



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Peptídeo ligante à proteína catiônica de eosinófilo no diagnóstico da esofagite eosinofílica e seu potencial terapêutico na alergia

Aluno: Tafarel Andrade de Souza

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Co-Orientadora: Dra. Ana Paula Carneiro dos Santos

**Uberlândia-MG
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Peptídeo ligante à proteína catiônica de eosinófilo no diagnóstico da esofagite eosinofílica e seu potencial terapêutico na alergia

Aluno: Tafarel Andrade de Souza

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Co-Orientadora: Dra. Ana Paula Carneiro dos Santos

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética)

**Uberlândia-MG
2019**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S729 Souza, Tafarel Andrade de, 1989-
2019 Peptídeo ligante à proteína catiônica de eosinófilo no diagnóstico da esofagite eosinofílica e seu potencial terapêutico na alergia [recurso eletrônico] / Tafarel Andrade de Souza. - 2019.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
Coorientadora: Ana Paula Carneiro dos Santos.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2240>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Filho, Luiz Ricardo Goulart, 1962-, (Orient.). II. Santos, Ana Paula Carneiro dos, 1984-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 07/2019 - PPGGB				
Data:	Vinte e seis de julho de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	18:00h
Matrícula do Discente:	11523GBI020				
Nome do Discente:	Tafarel Andrade de Souza				
Título do Trabalho:	Peptídeo ligante à proteína catiônica de eosinófilo no diagnóstico da esofagite eosinofílica e seu potencial terapêutico na alergia.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização fenotípica de Pacientes Pediátricos Portadores de Eosinofia Esofágica e Investigação de biomarcadores aplicados ao Diagnóstico da Esofagite Eosinofílica.				

Aos vinte e seis dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às 14:00 horas no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Dr^ª. Fabiana de Almeida Araújo Santos, Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Beltran Moschione Castro, Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior, Prof. Dr. José Roberto Mineo e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a): APROVADO (A). Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/07/2019, às 18:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Mineo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/07/2019, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jair Pereira da Cunha Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/07/2019, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana de Almeida Araújo Santos, Usuário Externo**, em 26/07/2019, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Beltran Moschione Castro, Usuário Externo**, em 26/07/2019, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1367935** e o código CRC **1AD24278**.

*Dedico esse trabalho a minha
amada mãe Eleusa (in memoriam)
pelo amor, apoio e incentivo
a mim sempre dados.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo amparo e pelas oportunidades que surgiram na minha vida, e que sempre me dá forças para superar todos os obstáculos em meu caminho.

Agradeço a minha amada mãe Eleusa, pelo amor incondicional, ensinamentos, apoio, paciência e compreensão dedicados a mim durante 27 anos. Por ter sido a minha melhor amiga, e meu anjo da guarda que continua me dando forças em todos os momentos difíceis da minha vida. Ela foi e sempre será minha maior inspiração para seguir em frente com meus sonhos.

Ao meu irmão e cunhada, Marcos e Érika, pela amizade e apoio nos momentos difíceis e pelos meus sobrinhos Henrique e Alice por trazer de volta a alegria na nossa família.

Ao Thiago pela parceria e companheirismo, por ter cuidado de mim em momentos difíceis, com ou sem pedra nos rins em pleno doutorado sanduíche, obrigado por tudo! Você é especial e a cada dia se torna mais importante na minha vida!

Aos meus familiares, pela companhia, palavra e abraços que me trouxeram conforto.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, por oferecem condições e infraestrutura para a realização deste trabalho.

Aos membros desta banca pela disponibilidade em participar da avaliação e pela contribuição à qualidade deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, por me aceitar como aluno de doutorado nos últimos 4 anos, por ter confiado no meu trabalho, pelo ensino, incentivo e estímulo que foram fundamentais para o meu desenvolvimento, e também pela sua preocupação e compreensão nos momentos que precisei me ausentar no começo do doutorado. Agradeço imensamente pela oportunidade de trabalharmos juntos e pela amizade.

A minha orientadora de doutorado sanduíche Prof^a Dr^a Fatima Ferreira-Briza, por me aceitar nesse período, ter confiado no meu trabalho, pela

preocupação e pelos ensinamentos que sem dúvida possibilitou meu crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Peter Briza pela contribuição, conhecimentos e realização dos experimentos de espectrometria de massa.

A minha co-orientadora e amiga Dra. Ana Paula, pelo acolhimento, auxílio e ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento desta tese de doutorado.

A minha amiga-irmã Andreia pela amizade e pelo convívio que tivemos nos 2 primeiros e intensos anos do meu doutorado e que nos últimos 2 anos a sua alegria e cumplicidade me fizeram falta.

À professora Dra. Cristina Palmer pelo acolhimento no grupo, amizade e por compartilhar o seu conhecimento na parte da pesquisa médica e que foi a idealizadora do projeto no Setor de Endoscopia do departamento de pediatria (UFU).

À Dra. Luciane do setor de endoscopia do departamento de pediatria (UFU) pela ajuda na coleta e análise das amostras e as médicas do Laboratório de Patologia (UFU) Dra. Tatiane e Dra. Tânia pela análise da histopatologia.

A Emília por ter sido mais que uma amiga durante meu doutorado, sempre preocupada em me ajudar em momentos difíceis e de ter aquela palavra amiga de que tudo iria ficar bem. Obrigado por tudo, você é muito especial pra mim!

Aos meus amigos da “La Famiglia”, Emília, Edu, Mau, Josie, Lu, Walther e Galber pelo convívio durante o doutorado sanduíche, pela alegria e carinho que me receberam e que foram fundamentais, principalmente, em períodos de inverno -20 °C. Vocês são pessoas especiais!!

Aos meus amigos Carina e Cristiano, pela amizade, apoio e que durante o doutorado sanduíche me abraçaram como filho e estavam presentes em todos os momentos. Vocês são fundamentais e pessoas especiais na minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Biociências na Universidade de Salzburg, Lisa, Thanasis, Olivia, Sara, Velky, Lorenz, Katharina, Gabi, pela paciência, ensinamentos e amizade durante o meu doutorado sanduíche.

Aos meus amigos do Laboratório de Nanobiotecnologia, pela amizade e apoio que sempre me proporcionaram.

As técnicas do Laboratório de Nanobiotecnologia, Luciana, Valéria e Natássia pela organização e trabalho de excelência no laboratório. Vocês são essenciais!

À CAPES, pela bolsa de doutorado no Brasil e de doutorado sanduíche e às agências de fomento CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro, sem o qual seria impossível o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos da 3ª Turma de Biomedicina-UFU que mantiveram o companheirismo e apoio, me incentivando e motivando ao longo de toda essa jornada acadêmica, e fora dela também, pelas nossas conversas, risadas e encontros.

Aos amigos de perto e de longe. Obrigado a vocês por estarem nos momentos felizes e tristes, me apoiando e me alimentando de certezas, carinho, força e alegria.

Sumário

Resumo	1
Abstract.....	2
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Esofagite Eosinofílica (EEo)	3
1.2 Epidemiologia da EEo	4
1.3. Diagnóstico da EEo	5
1.3.1 Aspectos clínicos	5
1.3.2 Aspectos endoscópicos	6
1.3.3 Aspectos histopatológicos	7
1.4 Tratamento.....	11
1.5 Complicações e prognóstico.....	12
1.6 Eosinófilos.....	13
1.7 Proteína Catiônica eosinofílica.....	14
1.8 Mastócitos.....	18
1.9 <i>Phage Display</i>	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Seleção de pacientes e coleta de amostras.....	23
3.2 Espectrometria de Massa	25
3.3 Seleção de peptídeos por <i>Phage Display</i>	26
3.4 Amplificação de colônias de fagos.....	28
3.5 <i>Phage</i> -ELISA pré-sequenciamento	29
3.6 Extração de DNA de fagos	29
3.7 Sequenciamento de DNA	30
3.8 Análise dos dados por bioinformática	30
3.9 <i>Phage</i> -ELISA: curva de linearidade de fagos selecionados.....	31
3.10 Avaliação da reatividade do clone selecionado utilizando muco esofágico de pacientes	31
3.11 Análise estatística	32
3.12 Preparação do peptídeo sintético	33
3.13 Acoplamento do peptídeo sintético à microesferas magnéticas (-NHS).....	33
3.14 Ensaio de reatividade com peptídeo sintético.....	35

3.15 Ensaio de <i>Dot blot</i> com peptídeo sintético	35
3.16 Tratamento de mastócitos humanos LAD2 com proteína catiônica eosinofílica (via independente de IgE)	36
3.17 Ensaio de citotoxicidade do peptídeo em linhagem celular de mastócitos humanos LAD2	37
3.18 Ensaio de degranulação de mastócitos humanos LAD2 sensibilizados e não sensibilizados por IgE	38
3.19 Tratamento da degranulação da linhagem celular de mastócitos humanos LAD2 com peptídeo E5	40
3.20 Espectrometria de massa: degranulação de mastócitos sensibilizados por IgE x degranulação de mastócitos não sensibilizados por IgE	41
3.21 Análise de dados <i>in Silico</i>	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Análise de espectrometria de massa	43
4.2 Seleção de fagos ligantes à PCE	44
4.3 Validação de clones de fagos por <i>phage</i> -ELISA	46
4.4 <i>Phage</i> -ELISA: muco de pacientes	47
4.5 ELISA e <i>Dot blot</i> com peptídeo sintético	51
4.6 Tratamento de mastócitos humanos LAD2 com proteína catiônica eosinofílica (via independente de IgE)	51
4.7 Ensaio de citotoxicidade	52
4.8 Ensaio de degranulação de mastócitos humanos LAD2 sensibilizados e não sensibilizados por IgE	53
4.9 Tratamento da degranulação de mastócitos humanos LAD2 com peptídeo E5	53
4.10 Análise de espectrometria de massa	54
4.11 Análise de dados <i>in Silico</i>	61
5 DISCUSSÃO	63
5.1 Seleção e abordagem do diagnóstico da Esofagite Eosinofílica	63
5.2 Abordagem terapêutica	66
6 CONCLUSÕES	70
Referências Bibliográficas	71
ANEXOS	91
Anexo I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	91
Anexo II. Termo de Assentimento para o menor com mais de 12 anos	93
Anexo III. Parecer Consubstanciado do CEP	95
Anexo IV. Pedido nacional de patente.	99

Lista de Figuras

Figura 1. O gene RNASE3 (PCE) e a sequência da proteína com números referentes à sequência de aminoácidos.....	15
Figura 2. Representação esquemática de algumas das interações bidirecionais entre mastócitos e eosinófilos.	17
Figura 3. Esquema representativo de um bacteriófago filamentosso M13 ilustrando as proteínas do capsídeo viral: pIX, pVII, pVIII, pVI e pIII.	20
Figura 4. Esquema representativo da seleção de peptídeos por phage display.	28
Figura 5. Esquema representativo do acoplamento do peptídeo E5 em microesferas magnéticas ativadas pelo grupo -NHS da Thermo Scientific.....	34
Figura 6. Esquema representativo do experimento de degranulação de mastócitos humanos LAD2 dependente e independente de IgE.....	39
Figura 7. Proteínas com expressão diferencial entre os grupos Controle, EEo e DRGE. Seta em vermelho a PCE.....	43
Figura 8. Análise de espectrometria de massa da PCE.	44
Figura 9. Seleção e enriquecimento da biblioteca de peptídeos..	45
Figura 10. Reatividade obtida através da interação dos clones de fagos sequenciados e clone irrelevante com a proteína catiônica eosinofílica.	46
Figura 11. Detecção de PCE por ensaio <i>phage</i> -ELISA e estrutura 3D da ligação do peptídeo E5 com a PCE..	47
Figura 12. <i>Phage</i> -ELISA em muco de pacientes pediátricos.	48
Figura 13. Correlação linear entre o Índice de Reatividade (IR) x Pico de contagem de eosinófilos/CGA.	49
Figura 14. ELISA e dot blot com peptídeo E5.....	51
Figura 15. Tratamento de células LAD2 com Proteína Catiônica Eosinofílica (PCE).	52
Figura 16. Ensaio de citotoxicidade com peptídeo E5 em células LAD2.....	52
Figura 17. Degranulação de células LAD2.	53
Figura 18. Tratamento da degranulação de mastócitos humanos LAD2 com peptídeo E5.....	54

Figura 19. Diagrama de Venn de proteínas identificadas e suas intersecções entre as diferentes condições de degranulação de células LAD2 (IgE-dependente, IgE-independente e degranulação basal).....	55
Figura 20. Categorização funcional das proteínas identificadas em cada tipo de degranulação.....	56
Figura 21. Análise do perfil proteômico entre as condições de degranulações...	57

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características gerais dos pacientes incluídos no estudo.....	24
Tabela 2. <i>Phage</i> -ELISA pré-sequenciamento dos clones selecionados contra a PCE recombinante.	45
Tabela 3. Sequências de aminoácidos e frequências dos peptídeos selecionados.	46
Tabela 4. Distúrbios atópicos em pacientes com $IR \geq 1$	50
Tabela 5. Características sugestivas de EEO presentes em pacientes não-EEO com $IR \geq 1$ e em pacientes EEO com $RI \leq 1$	50
Tabela 6. Proteínas identificadas exclusivamente na degranulação IgE-independente.....	58
Tabela 7. Alinhamento da sequência do peptídeo E5 (YPLHNWWSPYHF) com proteínas, mostrando as similaridades encontradas com as proteínas anotadas no banco de dados do GeneBank pelo BLAST, com a função, os números de acesso no Swissprot e valores do escore e da identidade.....	62

Lista de Abreviaturas

Aa	Aminoácido
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Soro albumina bovina
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
CGA	Campo de grande aumento
°C	Graus Celsius
EDA	Endoscopia digestiva alta
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (conjugado com peroxidase)
IBP	Inibidor de bomba de prótons
IgG	Imunoglobulina G
IBP	Inibidor de bomba de prótons
IL	Interleucina
ILA	<i>International Leprosy Association</i>
IPTG	Isopropil α -D-tiogalactosidase
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
M	Molar
M13	Bacteriófagos filamentosos
Mg	Microgramas
μL	Microlitro
Mm	Micrometro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium</i>
Nm	Nanometro
Ng	Nanograma
OD	Densidade óptica

pb	Pares de bases
p/v	Peso por volume
PBS	Tampão fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PCE	Proteína catiônica eosinofílica
PDB	<i>Protein data bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
Pfu	Unidades formadoras de colônias
Ph.D- 12	Biblioteca randômica contendo 12 peptídeos
pIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
PNPP	<i>p-nitrophenyl phosphate</i>
RPM	Rotações por minuto
TBS	Tampão Tris-HCl e Sódio
TBST	Tampão Tris-HCl e Sódio com tween 20
TMB	5,5'-Tetrametilbenzidina
Tris	Tri-hidroxi-metil-aminometano
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
X-gal	Substrato cromogênico de β -galactosidase

Lista de Aminoácidos

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cis	C
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Fen	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Resumo

A esofagite eosinofílica (EEo) é uma condição inflamatória do esôfago caracterizada pela presença de um grande número de eosinófilos. Atualmente, o diagnóstico da EEo é baseado em procedimentos endoscópicos invasivos para o exame histopatológico. Nesse contexto, nosso objetivo foi selecionar e validar peptídeos com potencial para serem usados na detecção de EEo. Para tanto, foi realizada uma análise comparativa da proteômica, utilizando espectrometria de massa (LC-MS/MS), de biópsias esofágicas de pacientes pediátricos com esofagite eosinofílica, doença do refluxo gastroesofágico e pacientes controle, que mostrou a proteína catiônica eosinofílica (PCE) regulada positivamente em pacientes EEo. Em seguida, a tecnologia de *Phage Display* foi utilizada para selecionar peptídeos contra a PCE e doze clones de fagos foram selecionados após três ciclos de *biopanning*. Destes clones, o clone de fago (E5) com maior reatividade contra a PCE foi capaz de distinguir, no muco esofágico, a esofagite eosinofílica, doença do refluxo gastroesofágico e pacientes controles através do ensaio ELISA em 94 pacientes pediátricos, alcançando a sensibilidade de 84,62%, especificidade de 82,72%, e AUC 0,84. Este é o primeiro estudo que demonstra a detecção da proteína catiônica eosinofílica usando peptídeos selecionados por *phage display* e pode ser uma ferramenta de diagnóstico útil para a detecção de pacientes EEo. Além disso, na abordagem terapêutica, o peptídeo (E5) demonstrou ser capaz de diminuir a degranulação independente de IgE. O alinhamento desse peptídeo com proteínas importantes de granulócitos, principalmente de mastócitos, reforçam a possibilidade desse peptídeo mimetizar receptores importantes para a degranulação de mastócitos. E, após a análise pela espectrometria de massa (LC-MS/MS) do sobrenadante da condição de degranulação independente de IgE, foram encontradas 79 proteínas exclusivas, as quais fornecem informações importantes para um melhor entendimento da alergia mediada por mastócitos, bem como o estudo de alvos biológicos que sirvam como estratégias diagnósticas e/ou terapêuticas no futuro.

