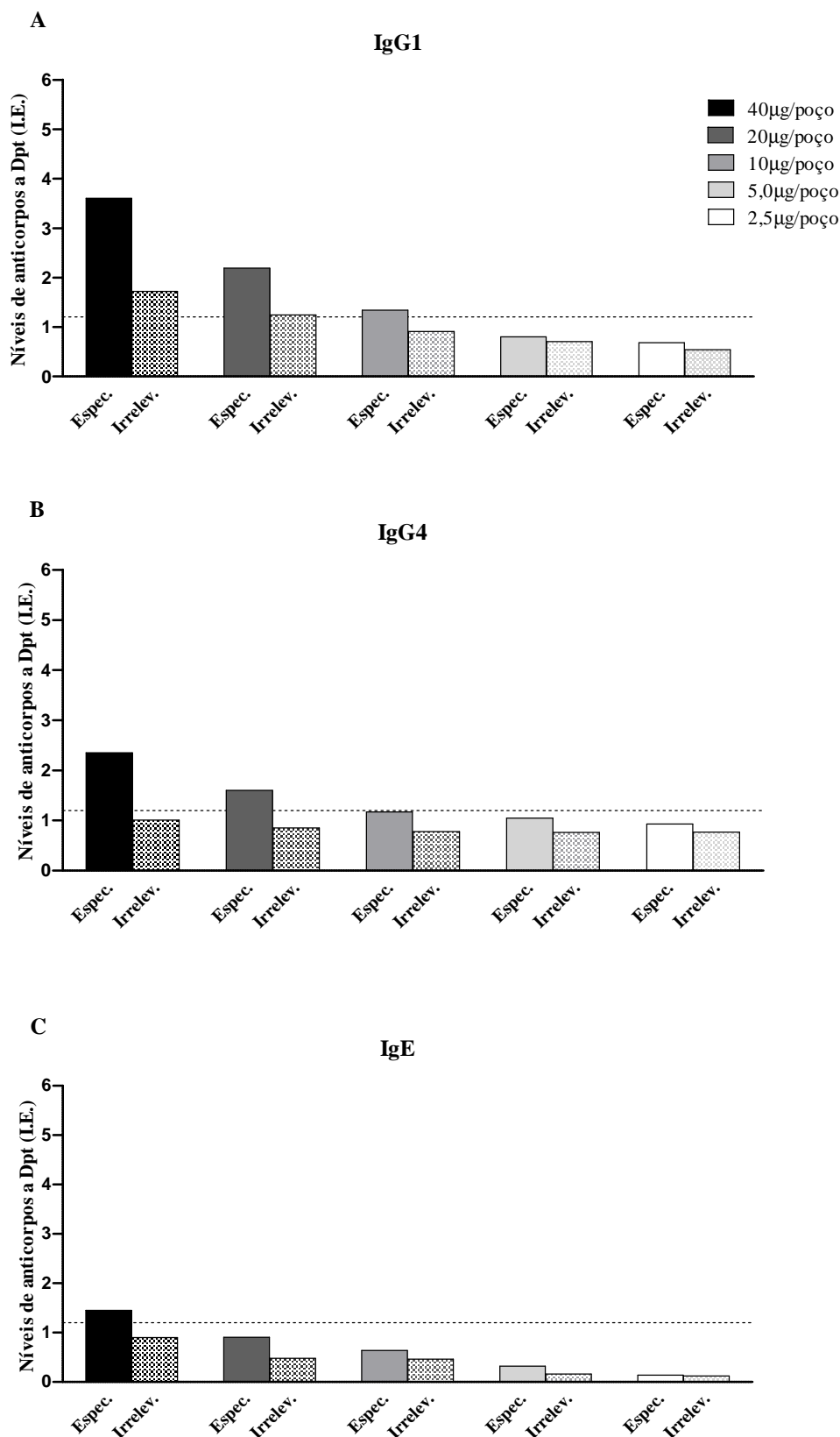


Figura 6 – Níveis de IgG1 (A), IgG4 (B) e IgE (C) específicos ao extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) nas frações IgG específica (Espec.) e irrelevante (Irrelev.) purificadas obtidas a partir de *pools* de soros de pacientes atópicos e não atópicos, respectivamente, determinados por ELISA. Frações IgG purificadas foram tituladas em diluição dupla seriada, de 40 até 2,5µg/poço, e dados estão expressos em índice ELISA (I.E.). As linhas pontilhadas indicam o limiar de positividade (I.E.>1,2).

4.7 ELISA Inibição

As frações IgG específica e IgG irrelevante anti-Dpt foram avaliadas quanto a sua capacidade bloqueadora da reatividade de anticorpos IgE específicos a Dpt em ensaios de ELISA inibição.

A reatividade de IgE a Dpt, na presença ou ausência das frações IgG específica ou irrelevante, foi determinada através de três *pools* de soros (I, II e III) de pacientes atópicos, selecionados com base na positividade para três classes de anticorpos, como segue: *pool* I (IgE+, IgG1+, IgG4-); *pool* II (IgE+, IgG1-, IgG4+); *pool* III (IgE+, IgG1+, IgG4+) (Tabela 3).

Tabela 3 – Perfil de reatividade de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* em três *pools* de soros (I, II e III) de pacientes atópicos com diferentes positivities para as classes de anticorpos.

Níveis de anticorpos Dpt-específicos	Pools de soros		
	I	II	III
IgE (media I.E.± desvio-padrão)	4,46 ± 3,63	1,80 ± 0,70	4,20 ± 2,55
IgG1 (media I.E.± desvio-padrão)	1,87 ± 0,60	0,90 ± 0,06	3,23 ± 2,06
IgG4 (media I.E.± desvio-padrão)	0,93 ± 0,22	2,81 ± 2,17	4,35 ± 2,24

Dpt: Extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus*; I.E.: índice ELISA; Valores positivos estão em negrito.

Para os três *pools* testados, a presença da fração IgG específica reduziu significativamente a reatividade de IgE a Dpt quando comparado ao PBS ($p < 0,0001$) (Fig. 7A), e efeito similar pôde ser observado na presença da fração IgG irrelevante. Entretanto, a reatividade de IgE foi significativamente menor na presença da fração IgG específica quando comparada à fração IgG irrelevante ($p < 0,0001$).

Quando a porcentagem de inibição da reatividade de IgE foi avaliada, a fração IgG específica foi capaz de inibir $\geq 50\%$ da reatividade de IgE nos *pools* I e II, e acima de 35% no *pool* III (Fig. 7B).