Palavras-chave: Proteína catiônica eosinofílica, *phage display*, diagnóstico, esofagite eosinofílica, IgE-independente

Abstract

Eosinophilic esophagitis (EoE) is an inflammatory condition of the esophagus characterized by the presence of a large number of eosinophils. Currently, EoE diagnosis is based on invasive endoscopic procedures for histopathological examination. Non-invasive biomarkers would be valuable for diagnosis and monitoring of EoE. Our aim was to select and validate peptides with potential to be used for EoE detection. We performed a comparative proteomics analysis using LC-MS/MS of esophageal biopsies from pediatric patients with eosinophilic esophagitis, gastroesophageal reflux disease and control individuals. Then, Phage Display technology was used to select peptides against up-regulated protein from patients with EoE. Twelve phage clones were selected after three biopanning rounds, and the best phage clone reactivity was evaluated in a phage-ELISA assay using patient mucus samples. Mass spectrometry showed that eosinophil cationic protein (ECP) was up-regulated in EoE patients. A high reactive ECP- binding peptide (E5) was able to distinguish mucus of eosinophilic esophagitis patients from gastroesophageal reflux disease and healthy individuals by ELISA in 94 pediatric patients, achieving sensitivity of 84.62, specificity of 82.72, a positive likelihood ratio of 4,896, and an area under the curve of 0.84. This is the first study to demonstrate the detection of eosinophil cationic protein using peptides identified phage display. The peptide presented herein could be a useful diagnostic tool for the detection of EoE patients. Furthermore, in the therapeutic approach, peptide (E5) has been shown to be able to decrease an IgE-independent degranulation. The alignment of the peptide with some proteins, especially from mast cells, reinforce the possibility of peptide mimetic the receptors important for a degranulation of mast cells. After mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of the supernatant of the IgE-independent degranulation condition, we found 79 unique proteins, which provide important information for a better understanding of mast cell-mediated allergy, as well as study of biological targets that serve as diagnostic and/or therapeutic strategies in the future.

Keywords: Eosinophilic cationic protein, phage-display, diagnostic, Eosinophilic esophagitis, IgE-independent.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esofagite Eosinofílica (EEo)

Em 1978 o termo esofagite eosinofílica (EEo) foi registrado pela primeira vez em banco de dados científicos. O estudo relatou a condição de um paciente adulto que apresentava acalasia e a presença de infiltração eosinofílica na mucosa esofágica (LANDRES et al., 1978). No entanto, foi considerada uma entidade clínica apenas em 1981, quando pesquisadores, através de manifestações radiológicas, relataram o caso de um paciente que apresentava intensa disfagia (PICUS; FRANK, 1981).

Considerada por muito tempo uma condição rara, a EEo é hoje uma doença que vem aumentando sua incidência e prevalência assim como outras alergias como asma, rinite alérgica, dermatite atópica e alergias alimentares (LIACOURAS et al., 2014). Um recente estudo sistemático de meta-análise mostrou a incidência de EEo na América do Norte e Europa, estimada em uma taxa de 3,7 / 100.000 pessoas por ano. Tal estudo afirma ainda que a prevalência populacional da EEo possui ampla diferença entre demais estudos de coorte, possivelmente devido a variações no diagnóstico da doença (ARIAS et al., 2016). Embora a EEo venha apresentando crescente incidência e prevalência ao longo dos anos, a doença é ainda considerada nova, pois os dados que se tem à longo prazo são poucos e o diagnóstico da doenças ainda apresenta muitas falhas. Um dos desafios enfrentados pela pesquisa é a similaridade fenotípica da EEo com a doença do refluxo gastroesofágica (DRGE) (PATEL; HIRANO, 2018) pois, ambas as desordens possuem sintomas semelhantes, como a presença de eosinofilia esofágica (NGO et al., 2006; KIA; HIRANO, 2015).

A relação diagnóstica da EEo com a DRGE sempre foi foco de discussão pela similaridade clínica, endoscópica e histológica nas manifestações das duas doenças. A presença de evidências da DRGE, antes considerada fator excludente do diagnóstico de EEo, hoje não é mais apoiada (LUCENDO et al., 2017). Cheng e col. (2014) apresentam argumentos que demonstram que as duas patologias podem coexistir e que esta interação parece envolver mecanismos complexos que merecem ser mais detalhadamente estudados.

Os métodos diagnósticos e de acompanhamento dos pacientes com EEO aplicados até o momento, apresentam falhas na identificação e no manejo dos grupos clínicos que possuem evolução fenotípica variada. Logo, o esclarecimento dessas questões conduz os esforços científicos para níveis moleculares almejando a obtenção de melhores marcadores para o diagnóstico e prognóstico da doença.

1.2 Epidemiologia da EEO

Para a compreensão da epidemiologia da EEO, muitos trabalhos foram realizados nas últimas duas décadas. Os estudos iniciais publicados estiveram mais focados na descrição de casos e na caracterização da doença. Atualmente, as pesquisas estão mais voltadas para a determinação de fatores de risco, etiologias novas e biomarcadores para a doença. Todos esses estudos fornecem informações para caracterização epidemiológica da EEO. Apesar de se ter relatos de EEO ocorrendo em ampla faixa etária, desde crianças até idosos, a maior parte dos casos se concentra entre crianças, adolescentes e adultos, até a idade dos 50 anos (LIACOURAS et al., 2011; DELLON et al., 2013). Existe uma considerável discrepância entre os sexos, pois afeta, significativamente, mais indivíduos do sexo masculino que feminino (masculino/feminino, 3:1) (LIACOURAS et al., 2011; DELLON et al., 2014) no entanto, a razão disso ainda não está definida (DELLON et al., 2007; PRASAD et al., 2009; LIACOURAS et al., 2011).

Esofagite eosinofílica está presente na maioria dos grupos étnicos, porém a incidência é maior em populações de países ocidentais (PRASAD et al., 2009; VAN RHIJN et al., 2013) com predomínio ainda não esclarecido em indivíduos de cor branca e não hispânicos (LIACOURAS et al., 2011; PRASAD et al., 2009; DALBY et al., 2010). Apesar da EEO estar sendo alvo de pesquisas em todo mundo, é mais extensivamente estudada em países ocidentais, onde tem prevalência estimada de 0,4% entre crianças e adultos. Na população em geral, estima-se que um valor aceitável da prevalência da EEO seria de 0,5 – 1,0 caso/1000 pessoas/ano (DELLON; LIACOURAS, 2014). O maior estudo já realizado nos Estados Unidos encontrou prevalência de 57/100.000 casos

(DELLON et al., 2013). Já em relação à incidência da EEO, a maioria dos relatos estima que esteja entre 6-13 casos/100.000 pessoas (DELLON; LIACOURAS, 2014). No Brasil, entretanto, a EEO não possui valores de incidência e prevalência bem definidos para crianças e adolescentes, sendo que o que mais se encontra na literatura nacional são relatos ou série de casos publicados em diversos centros. Um estudo feito na cidade de Niterói-RJ mostrou prevalência em adultos com clínica de disfagia e queimação de 1,3% (BOECHAT et al., 2015). Ressalta-se também a frequente relação da EEO com doenças alérgicas, ocorrendo muitas vezes de forma concomitante. A presença de atopias como alergia alimentar, asma, rinite alérgica e dermatite atópica ocorrendo, simultaneamente, com EEO é relatada em mais de 60% dos casos (SPERGEL et al., 2007). Muitos estudos relatam que 50 a 60% dos pacientes com EEO tem história prévia de atopia (PRASAD et al., 2009; CHEHADE et al., 2007). A maioria dos pacientes com EEO tem sensibilização com alérgenos alimentares, aeroalérgenos ou ambos baseado em resposta positiva no teste cutâneo ou teste sorológico de anticorpos IgE específico (LIACOURAS et al., 2011).

1.3. Diagnóstico da EEO

Existem vários critérios que são indispensáveis para o diagnóstico da EEO, dentre eles estão os sintomas, os sinais clínicos e sinais endoscópicos e as alterações histológicas dos pacientes. Outro importante critério de diagnóstico é a exclusão de qualquer outra causa de eosinofilia esofágica em particular as gastroesofágicas (PATEL; HIRANO, 2018).

1.3.1 Aspectos clínicos

A EEO apresenta ampla diversidade em seu espectro clínico em adultos e crianças, com início dos sintomas em idades diversas. É uma doença inflamatória crônica identificada pelo aumento do número de infiltrados eosinofílicos na mucosa esofágica (condição também conhecida por eosinofilia esofágica) e intensa hiperplasia no epitélio escamoso do esôfago. Os sintomas típicos da EEO são disfagia, dor no peito e impactação alimentar, resultantes dos sinais clínicos

de disfunção e fibrose esofágica (LIACOURAS et al., 2011; PAPADOPOULOU et al., 2014; MUIR et al., 2015; WARNERS et al., 2017). Lactentes e crianças menores podem apresentar intolerância ou recusa alimentar, intensa disfagia, com descrição de sintomas persistentes da DRGE, mesmo após tratamento adequado com inibidores de bomba de prótons. Vômitos frequentes, irritabilidade e baixo ganho de peso são também relatados (PEETIUK; MILLER; KAUL, 2007). Considera-se que bebês e crianças menores apresentem geralmente dificuldades de amamentação, enquanto que vômitos e dor abdominal ou retroesternal sejam sintomas mais comuns em crianças na idade escolar (ACEVES et al., 2009). Crianças maiores e adolescentes podem manifestar dor abdominal, vômitos, diarreia, disfagia e mesmo impactação com alimentos sólidos, ao passo que, em adultos, o achado clínico maior é a disfagia intermitente e a impactação, a qual pode surgir de forma abrupta em pacientes outrora assintomáticos (PUTNAM, 2009). Alguns autores sugerem que em adultos, devido ao maior tempo de progressão da doença, sintomas como disfagia para alimentos sólidos e impactação são mais esperados, enquanto, nas crianças, sintomas inespecíficos, como dor abdominal e vômitos são os mais comuns (SINGLA et al., 2015).

São descritos também alterações no comportamento alimentar desses pacientes que passam a adotar perfil adaptativo na alimentação, evitando alimentos que possam causar disfagia e impactação. Essa alteração, consciente ou não, provocada pelo paciente necessita ser cuidadosamente investigada durante o exame clínico, a fim de evitar retardo ou falha diagnóstica (SCHOEPFER et al., 2014).

1.3.2 Aspectos endoscópicos

Muitos estudos já relataram a presença de variadas anormalidades esofágicas em exames de endoscopia digestiva alta (EDA) em pacientes com EEO. Entre esses achados estão anéis esofágicos fixos, também conhecidos como “traquealização”, anéis esofágicos transitórios, exsudato esbranquiçado, sulcos longitudinais, edema, estreitamentos esofágicos e lacerações da parede do esôfago (LIACOURAS et al., 2011). Além disso, EDA mostrando mucosa normal também pode ser vista em casos de EEO (CROESSE et al., 2003). Apesar de

serem variados e numerosos os achados endoscópicos na EEO, nenhum deles é considerado patognomônico, um vez que todos podem ser encontrados em outras desordens esofágicas (LIACOURAS et al., 2011). A presença de exsudato esbranquiçado, por exemplo, pode induzir confusão diagnóstica, na endoscopia, com esofagite fúngica. Os achados histopatológicos, porém, mostram diferenças que permitem a distinção entre essas entidades (AHMED et al., 2000). Enquanto os aspectos histopatológicos da EEO são semelhantes em todas as faixas etárias, os achados endoscópicos podem variar. Essa variação geralmente é devida ao tempo de progressão da doença, podendo, em casos mais prolongados, ser encontrada alteração decorrente de remodelação esofágica, como constrições fibrosas (SCHOEPFER et al., 2013). Na endoscopia, crianças geralmente apresentam achados com características inflamatórias, incluindo placas esbranquiçadas e sulcos longitudinais, ao contrário de adultos e daqueles com doença de longa progressão que mostram principalmente aspectos indicativos de fibrose e estenose, como anéis e constrições (SCHOEPFER et al., 2013; SINGLA et al., 2015; DELLON; LIACOURAS, 2014). Segundo as diretrizes para EEO do Colégio Americano de Gastroenterologia, de 2013, a recomendação é para que sejam coletados de 2 a 4 fragmentos da mucosa esofágica durante o procedimento endoscópico, tanto da parte proximal quanto da parte distal, de pacientes com suspeita para EEO (DELLON et al., 2013). Além disso, coleta de fragmentos do antro gástrico e do duodeno é recomendada em todas as crianças e em adultos com alguma anormalidade, a fim de se excluir outras causas de eosinofilia esofágica, como gastroenterite eosinofílica, doença de Crohn e doença celíaca (MOAWAD et al., 2016).

1.3.3 Aspectos histopatológicos

Características histopatológicas da EEO são essenciais, visto que uma delas é o fator necessário para se fazer o diagnóstico, atualmente definido como a presença de 15 ou mais eosinófilos/CGA (campo de grande aumento) permeando o epitélio da mucosa esofágica (LIACOURAS et al., 2011). Nesse diagnóstico existe a limitação da diferença de padronização do tamanho do CGA e a identificação da localização exata do infiltrado eosinofílico intraepitelial

(LIACOURAS et al., 2011). No consenso de 2011, os estudos mostraram que o achado de 15 ou mais eosinófilos/CGA seria o valor limite mais adequado a ser considerado (LIACOURAS et al., 2011). Para uma avaliação satisfatória dos achados morfológicos, recomenda-se que se tenha de dois a quatro fragmentos de mucosa esofágica da parte proximal e distal, e que esses fragmentos estejam bem orientados na lâmina histológica (DELLON et al., 2013).

A contagem de eosinófilos em fragmentos esofágicos é essencial para diagnóstico. Porém, é importante e recomendado que se avaliem também outras características morfológicas que fazem parte de um quadro inflamatório inespecífico. Entre elas, destacam-se hiperplasia de células da camada basal, abscessos eosinofílicos, estratificação da superfície dos eosinófilos, espaços intercelulares dilatados (DIS), alteração do epitélio de superfície, células epiteliais disceratóticas e fibrose da lâmina própria (COLLINS et al., 2014), 2014), alongamento de papilas do córion, espongiose, microabscessos de eosinófilos e a tendência à superficialização dos eosinófilos na mucosa. Esses achados podem ser encontrados na EEO, como também em outras desordens esofágicas cuja patogênese inclui processo inflamatório, como esofagite de refluxo, esofagite fúngica, envolvimento esofágico na doença de Crohn, entre outras (LIACOURAS et al., 2011). Ressalta-se que esses achados, bem como a contagem de eosinófilos, são importantes não só para o diagnóstico da EEO, mas também no acompanhamento dos pacientes, a fim de averiguar correlação sintomático-endoscópico-morfológica (LIACOURAS et al., 2011).

Em relação aos achados morfológicos adicionais à contagem de eosinófilos, tem-se a hiperplasia de células da camada basal. A camada basal é uma das partes que compõe o epitélio de revestimento do esôfago, juntamente com as camadas espinhosa e superficial. Em situações de normalidade ela ocupa cerca de 5 a 15% da espessura do epitélio esofágico (DENARDI; RIDDELL, 2012). Quando se tem aumento da sua espessura, tem-se hiperplasia. Essa hiperplasia pode ser graduada em leve, quando o aumento é inferior a 30% e acentuada quando é igual ou superior a 30%. Hiperplasia de células da camada basal pode estar presente em vários processos inflamatórios do esôfago. Porém, estudos realizados em crianças, analisando esse achado na EEO em outras doenças, principalmente DRGE, encontraram que a proliferação de células da

camada basal foi mais intensa em pacientes com EEO em relação àqueles com DRGE, podendo ser um achado que se relacione mais com EEO (STEINER et al., 2006). Um estudo recente, realizado por Jiao e colaboradores (2017), analisou, entre outros aspectos, a presença de hiperplasia de células da camada basal na EEO, na DRGE e na eosinofilia esofágica responsiva a inibidor de bomba de prótons (EEO IBP) e constatou que esse fenômeno foi mais frequentemente encontrado em pacientes com EEO e com eosinofilia esofágica responsiva a inibidor de bomba de prótons do que naqueles com DRGE. Hiperplasia de células da camada basal é considerada uma das características de remodelamento esofágico na EEO, uma vez que é o achado morfológico indicativo de proliferação ativa de células da zona basal da mucosa, uma fonte constante de renovação do epitélio, contribuindo também para extensão das projeções da lâmina própria (ACEVES, 2014).

Alongamento de papilas é outro aspecto morfológico da lesão esofágica encontrado na EEO (LIACOURAS et al., 2011; FURUTA et al., 2007). Papilas são extensões digitiformes da lâmina própria, que é o tecido conjuntivo vascularizado subepitelial, em direção à camada epitelial (DENARDI; RIDDELL, 2012). As papilas estão alongadas quando acima de 50% a 66% da espessura do epitélio total e esse alongamento é identificado a partir de estruturas vasculares presentes na projeção de lâmina própria em direção ao epitélio (FIOCCA et al., 2011). Vindigni e colaboradores encontraram alongamento das papilas em todos os 22 casos analisados de EEO (VINDIGNI et al., 2010). Outros estudos que analisaram esse achado em fragmentos esofágicos de pacientes com e sem EEO concluíram que o alongamento de papilas na mucosa é maior em pacientes com EEO, principalmente em pacientes que mostraram acentuada hiperplasia de células basais (ATTWOOD et al., 1993; COLLINS et al., 2014).

Espongiose, também conhecida como dilatação ou aumento dos espaços intercelulares, é uma característica morfológica que pode estar presente em processos inflamatórios que acometem epitélios de várias regiões anatômicas (FIOCCA et al., 2011) e, no esôfago, esse achado é relacionado com a EEO (COLLINS et al., 2014). Estudos experimentais demonstraram que espongiose provoca aumento na permeabilidade paracelular sugerindo ser um fator facilitador da penetração de ácido, no caso da DRGE ou de antígenos, no caso da EEO

(ORLANDO et al., 1981; TOBEY et al., 1996). A distribuição de eosinófilos intraepiteliais em pacientes com EEO é também um achado característico. Eles tendem a se alinhar no terço superior do epitélio, paralelamente à superfície epitelial (TEITELBAUM et al., 2002; ATTWOOD et al., 1993). Essa tendência à “superficialização” é um achado morfológico mais associado à EEO do que DRGE (VINDIGNI et al., 2010; LIACOURAS et al., 2011; GRIN; STREUTKER, 2015). Com esse processo, os eosinófilos adquirem maior tendência de formar microabscessos, que são definidos como acúmulos de quatro ou mais eosinófilos no epitélio (COLLINS, 2014). São achados muito sugestivos de EEO, sendo encontrados, por alguns autores somente em pacientes com contagem de eosinófilos intraepiteliais superior a 15/CGA (DEBROSSE et al., 2010).

O comportamento das células apresentadoras de antígenos na EEO também é uma característica importante. Essas células, localizadas em região suprabasal, são escassas na mucosa esofágica e são morfolologicamente identificadas por meio de reação imuno-histoquímica usando marcadores como CD1a, S-100 e Cd6 (DENARDI; RIDDELL, 2012). Identifica-se o aumento delas quando encontradas acima da camada suprabasal. Atuam de forma a apresentar antígenos a linfócitos, proporcionando uma ligação entre resposta imune inata e adaptativa. Esse processo pode ser o evento que inicia a cascata de produção de citocinas que leva à EEO (MULDER; JUSTINICH, 2011). Entretanto, até o momento são escassos os estudos que analisam a relação das células apresentadoras de antígenos na EEO. Teitelbaum e colaboradores (2002) encontraram aumento significativo de células apresentadoras de antígenos por meio de análise imuno-histoquímica utilizando como marcador o CD1a. Observaram que no grupo de pacientes com EEO, quando comparado ao grupo com mucosa normal, havia aumento da expressão de CD1a (TEITELBAUM et al., 2002). Já Mulder e Justinich encontraram aumento de células CD1a+ somente na parte proximal do esôfago de crianças com EEO, normalizando sua expressão após tratamento (MULDER; JUSTINICH, 2011). Contudo, tem-se sugerido que outras células, que não são as células apresentadoras de antígenos profissionais, como células epiteliais, possam adquirir esse papel de apresentação de antígeno. Esse processo pode atuar na predisposição e perpetuação da exposição de antígenos (LUCENDO et al., 2007).

Desta forma, o conjunto de alterações morfológicas que podem estar presentes na EEO deve ser relatado nos laudos anatomopatológicos. Essas descrições podem auxiliar na identificação de biomarcadores de inflamação confiáveis, visando limitar o número de EDA necessárias para confirmar o diagnóstico de EEO, bem como acompanhar a eficiência do tratamento (LIACOURAS et al., 2011). Além disso, torna-se necessário almejar a redução de procedimentos invasivos, principalmente, no manejo de crianças que necessitam de sedação para a realização de EDA. Assim, o desenvolvimento de diagnóstico molecular da doença, tem sido considerado uma boa opção, uma vez que diminui a necessidade de realização de procedimentos invasivos, além de promover um resultado específico em tempo mais ábil que a histopatologia.

1.4 Tratamento

Tratamento dietético deve ser considerado em todas as crianças com EEO, sendo indicado acompanhamento com profissional da área a fim de garantir qualidade e quantidade de calorias e nutrientes adequados para bom desenvolvimento e crescimento do paciente pediátrico. Recomenda-se que 6 alimentos constatados como desencadeadores de EEO sejam restringidos da dieta por período indefinido, enquanto aqueles que não foram comprovados como tal, sejam reintroduzidos com observação cautelosa (LIACOURAS et al., 2011; SPERGEL et al., 2007).

Inibidor de bomba de prótons (IBP) é um medicamento útil para excluir DRGE como causa de eosinofilia esofágica, sendo que a dose recomendada em crianças é de 1 mg/kg, duas vezes ao dia, durante 8 a 12 semanas. Contudo, IBP também são usados no tratamento da EEO em pacientes que apresentem DRGE como comorbidade. Sabe-se que IBP primariamente atua bloqueando secreção ácida, porém questiona-se o seu efeito na eosinofilia esofágica por outros mecanismos, uma vez que se mostram úteis no tratamento de pacientes com eosinofilia esofágica responsiva a IBP (LIACOURAS et al., 2011).

Tratamento com corticosteroide tópico, por sua vez, deve ser considerado em todas as crianças e adultos com diagnóstico de EEO, tanto como terapia inicial como de manutenção. Contudo, preconiza-se que se individualize a situação de

cada paciente, considerando características da intensidade da doença, estilo de vida, padrão socioeconômico, entre outros. Vale ressaltar, que o uso crônico de esteróides tópicos deve levar os profissionais da saúde a se atentarem para possíveis efeitos adversos e monitorar cuidadosamente a curva de crescimento da criança (LIACOURAS et al., 2011; CALDWELL et al., 2010).

1.5 Complicações e prognóstico

Os pacientes com EEO podem apresentar, como complicações, impactação alimentar, constrictões esofágicas, redução do calibre do esôfago e perfuração da parede. Impactação alimentar é definida como evento que ocorre após ingestão de alimento, quando a matéria deglutida fica retida no esôfago e, frequentemente, necessita de intervenção endoscópica para sua resolução (LIACOURAS et al., 2011; DELLON et al., 2009; PRASAD et al., 2009). Constrictões esofágicas tem sua definição relacionada com anéis esofágicos, que são manifestação comum da doença em adultos. São diferenciados da redução do calibre do esôfago, uma vez que a área de envolvimento deste é maior em relação ao anel.

Em relação à perfuração da parede esofágica, ela pode ocorrer de forma completa, quando há saída do conteúdo esofágico e gástrico para a cavidade torácica, necessitando de tratamento cirúrgico ou pode ser de forma incompleta. Uma ruptura parcial da parede ocorre quando se encontra quantidade limitada de ar ou contraste extravasado para o mediastino, sendo preferível, nesses casos uma abordagem conservadora. As perfurações esofágicas podem ocorrer relacionadas ou não ao procedimento endoscópico para dilatação luminal (LIACOURAS et al., 2011).

Devido a individualidade de fatores e complicações o prognóstico a longo prazo, de pacientes com EEO, é desconhecido. Alguns pacientes podem apresentar uma evolução caracterizada por períodos sintomáticos seguidos por períodos de remissão. Outros pacientes podem apresentar quadro clínico de aparente remissão espontânea, sendo desconhecido, nesses, o risco de recorrência. É possível que pacientes com doença de longa evolução, sem tratamento, evoluam para remodelamento esofágico, constrictões e anéis. Além disso, não está claro, no entanto, se o tratamento dietético ou medicamentoso

altera a história natural da doença (LIACOURAS et al., 2011; CARR; WATSON, 2011).

1.6 Eosinófilos

Os eosinófilos são leucócitos do tipo granulócitos, produzidos na medula óssea. Em um adulto normal, os leucócitos representam em cerca de 7000 células/ μ L de sangue (ABBAS et al., 2015) e desse total, cerca de 1-3% são granulócitos do tipo eosinófilos, que apresentam um tempo de vida na circulação de 8 à 12 horas e de 8 à 12 dias nos tecidos sem presença de estímulos (UHM et al., 2012).

Eles estão envolvidos na defesa do organismo contra infecções parasitárias helmínticas, nos infiltrados inflamatórios de resposta imune de fase tardia e ainda podem ser responsáveis por reações imunológicas desreguladas associadas a doenças alérgicas, tais como asma e dermatite atópica. Os eosinófilos também podem apresentar um papel importante e construtivo na manutenção da homeostase, quando envolvidos na defesa do organismo através da regulação imunológica, no reparo e na remodelação tecidual (JACOBSEN et al., 2012; FULKERSON; ROTHENBERG, 2013). Os eosinófilos e as proteínas presentes nos seus grânulos, além de possuírem uma participação de resistência contra parasitas, especialmente helmintos, também apresentam atividades antimicrobianas contra bactérias, vírus e protozoários e são mediadores de doenças de hipersensibilidade (ACHARYA; ACKERMAN, 2014).

Uma revisão recente descreve que os eosinófilos estão sendo reconhecidos por funções mais variadas em diversos locais de tecidos anteriormente subestimados, com base na capacidade dos eosinófilos de liberar citocinas (geralmente pré-formadas) que mediam uma ampla gama de atividades no ambiente local (WELLER ; SPENCER, 2018).

Várias pesquisas com enfoque em diferentes doenças alérgicas descrevem que os eosinófilos, quando estimulados, são recrutados da circulação para os tecidos e agem como mediadores pró-inflamatórios e moduladores da resposta imune adaptativa de fase tardia. Conforme já mencionado, o recrutamento e a ativação dos eosinófilos no local da inflamação é oriundo de citocinas produzidas

pelas células Th2, em destaque a IL-5 e eotaxinas (LACY e MOQBEL, 2001; KITA, 2011; ZHANG et al., 2013).

Em condições alérgicas, os níveis de eosinófilos na corrente sanguínea e nos tecidos estão elevados (MALM-ERJEFALT et al., 2005). Na asma, rinites alérgicas, dermatites atópicas e EEO, as técnicas histológicas mostram que, nos tecidos, os eosinófilos sofrem acentuada degranulação (AHLSTROM-EMANUELSSON et al., 2004).

Os grânulos dos eosinófilos são compostos basicamente por quatro proteínas citotóxicas específicas: Proteína Básica Principal (PBP), Peroxidase Eosinofílica (PE), Proteína Catiônica Eosinofílica (PCE) e Neurotoxina Derivada de Eosinófilos (NDE) (HOGAN et al., 2008; FULKERSON; ROTHENBERG, 2013; ACHARYA; ACKERMAN, 2014), e também uma grande quantidade de citocinas e quimiocinas imunorreguladoras (LACY; MOQBEL, 2001; UHM et al., 2012; MAZZEO et al., 2015).

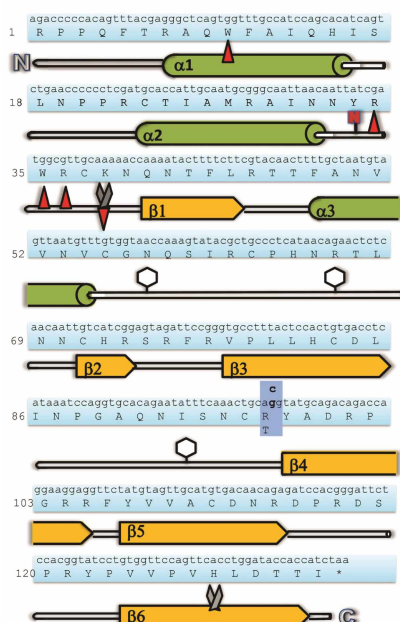
1.7 Proteína Catiônica eosinofílica

A proteína catiônica eosinofílica é uma das 4 proteínas catiônicas primárias secretadas pelos eosinófilos ativados, sendo as outras 3, a proteína básica (PBP), a peroxidase eosinofílica (PE) e a neurotoxina derivada dos eosinófilos (NDE) (SORRENTINO et al., 1991). Dentre estas proteínas, a PCE é o marcador clínico mais estudado com relação a atividade dos eosinófilos (ROSENBERG et al., 1989).

A PCE é sintetizada, transportada e armazenada nos grânulos secundários maduros dos eosinófilos a uma taxa alta, contendo 13,5 µg PCE/10⁶ células (CARLSON et al., 1994) e possui parte de atividade de ribonuclease e atividade citotóxica (ROSENBERG et al., 1995). Assim, o eosinófilo é a principal célula produtora de PCE, enquanto monócitos e linhagens mielo-monocíticas produzem quantidades mínimas em comparação aos eosinófilos (BYSTROM et al., 2001). Os neutrófilos ativados (MONTESEIRIN et al., 2007) também produzem pouco PCE e têm a capacidade de absorver mais PCE do meio circundante, armazenando-o em seus grânulos azurófilos (SUR et al., 1998; BYSTROM et al., 2002).

A PCE tem homologia à ribonuclease pancreática e tem a capacidade de degradar o RNA (GLEICH et al., 1986). A sequência de aminoácidos da PCE tem oito resíduos de cisteína espaçados por todo o polipeptídeo, estabelecendo a estrutura terciária da proteína pela formação de quatro ligações duplas de cisteína. A molécula de PCE apresenta ainda dois resíduos essenciais a atividade catalítica, sendo uma lisina e uma histidina, responsáveis pela degradação do RNA foram identificados, K38 e H128 (GLEICH et al., 1986; ROSENBERG et al., 1995). A PCE consiste de uma cadeia simples de peptídeo de 133 aa contendo três sítios para N-glicosilação, nas sequências de aminoácidos 57-59, 65-67 e 92-94 (ROSENBERG et al., 1989). O gene da RNASE3 (PCE) e a sequência da proteína com números referentes à sequência de aminoácidos podem ser vistas na figura 1.

Figura 1. O gene RNASE3 (PCE) e a sequência da proteína com números referentes à sequência de aminoácidos. Abaixo da sequência peptídica está um diagrama esquemático da sequência peptídica onde os domínios de folha beta e os domínios de hélice alfa são mostrados como estruturas de seta amarela e estrutura verde, respectivamente. Os aminoácidos envolvidos na atividade da RNase são representados por tesouras. Os aminoácidos envolvidos na interferência da membrana, na ligação da heparina e na atividade bactericida são representados pelas setas vermelhas. Aminoácidos glicosilados são representados com uma glycomoiety enquanto a letra N destaca o aminoácido nitrado. Caixa azul mostra o local do polimorfismo de alteração de aminoácidos rs2073342.

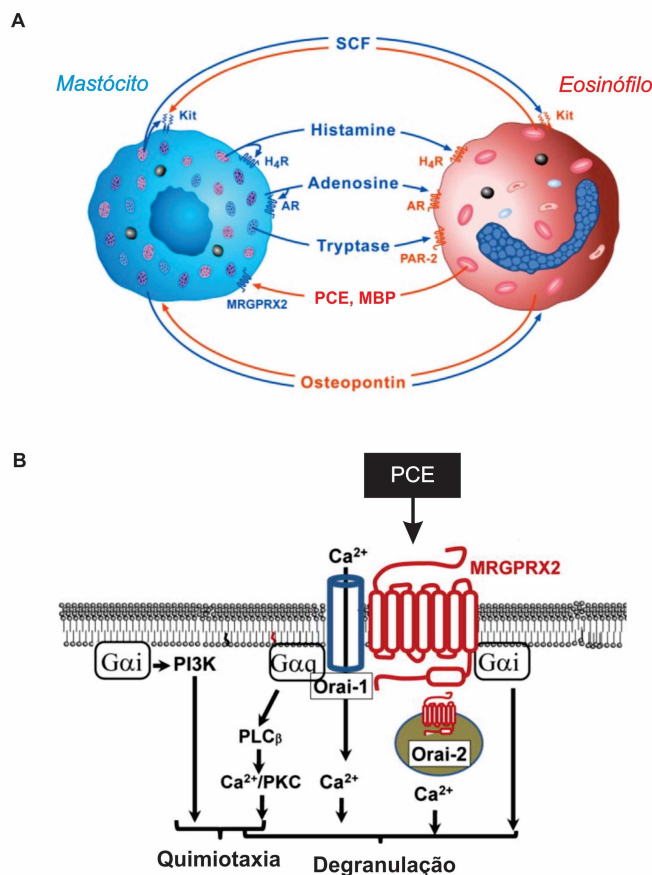


Fonte: BYSTROME et al., 2011.

A glicosilação é composta de ácido siálico, galactose e acetilglicosamina (ERIKSSON et al., 2007) explicando a variação em seu tamanho detectado por *Western blot* entre 16 e 22 kDa (PETERSON et al., 1988). Dezenove resíduos de arginina voltados para o exterior da proteína conferem à basicidade da proteína (pI>11) (POUS et al., 2001) e, possivelmente, também conferem a sua maior estabilidade em comparação com outras ribonucleases (MAEDA et al., 2002).