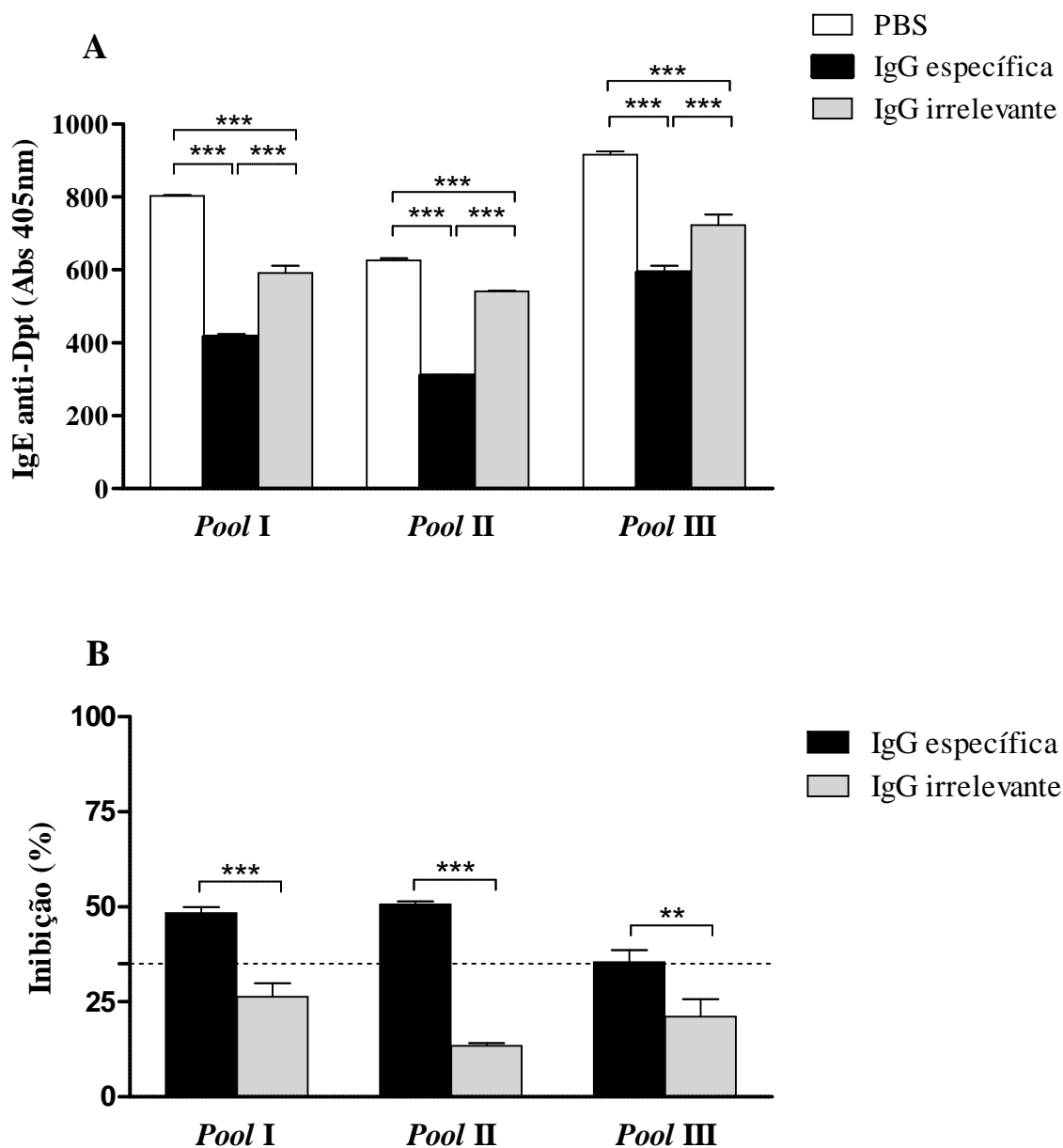


Figura 7 – Resultados do ELISA inibição mostrando a capacidade bloqueadora dos anticorpos IgG específico e irrelevante sobre a reatividade de IgE ao extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) em pools de soros de pacientes atópicos. Três pools de soros (I, II e III) com diferentes positivities para as classes de anticorpos foram usados, como segue: *pool I* (IgE+, IgG1+, IgG4-); *pool II* (IgE+, IgG1-, IgG4+); *pool III* (IgE+, IgG1+, IgG4+). (A) Níveis de IgE anti-Dpt expressos em absorbância a 405nm. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (** $p < 0,0001$). (B) Porcentagem de inibição da reatividade de IgE, através do bloqueio de anticorpos IgG específico e irrelevante purificados, em três pools de soros de pacientes atópicos. As linhas pontilhadas indicam o valor de inibição limiar de 35%. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas pelo Teste *t* de Student (** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).

5 Discussão



Sabe-se que o objetivo final da imunoterapia alérgeno-específica é modular o perfil de resposta imunológica do paciente contra alérgenos e que os benefícios adquiridos sejam duradouros, mesmo após a descontinuação da imunoterapia (BURKS et al., 2013). O aumento nos níveis de IgG1 e IgG4 alérgeno-específicos são comumente associados à uma atividade bloqueadora, evitando a ligação de anticorpos IgE ao alérgeno e, consequentemente, levando a uma redução da resposta alérgica inflamatória (AALBERSE et al., 1993; GELHAR et al., 1999; MÖBS et al., 2012).

A caracterização, quantificação e avaliação da capacidade bloqueadora de anticorpos IgG frente à interação IgE-alérgeno utilizando testes in vitro representa uma ferramenta importante para elucidar o papel dos diferentes tipos de imunoglobulinas na resposta alérgica. No presente trabalho, essa abordagem foi realizada, inicialmente, através da purificação de frações IgG específicas a Dpt a partir de *pools* de soros de pacientes atópicos a ácaros e subsequente avaliação da sua capacidade bloqueadora sobre a reatividade de IgE em ensaio de ELISA inibição.

A seleção dos indivíduos participantes do estudo foi baseada na história clínica e TCP. Com relação a estes dois parâmetros, todos os participantes incluídos no grupo atópico apresentaram TCP positivo a pelo menos extrato alergênico de *D. pteronyssinus* e sintomas de rinite alérgica. Um estudo prévio realizado por Soares e colaboradores (2007), em pacientes da região do Triângulo Mineiro atendidos pelo Hospital das Clínicas da UFU, mostrou altas porcentagens de positividade a extratos de ácaros da poeira domiciliar, destacando as espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae* como importantes agentes sensibilizantes dessa região.

Os níveis de IgE e a soropositividade em pacientes atópicos encontrados nesse estudo se assemelham àqueles encontrados em estudo prévio, realizado por nosso grupo, cujo objetivo foi avaliar os níveis de IgE, IgA e IgG4 a *D. pteronyssinus* e seus principais alérgenos, Der p 1 e Der p 2, em amostras de soro e saliva de crianças alérgica e não alérgicas (MIRANDA, 2011). Embora os níveis médios de IgG4 tenham sido maiores em indivíduos atópicos que em não atópicos, esta diferença não foi estatisticamente significativa, como encontrado por Miranda e colaboradores (2011) e Pereira e colaboradores (2005), em estudos anteriores envolvendo *D. pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, respectivamente, reforçando que antígenos que induzem anticorpos IgE também são bons indutores de anticorpos IgG4.

Em contrapartida, níveis de anticorpos IgG1 específicos a Dpt foram maiores em indivíduos atópicos que em não atópicos, condizente com os dados encontrados para IgG1 anti-*B. tropicalis* (PEREIRA et al., 2005), corroborando que anticorpos do tipo IgG1 podem estar mais relacionados à exposição alergênica. Ainda há discussões sobre o papel bloqueador

ou anafilático de anticorpos IgG4, e se IgG1 está associada com exposição e/ou papel protetor (MERRETT et al., 1984; MORI et al., 2001).

Considerando a maior e menor reatividade concomitante de IgG1 e IgG4 a Dpt em pacientes atópicos e não atópicos, respectivamente, as amostras de soros foram selecionadas para obter os *pools* Dpt-específico e Dpt-inespecífico. Esses *pools* foram parcialmente purificados por precipitação com sulfato de amônio a 40% e depois submetidos à cromatografia de afinidade para a obtenção das frações IgG específica e irrelevante. Essas técnicas de purificação de imunoglobulinas têm sido amplamente utilizadas, garantindo alta qualidade e integridade dos anticorpos recuperados (PEROSA et al., 1990; ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007).

O uso da precipitação com sulfato de amônio permite a obtenção de altas concentrações de imunoglobulinas com considerável nível de pureza e sem prejuízo à sua atividade funcional. O perfil eletroforético após a precipitação com solução de sulfato de amônio a 40% dos *pools* de soros Dpt-específico e Dpt-inespecífico mostrou um enriquecimento de proteínas de alto peso molecular na fração precipitada e a depleção quase completa da soroalbumina humana, consistente com dado encontrado na literatura (BERGMANN-LEITNER et al., 2008).

Além disso, todas as classes de anticorpos analisadas estavam mais concentradas nas frações precipitadas. O uso dessa técnica possibilitou, nesse estudo, otimizar a cromatografia de afinidade em Proteína G-agarose, evitando interferentes provenientes de outras proteínas séricas, especialmente a soroalbumina, no processo.

Os resultados obtidos a partir do perfil eletroforético, após a cromatografia de afinidade, mostraram bandas de alto peso molecular fortemente coradas nas frações ligantes à Proteína G, compatíveis com o peso molecular da IgG humana. Embora outras bandas sejam visíveis, as mesmas podem ser consideradas produto de degradação, já que foram reativas no ensaio de *immunoblot* para detecção de IgG total.

A confirmação da depleção de outras classes de imunoglobulinas nas frações ligantes, por meio de *immunoblot*, aponta para a obtenção de um enriquecimento bastante significativo de IgG total. Ainda que se observe uma leve reatividade para IgA, sua marcação quando comparada a obtida na fração não ligante ou à forte marcação obtida para IgG total é consideravelmente menor. Por isto, as frações ligantes obtidas foram denominadas como frações IgG purificadas e estas foram utilizadas nos ensaios seguintes.

Embora estudos recentes têm procurado por novos esclarecimentos a respeito do papel da IgD na regulação do sistema imune (CHEN et al., 2009; CHEN, K.; CERUTTI, A., 2010),

nesse estudo não foi realizado *immunoblot* para IgD, já que sua concentração sérica é ínfima quando comparada às demais imunoglobulinas (PREUD'HOMME et al., 2000).

É bem conhecido que a imunoterapia alérgeno-específica leva a um aumento da produção de IgG alérgeno-específica (MOTHES et al., 2003; WACHHOLZ et al., 2003; CHEN et al., 2012), com capacidade de bloquear a interação IgE-alérgeno, bem como a interação desses complexos com as células B, e a ativação de basófilos (JAMES et al., 2012). Vários estudos têm correlacionado o aumento nos níveis de IgG sérica, principalmente IgG1 e IgG4, com respostas clínicas de pacientes após imunoterapia específica (CEUPPENS et al., 2009; JAMES et al., 2012; MÖBS et al., 2012).

No presente estudo, foi obtida uma fração contendo IgG específica a Dpt, purificada a partir de *pool* de soros de pacientes atópicos que não foram submetidos a nenhuma imunoterapia prévia. Além disso, os níveis de IgG1 e IgG4 específicos a Dpt foram medidos nessa fração, com o intuito de garantir a presença de altos níveis desses anticorpos bloqueadores específicos. Um baixo nível de IgE residual foi detectado na maior concentração da fração IgG específica, sugerindo uma provável reatividade cruzada com o anticorpo anti-IgE humana biotinizado utilizado no ELISA, visto que no ensaio de *immunoblot* outro anticorpo secundário foi utilizado, e nenhuma reatividade para IgE foi detectada nessa fração de IgG purificada.

A atividade bloqueadora da fração IgG específica, sobre a reatividade de IgE ao extrato alergênico Dpt, foi avaliada através do ensaio ELISA inibição. A fração IgG específica foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IgE anti-Dpt, resultando em 35-51% de inibição da reatividade de IgE a Dpt nos três *pools* de soros testados.

Esse papel bloqueador de anticorpos IgG alérgeno-específicos foi recentemente investigado em camundongos, através de imunização passiva com anticorpos IgG específicos para prevenção e tratamento de alergia a alérgenos de bétula e gramíneas. Os autores mostraram que camundongos tratados com IgG anti-Phl p 1, após a sensibilização com Phl p 1 recombinante, tiveram redução nos níveis de IgE específica a Phl p 1 em todos os tempos testados. Além disso, porcentagens de inibição da ligação da IgE ao alérgeno Bet v 1 (23,8% a 57,4%) e ao alérgeno Phl p 1 (30,8% a 63,3%) foram encontradas nos grupos tratados com os respectivos anticorpos IgG específicos (FLICKER et al., 2013).

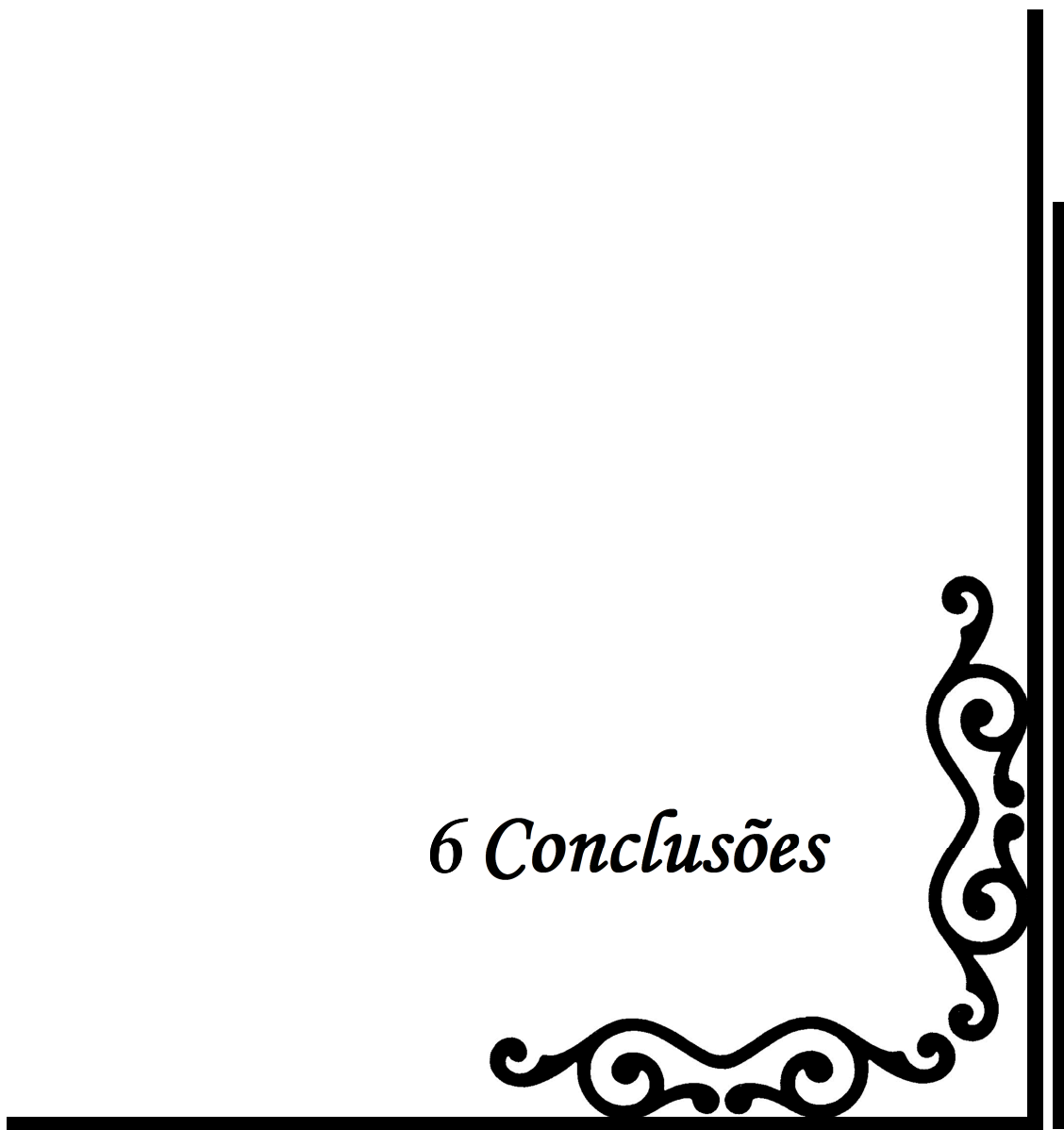
Neste trabalho, quando a fração IgG irrelevante foi utilizada, observou-se uma diminuição nos níveis de IgE específica a Dpt, embora com uma inibição menor, o que poderia estar associado com a heterogeneidade da composição alergênica dos extratos de ácaros (FLICKER; VALENTA, 2003; CASSET et al., 2012). Nesse contexto, anticorpos do

tipo IgG poderiam reagir com ambos componentes alergênicos e não alergênicos presentes no extrato bruto, mas apenas aqueles anticorpos IgE epítipo-específicos seriam os verdadeiros anticorpos IgG bloqueadores (FLICKER; VALENTA, 2003).

De modo geral, os resultados deste estudo mostraram que os anticorpos IgG específicos purificados a partir de soros de pacientes atópicos a ácaros, utilizando uma metodologia disponível e padronizada, são capazes de inibir a reatividade de IgE frente ao extrato Dpt. Além da melhoria da sintomatologia clínica, o qual seria um parâmetro subjetivo, essa abordagem reforça que a avaliação intermitente de anticorpos IgG alérgeno-específicos pode ser uma ferramenta laboratorial de grande importância, ajudando especialistas a seguirem seus pacientes que estão em imunoterapia.

Portanto, a continuidade de estudos nesta linha de pesquisa é fundamental para confirmar as diferentes hipóteses formuladas. Novos modelos e reações, incluindo *immunoblot* de inibição, modelos de experimentação em animais, e ensaios de ativação de basófilos humanos por citometria de fluxo, devem ser desenvolvidos, no futuro próximo, para elucidar o papel bloqueador funcional de anticorpos IgG, e suas subclasses, no processo imunopatológico das alergias respiratórias.

6 Conclusões



- ❖ A precipitação dos *pools* de soro com sulfato de amônio 40% permitiu uma efetiva purificação parcial das imunoglobulinas, contribuindo para a eficácia e rendimento da cromatografia realizada na sequência;

- ❖ A cromatografia em coluna de Proteína G covalentemente ligada à agarose permitiu a purificação de frações contendo a classe de imunoglobulinas IgG de forma satisfatória;

- ❖ O ensaio ELISA inibição proposto neste trabalho permitiu a avaliação *in vitro* da capacidade bloqueadora da classe de imunoglobulinas IgG frente à interação IgE-alérgeno, e novos experimentos futuros são necessários para melhor elucidar tal efeito.