Existem interações entre mastócitos e eosinófilos onde um induz o outro a a degranularem seus mediadores pré-formados, como por exemplo, o fator de células-tronco, histamina, adenosina e triptase, liberados por mastócitos ativados, podem exercer funções parácrinas e/ou autócrinas através de receptores envolvidos com cada mediador encontrados nas superfície de eosinófilos e mastócitos. Por outro lado, proteínas catiônicas [proteína catiônica eosinofílica (PCE) e proteína básica principal (PBP)] liberadas por eosinófilos ativados, modulam as funções dos mastócitos através da ativação de MRGPRX2 (Mas-related G-protein coupled receptor member X2) em sua superfície e ativa vias que aumentam a entrada de Ca^{2+} na célula e induzem a degranulação (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática de algumas das interações bidirecionais entre mastócitos e eosinófilos. Vários mediadores pré-formados, como fator de células-tronco, histamina, adenosina e triptase, liberados por mastócitos ativados, podem exercer funções parácrinas e/ou autócrinas através do envolvimento de Kit, H4R, receptores de adenosina e receptores ativados por proteases 2 (PAR-2). Por outro lado, proteínas catiônicas [proteína catiônica eosinofílica (PCE) e proteína básica principal (MBP)] liberadas por eosinófilos ativados, modulam as funções dos mastócitos através da ativação de MRGPRX2 em sua superfície. (B) PCE se liga ao MRGPRX2 e ativa as vias G α i dependentes de toxina pertussis e G α q independente da toxina pertussis para respostas de mastócitos. (B) Os mastócitos expressam MRGPRX2 na superfície da célula, bem como nos locais intracelulares. O receptor extracelular provavelmente usa o canal Orai-1 Ca²⁺ e a via G α q independente de toxina pertussis para degranulação, enquanto o receptor intracelular pode usar o canal Orai-2 Ca²⁺ para mediar as respostas dos mastócitos.



Fonte: Adptado de GALDIERO et al. 2017; SUBRAMANIAN et al., 2016.

1.8 Mastócitos

Os mastócitos foram descobertos no final do século XIX por Paul Erlich devido à marcante e característica coloração de seus densos grânulos citoplasmáticos, os quais contêm mediadores vasoativos (PRUSSIN; METCALFE, 2003). Tratam-se de células do sistema imune derivadas de células progenitoras hematopoiéticas e positivas para os marcadores CD34, CD117 e CD13 (TAYLOR; METCALFE, 2001). As células progenitoras, originárias da medula óssea, circulam no sangue e na linfa como células indiferenciadas e, subsequentemente, migram para tecidos periféricos, onde proliferam e se diferenciam em mastócitos maduros (TAYLOR; METCALFE, 2001).

Em vertebrados, os mastócitos estão amplamente distribuídos por tecidos vascularizados, particularmente aqueles próximos à superfícies expostas ao ambiente externo, incluindo a pele, vias respiratórias e o trato gastro-intestinal. Juntamente com as células dendríticas, os mastócitos estão bem posicionados para atuarem como umas das primeiras células do sistema imune a interagirem com antígenos e toxinas ambientais, ou patógenos invasores (GALLI; TSAI, 2010).

Os mastócitos ocupam um nicho crítico nas imunidades inata e adquirida, onde, dependendo das circunstâncias, estas células podem perturbar ou auxiliar no reestabelecimento da homeostase, com conseqüências que podem tanto promover a saúde como contribuir para a doença. Nesse contexto, os mastócitos, mais conhecidos por seu papel nas dosordens alérgicas, também podem exacerbar modelos de autoimunidade, aumentar a sensibilização e/ou fases efetoras de certas respostas de hipersensibilidade de contato cutânea e aumentar a inflamação e mortalidade durante algumas infecções bacterianas severas (TAYLOR; METCALFE, 2001).

Os mastócitos têm a capacidade de liberar, rapidamente, uma ampla variedade de mediadores, tais como histamina, proteoglicanas, proteases e citocinas específicas (mediadores pré-formados). Outros mediadores sintetizados incluem leucotrienos, prostaglandinas e o fator de agregação plaquetária (PAF) (mediadores neoformados). Os mastócitos também são capazes de organizar uma resposta tardia, através da transcrição, tradução e secreção de uma ampla

gama de citocinas imunorregulatórias e fatores de crescimento (mediadores neossintetizados) (TAYLOR; METCALFE, 2001; STONE et al., 2010). Estas células também têm a capacidade única de sofrer múltiplos ciclos de liberação de mediadores e de responder a múltiplos estímulos, visto que uma mastócito pode permanecer localizado em um tecido por pelo menos alguns meses (TAYLOR; METCALFE, 2001).

Em uma resposta inflamatória alérgica, células apresentadoras de antígeno capturam e processam um alérgeno na forma de pequenos fragmentos peptídicos, os quais são apresentados, através de moléculas MHC de classe II, à células T naive, com o direcionamento destas células a favor de um fenótipo de células T helper tipo 2 (células Th2) (HOLGATE e POLOSA, 2008). Células Th2 ativadas determinam rapidamente a expressão de CD40 ligante e a produção das interleucinas 4 (IL-4) e 13 (IL-13). A ligação destas citocinas, bem como de CD40, à células B, induzem estas células a promoverem a troca de classe de imunoglobulinas (Ig) a favor da síntese de IgE (STONE et al., 2010).

Uma vez produzidas, as moléculas de IgE ligam-se a receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) localizados na superfície de mastócitos e considerados o receptor central para a ativação destas células. Nesse contexto, a ligação de IgE ao receptor FcεRI sensibiliza os mastócitos para um alérgeno específico, estabiliza o complexo receptor e causa um aumento substancial na expressão de FcεRI na superfície celular (MASUDA e SHIMITZ, 2008). A exposição subsequente de mastócitos, previamente sensibilizados, ao mesmo alérgeno multivalente, determina o intercruzamento dos receptores FcεRI e distintas cascatas de sinalização são estabelecidas, as quais levam à liberação de mediadores inflamatórios de natureza diversa como, por exemplo, proteínas e lipídeos (CALLEJON, D. R., 2008).

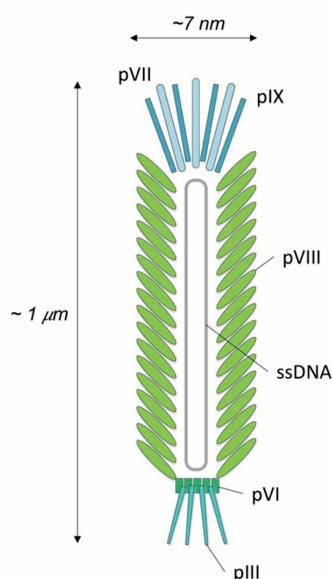
1.9 Phage Display

A tecnologia de *Phage Display* foi desenvolvida por Smith (SMITH et al., 1985) e é utilizada na identificação de peptídeos ou proteínas que interagem a molécula alvo, através da exposição de biomoléculas em bacteriófagos (LIU et al., 2014). É uma técnica de seleção que utiliza sequências aleatórias de DNA

fundidos em genes codificadores de proteínas do capsídeo viral (PANDE et al., 2010).

Os bacteriófagos são formados por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 3).

Figura 3. Esquema representativo de um bacteriófago filamentoso M13 ilustrando as proteínas do capsídeo viral: pIX, pVII, pVIII, pVI e pIII.



Fonte: Adaptado de FUKUNAGA; TAKI, 2012.

O bacteriófago expressa aproximadamente 2.700 cópias da proteína 8 (pVIII, uma proteína de 50 resíduos de aminoácidos) e 3 a 5 cópias da proteína 3 (pIII, proteína de 406 aminoácidos) (RUSSEL et al., 1991).

Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago (ZANCONATO et al. 2011). Devido à baixa representatividade da pIII em relação à pVIII, as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas as bibliotecas fusionadas a pVIII (KEHOE et al., 2005). Assim, a utilização do bacteriófago filamentoso-M13 para construção de uma biblioteca randômica de sequências de peptídeos fusionados à proteína pIII, permite a realização de um

“screening” de peptídeos ligantes a molécula alvo de forma mais específico (PLOSS et al., 2014).

O peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago possibilita a seleção de sequências baseada na afinidade de ligação a uma molécula alvo por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (PARMLEY; SMITH, 1988), realizado pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. O alvo é imobilizado em um suporte sólido tais como placas de ELISA, beads, resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O conjunto de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção (ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento daqueles com sequências específicas contra o alvo (PARMLEY; SMITH, 1988).

A técnica de *phage display* tem sido usada com as mais diversas funções, tais como: mapeamento de epítomos de anticorpos (ROWLEY et al., 2004), triagem de receptores (MCCONNELL et al.; 1998; LEE et al., 2001; SCHOOLTINK; ROSE-JOHN, 2005), desenvolvimento de anticorpos *in vitro* (HOOGENBOOM, 2002; CONRAD; SCHELLER, 2005), descoberta de inibidores (HAWINKELS et al, 2007; HYDE-DERUYSCHER et al.; 2000), identificação de proteínas funcionalmente acopladas e análise de interações proteína-proteína (SIDHU; KOIDE, 2007; HERTVELDT et al., 2009), e desenvolvimento de vacinas e drogas (NAIM et al., 2008; LIU et al., 2009). Na área da biotecnologia, essa metodologia também é bastante útil devido a produção em escala de bacteriófagos que podem diminuir os custos na fabricação de fármacos (WARNER et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e analisar o papel de peptídeo ligante à proteína catiônica eosinofílica como forma de aprimorar o diagnóstico da Esofagite Eosinofílica em crianças e adolescentes e seu possível potencial terapêutico em alergias mediadas por mastócitos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Seleção de peptídeos ligantes à proteína catiônica eosinofílica através da técnica molecular de *Phage display* e validação desses peptídeos;
- b) Estabelecer um diagnóstico pela identificação da proteína catiônica eosinofílica por ensaio de *phage*-ELISA em muco esofágico de pacientes pediátricos submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta (EDA);
- c) Analisar a relação dos níveis da proteína catiônica eosinofílica em muco esofágico por *phage*-ELISA com o número de eosinófilos encontrados na histopatologia dos pacientes com EEo e com os achados clínicos.
- d) Avaliar o potencial terapêutico do peptídeo selecionado em células de mastócitos humanos (LAD2).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de pacientes e coleta de amostras

Este estudo foi iniciado entre setembro de 2014 e setembro de 2018 no setor de gastropediatria da Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU) e no laboratório de Nanobiotecnologia-UFU. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido dos pais de cada criança e adolescente incluído no estudo. A aprovação ética foi concedida pelo Conselho de Ética e Pesquisa da UFU (CEP-UFU) e a pesquisa foi registrada no “Clinical Trials” (ClinicalTrials.gov) com o número de registro: NCT03069573. Foi realizado um estudo prospectivo com 94 pacientes da Unidade de Serviço de Endoscopia Digestiva do HC/UFU submetidos a endoscopia digestiva alta (EDA) e amostras de muco esofágico foram coletadas do esôfago distal até o proximal utilizando-se escovas citológicas padrão antes de obter as biópsias esofágicas. As escovas foram mergulhadas e agitadas no tubo contendo 1 mL de PBS e mantido a -20°C até o momento do uso.

Os pacientes foram classificados por consensos publicados em 2007 e 2011 (FURUTA et al., 2007; LIACOURAS et al., 2011) e atualizados pelo novo consenso internacional de critério de diagnóstico, recentemente publicados por Dellon e colaboradores (2018) e resumido por Spergel e colaboradores (2018), que considera os sintomas de disfunção esofágica com ≥ 15 eosinófilos/CGA para o diagnóstico. Os indivíduos incluídos neste estudo foram classificados em cinco grupos: os pacientes portadores de EEO, confirmados com análise anatomopatológica dos tecidos do esôfago distal e proximal com pelo menos uma biópsia esofágica com 15 ou mais eosinófilos/CGA, e com nenhuma evidência de outro distúrbio eosinofílico (E; n = 13); DRGE (G; n = 7), DRGE com <15 eosinófilos/CGA (GE; n = 6), Controle sem eosinófilos/CGA, (C; n = 51); e Controle com <15 eosinófilos/CGA (CE; n = 17). Todos os pacientes elegíveis não faziam uso tópico de esteróides ou terapia dietética e tratamento com IBP (inibidor de bomba de prótons) no momento da coleta das amostras. As características gerais dos pacientes incluídos no estudo são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Características gerais dos pacientes incluídos no estudo.

	EEO (n=13)	DRGE (n=7)	DRGE com Eo (n=6)	Controle (n= 51)	Controle com Eo (n=17)
Idade, média (s.d)	8,3 (4,8)	9,1 (2,7)	9,8 (1,1)	8,9 (3,6)	8,5 (4)
Sexo masculino, nº (%)	9 (69,2)	4 (57,1)	3 (50)	27 (52,9)	6 (35,2)
Primeiro sintoma, nº (%)					
Dor abdominal	5 (38,4)	3 (42,8)	—	26 (59,9)	6 (35,2)
Nausea-vômito	5 (38,4)	2 (28,5)	5 (83,3)	14 (27,4)	6 (35,2)
Disfagia	1 (7,6)	—	—	1 (2,2)	1 (5,8)
Dor epigástrica-azia	—	2 (28,5)	—	2 (3,9)	—
Impactação de alimentos	—	—	—	—	2 (11,7)
Outros	2 (15,3)	—	1 (16,6)	8 (15,6)	2 (11,7)
Achados endoscópicos, nº (%)					
Anéis fixos	2 (15,3)	—	—	—	—
Exsudato	7 (53,8)	1 (14,2)	1 (16,6)	1 (1,9)	1 (5,8)
Estrias longitudinais	7 (53,8)	—	1 (16,6)	1 (1,9)	—
Edema	11 (84,6)	4 (57,1)	3 (50)	15 (29,4)	3 (17,6)
Estenose	1 (7,6)	—	1 (16,6)	—	—
Anéis transitórios (felinização)	1 (7,6)	1 (14,2)	1 (16,6)	1 (1,9)	—
Distúrbios atópicos, nº (%)					
Asma	3 (23)	—	1 (16,6)	5 (9,8)	2 (11,7)
Rinite	7 (53,8)	—	5 (83,3)	24 (47)	5 (29,4)
Dermatite atópica	3 (23)	—	—	4 (7,8)	1 (5,8)
Alergia alimentar	6 (46,1)	—	1 (16,6)	5 (9,8)	2 (11,7)
Pais atópicos	3 (23)	3 (42,8)	4 (66,6)	18 (35,2)	7 (41,1)
Eosinofilia esofágica (Eos/CGA)					
Esôfago proximal, média (s.d)	33,9 (28,4)	—	1,5 (1,8)	—	0,8 (1,2)
Esôfago distal, média (s.d)	42,1 (35)	—	5 (4,9)	—	1,3 (1,2)

EEO, Esofagite eosinofílica; DRGE, Doença do refluxo gastroesofágico; Eos/CGA, eosinófilos por campo de grande aumento.

3.2 Espectrometria de Massa

Pela utilização da técnica laboratorial de espectrometria de massa (MS), as proteínas foram mensuradas e comparadas entre amostras de biópsias esofágicas de pacientes pediátricos. Sete pacientes do grupo controle, três pacientes do grupo EEO e três pacientes do grupo DRGE foram comparados. A etapa de extração começou com digestão de 10 mg/amostra usando o Kit de Digestão de Trypsin All-in-One ProteoExtract® (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA). Aproximadamente 10 mg de tecido foram adicionados a 200 µL de tampão de extração e 200 µL de esferas de vidro, agitadas por uma hora a 4 °C. Os tecidos foram reduzidos, alquilados e digeridos em condições padrão por três horas. Os peptídeos digeridos foram dessalinizados utilizando a C18 ZipTip (EMD Millipore) e separados por nano-HPLC de fase reversa (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha, coluna: PepSwift Monolithic Nano Column, 100 25m, Dionex). A eluição foi feita com a coluna com um gradiente de acetonitrilo (Solvente A: 0,1% (v / v) FA / 0,01% (v/v) de TFA/5% (v / v) de DMSO; solvente B: 0,1% (v / v) de FA/0,01% (v/v) de TFA / 90% (v/v) de ACN/5% (v/v) de DMSO; 5-45% de B em 60 min) a uma taxa de fluxo de 0,8/min a 55 °C . Os peptídeos foram analisados com um espectrometro de massa Q Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), acoplado diretamente ao HPLC. A voltagem de capilaridade do nanoeletrospray foi de 2 kV, e esse instrumento foi sintonizado para sensibilidade máxima. Alíquotas dos extratos foram digeridas 5 vezes. Consequentemente, foram realizados 5 experimentos independentes de MS por biópsia. Os dados destes 5 experimentos de MS foram combinados e analisados. Para a quantificação utilizou-se o MaxQuant/Perseus, o PEAKS Studio (quantificação com o Q-Module incorporado) e o PEAKS Studio (quantificação manual e validação de dados após pesquisa na base de dados). A identificação das proteínas foi realizada no banco de dados *Human UniProt Complete Proteome*.