7 Perspectivas futuras



A caracterização e quantificação da capacidade de interação de anticorpos IgG com alérgenos, e sua atividade bloqueadora, frente à interação da IgE, são necessários para elucidar e conhecer de maneira mais detalhada a influência dessas imunoglobulinas nos processos alérgicos, além de possibilitar novas perspectivas no tratamento das alergias, de maneira a ampliar os conhecimentos de tratamentos já bem estabelecidos, como a imunoterapia. Portanto, a combinação de ensaios sorológicos e celulares podem ser a chave para solucionar os problemas relacionados à sintomatologia clínica de pacientes.

Como perspectivas futuras desse estudo estão as análises *in vivo* dos anticorpos IgG purificados, seja em ensaios de cultura celular ou de degranulação de basófilos. Abaixo estão relacionados alguns experimentos já realizados, com seus resultados preliminares, além de metodologias a serem testadas.

7.1 Cultura de sangue total para dosagem de citocinas no sobrenadante por citometria de fluxo

A modulação do perfil de citocinas secretadas no plasma, na presença das frações contendo IgG específica ou irrelevante, foi avaliada a partir da cultura de sangue total de 9 pacientes, sendo 3 pertencentes a cada um dos *pools* anteriormente descritos (ver item 3.12, seção Material e Métodos).

O sangue de cada paciente foi obtido por punção venosa na região do antebraço, utilizando-se tubos de 10 mL contendo heparina sódica (*Vacutainer®* - *Becton Dickinson Vacutainer Systems*, Franklin Lakes, EUA), sendo processado imediatamente após a coleta.

Placas de 96 poços (JET BIOFIL®, Jet Bio-Filtration Products, Co., Ltd, Guangzhou, China) foram cultivadas com 50 µL de sangue total, em triplicata, seguido da adição de 50 µL dos estímulos, previamente diluídos em meio RPMI (Gibco Laboratories, Paisley, Escócia) suplementado com soro fetal bovino a 5% (LGC Biotecnologia LTDA, São Paulo, Brasil), e L-glutamina a 1% (Sigma). Os estímulos consistiram de 5 µg/mL de mitógeno Fitohemaglutinina – PHA (Sigma); 10 µg/mL de extrato alérgênico de *D. pteronyssinus* – Dpt (Hollister-Stier); 40 µg/poço da fração IgG específica ou irrelevante; fração IgG específica previamente adsorvida com extrato Dpt (2 horas, 4°C) e fração IgG irrelevante previamente adsorvida com extrato Dpt. Sangue não estimulado contendo somente meio completo foi incluído como controle. As placas foram incubadas por 48 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, e o plasma foi coletado e armazenado a -70°C para posterior análise.

As citocinas humanas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF e IL-17A) foram mensuradas pelo método de captura, utilizando-se o kit *Cytometric Bead Array* (CBA) *Human Th1/Th2/Th17*, (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, amostras de plasma e padrões de citocinas foram incubados com microesferas de captura de tamanho e fluorescência conhecidas, recobertas com anticorpos específicos para a captura das respectivas citocinas. Anticorpo de detecção conjugado com ficoeritrina (PE) foi adicionado subsequentemente. Após as incubações, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e centrifugado a 200 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 300 μ L da solução de lavagem. Os complexos formados foram mensurados utilizando o citômetro de fluxo BD FACS Aria III TM (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os dados obtidos foram analisados pelo *Software FCAP Array* (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA versão 1.0.1). Os limites de detecção de cada citocina foram: 2,6 pg/mL para IL-2; 4,9 pg/mL para IL-4; 2,4 pg/mL para IL-6; 4,5 pg/mL para IL-10; 3,8 pg/mL para TNF; 3,7 pg/mL para IFN- γ e 18,9 pg/mL para IL-17A. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

7.2 Análise da detecção de histamina intracelular por citometria de fluxo

Para avaliar a capacidade funcional dos anticorpos bloqueadores purificados será realizada a detecção de histamina intracelular em basófilos, associada com a expressão de marcadores de ativação por meio de citometria de fluxo (EBO, 2012).

Serão utilizados 200 μ L de sangue total de pacientes que apresentarem altos índices de IgE específica a *D. pteronyssinus*. Os anticorpos bloqueadores serão pré-incubados com o extrato de *D. pteronyssinus* em concentrações e tempos a serem padronizados, seguindo-se a incubação com amostra de sangue total dos pacientes. Controles da reação serão realizados na ausência de anticorpos bloqueadores ou extrato alergênico. A reação será parada pela adição dos tubos em gelo, e as amostras submetidas à centrifugação por 200 x g por 5 minutos, 4°C.

Para a imunofenotipagem, as amostras serão incubadas com anti-IgE humana, anti-CD203c e anti-CD63 marcados com diferentes fluorocromos, por 20 minutos, 4°C. Os basófilos serão identificados como células anti-IgE e CD203c positivos, enquanto basófilos ativados/degranulados serão identificados como células CD63 positivas. Para a quantificação de histamina intracelular, as células serão fixadas e permeabilizadas com tampão específico e

posteriormente será adicionado o anticorpo anti- diamina oxidase (DAO) marcado com fluorocromo. As análises serão feitas por citômetro de fluxo BD FACS Aria™ III (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA).

7.3 Resultados preliminares

Dentre as citocinas analisadas por CBA, as citocinas de maior interesse nesta investigação foram IL-4 (citocina do perfil Th2), IFN- γ (citocina do perfil Th1) e IL-10 (citocina do perfil regulatório). Os resultados preliminares não mostraram alteração significativa no perfil de IL-4, após estimulação com Dpt+IgG específica, comparado a Dpt somente, nos três grupos de pacientes analisados (Figura 8A). Vale ressaltar que o estímulo mitogênico (PHA) foi capaz de induzir produção de IL-4 pelas células dos três grupos de pacientes, indicando que a cultura celular foi viável.

O perfil de IFN- γ mostrou aumento nos níveis desta citocina, após estímulo de Dpt+IgG específica em relação a Dpt, em todos os grupos de pacientes, embora sem diferenças significativas (Figura 8B). Entretanto, este efeito foi também observado com estímulo de Dpt+IgG irrelevante. De modo similar, foi observado um aumento nos níveis de IL-10 após estímulo com Dpt+IgG específica ou irrelevante, comparado a Dpt, nos três grupos de pacientes, embora sem diferenças significativas (Figura 8C).

Assim, experimentos adicionais deverão ser conduzidos para determinar a concentração ótima de anticorpos IgG específicos que induza estes aumentos de citocinas e minimizar os efeitos da IgG irrelevante. Vale ressaltar que estes resultados não foram devido a um possível efeito estimulador da porção Fc dos anticorpos IgG, uma vez que os controles somente com IgG específica ou irrelevante induziram baixos níveis destas citocinas. É interessante notar que o aumento nos níveis de IFN- γ , após estimulação com o alérgeno previamente incubado com anticorpos IgG específicos, pode indicar uma modulação para o perfil inflamatório Th1. Por outro lado, o aumento nos níveis de IL-10 com estes estímulos pode indicar uma modulação para o perfil anti-inflamatório ou regulatório. Estas duas situações podem ser desejáveis para a ação bloqueadora destes anticorpos IgG específicos.

Experimentos adicionais deverão incluir maior número de pacientes por grupo para se atingir tamanho amostral para significância estatística.