3.3 Seleção de peptídeos por *Phage Display*

Para a seleção dos peptídeos (expressos na proteína III do capsídeo de bacteriófagos filamentosos), reativos com a proteína PCE, utilizou-se uma biblioteca randômica de peptídeos de 12 aminoácidos (Ph.D-12mer, New England Biolabs, Beverly, USA).

Foi adsorvido em um poço de uma microplaca de 96 poços (Maxisorp-NUNC, Denmark) 100 µL de proteína catiônica eosinofílica recombinante (Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) em tampão fosfato salino (1 µg/poço em PBS, pH 7,4) e incubada overnight a 4°C. A placa foi bloqueada com tampão de bloqueio (PBS com 5% de BSA, pH 7,4) por 1h sob agitação a 37°C, e lavada seis vezes com PBST (PBS, pH 7,4, 0,1% v/v de Tween 20). No primeiro ciclo, foram acrescentados na placa 10 µL (1×10^{11} fagos) da biblioteca de peptídeos diluída em 90 µL de PBS, e a placa foi mantida sob agitação por 1h a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos pela lavagem da placa por seis vezes com PBST 0,1%. Os fagos ligantes foram eluídos com 150 µL do tampão de eluição (glicina-HCl 0,2M, pH 2,2) durante 10 min à temperatura ambiente e imediatamente neutralizados com 22,5 µL do tampão de neutralização (Tris-HCl 1 M, pH 9,1). E um microtubo foi adicionada uma alíquota dos fagos eluídos para ser utilizada na determinação do título do eluato.

Uma pequena amostra deste eluato (10 µL) foi separada para titulação e o restante foi utilizado para reamplificação, realizada em 20 mL de cultura de *E. coli* (ER2738) em fase inicial de crescimento ($OD_{600} \leq 0,3$), contendo 20 µL de tetraciclina, incubando-se a cultura por 4-5 horas em agitador com temperatura a 37°C.

A cultura foi transferida para um tubo Nalgene Oak ridge (Thermo Scientific Nalgene, 50 mL) e centrifugada (10 min, 10.000 rpm). As células residuais foram descartadas e o sobrenadante transferido para um tubo limpo e re-centrifugado. Foi pipetado 80% do sobrenadante para um tubo esterilizado onde foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% p/v de Polietileno glicol-8000, NaCl 2,5M, água), homogeneizado e permaneceu em repouso por 12 horas à 4°C.

No dia seguinte, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi centrifugado brevemente, para

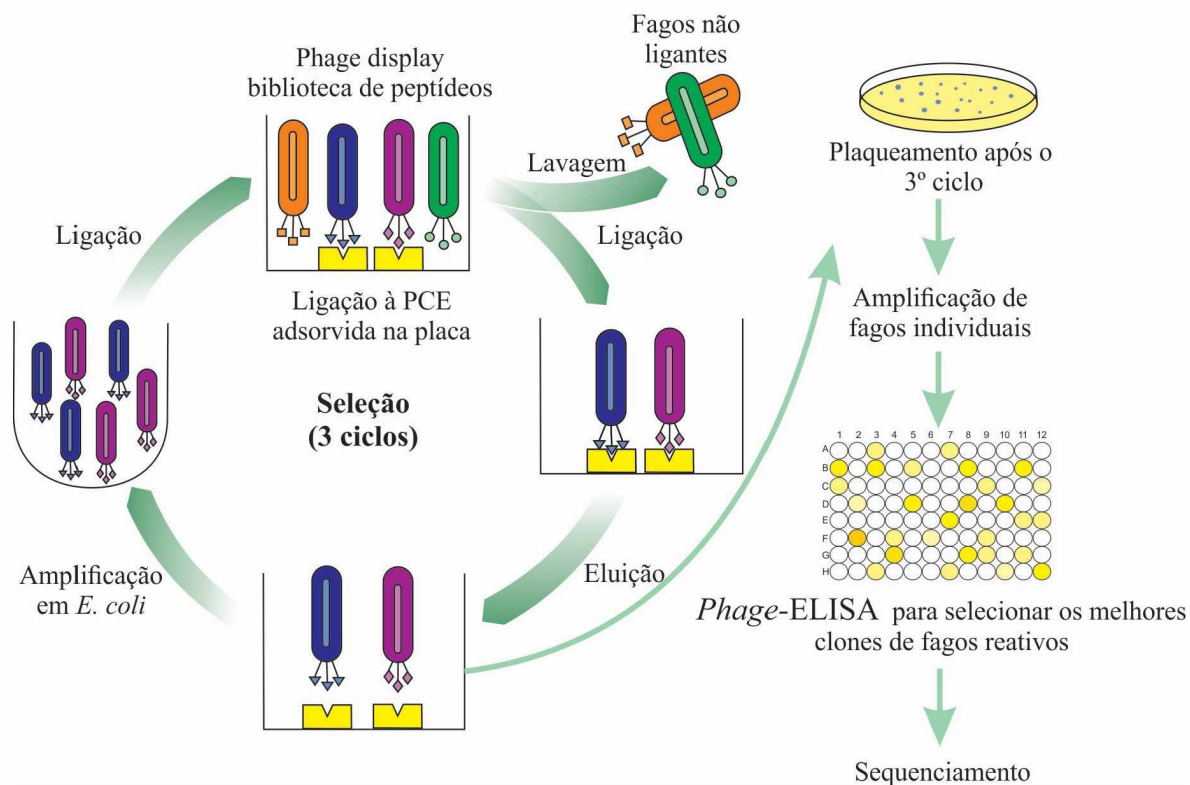
que o sobrenadante residual pudesse ser removido. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de PBS, transferido para um microtubo e centrifugado à 10.000 rpm, por 5 min e à 4°C para precipitar os resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para a adição de PEG/NaCl (1/6 do volume). A solução foi homogeneizada e incubada em gelo por 1h e então centrifugada por 14.000 rpm, por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado, e a centrifugação foi repetida para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de PBS, obtendo-se então o eluato amplificado, pronto para a titulação e entrar no próximo ciclo de seleção.

Os fagos amplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo e repetido, novamente, por um total de três ciclos, sendo que a mesma quantidade de entrada de fago (1×10^{11} pfu/poço) foi mantida nos dois ciclos subsequentes (Figura 4).

Para todas as titulações foram utilizadas 10 µL dos fagos, diluídos em 90 µL de meio de cultura LB. As diluições (10^{-1} a 10^{-4} , para eluato não amplificado e de 10^{-8} a 10^{-11} , para fagos amplificados) foram incubadas com 200 µL de *E. coli* (ER2738) em fase de crescimento inicial por 5 min e plaqueadas em meio LB contendo IPTG (200 mg/mL) e X-gal (20 mg/mL), juntamente com 3 mL de Agarose Top (10 g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 1 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$)/L).

Após a incubação *overnight* em estufa à 37°C, as colônias azuis foram contadas para a obtenção dos títulos de entrada e saída para todos os ciclos de seleção (número de colônias azuis x fator de diluição).

Figura 4. Esquema representativo da seleção de peptídeos por *phage display*. A biblioteca de peptídeos foi incubada com a proteína catiônica eosinofílica (PCE) sensibilizada na superfície de uma microplaca. Os fagos não ligantes foram lavados e os fagos ligantes a PCE foram eluídos e amplificados para o próximo ciclo da seleção. Após o 3º ciclo, o eluato foi plaqueado e os clones individuais foram amplificados. Em seguida, os melhores clones de fagos reativos foram selecionados por *phage*-Elisa para análise de sequenciamento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Amplificação de colônias de fagos

As colônias que apresentaram coloração azul, demonstrando a expressão do gene da β -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738 e, consequentemente, a quebra do substrato X-Gal, foram reamplificadas separadamente em placas *deepwell* para o armazenamento dos clones selecionados. Para isso, cada colônia isolada obtida do 3º ciclo da seleção não amplificado foi coletada da placa e dispensada em um poço da *deepwell* contendo 1 mL de meio de cultura LB com *E.coli* em fase de crescimento inicial. A placa foi incubada por 12 h à 37°C, sob agitação. A placa *deepwell* foi centrifugada por 60 min a 3.700 rpm, para a retirada do sobrenadante da cultura. Seu conteúdo foi transferido para uma outra placa *deepwell* e então foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de polietileno glicol-800, NaCl 2,5 M) incubando-a por 12h à

4°C. A placa foi centrifugada por 1h a 3.700 rpm, o sobrenadante descartado, e o precipitado suspenso em 200 µL de PBS.

3.5 *Phage*-ELISA pré-sequenciamento

Testes de *Phage*-ELISA foram realizados para determinar a reatividade dos peptídeos expressos nos fagos selecionados com a PCE.

Uma placa de alta afinidade (NUNC, Denmark) foi sensibilizada com 100 µL/poço de proteína catiônica recombinante (1 µg/mL) em tampão bicarbonato/carbonato (0,1 M de NaHCO₃, 0,1 M de Na₂CO₃, pH 9,6) e incubada *overnight* à 4°C.

Após três lavagens com PBST 0,01% (PBS + 0,01% v/v de Tween 20), foram adicionados 250 µL de tampão de bloqueio (PBST 0,01%-BSA 5%), sendo a placa incubada por 1h à temperatura ambiente. A placa foi então lavada três vezes e adicionados 100 µL de solução contendo 50 µL do sobrenadante do fago mais 50 µL de bloqueio (um fago em cada poço). Para a detecção, utilizou-se a diluição de 1:500 do anticorpo conjugado anti-M13 marcado com peroxidase (GE Healthcare, New Jersey, USA). Os clones selecionados para o sequenciamento foram aqueles que apresentaram alta reatividade no ensaio de *phage*-ELISA.

3.6 Extração de DNA de fagos

Após o 3º ciclo do *biopanning*, para a obtenção de DNA dos fagos mais reativos, 10 µL dos fagos purificados em placa *deepwell* foram adicionados a 1 mL de cultura de ER2738 em fase de crescimento inicial em tubos de 15 mL, onde permaneceram sob agitação de 250 rpm por 6h à 37°C. Após o crescimento, as culturas foram transferidas para microtubos para a sedimentação das bactérias que foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm. 500 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo, e acrescidos a este, 84 µL de PEG-NaCl, incubando o tubo em seguida à temperatura ambiente por 10 min. Após centrifugar por 10 min a 14.000 rpm, foi descartado o sobrenadante, e o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de Tampão Iodeto (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1mM, NaI 4 M) e então foram adicionados 250 µL de etanol absoluto, incubando o tubo por 10-20 minutos

à temperatura ambiente. O tubo foi centrifugado por 10 min a 14.000 rpm, descartando o sobrenadante, e em seguida, foi lavado o precipitado com 500 µL de etanol 70%, centrifugando mais uma vez por 10 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 20 µL de água ultra pura estéril.

A qualidade do DNA presente nas amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.7 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi realizado utilizando o Sistema de Análise Genética GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter®, USA) do Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU). Para a reação do sequenciamento, foi utilizado o primer-96 gIII–(5'-OH CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'-Biolabs), e o mix de sequenciamento (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences). O primer utilizado amplifica a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados nos fagos M13 recombinantes.

A análise das sequências de DNA provenientes do sequenciador automático foram processadas e somente aqueles insertos com 36 nucleotídeos íntegros após análise foram traduzidos.

3.8 Análise dos dados por bioinformática

As sequências de DNA geradas pelo sequenciamento foram analisadas utilizando-se programas de bioinformática disponíveis *on-line*.

A dedução da tradução *in silico* das sequências de aminoácidos foi realizada pelo programa ExPASy Translate (<https://web.expasy.org/translate/>) e foi calculada a frequência de cada fago.

Para a predição estrutural tridimensional do peptídeo selecionado, utilizou-se o programa RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>). Assim, para a realização da modelagem, a sequência dos aminoácidos do peptídeo precisaram ser repetidas e intercaladas entre as sequências GGGS. A interação do peptídeo selecionado com a sequência da PCE recombinante (PDB: 1QMT) foi executada pelo

programa Pathdock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) e visualizada pelo programa PyMol (<https://pymol.org/>).

3.9 Phage-ELISA: curva de linearidade de fagos selecionados

Para confirmar a especificidade dos clones obtidos, realizou-se o teste ELISA para determinar a curva de linearidade dos clones de fagos nomeados como fago E3 e fago E5 em comparação com um clone negativo (clone de fago com uma sequência peptídica irrelevante não selecionada para a PCE). Para tanto, foi realizada uma sensibilização da microplaca com uma curva de diluição da PCE (0 ng /mL; 15,625 ng /mL; 31,25 ng /mL; 62,5 ng /mL; 125 ng /mL; 250 ng /mL; 500 ng /mL e 1000 ng /mL) em um volume final de 100 uL de tampão carbonato/bicarbonato (0,1 M de NaHCO₃, 0,1 M de Na₂CO₃, pH 9,6).

Após três lavagens com PBST 0,01% (PBS + 0,01% v/v de Tween 20), a placa foi bloqueada para sítios inespecíficos com 250 µL de tampão de bloqueio (PBST 0,1% - BSA 5%), incubado por 2h a 37°C. A placa foi então lavada três vezes, novamente, com PBST 0,01%. Os clones do fago E3, E5 e clone irrelevante foram adicionados na concentração de 1x10⁹ pfu/poço em PBST 0,01% com 5% de BSA. Após incubação, durante 1h a 37°C, a placa foi lavada três vezes com PBST 0,01%, e foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase (GE Healthcare, New Jersey, USA) diluído 1:5.000 usando 5% de BSA em PBST 0,01%. Após 1h a 37 °C a placa foi lavada seis vezes com PBST 0,01% e 100 µL de substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidina) foram adicionados e incubados a temperatura ambiente durante 5-15 min. Finalmente, a reação foi interrompida utilizando 100 mL de 2M de H₂SO₄ e foi lida a absorbância das reações a 450 nm utilizando um leitor de microplacas Multiscan Plus versão 2.03.

3.10 Avaliação da reatividade do clone selecionado utilizando muco esofágico de pacientes

Para confirmar a especificidade do clone escolhido, realizou-se o ensaio de *phage*-ELISA com muco esofágico de 94 pacientes pediátricos do setor de

gastropediatra do HC/UFU que realizaram endoscopia digestiva alta (EDA). A sensibilização das placas foi feita com o muco desses pacientes, na quantidade de 4 µg de proteína/poço da fração solúvel do muco de cada um dos 94 pacientes diluída em 0,1 M de tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6), em duplicata, incubado durante 20 horas a 4°C. Como controles negativos foram utilizados um poço sem fago, um poço sem muco e um poço com muco e um fago irrelevante.

Após três lavagens com PBST 0,01% (PBS + 0,01% v/v de Tween 20), as placas foram bloqueadas para sítios inespecíficos com 250 µL de tampão de bloqueio (PBST 0,01%-BSA 5%), incubado por 2h a 37°C. As placas foram então lavadas três vezes, novamente, com PBS-T 0,1%. O fago E5 foi adicionado na concentração de 1×10^9 pfu/poço em PBS-T 0,1% com 5% de BSA. Após incubação, durante 1h a 37°C, as placas foram lavadas três vezes com PBST 0,01%, e foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:5.000 usando 5% de BSA em PBST 0,01%. Após 1h a 37 °C as placas foram lavadas seis vezes com PBST 0,01%, e 100 µL de substrato TMB foram adicionados e incubados a temperatura ambiente durante 5-15 min. Finalmente, a reação foi interrompida utilizando 100 mL de 2M de H₂SO₄ e foi lida a absorbância das reações a 450 nm utilizando um leitor de microplacas Multiscan Plus versão 2.03.

3.11 Análise estatística

Para análise da reatividade dos clones de fagos à ECP no *phage*-ELISA, de maneira dependente da concentração, foi utilizada uma análise não paramétrica de Friedman do teste ANOVA. Para avaliar a reatividade no ensaio de *phage*-ELISA, entre os grupos, utilizando o clone de fago E5 nas amostras de muco esofágico, foi utilizada a análise não paramétrica do teste de Mann Whitney. Os parâmetros de sensibilidade e especificidade foram calculados com base na análise da curva ROC. A correlação de *Spearman* foi usada para análise entre o Índice de Reatividade (RI) e o Pico de contagem de eosinófilos/CGA. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 7* (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.12 Preparação do peptídeo sintético

Após a validação do clone com maior reatividade e que diferenciou o muco dos pacientes positivos dos negativos para EEO, o clone foi sintetizado quimicamente afim de verificar se manteria sua reatividade com a PCE.

O peptídeo foi produzido pela empresa BACHEM (Weil am Rhein, Germany) e após a purificação por cromatografia de afinidade em HPLC, o peptídeo apresentou 93,2% de pureza. Ao peptídeo foi acrescentado um grupo GGGS-NH₂ (amino-) e uma amidação C-Terminal. O peptídeo sintético foi entregue pela empresa liofilizado e a diluição foi feita segundo as recomendações do fabricante, dessa forma o peptídeo E5 foi ressuspendido em HCl a 1% na concentração de 1 mg/mL, aliquotado para uso posterior e mantido a -20°C.