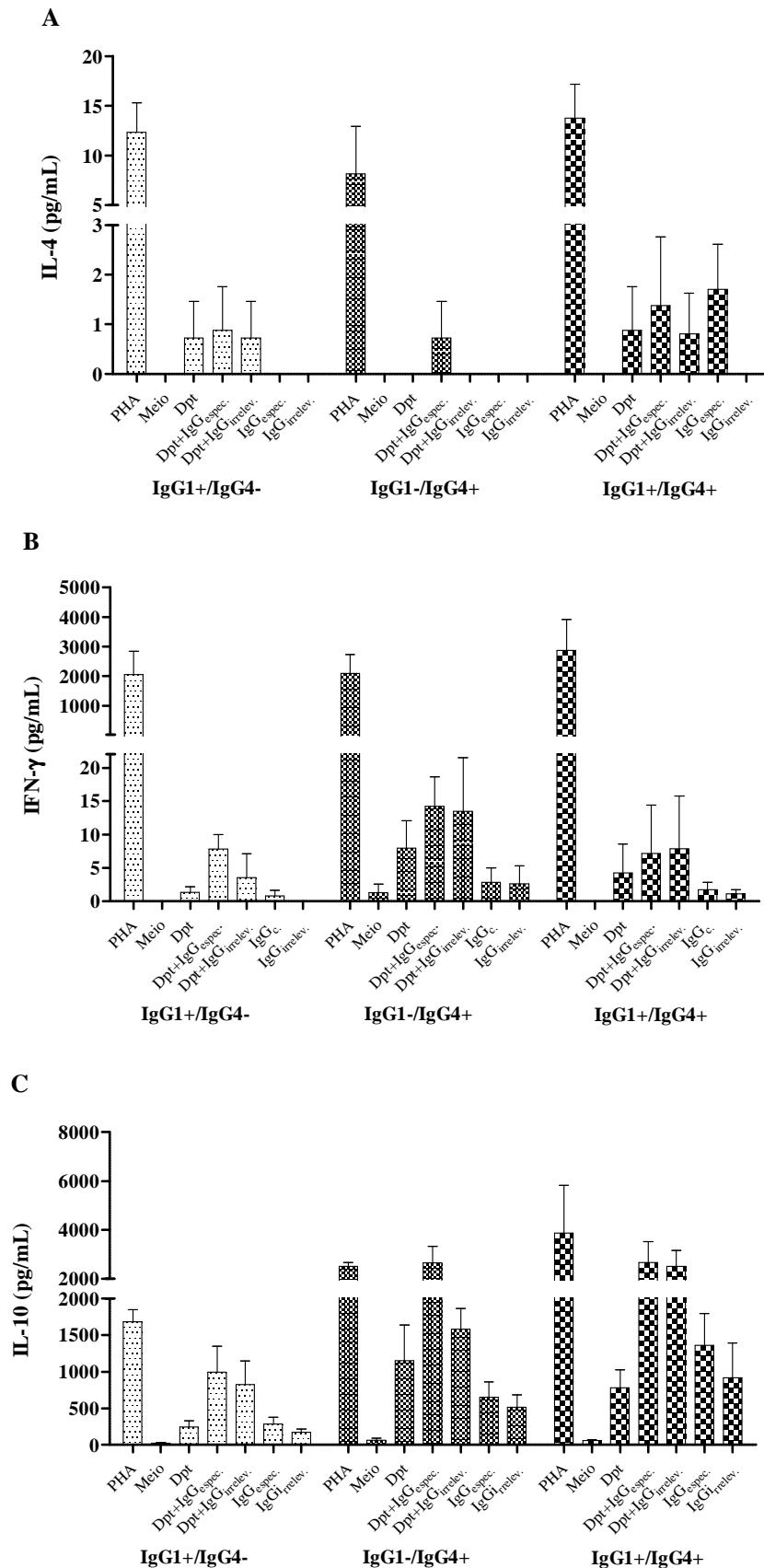


Figura 8 – Níveis de citocinas IL-4 (A), IFN-γ (B) e IL-10 (C) determinados por CBA (BD Pharmingen) em sobrenadante de cultura de sangue total após 48 horas de incubação em três grupos de pacientes atópicos. Os estímulos foram mitógeno fitohemaglutinina (PHA), meio (controle), alérgeno Dpt, Dpt+IgG específica, Dpt+IgG irrelevante, IgG específica ou irrelevante (controles). Todos os pacientes são positivos para IgE anti-Dpt com a presença de somente IgG1, somente IgG4 ou ambos IgG1 e IgG4. As barras representam a média e desvio padrão.

8 Referências bibliográficas



AALBERSE, R.C.; VAN MILLIGEN, F.; TAN, K.Y.; STAPEL, S.O. Allergen-specific IgG4. **Allergy**, Copenhagen ,v. 48, n. 4, p. 559-569, 1993.

AHMAD, S.; MOINUDDIN, ALI. A. Immunological studies on glycated human IgG. **Life Sciences**, Oxford, v. 90, n. 25-26, p. 980-987, 2012.

AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 119, n. 4, p. 780–791, 2007.

BERGMANN-LEITNER, E.S.; MEASE, R.M.; DUNCAN, E.H.; KHAN, F.; WAITUMBI, J.; ANGOV, E. Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies. **Malaria Journal**, London, v. 7, p. 129, 2008.

BESSOT, J.C.; PAULI, G. Mite allergens: an overview. **European Annals of Allergy and Clinical Immunology**, Paris, v. 43, n. 5, p. 141-156, 2011.

BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.; MALLING, H.J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 102, n. 4, p. 558-562, 1998.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its Impact on Asthma: Aria Workshop Report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 108, n. 5, p. s147-s270, 2001.

BURKS, A.W.; CALDERON, M.A.; CASALE, T.; COX, L.; DEMOLY, P.; JUTEL, M.; NELSON, H.; AKDIS, C.A. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 131, n. 5, p. 1288-1296, 2013.

CALDERÓN, M.A.; CASALE, T.B.; TOGIAS, A.; BOUSQUET, J.; DURHAM, S.R.; DEMOLY, P. Allergen-specific immunotherapy for respiratory allergies: From meta-analysis to registration and beyond. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v.127 n. 1, p. 30-38, 2010.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CANNONS, J.L.; LU, K.T.; SCHWARTZBERG, P.L. T follicular helper cell diversity and plasticity. **Trends in Immunology**, Oxford, v.34, n. 5, p. 200-207, 2013.

CASSET, A.; MARI, A.; PUROHIT, A.; RESCH, Y.; WEGHOFER, M.; FERRARA, R.; THOMAS, W.R.; ALESSANDRI, C.; CHEN, K.W.; DE BLAY, F.; VALENTA, R.; VRTALA, S. Varying allergen composition and content affects the in vivo allergenic activity of commercial *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts. **International Archives of Allergy and Immunology**, New York , v.159, n. 3, p. 253-262, 2012.

CASTRO, F.F.M. **Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Alergia**. 1.ed. Barueri: Manole, 2012.

CEUPPENS, J.L.; BULLENS, D.; KLEINJANS, H.; VAN DER WERF, J. Immunotherapy with a modified birch pollen extract in allergic rhinoconjunctivitis: clinical and immunological effects. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 39, n. 12, p. 1903-1909, 2009.

CHEN, K.; CERUTTI, A. New insights into the enigma of immunoglobulin D. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 237, n. 1, p.160-179, 2010.

CHEN, K.; XU, W.; WILSON, M.; HE, B.; MILLER, N.W.; BENGTÉN, E.; EDHOLM, E.S.; SANTINI, P.A.; RATH, P.; CHIU, A.; CATTALINI, M.; LITZMAN, J.B.; BUSSEL, J.; HUANG, B.; MEINI, A.; RIESBECK, K.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; PLEBANI, A.; CERUTTI, A. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. **Nature Immunology**, New York, v. 10, n. 8, p. 889-898, 2009.

CHEN, K.W.; FOCKE-TEJKL, M.; BLATT, K.; KNEIDINGER, M.; GIERAS, A.; DALL'ANTONIA, F.; FAÉ, I.; FISCHER, G.; KELLER, W.; VALENT, P.; VALENTA, R.; VRTALA, S. Carrier-bound nonallergenic Der p 2 peptides induce IgG antibodies blocking allergen-induced basophil activation in allergic patients. **Allergy**, Copenhagen, v. 67, n. 5, p. 609-621, 2012.

COFFMAN, R.L.; SHER, A.; SEDER, R.A. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. **Immunity**, Cambridge, v.33, n. 4, p. 492-503, 2010.

COLLOFF, M. J; AYRES, J.; CARSWELL, F. The control of allergens of dust mites and domestic pets: a position paper. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 1-28, 1992. Supplement 2.

COOKE, R.A.; BERNHARD, J.H.; HEBALD, S.; STULL, A. Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in hay fever type of human allergy. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 62, n. 6, p. 733-750, 1935.

DATASUS, Ministério da Saúde. Morbidade Hospitalar do SUS - por local de internação – Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em 26 de março de 2013.

DURHAM, S.R.; TILL, S.J. Immunological changes associated with allergen immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 102, n. 2, p. 157-164, 1998.

FAGARASAN, S.; HONJO, T. Intestinal IgA synthesis: Regulation of front-line body defences. **Nature Reviews. Immunology**, Londres, v. 3, n. 1, p. 63-72, 2003.

FLICKER, S.; LINHART, B.; WILD, C.; WIEDERMANN, U.; VALENTA, R. Passive immunization with allergen-specific IgG antibodies for treatment and prevention of allergy. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 218, n. 6, p. 884-891, 2013.

FLICKER, S.; STEINBERGER, P.; NORDERHAUG, L.; SPERR, W.R.; MAJLESI, Y.; VALENT, P.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Conversion of grass pollen allergen-specific human IgE into a protective IgG(1) antibody. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 32, n.8, p. 2156–2162, 2002.

FLICKER, S.; VALENTA, R. Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, New York, v. 132, n. 1, p. 13-24, 2003.