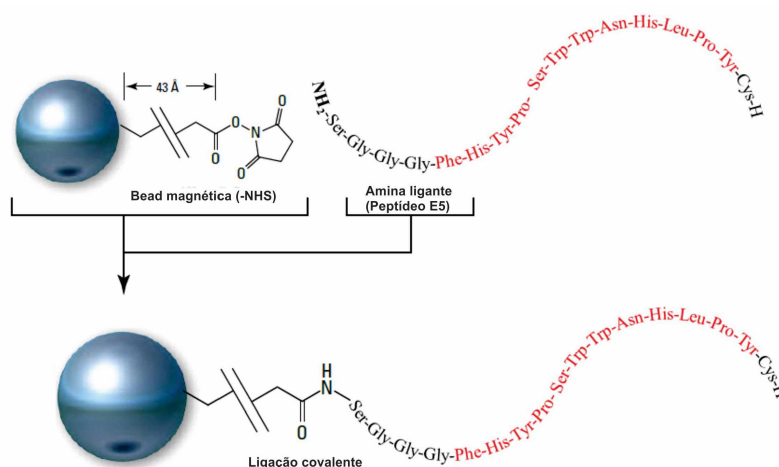
3.13 Acoplamento do peptídeo sintético à microesferas magnéticas (-NHS)

Para verificar a reatividade do peptídeo E5 sintético com a PCE, foram utilizadas microesferas magnéticas com o grupo funcional -NHS (N-hidroxissuccinimida). O acoplamento foi realizado segundo as recomendações do fabricante das microesferas (Thermo scientific Pierce, USA).

Primeiramente, foram adicionados 300 µL de microesferas magnéticas em um tubo de 1,5 mL, e então as microesferas foram imobilizadas na parede do tubo com um suporte magnético e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem A (HCl 1mM) e agitado suavemente em vórtex por 15 segundos para homogeneizar. Após isso, as microesferas foram imobilizadas na parede do tubo com um suporte magnético e descartado o sobrenadante. Imediatamente, foram adicionados 300 µL de solução do peptídeo E5 (5mg/mL) diluído em tampão de acoplamento (NaP 10mM, pH 7,4) no tubo e agitou-se durante 30 segundos. Após isso, a solução foi incubada por 1-2h em temperatura ambiente em um rotator. Durante os primeiros 30 min da incubação, o tubo foi vortexado por 15 segundos a cada 5 min e para o tempo restante, o tubo foi vortexado por 15 segundos a cada 15 min até a incubação completa. As microesferas foram imobilizadas na parede do tubo com um suporte magnético e o sobrenadante foi coletado para testes posteriores. Após isso, foi adicionado 1

mL de tampão de lavagem B (glicina 0.1M, pH 2.0) e agitou-se no vórtex durante 15 segundos. Novamente, as microesferas foram imobilizadas na parede do tubo com um suporte magnético e o sobrenadante foi descartado. Foi repetida essa etapa de lavagem por mais duas vezes e adicionado 1 mL de água ultrapura às microesferas e vortexado por 15 segundos. O tubo foi colocado mais uma vez no suporte magnético para imobilização das microesferas na parede do tubo e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1 mL de tampão etanolamina 3M, pH 9,0 às microesferas e vortexado o tubo por 30 segundos. Incubou-se o tubo por 2h à temperatura ambiente em um rotator e após isso as microesferas foram imobilizadas pelo suporte magnético e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 1 mL de água ultra pura ao tubo, homogeneizou-se bem, e as microesferas foram imobilizadas na parede do tubo com o suporte magnético e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1 mL de tampão de armazenamento (NaP 10mM, pH 7,4 com azida de sódio 0,05%) ao tubo, homogeneizou-se, e as microesferas foram imobilizadas na parede do tubo pelo suporte magnético e o sobrenadante foi descartado. Essa lavagem foi repetida mais duas vezes e por último adicionou-se 300 µL de tampão de armazenamento às microesferas, homogeneizou-se, e armazenou a 4°C até estar pronto para uso. Ao final do processo o peptídeo E5 foi acoplado à microesfera magnética como mostra o esquema da figura 5.

Figura 5. Esquema representativo do acoplamento do peptídeo E5 em microesferas magnéticas ativadas pelo grupo -NHS da Thermo Scientific Pierce. Em vermelho está representado a sequência dos 12 aminoácidos do peptídeo e em preto os grupos GGGS-NH₂ (amino-) e amidação C-Terminal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.14 Ensaio de reatividade com peptídeo sintético

Para verificar a reatividade do peptídeo sintético com a PCE foi utilizado o peptídeo acoplado à microesferas magnéticas em um ensaio de ELISA. Como controle positivo foram utilizadas microesferas magnéticas acopladas com proteína catiônica eosinofílica e como controle negativo foram utilizadas microesferas magnéticas acopladas com um peptídeo irrelevante.

Adicionou-se 40 µL (0,40 mg) de microesferas magnéticas acopladas com o peptídeo no microtubo de 1,5 mL e com o suporte magnético as microesferas foram imobilizadas na parede do tubo e o sobrenadante foi descartado. As microesferas magnéticas foram lavadas duas vezes com 100 µL de TBST 0,05% (TBS + 0,05% v/v de Tween 20) e, após isso, foram bloqueadas para sítios inespecíficos com o tampão de bloqueio TBST 0,05% - BSA 1,5% (TBS + 0,05% v/v de Tween 20 e 1,5% v/v de BSA) por 1h a temperatura ambiente. Após o bloqueio ser descartado, foram adicionados 100 µL da solução de PCE nativa, purificada de eosinófilos humanos (Arotec diagnostics, New Zealand) (2 µg/mL) em TBST 0,05% - BSA 1,5% e incubou-se por 2h a temperatura ambiente. Após três lavagens com 100 µL de TBST 0,05%, foram incubados com o anticorpo anti-PCE (Antibodies GmbH, Germany) diluído 1:1.000 em tampão de bloqueio TBST 0,05% - BSA 1,5% por 1h a temperatura ambiente. As microesferas foram lavadas três vezes com o tampão de lavagem TBST 0,05% e foram adicionados 100 µL do anticorpo secundário anti-IgG rabbit conjugado com AP (fosfatase alcalina) diluído 1:5.000 em tampão de bloqueio TBST 0,05% - BSA 1,5% por 1h a temperatura ambiente. Foram lavadas quatro vezes com 200 µL de TBST 0,05% e adicionados 100 µL de PNPP 10mM em tampão de detecção ELISA pH 9,8 por 10-30 min. Finalmente, a reação foi lida a 405 nm utilizando um leitor de microplacas Multiscan Plus versão 2.03.

3.15 Ensaio de *Dot blot* com peptídeo sintético

Foram adicionados 4µL (0,04 mg) de microesferas magnéticas acopladas com o peptídeo E5 na membrana e esperou secar ao ar por 10 minutos. Como controle positivo foram utilizadas 4 µL (0,04 mg) de microesferas magnéticas

acopladas com PCE nativa, purificada de eosinófilos humanos (Arotec diagnostics, New Zealand), e como controle negativo foram utilizadas 4 µL (0,04 mg) de microesferas magnéticas acopladas com um peptídeo irrelevante.

A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (BSA 0,5%, NaCl 0,15%, Tris/HCl 25mM pH 7,5, NaN₃ 0,05% Tween 20 0,05%) por 1h a temperatura ambiente. Adicionou-se PCE nativa, purificada de eosinófilos humanos (Arotec diagnostics, New Zealand) na concentração de 1 µg/mL, diluída no tampão de bloqueio e incubou-se por 2h à temperatura ambiente e *overnight* a 4°C. Após isso, a membrana foi lavada três vezes de 5 min cada com tampão de bloqueio e adicionou-se anti-PCE (Antibodies GmbH, Germany) na diluição 1:10.000 no tampão de bloqueio por 1h a 37°C. A membrana foi lavada três vezes de 5 min cada com tampão de bloqueio e foi adicionado IgG anti-coelho marcado com AP diluído 1:20.000 em tampão de bloqueio por 1h a 37°C. A membrana foi lavada três vezes de 5 min cada com tampão de bloqueio e foi adicionado o tampão de detecção (Tris/HCl 100mM pH 9,5, NaCl 100mM, Mg Cl₂+6 H₂O 5mM) por 5 min. Finalmente foi adicionada a solução de revelação colorimétrica (10 mL de tampão de detecção + 30 µL de NBT +30 µL de BCIP) por 5-30 min no escuro sem agitar até as marcações estarem visíveis, e a reação foi parada pela lavagem da membrana com ddH₂O.

3.16 Tratamento de mastócitos humanos LAD2 com proteína catiônica eosinofílica (via independente de IgE)

Para testar se o peptídeo sintético teria ação bloqueadora da PCE, foi realizado um ensaio de degranulação de mastócitos LAD2 via independente de IgE com a PCE, ou seja, as células LAD2 não foram sensibilizadas previamente com IgE. Os ensaios de degranulação utilizando as células LAD2 foram conduzidos e realizados no Departamento de Biociências na Universidade de Salzburg (Áustria). O protocolo de mensuração de degranulação de mastócitos foi feito pela quantificação da liberação de β-hexosaminidase segundo Kuehn e colaboradores (2010) com modificações.

As células LAD2 foram cultivadas em meio Completo de StemPro-34 SFM (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY) e suplementado com L-glutamina

2mM e SCF (100ng/mL), a 37°C, 7% de CO₂. Foram adicionadas a cada poço da placa de cultura 2x10⁴ células/mL de células LAD2, centrifugado 450 x g em temperatura ambiente por 5 min e o meio foi descartado. As células foram tratadas com 50 µL de proteína catiônica eosinofílica nativa (Arotec diagnostics, New Zealand) diluída no tampão HEPES (HEPES 10mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄.7H₂O 0,4mM, glicose 5,6mM, CaCl₂.2H₂O 1,8 mM, MgSO₄.7H₂O 1,3mM, BSA 0,04%) nas seguintes concentrações (20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, 0,625 µg/mL, 0,3125 µg/mL) e incubou-se por 24h a 37°C, 7% de CO₂. Como controle negativo foram utilizadas células LAD2 sem estímulo e como controle positivo da reação foi utilizado anti-FcεRI (1:1.000) para induzir a degranulação das células LAD2 através da ativação do receptor FcεRI. A placa foi centrifugada a 450 x g em temperatura ambiente por 5 min, o sobrenadante (50 µL) foi transferido para outra placa e foram adicionados 50 µL de solução de ensaio (5 mL de tampão citrato a 0,1M e 80 µL de 4-metil lubeliferil-N-acetil-beta-D-glucosaminida) (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas por 30 min a 37°C e a reação foi parada pela adição de 100 µL de NaCl 0,2M, NaOH 0,2M e glicina 0,2M, pH 2,2. A absorbância de cada poço foi determinada num leitor de microplacas a 592 nm.

3.17 Ensaio de citotoxicidade do peptídeo em linhagem celular de mastócitos humanos LAD2

As células LAD2 foram cultivadas em meio Completo de StemPro-34 SFM (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY) e suplementado com L-glutamina 2mM e SCF (100 ng/mL), a 37°C, 7% de CO₂. Foram adicionadas 2x10⁴ células/poço de células LAD2 em triplicatas em placa de cultura de 96 poços e foram tratadas com o peptídeo E5 nas concentrações de 1, 10 e 100 µM por 24h. Após isso 10 µL de MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]) (Calbiochem, Darmstadt, Germany) da solução (5mg/mL) foram adicionados a cada poço, e a cultura foi incubada por 1h a 37°C. Células mantidas apenas com meio de cultura suplementado com L-glutamina 2mM e SCF (100 ng/mL) foram utilizadas como controle negativo. Após a incubação o sobrenadante foi descartado e adicionados 50 µL/poço de dimetilsulfóxido

(DMSO) para solubilização dos cristais de formazan, seguido de leitura de absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 592 nm. A viabilidade celular (%) foi calculada pela leitura obtida pela leitora de microplaca usando a seguinte fórmula: % Viabilidade= $[(A_{592}\text{-células tratadas})/(A_{592}\text{-células não tratadas})] \times 100$.

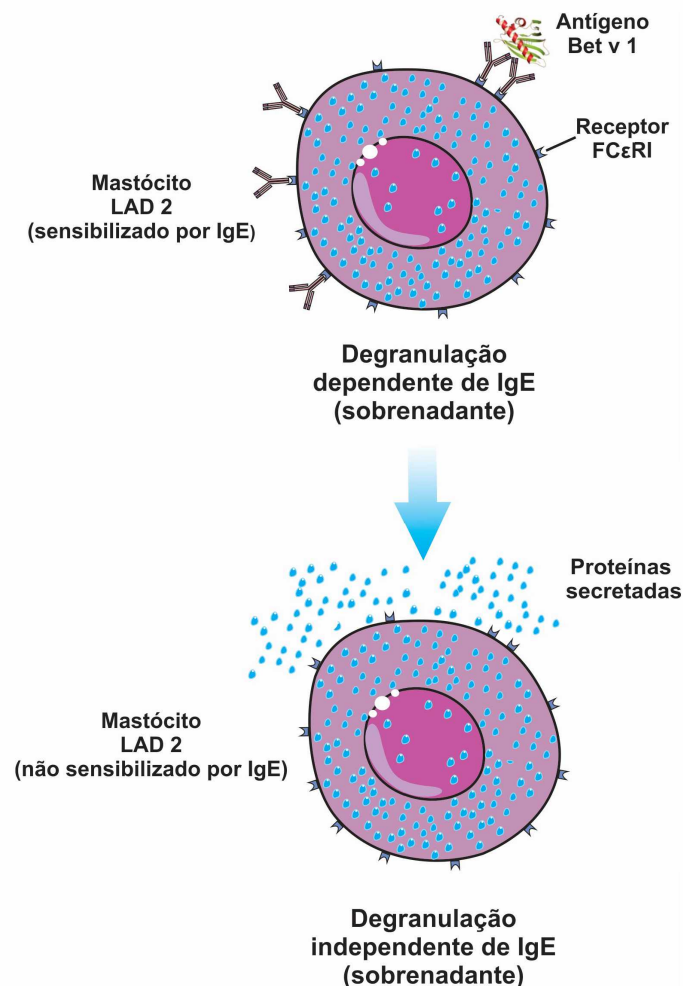
3.18 Ensaio de degranulação de mastócitos humanos LAD2 sensibilizados e não sensibilizados por IgE

Para testar se a degranulação de mastócitos via IgE é capaz de estimular a degranulação de mastócitos que não foram sensibilizados por IgE, foi realizado o ensaio de quantificação de β -hexosaminidase, visto que essas células respondem a uma sinalização autócrina. Primeiramente, as células da linhagem LAD2 foram estimuladas a degranularem com soro de pacientes alérgicos ao pólen de Bétula (*Betula verrucosa*), uma árvore da família Betulaceae, que têm como principal alérgeno a proteína Bet v1, (BREITENEDER et al., 1989). Na europa, a alergia a Betulaceae é muito comum, e cerca de 50% dos pacientes com alergia respiratória são sensibilizados aos pólenes de Betuláceas (CIPRANDI et al., 2016).

O esquema desse ensaio está mostrado na figura 6. As células Ag8 foram incubadas com soros de pacientes alérgicos à Bétula (1:10), com finalidade de depletar o sistema complemento, por 1h a 37 °C e 7% de CO₂. As células Ag8 foram centrifugadas durante 5 min a 250 x g a temperatura ambiente. O sobrenadante (50 μ L) foi adicionado a cada poço contendo 2×10^4 células/mL de células LAD2 e mantidas em meio Completo de StemPro-34 SFM (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY) e suplementado com L-glutamina 2mM e SCF (100ng/mL), a 37°C, 7% de CO₂ *overnight*. As células foram lavadas três vezes com tampão HEPES pH 7,4 (HEPES 10mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄.7H₂O 0,4mM, glicose 5,6mM, CaCl₂.2H₂O 1,8 mM, MgSO₄.7H₂O 1,3mM, BSA 0,04%) para retirar as IgE não ligadas ao receptor FC ϵ RI. Após a lavagem foi adicionada a solução de antígeno de Bet v1 diluída em tampão HEPES (1000 ng/mL) e a placa foi incubada por 1h a 37°C e 7% de CO₂. A placa foi centrifugada a 450 x g em temperatura ambiente por 5 min, e 50 μ L de degranulação IgE-dependente foi coletado para comparar com o restante do

sobrenadante (50 μL) que foi coletado e utilizado para o tratamento de 2×10^4 células/mL de células LAD2 em cada poço, não sensibilizadas com IgE, por 1h a 37°C e 7% de CO_2 . A placa foi centrifugada a $450 \times g$ em temperatura ambiente por 5 min, os sobrenadantes foram transferidos para outra placa e foram adicionados 50 μL de solução de ensaio (5 mL de tampão citrato a 0,1M e 80 μL de 4-metil lubeliferil-N-acetil-beta-D-glucosaminida) (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas por 30 min a 37°C e a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de NaCl 0,2M, NaOH 0,2M e glicina 0,2M, pH 2,2. A absorbância de cada poço foi determinada num leitor de microplacas a 592 nm.