FOKKENS, W. J. Antigen-presenting cells in nasal allergy. **Allergy**, Copenhagen, v.54, n. 11, p. 1130-1141, 1999.

GELHAR, K.; SCHLAAK, M.; BECKER, W.; BUFE, A. Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: The ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 497-506, 1999.

HUBY, R. D. J.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Why are some proteins allergens? **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 55, n. 2, p. 235, 246, 2000.

JACKOLA, D.R.; PIERSON-MULLANY, L.K.; LIEBELER, C.L.; BLUMENTHAL, M.N.; ROSENBERG, A. Variable binding affinities for allergen suggest a ‘selective competition’ among immunoglobulins in atopic and non-atopic humans. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 39, n. 5-6, p. 367–377, 2002.

JACQUET, A. The role of the house dust mite-induced innate immunity in development of allergic response. **International Archives of Allergy and Immunology**, New York, v. 155, p. 95-105, 2010.

JAMES, L.K.; BOWEN, H.; CALVERT, R.A.; DODEV, T.S.; SHAMJI, M.H.; BEAVIL, A.J.; MCDONNELL, J.M.; DURHAM, S.R.; GOULD, H.J. Allergen specificity of IgG(4)-expressing B cells in patients with grass pollen allergy undergoing immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 130, n. 3, p. 663-670, 2012.

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

JUSTINO, C. M.; SEGUNDO, G. R.; PEREIRA, F. L.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M.C.; SUNG, S. S.; TAKETOMI, E. A. Mite and pet allergen exposure in Brazilian private cars. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 94, n. 6, p. 658-661, 2005.

KAPLAN, M.H. Th9 cells: differentiation and disease. **Immunological reviews**, Copenhagen, v. 252, n. 1, p. 104-115, 2013.

KOWALSKI, M. L.; JUTEL, M. Mechanisms of specific immunotherapy of allergic diseases, Munksgaard, **Allergy**, Copenhagen, v. 53, n. 5, p. 485-492, 1998.

- KUREBAYASHI, Y.; NAGAI, S.; IKEJIRI, A.; KOYASU, S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. **Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms**, Oxford, v. 18, p. 247-265, 2013.
- LARCHÉ, M.; AKDIS, C.A.; VALENTA, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Nature Reviews. Immunology**, Londres, v. 6, n. 10, p. 761-771, 2006.
- LEMANSKE JUNIOR, R. F.; BUSSE, W. W. 6. Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 111, p. 502-519, 2003. Supplement 2.
- LICHTENSTEIN, L.M.; HOLTZMAN, N.A.; BURNETT, L.S. A quantitative in vitro study of the chromatographic distribution and immunoglobulin characteristics of human blocking antibody. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 101, n. 2, p. 317-324, 1968.
- LIU, X.; NURIEVA, R.I.; DONG, C. Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 252, p. 139-145, 2013.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.
- MACAN, J.; KANCELJAK-MACAN, B.; MILKOVIĆ-KRAUS, S. Pyroglyphid mites as a source of work -related allergens. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**. Zagreb, V. 63, p. 57-66, 2012.
- MALLING HJ. Methods of skin testing: position paper. **Allergy**, Copenhagen, v. 48, p. 55-56, 1993.
- MEILER, F.; KLUNKER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. **Allergy**, Copenhagen, v. 63, n. 11, p. 1455-1463, 2008.
- MERRETT, J.; BARNETSON, R.S.; BURR, M.L.; MERRETT, T.G. Total and specific IgG4 antibody levels in atopic eczema. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 56, n.3, p. 645-652, 1984.
- MEYER, P.; CO MINH, H. B.; DEMOLY, P. Nomenclature révisée des termes d'allergologie. **Archives de Pédiatrie**, Paris, v. 11, n. 9, p. 1131-1134, 2004.
- MIRANDA, D.O.; SILVA, D.A.; FERNANDES, J.F.; QUEIRÓS, M.G.; CHIBA, H.F.; YNOUE, L.H.; RESENDE, R.O; PENA, J.D.; SUNG, S.S.; SEGUNDO, G.R.; TAKETOMI, E.A. Serum and salivary IgE, IgA, and IgG4 antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* and its major allergens, Der p1 and Der p2, in allergic and nonallergic children. **Clinical & Developmental Immunology**, Abingdon, DOI:302739, 2011.
- MÖBS, C.; SLODOSCH, C.; LÖFFLER, H.; PFÜTZNER, W.; HERTL, M. Cellular And Humoral Mechanisms Of Immune Tolerance In Immediate-Type Allergy Induced By Specific

Immunotherapy. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 147, n. 3, p. 171-8, 2008.

MÖBS, C.; IPSEN, H.; MAYER, L.; SLOTOCH, C.; PETERSEN, A.; WÜRTZEN, P.A.; HERTL, M.; PFÜTZNER, W. Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 130, n. 5, p. 1108-1116, 2012.

MORI, J.C.; PIRES, M.C.; GALVÃO, C.E.S.; FERREIRA DE MELLO, J.; MONTEALEGRE, F. Determination of *Blomia tropicalis*-specific IgE and IgG subclasses in atopic dermatitis patients. **Allergy**, v. 56, n. 2, p.180–184, 2001.

MOTHES, N.; HEINZKILL, M.; DRACHENBERG, K.J.; SPERR, W.R.; KRAUTH, M.T.; MAJLESI, Y.; SEMPER, H.; VALENT, P.; NIEDERBERGER, V.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 1198-1208, 2003.

NANDAKUMAR, S.; MILLER, C. W.; KUMARAGURU, U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. **Clinical and Molecular Allergy**, London, v. 7, p. 5, 2009.

NEERVEN, R.J.J.; KNOL, E.F.; EJRNAES, A.; WÜRTZEN, P.A. IgE-Mediated Allergen Presentation and Blocking Antibodies: Regulation of T-Cell Activation in Allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 141, n. 2, p. 119-129, 2006.

NOON, L. Prophylactic inoculation against hay fever. **The Lancet**, v. 177, n. 4580, p. 1572-1573, 1911.

PALOMARES, O.; YAMAN, G.; AZKUR, A. K.; AKKOC, T.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. **European Journal of Immunology, Weinheim**, v. 40, p. 1232-1240, 2010.

PAWANKAR, R.; CANONICA, G.W.; HOLGATE, S.T.; LOCKEY, R.F. Allergic diseases and asthma: a major global health concern. **Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology**, Buffalo, v.12, n.1, p. 39-41, 2012.

PEREIRA, F. L.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. S.; TAKETOMI, E. A. Mite and cat allergen exposure in Brazilian public transport vehicles. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 93, n. 2, p. 179-184, 2004.

PEROSA, F.; CARBONE, R.; FERRONE, S.; DAMMACCO, F. Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.128, n.1, p. 9-16, 1990.

PIPET, A.; BOTTURI, K.; PINOT, D.; VERVLOET, D.; MAGNAN, A. Allergen-specific immunotherapy in allergic rhinitis and asthma. Mechanisms and proof of efficacy. **Respiratory Medicine**, London, v. 103, n. 6, p. 800–812, 2009.

- PLATTS-MILLS, T.A.; VON MAUR, R.K.; ISHIZAKA, K.; NORMAN, P.S.; LICHTENSTEIN, L.M. IgA and IgG anti-ragweed antibodies in nasal secretions. Quantitative measurements of antibodies and correlation with inhibition of histamine release. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 57, n. 4, p. 1041-1050, 1976.
- PREUD'HOMME, J.L.; PETIT, I.; BARRA, A.; MOREL, F.; LECRON, J.C.; LELIÈVRE, E. Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 37, n. 15, p. 871-887, 2000.
- PULENDRAN, B.; ARTIS, D. New paradigms in type 2 immunity. **Science**, New York, v. 337, p. 431-435, 2012.
- QUEIRÓS, M. G. J.; SILVA, D. A. O.; ALVES, R.; CHIBA, H. F.; AMARAL, V. B. S.; ALMEIDA, K. C.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SOPELETE, M. C.; SEGUNDO, G. R. S.; MOREIRA, P. F. S.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite-specific immunotherapy using allergen and/or bacterial extracts in atopic patients in Brazil. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, Barcelona, v. 18, n. 2, p. 84-92, 2008.
- ROQUE, A.C.; SILVA, C.S.; TAIPA, M.A. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: advances and perspectives. **Journal of Chromatography. A**, Amsterdam, v. 1160, n. 1-2, pp. 44-55, 2007.
- SCHEI, M. A.; HESSEN, J. O.; LUND, E. House-dust mites and mattresses. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n. 6, p. 538-542, 2002.
- SIMPLÍCIO, E. C.; SILVA, D. A. O.; BRAGA, I. A.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite and pet allergen exposure in hotels in Uberlândia, Midwestern Brazil. **Indoor Air**, Copenhagen, v. 17, n. 4, p. 278-283, 2007.
- SMITH, A. M.; YAMAGUCHI, H.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; FU, S. M. Prevalence of IgG Anti-Der p 2 Antibodies in Children from High and Low Antigen Exposure Groups: Relationship of IgG and Subclass Antibody Responses to Exposure and Allergic Symptoms. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York, v. 86, n. 1, p. 102-109, 1998.
- SOARES, F.A.; SEGUNDO, G.R.; ALVES, R.; YNOUE, L.H.; RESENDE, R.O.; SOPELETE, M.C.; SILVA, D.A.; SUNG, S.S.; TAKETOMI, E.A. Indoor allergen sensitization profile in allergic patients of the allergy clinic in the University Hospital in Uberlândia, Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.53, n.1, p. 25-28, 2007.
- SOPELETE, M.C.; SILVA, D.A.O.; ARRUDA, L.K.; CHAPMAN, M.D.; TAKETOMI, E.A. Dermatophagoides farinae (Der f 1) and Dermatophagoides pteronyssinus (Der p 1) allergen exposure among subjects living in Uberlândia, Brazil. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 122, n. 4, p. 257-263, 2000.
- TAKETOMI, E. A.; JUSTINO, C. M.; PEREIRA, F. L.; SEGUNDO, G. R.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. J.; SILVA, D. A. O. Taxis but not private cars are mite allergen reservoirs in Brazil. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 16, n. 1, p. 34-36, 2006.