Figura 6. Esquema representativo do experimento de degranulação de mastócitos humanos LAD2 dependente e independente de IgE.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.19 Tratamento da degranulação da linhagem celular de mastócitos humanos LAD2 com peptídeo E5

Para testar se o peptídeo E5 tem papel bioativo na diminuição da degranulação de mastócitos não sensibilizados por IgE, foi realizado o ensaio de quantificação de β -hexosaminidase. Primeiramente, as células LAD2 foram estimuladas a degranularem com soro de pacientes alérgicos ao pólen de Bétula (*Betula verrucosa*). Os soros de 10 pacientes alérgicos à Bétula foram diluídos em meio com células Ag8 (1:10), com finalidade de depletar o sistema complemento, por 1h a 37 °C e 7% de CO₂. As células Ag8 foram centrifugadas durante 5 min a 250 x g a temperatura ambiente. O sobrenadante (50 μ L) foi adicionado a cada poço contendo 2 x 10⁴ células/mL de células LAD2 e mantidas em meio Completo de StemPro-34 SFM (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY) e suplementado com L-glutamina 2mM e SCF (100ng/mL), a 37°C, 7% de CO₂ *overnight*. As células foram lavadas três vezes com tampão HEPES pH 7,4 (HEPES 10mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄.7H₂O 0,4mM, glicose 5,6mM, CaCl₂.2H₂O 1,8 mM, MgSO₄.7H₂O 1,3mM, BSA 0,04%) para retirar as IgE não ligadas ao receptor Fc ϵ RI. Após a lavagem, foram adicionados 100 μ L da solução de antígeno de Bet v1 (100 ng/mL) diluída em tampão HEPES e a placa foi incubada por 1h a 37°C e 7% de CO₂.

A placa foi centrifugada a 450 x g em temperatura ambiente por 5 min, e o sobrenadante 100 μ L foi coletado. Metade do sobrenadante (50 μ L) foi tratado com o peptídeo E5 10 μ M por 1h, a temperatura ambiente. Após isso os sobrenadantes tratados e não tratados com peptídeo E5 foram utilizados para o tratamento de 2 x 10⁴ células/mL de células LAD2 não sensibilizadas com IgE por 1h a 37°C e 7% de CO₂. A placa foi centrifugada a 450 x g em temperatura ambiente por 5 min, os sobrenadantes foram transferidos para outra placa e foram adicionados 50 μ L de solução de ensaio (5 mL de tampão citrato a 0,1M e 80 μ L de 4-metil lubeliferil-N-acetil-beta-D-glucosaminida) (Sigma-Aldrich). Após incubar por 30 min a 37°C e 7% de CO₂ a reação foi parada pela adição de 100 μ L de NaCl 0,2M, NaOH 0,2M e glicina 0,2M, pH 2,2. A absorbância de cada poço foi determinada num leitor de microplacas a 592 nm.

3.20 Espectrometria de massa: degranulação de mastócitos sensibilizados por IgE x degranulação de mastócitos não sensibilizados por IgE

Utilizando espectrometria de massa, as proteínas foram mensuradas e comparadas entre amostras do *pool* de sobrenadantes da degranulação de células LAD2 dependente e independente de IgE. Como controle negativo foi utilizado apenas o tampão HEPES em células LAD2 não sensibilizadas com IgE (degranulação basal).

Foram utilizados 100 μ L da solução de antígeno de Bet v1 (1000 ng/mL) diluída em tampão HEPES no tratamento de 8 poços com 2×10^4 células/mL de células LAD2 sensibilizadas por IgE de paciente alérgico a Bétula, por 1h a 37°C e 7% de CO₂. A placa foi centrifugada a 450 x g em temperatura ambiente por 5 min, e foi feito um *pool* da coleta de 50 μ L de cada poço e o restante do volume (50 μ L) de cada poço foi utilizado para tratar 8 poços, em outra placa, com 2×10^4 células/mL de células LAD2 não sensibilizadas por IgE por 1h a 37°C e 7% de CO₂. A placa foi centrifugada a 450 x g em temperatura ambiente por 5 min e foi feito um *pool* da coleta de 50 μ L de cada poço para comparar o perfil proteômico de cada tipo de degranulação. Como controle negativo, foi feito o *pool* da coleta de 50 μ L de 8 poços com 2×10^4 células/mL de células LAD2 em tampão HEPES não sensibilizadas por IgE por 1h a 37°C e 7% de CO₂.

A etapa de extração começou com digestão de 100 μ L/amostra usando o Kit de Digestão de Trypsin All-in-One ProteoExtract® (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA). Aproximadamente 100 μ L de sobrenadante foram adicionados a 100 μ L de tampão de extração e 100 μ L de esferas de vidro, agitadas por 1h a 4 °C. As amostras foram reduzidas, alquiladas e digeridas em condições padrão por 3h. Os peptídeos digeridos foram dessalinizados utilizando a C18 ZipTip (EMD Millipore) e separados por nano-HPLC de fase reversa (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha, coluna: PepSwift Monolithic Nano Column, 100 25m, Dionex). Foi eluído da coluna com um gradiente de acetonitrilo (Solvente A: 0,1% (v / v) FA / 0,01% (v/v) de TFA/5% (v / v) de DMSO; solvente B: 0,1% (v / v) de FA/0,01% (v/v) de TFA / 90% (v/v) de ACN/5% (v/v) de DMSO; 5-45% de B em 60 min) a uma taxa de fluxo de 0,8/min a 55°C. Os peptídeos foram analisados com um espectrometro de massa Q Exactive Orbitrap (Thermo Fisher

Scientific, Bremen, Alemanha), acoplado diretamente ao HPLC. A voltagem de capilaridade do nano eletrospray foi de 2 kV, e esse instrumento foi sintonizado para sensibilidade máxima. Alíquotas dos sobrenadantes foram digeridas 2 vezes. Consequentemente, foram realizados 2 experimentos independentes de MS por *pool* de sobrenadantes. Os dados destes 2 experimentos MS foram combinados e analisados. Para a quantificação utilizou-se o *PEAKS Studio* (quantificação manual e validação de dados após pesquisa na base de dados). A identificação das proteínas foi realizada no banco de dados *Human UniProt Complete Proteome* e as anotações de proteínas foram analisadas com a visualização de dados pelo *Software Tool for Researching Annotations of Proteins* (STRAP).

3.21 Análise de dados *in Silico*

O peptídeo E5 foi alinhado com proteínas depositadas no NCBI/BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que consta de um conjunto de programas que buscam similaridades entre diferentes sequências. O alinhamento das sequências investigadas foi realizado com o banco de dados de proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Dentro do BLAST a busca foi realizada no *Protein blast* utilizando como database o *swissprot protein sequence (swissprot)*, algoritmo - *blastp* (protein BLAST) e a pesquisa foi restrita ao *Homo sapiens* (taxid: 9606). Para obter informações detalhadas sobre as proteínas que alinharam com o peptídeo E5 foi utilizado o banco de dados *UniProtKB SwissProt* (<http://www.uniprot.org/>).

4 RESULTADOS

4.1 Análise de espectrometria de massa

Todas as proteínas identificadas apresentaram compatibilidade com o banco de dados *Human Uniprot* após a análise dos espectros. Foram encontradas 17 proteínas com expressão diferencial estatisticamente significativa, com alta ou média usabilidade para diferenciar os 3 grupos analisados (Figura 7). Destas 17 proteínas, 5 apresentaram alta usabilidade, com alta expressão nos pacientes do grupo EEO, 1 apresentou alta expressão na maioria dos pacientes do grupo controle e DRGE, 4 apresentaram média usabilidade, detectando expressão na maioria dos pacientes do grupo EEO e 7 apresentaram média usabilidade, com possível utilidade para distinguir entre pacientes dos grupos EEO e DRGE.

Em relação as proteínas com alta usabilidade, com alta expressão no grupo dos pacientes EEO, destaca-se a proteína catiônica eosinofílica (PCE), uma proteína com ação de citotoxina e helmintotoxina com atividade de ribonuclease de baixa eficiência, que se apresentou mais de 100 vezes expressa em relação ao grupo controle. Os dados de três métodos, MaxQuant/Perseus, PEAKS Studio e PEAKS Studio foram combinados e visualizados como gráficos de barras (média + SEM) (Figura 8A) e para comparar os grupos, calculou-se a média de todas as amostras de Controle, EEO e DRGE (Figura 8B). PCE nativa com as suas sequências peptídicas identificadas pela espectrometria de massa (Figura 8C).

Figura 7. Proteínas com expressão diferencial entre os grupos Controle, EEO e DRGE. A PCE está indicada pela seta em vermelho.

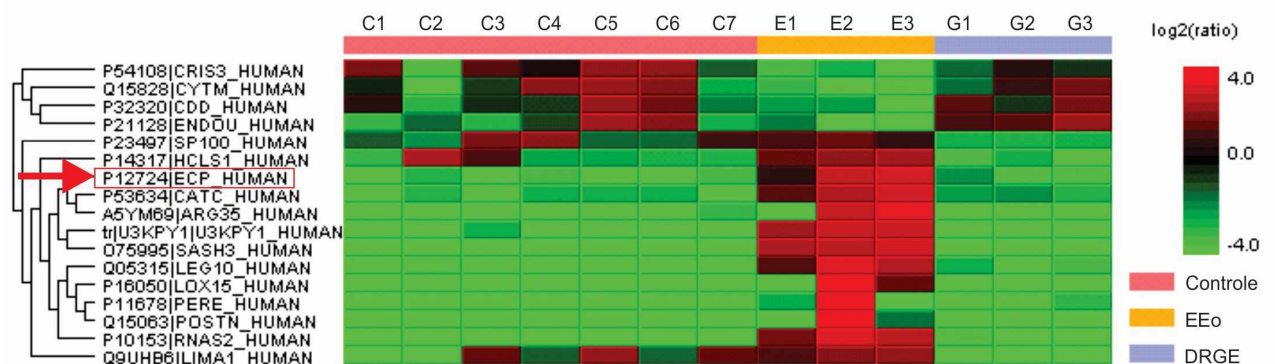
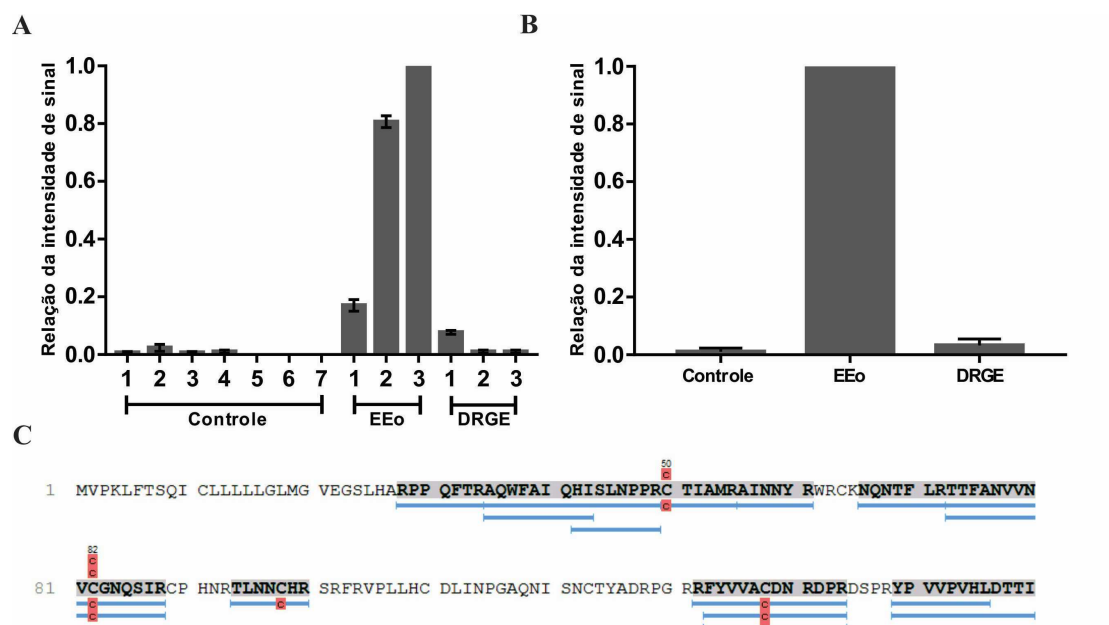


Figura 8. Análise de espectrometria de massa da PCE. (A) Os dados dos três métodos de quantificação da proteína catiônica eosinofílica (PCE) foram combinados e visualizados como gráficos de barras (média+SEM), (B) Para comparar os grupos, a média das amostras de todos os controles, EEO e GERD foram calculadas (média+SEM), (C) PCE nativa identificada e analisada por espectrometria de massa. As regiões cobertas por peptídeos identificados são mostradas em cinza, cada barra azul indica uma sequência peptídica identificada e a modificação pós-translacional (MPT) carbamidometilação está mostrada na caixa vermelha.



4.2 Seleção de fagos ligantes à PCE

Com a utilização da técnica de *Phage display*, três ciclos de seleção foram realizados para selecionar fagos ligantes à PCE. O enriquecimento de fago da seleção foi monitorado mensurando os títulos de saída após cada ciclo da seleção com relação ao título de saída do primeiro ciclo. O título de saída de fagos após a seleção aumentou do primeiro ciclo (4×10^4 pfu) ao terceiro ciclo (6.9×10^6 pfu) (Figura 9A) e no fim de três ciclos da seleção, o título do fago aumentou 172,5 vezes mais do que o primeiro ciclo da seleção (Figura 9B). O enriquecimento do título de fagos sugere que a seleção de fagos que se ligam seletivamente à PCE foi alcançada com sucesso.

Um total de 96 clones de fagos foi escolhido aleatoriamente após o plaqueamento do terceiro ciclo. Dos 96 clones selecionados, 20 clones foram mais reativos contra a PCE no *phage*-Elisa pré-sequenciamento (*cut-off* absorvância = 0,692) (Tabela 2). Assim, o DNA desses clones de fagos foi submetido à reação pela cadeia da polimerase e sequenciamento para identificar

a sequência dos peptídeos expressos em cada clone de fago. Das 20 amostras de DNA sequenciadas, foram identificadas 13 sequências válidas de clones no sequenciamento (sem erros de sequenciamento), e então as sequências de aminoácidos e a frequência dessas sequências foram analisadas (Tabela 3). A figura 10 demonstra a reatividade dos clones purificados contra a PCE, utilizando 1×10^{10} pfu/poço. Nessa concentração de fagos a reatividade foi muito semelhante para 6 clones, que apresentaram os maiores valores de absorvância e a maior diferença em comparação com o clone irrelevante ($p < 0,05$).

Figura 9. Seleção e enriquecimento da biblioteca de peptídeos. (A) A titulação dos fagos ao longo dos ciclos da seleção, (B) Três ciclos de seleção com a PCE foram realizados, e a quantidade do fago (pfu) após cada ciclo foi mensurado. Os números acima das barras mostram a quantidade de vezes de enriquecimento da titulação do fago com relação ao primeiro ciclo.

A

Ciclo	Entrada (pfu)	Saída (pfu)	Relação (Saída/Entrada)
1º ciclo	1×10^{11}	4.0×10^4	4.0×10^{-7}
2º ciclo	1×10^{11}	3.1×10^5	3.1×10^{-6}
3º ciclo	1×10^{11}	6.9×10^6	6.9×10^{-5}

B

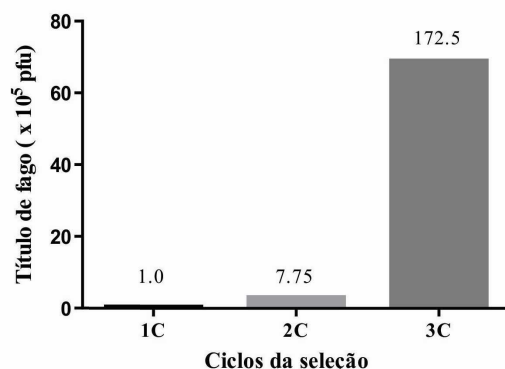


Tabela 2. Phage-ELISA pré-sequenciamento dos clones selecionados contra a PCE recombinante.