TERRA, S. A.; SILVA, D. A.; SOPELETE, M. C.; MENDES, J.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite allergen levels and acarologic analysis in house dust samples in Uberaba, Brazil. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 14, n. 3, p. 232-237, 2004.

VALENTA, R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 2, p. 446-453, 2002.

VAN NEERVEN, R.J.; WIKBORG, T.; LUND, G.; JACOBSEN, B.; BRINCH-NIELSEN, A.; ARNVED, J.; IPSEN, H. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, n. 5, p. 2944-2952, 1999.

WACHHOLZ, P.A.; SONI, N.K.; TILL, S.J.; DURHAM, S.R. Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 112, n. 5, p. 915-922, 2003.

WANG, Y.H.; WILLS-KARP, M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**, Philadelphia, v. 11, n.5, p. 388-394, 2011.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 28, p. 445-489, 2010.

ANEXO A

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Uberlândia/MG

PROJETO DE PESQUISA

Título: Análise da capacidade bloqueadora de anticorpos das classes IgG e IgA sobre a reatividade de IgE em pacientes alérgicos a Dermatophagoides pteronyssinus

Área Temática:

Pesquisador: Ernesto Akio Taketomi

Versão: 3

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

CAAE: 00688912.6.0000.5152

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 47894

Data da Relatoria: 01/06/2012

Apresentação do Projeto:

Doenças alérgicas são consideradas como resultado de um rompimento na tolerância imune que os indivíduos normalmente possuem à exposição natural aos antígenos ambientais (CALDERÓN et al., 2010). Alergia é definida como sinônimo de hipersensibilidade imediata, isto é, reação mediada por anticorpos, particularmente a imunoglobulina E (IgE), e por células responsáveis pelas manifestações clínicas devido à exposição a um determinado estímulo em dose tolerada por indivíduos saudáveis (JOHANSSON et al., 2004). Indivíduos predispostos geneticamente que respondem aos estímulos provocados pela exposição a diferentes tipos de alérgenos com alta produção de IgE são designados atópicos (JOHANSSON et al., 2004), sendo asma e rinite alérgica as manifestações clínicas mais comuns da atopia mediante exposição a alérgenos ambientais, seguidas pela dermatite atópica (TERR, 1997). Apesar dos progressos na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e do maior e melhor arsenal terapêutico disponível, acredita-se que a mudança no estilo de vida das populações justifique o aumento progressivo na incidência dessas doenças (BACHERT et al., 2008). Os antígenos causadores de doenças alérgicas são denominados de alérgenos. De origem protéica, glicoprotéica ou até mesmo carboidratos isolados, apresentam baixo peso molecular e podem ser provenientes de diversas fontes (JOHANSSON et al., 2004; MEYER; CO MINH; DEMOLY, 2004). Os aeroalérgenos, designação esta por serem transportados pelo ar, são os mais importantes agentes etiológicos da atopia (SMITH et al., 1998). A poeira domiciliar constitui-se de partículas em suspensão de fontes orgânicas e inorgânicas. Segundo Seltzer (1994), a poeira doméstica é uma mistura de fibras vegetais, fibras de carpetes, partículas de móveis, estofados, areia, terra, peças do vestuário, escamação humana, restos alimentares, resíduos químicos e produtos de vários microorganismos (bactérias, vírus e fungos) e macroorganismos (animais domésticos, insetos e aracnídeos). Dentre os grupos de ácaros da poeira domiciliar, uma importância considerável é dada àqueles pertencentes à família Pyroglyphidae, sobretudo às espécies Dermatophagoides pteronyssinus e Dermatophagoides farinae, principais causadores da sensibilização em pacientes alérgicos (PLATTS-MILLS et al. 1997). A única terapia empregada para o tratamento das alergias é a imunoterapia alérgeno-específica (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998). De forma geral, os mecanismos envolvidos na imunoterapia específica incluem a indução de anticorpos bloqueadores, uma mudança da resposta imune do tipo Th2 para

Prof. Dr. Sandra Terezinha de Farias Furlado
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Comitê de Ética em Pesquisa
 Prof.ª Dr.ª Sandra Terezinha de Farias Furlado
 Coordenadora

Th1 e a indução de tolerância. (DURHAM, 1998; VALENTA, 2002). O contato do alérgeno com o organismo e a resposta inflamatória ocorre na maioria das vezes nas regiões de mucosas, onde caracteristicamente estão presentes imunoglobulinas do tipo IgA. Por isso, têm-se discutido o papel desta imunoglobulina como fator de proteção no contato com alérgeno (FAGARASAN, 2003). Vários pesquisadores têm atribuído uma atividade protetora às subclasses de IgG, principalmente, IgG4, que é produzida como resultado de uma longa exposição antigênica e atua neutralizando o antígeno ou bloqueando o anticorpo IgE, melhorando, deste modo, o quadro da reação alérgica (AALBERSE et al., 1993; MÖBS et al., 2008). Trabalhos sugerem ainda que as imunoglobulinas bloqueadoras são capazes de inibir a liberação de histamina por basófilos e impedir a ligação do complexo alérgeno-IgE às células B, e consequentemente a apresentação do alérgeno às células T (MOTHES et al., 2003; WACHHOLZ et al., 2003). Por muitos anos, os basófilos foram considerados como coadjuvantes na fisiopatologia de doenças alérgicas. Hoje, sabe-se que essas células desempenham papel fundamental na inflamação alérgica, através da produção de aminas vasoativas (histamina), metabólitos do ácido aracônico (LTC4), e citocinas pró-inflamatórias, como IL-4 e IL-13 (SCHROEDER, 2011).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

Analisar a capacidade bloqueadora de anticorpos das classes IgG e IgA sobre a reatividade de IgE em pacientes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Objetivo Secundário

- Caracterizar o perfil de reatividade das imunoglobulinas séricas (IgE, IgG1, IgG4, IgA) a partir de amostras de sangue coletadas de pacientes;
- alérgicos e não-alérgicos a *D. pteronyssinus* por meio de teste imunoenzimático; - Isolar e purificar as frações séricas contendo cada imunoglobulina;
- de interesse através de cromatografias de afinidade;
- Confirmar a purificação das imunoglobulinas por meio de eletroforese (SDS-PAGE) e Immunoblot;
- Padronizar testes ELISA de inibição para verificar a capacidade bloqueadora das imunoglobulinas IgA, IgG1 e IgG4 sobre a interação IgE-alérgenos; - Verificar a capacidade funcional das imunoglobulinas IgA, IgG1 e IgG4 na inibição da degranulação de basófilos de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* por meio da detecção de histamina intracelular em basófilos ativados por citometria de fluxo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

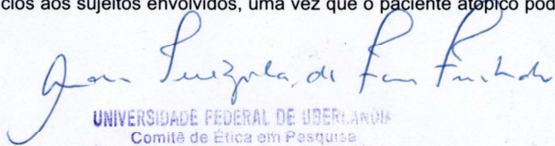
Riscos

Por tratar de uma pesquisa com seres humanos, sabe-se que existem certos riscos envolvidos na sua execução.

Desta forma, todos os procedimentos de coleta, manuseio e transporte de materiais biológicos serão realizados de acordo com as normas de biossegurança. Os riscos envolvidos no desenvolvimento deste estudo proposto são mínimos, e estão relacionados à realização do teste cutâneo de punctura com alérgenos respiratórios nos indivíduos que aceitarem participar do estudo, podendo acarretar em crises alérgicas. Caso isso venha a ocorrer, o indivíduo será prontamente atendido e examinado por médicos e receberá tratamento adequado junto ao Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG).

Benefícios

A pesquisa também proporcionará benefícios aos sujeitos envolvidos, uma vez que o paciente atópico poderá se


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Dr. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora

informar melhor a quais alérgenos ele possui alergia, e de que forma o tratamento específico mediante imunoterapia poderá diminuir a sintomatologia e o uso de medicamentos através do aumento de anticorpos bloqueadores específicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há considerações.

Recomendações:

Não recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências Atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data de entrega de relatório parcial para o CEP: agosto/ 2013.

Data de entrega de relatório final para o CEP: fev/ 2014

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Orientações ao pesquisador

¿ O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

¿ O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

¿ O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ¿ ANVISA ¿ junto com seu posicionamento.

¿ Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comitê de Ética em Pesquisa
Profª Drª Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora

Data de entrega de relatório parcial para o CEP: agosto/ 2013.
Data de entrega de relatório final para o CEP: fev/ 2014

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Orientações ao pesquisador

¿ O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

¿ O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

¿ O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ¿ ANVISA ¿ junto com seu posicionamento.

¿ Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

30 de Junho de 2012

Assinado por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comitê de Ética em Pesquisa
Profª Drª Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902 Telefone: 034-3218-2394

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Análise da capacidade bloqueadora de anticorpos das classes IgG e IgA sobre a reatividade de IgE em pacientes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus*”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dr. Ernesto Akio Taketomi, BSc. Isabella Lima Siman, Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, Dr. Leandro Hideki Ynoue, Dra. Karine Cristine de Almeida, MSc. Juliana Silva Miranda, MSc. Helena Maria Caleiro Acerbi Penha e Lais Martins de Aquino.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender qual o papel dos anticorpos bloqueadores (pequenas estruturas presentes no corpo que nos ajudam na defesa contra doenças) na resposta imunológica em pacientes com rinite alérgica.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Questionário Clínico serão obtidos pela pesquisadora BSc. Isabella Lima Siman. A coleta de material biológico será realizada por um técnico especializado em coleta de sangue no Ambulatório de Alergia, Hospital das Clínicas – UFU.

Na sua participação como voluntário(a), you will answer some questions para sabermos se você tem alguns sintomas típicos de alergia, passará por um Teste Cutâneo de Puntura, isto é, será aplicado em um dos seus braços, 11 (onze) pequenas gotas de substâncias tiradas de ácaros (animais microscópicos presentes geralmente na poeira doméstica), baratas, cão, gato e fungos para sabermos se você é alérgico a estas substâncias ou não. Para passar por este teste, você não poderá ter usado medicamentos antialérgicos nos últimos 7 dias. Este teste demora no máximo 20 minutos e a resposta é obtida de acordo com a presença ou não de uma pápula (carocinho) e um eritema (vermelhidão no local). Para ser considerado positivo tanto a pápula quanto o eritema deverão ser maiores que 3 mm (três milímetros) de diâmetro. Será coletado também 10 mL de seu sangue (veia do braço) que passará por uma série de centrifugações (movimentos de rotações muito rápidos) para separarmos o soro e estudarmos os anticorpos (pequenas estruturas presentes no corpo que nos ajudam na defesa contra doenças que são o objetivo de estudo desse projeto de pesquisa). Talvez você seja chamado novamente para coletarmos 5mL de sangue fresco (veia do braço) para estudarmos os basófilos (células do corpo que liberam substâncias que causam os sintomas da alergia). Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

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

Você não corre risco ao participar deste projeto. O máximo que pode acontecer é você sentir um leve desconforto no momento da introdução da agulha no braço e/ou uma resposta local mais exagerada, isto é, presença de coceira mais intensa, com vermelhidão no local do teste cutâneo. Estes sintomas melhoram após algumas horas. São raríssimos os casos de resposta exagerada aos testes, como aumento da coriza (nariz escorrendo), coceira no nariz e olhos. Nestes casos usamos medicamentos antialérgicos e acompanhamos a melhora no quadro clínico. Este teste cutâneo é feito sob a orientação do médico alergologista, coordenador deste projeto de pesquisa, Dr. Ernesto Akio Taketomi. Quanto à coleta de sangue, você não corre nenhum risco, todo o material usado é descartável.

Bsc. Isabella Siman Lima

Orientador: Dr. Ernesto Akio Taketomi

Assinatura do Participante

Quanto aos benefícios, você participa de um projeto de pesquisa que poderá contribuir para a melhora da qualidade de vida dos pacientes alérgicos.

Você é livre para parar de participar a qualquer momento sem dar qualquer explicação e sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a).

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o(a) senhor(a).

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa o (a) senhor(a) poderá entrar em contato com:

Pesquisadores: Dr. Ernesto Akio Taketomi

BSc. Isabella Lima Siman

Endereço para contato:

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

Caixa Postal: 593 - Bairro: Jardim Umuarama,

38.400.902 - Uberlândia, MG

Fone: 34 3218-2394

Fax: 34 3232-8620

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFU

Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A sala 224

Campus Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP: 38.408.100

Fone: 34 3239 4131

Uberlândia, _____ de _____ de 2012.

BSc. Isabella Lima Siman

Orientador: Dr. Ernesto Akio Taketomi

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

Uberlândia, _____ de _____ de 2012.

Assinatura do Participante

ANEXO C



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Instituto de Ciências Biomédicas
 Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
 Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902 Telefone: 034-3218-2394

QUESTIONÁRIO CLÍNICO

Código Paciente: _____ Data: ____/____/____

Idade: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: () Masculino () Feminino

Grau de escolaridade: () Primeiro grau completo () Segundo grau completo
 () Ensino Superior completo () Pós-graduação

Nível socioeconômico (renda familiar):

- () até 1 salário mínimo () de 5 a 10 salários mínimos
 () de 1 a 2 salários mínimos () mais de 10 salários mínimos
 () de 2 a 5 salários mínimos

Questionário 1 (Módulo Asma)

1) Alguma vez na vida você teve sibilos (chiado no peito)?

() Sim () Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6.

2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito)?

() Sim () Não

3) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?

Nenhuma crise ()

1 a 3 crises ()

4 a 12 crises ()

mais de 12 crises ()

4) Nos últimos 12 (doze) meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?

Nunca acordou com chiado ()

Menos de uma noite por semana ()

Uma ou mais noites por semana ()

5) Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?

() Sim () Não

6) Alguma vez na vida você teve asma?

() Sim () Não

7) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?

() Sim () Não

8) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?

() Sim () Não

Questionário 2 (Módulo Rinite)

Todas as perguntas são sobre problemas que ocorreram quando você não estava gripado ou resfriado:

- 1) Alguma vez na vida você teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?
☐ Sim ☐ Não
- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?
☐ Sim ☐ Não
- 3) Nos últimos 12 (doze) meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?
☐ Sim ☐ Não
- 4) Em qual dos últimos 12 (doze) meses este problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu).

<input type="checkbox"/> Janeiro	<input type="checkbox"/> Maio	<input type="checkbox"/> Setembro
<input type="checkbox"/> Fevereiro	<input type="checkbox"/> Junho	<input type="checkbox"/> Outubro
<input type="checkbox"/> Março	<input type="checkbox"/> Julho	<input type="checkbox"/> Novembro
<input type="checkbox"/> Abril	<input type="checkbox"/> Agosto	<input type="checkbox"/> Dezembro
- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal?

Nada	<input type="checkbox"/>
Pouco	<input type="checkbox"/>
Moderado	<input type="checkbox"/>
Muito	<input type="checkbox"/>
- 6) Alguma vez na vida você teve rinite?
☐ Sim ☐ Não

Questionário 3 (Módulo Eczema)

- 1) Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses?
☐ Sim ☐ Não
 Se você respondeu não, passe para a questão número 6.
- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve essas manchas na pele (eczema)?
☐ Sim ☐ Não
- 3) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?
☐ Sim ☐ Não
- 4) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) desapareceram completamente nos últimos doze meses?
☐ Sim ☐ Não

5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa dessa coceira na pele?

Nunca nos últimos 12 (doze) meses ☐

Menos de uma noite por semana ☐

Uma ou mais noites por semana ☐

6) Alguma vez na vida você teve eczema?

☐ Sim ☐ Não