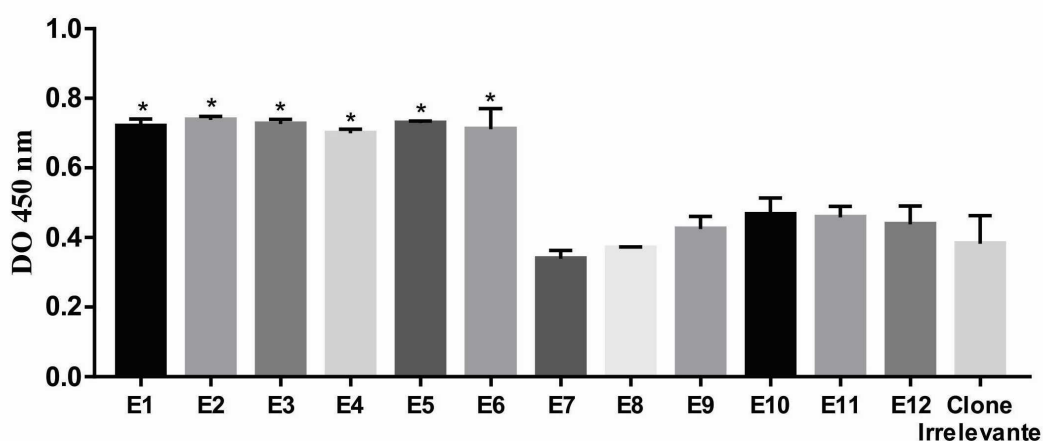
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,182	0,272	0,933	0,238	0,215	0,793	0,625	1,141	0,408	0,668	0,691	0,653
B	0,162	0,079	0,106	0,093	0,478	0,814	0,611	0,579	0,432	0,630	0,453	0,580
C	0,166	0,087	0,100	0,147	0,204	0,779	0,352	0,626	0,899	0,569	0,843	0,580
D	0,331	0,119	0,120	0,129	0,503	1,040	0,463	0,343	1,142	0,671	0,665	1,014
E	0,139	0,132	0,141	0,087	0,178	0,647	0,919	1,050	0,343	0,598	0,618	0,628
F	0,176	0,579	0,136	0,265	0,733	0,602	0,626	0,858	0,519	0,496	0,648	0,654
G	0,263	0,125	0,154	0,264	0,563	0,615	0,829	0,429	0,465	0,883	0,580	0,635
H	0,312	0,179	0,799	0,254	0,754	0,962	0,585	0,584	0,932	0,518	0,658	0,657

*20 fagos escolhidos para o sequenciamento (vermelho).

Tabela 3. Sequências de aminoácidos e frequências dos peptídeos selecionados.

Clone	Sequência de aminoácidos	Frequência
E1	EMLYEPFSNLR	1/13
E2	HPDGPEYNAYLY	1/13
E3	AASNAIFSVMDS	1/13
E4	AGFTFNVNAYDF	1/13
E5	YPLHNWWSPLYHF	1/13
E6	YSASSYNTAWWS	1/13
E7	VHWDFRQWWQPS	2/13
E8	SSSAYRINAESM	1/13
E9	VVAGSPHILWLT	1/13
E10	GSWGPFFYDRMSK	1/13
E11	SSYRPSDIGLLL	1/13
E12	DGGPWVLSLNSA	1/13

Figura 10. Reatividade obtida através da interação dos clones de fagos sequenciados e clone irrelevante com a proteína catiônica eosinofílica.* $p < 0,05$.

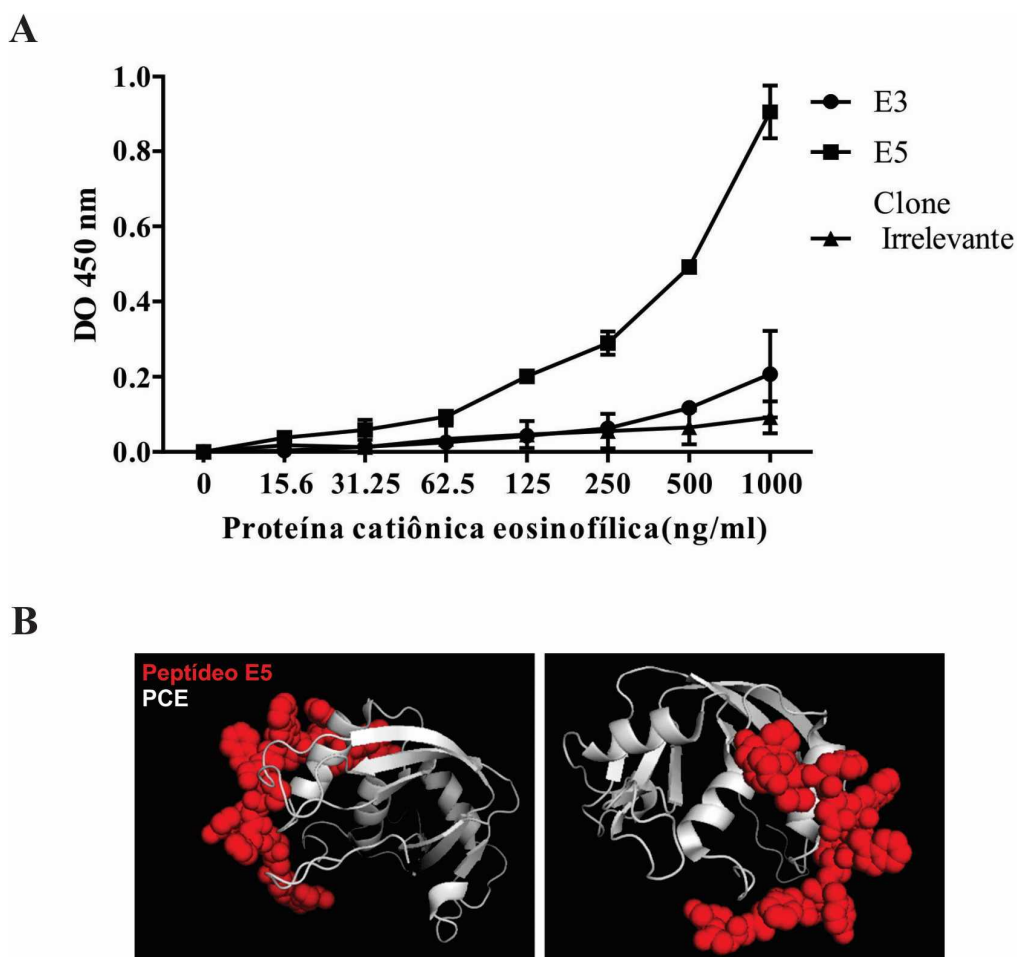


4.3 Validação de clones de fagos por *phage*-ELISA

Dos 12 clones com sequências distintas, foram escolhidos 2 clones (E3 e E5) dentre os clones que apresentaram os maiores valores de absorbância para testar a atividade de ligação à PCE de um modo dependente da concentração da PCE, utilizando 1×10^9 pfu/poço. O clone E5 apresentou maior ligação à PCE do que o clone E3, enquanto o clone irrelevante apresentou pouca ligação à PCE. Estes resultados indicam a atividade de ligação seletiva e específica desses clones de fagos à PCE. O clone E3 foi capaz de se ligar a PCE de maneira dependente da concentração, mas a curva de ligação obtida pelo fago E5 foi

melhor e mais reativa nas concentrações de PCE (0-1000 ng/ml) comparado com as curvas dos clones E3 e irrelevante (Figura. 11A). A Estrutura 3D da ligação do peptídeo E5 a proteína catiônica eosinofílica recombinante (PDB: 1QMT) foi obtida pela ferramenta *Patchdock* e visualizada no *software PyMOL* (Figura. 11B).

Figura 11. Detecção de PCE por ensaio *phage*-ELISA e estrutura 3D da ligação do peptídeo E5 com a PCE. (A) Concentrações crescentes de PCE foram pré-sensibilizadas em placas de ELISA e incubadas com os fagos selecionados E3, E5 e clone Irrelevante e depois incubadas com o anticorpo anti-M13. O anticorpo foi detectado por anti-IgG conjugada com HRP e o substrato da enzima. A densidade óptica (DO) foi medida no comprimento de onda de 450 nm. Os dados representam a média da DO $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas. (B) Estrutura 3D da ligação do peptídeo E5 a proteína catiônica eosinofílica recombinante (PDB: 1QMT) obtida pela ferramenta *Patchdock* e visualizada no *software PyMOL*.

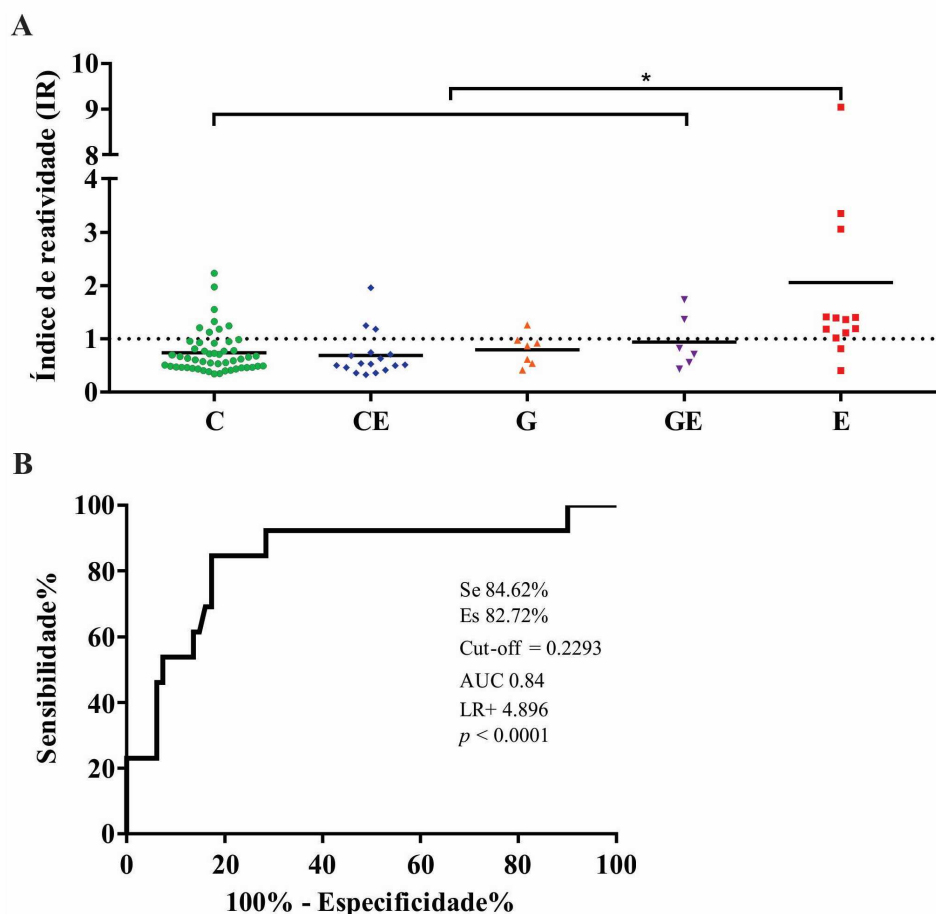


4.4 *Phage*-ELISA: muco de pacientes

Após a curva de linearidade obtida utilizando o fago E5, ele foi escolhido para ser usado em muco esofágico de 94 pacientes pediátricos no ensaio de *phage*-ELISA.

Para determinar o limiar do Índice de Reatividade (IR), *cut-off* = 0,2293 (absorbância) em ELISA, a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi construída e o Índice de Reatividade (IR) de cada amostra foi calculado usando a equação $IR = \text{absorbância da amostra} / \text{cut-off}$. Amostras de muco com $IR \geq 1,00$ foram consideradas reativas (positivas) (Fig. 12A). Após a análise da curva ROC, obtivemos nesse diagnóstico uma área sob curva (AUC) de 0,84, sensibilidade de 84,62%, especificidade de 82,72%, $LR + 4,896$ e $p \leq 0,0001$ (Fig. 12B).

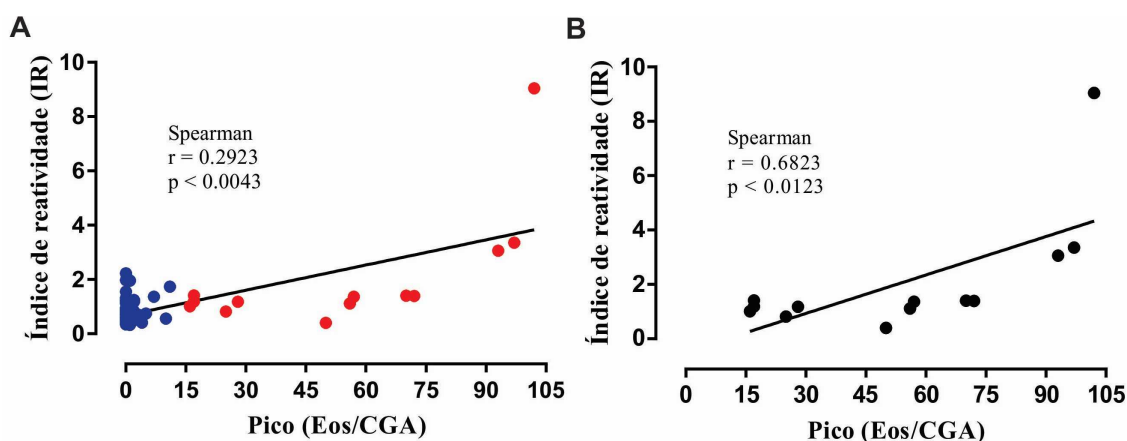
Figura 12. Phage-ELISA em muco de pacientes pediátricos. (A) Para os 94 pacientes classificados em 5 grupos: C (Controle), CE (Controle com eosinófilo), G (Doença do refluxo gastroesofágico), GE (Doença do refluxo gastroesofágico com eosinófilo) e E (Esofagite eosinofílica) foi realizado um ensaio ELISA-fago e mostrado pelo índice de reatividade (IR). O cut-off de diagnóstico por Elisa-fago = 0,2993 a $IR = 1$ (linha tracejada) foi derivada de estudos posteriores em escala maior pela análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), (B) Curva ROC baseada no cut-off 0,2293, com uma área sob a curva (AUC) de 0,84, Se 84,62%, Es 82,72%; $LR + 4,896$ e $p < 0,0001$.



Houve correlação positiva para os 94 pacientes entre o Índice de Reatividade (IR) e o Pico da contagem de eosinófilos/CGA (Fig. 13A, $r = 0,2923$, p

<0,0043). No entanto, quando analisamos apenas os 13 pacientes EEO a correlação positiva é ainda maior entre o Índice de Reatividade (IR) e o Pico de contagem de eosinófilos/CGA (Fig. 13B, $r = 0,6823$, $p < 0,0123$).

Figura 13. Correlação linear entre o Índice de Reatividade (IR) x Pico de contagem de eosinófilos/CGA. (A) Para os 94 pacientes foi realizada uma correlação linear entre o Índice de Reatividade (IR) e o Pico de contagem de eosinófilos/CGA. Círculos azuis (C, CE, G e GE) e círculos vermelhos (E) com Spearman $r = 0,2923$ e valor $p < 0,0043$, (B) Para os 13 pacientes (EEO) foi realizada uma correlação linear entre o Índice de Reatividade (IR) e o Pico de contagem de eosinófilos/CGA, com o valor de Spearman $r = 0,6823$ e $p < 0,0123$.



Pacientes com $IR \geq 1$ tiveram associação significativa com distúrbios atópicos, já que 64% dos 25 pacientes com $IR \geq 1$ apresentaram alguma alergia. Dentre os distúrbios atópicos analisados, a rinite alérgica foi encontrada em 40% dos pacientes $IR \geq 1$, em seguida a alergia alimentar (28%), dermatite atópica (16%) e asma (12%). Os distúrbios atópicos em pacientes com $IR \geq 1$ de cada grupo estão mostrados na Tabela 4.

Foram observadas características importantes identificadas em EEO e que estão presentes em pacientes não-EEO com $IR \geq 1$ e em pacientes EEO com $IR \leq 1$, levando em consideração as desordens atópicas, aspectos histológicos e aspectos endoscópicos para o melhor entendimento desses pacientes *outliers* no diagnóstico por *phage*-Elisa (Tabela 5).

Tabela 4. Distúrbios atópicos em pacientes com IR ≥ 1 .

	IR ≥ 1 (n°)	Distúrbios atópicos, n° (%)	Asma, n° (%)	Rinite, n° (%)	Dermatite atópica, n° (%)	Alergia alimentar, n° (%)
EEo	11	9 (81,8)	3 (27,2)	6 (54,5)	2 (18,1)	5 (45,4)
DRGE	1	—	—	—	—	—
DRGE com Eo	2	2 (100)	—	2 (100)	—	—
Controle	8	3 (37,5)	—	1 (12,5)	1 (12,5)	2 (25)
Controle com Eo	3	2 (66,6)	—	1 (33,3)	1 (33,3)	—
Total	25	16 (64)	3 (12)	10 (40)	4 (16)	7 (28)

IR, Índice de reatividade no ELISA; EEo, Esofagite eosinofílica; DRGE, Doença do refluxo gastroesofágico; Eo, eosinófilo.

Tabela 5. Características sugestivas de EEo presentes em pacientes não-EEo com IR ≥ 1 e em pacientes EEo com RI ≤ 1 .

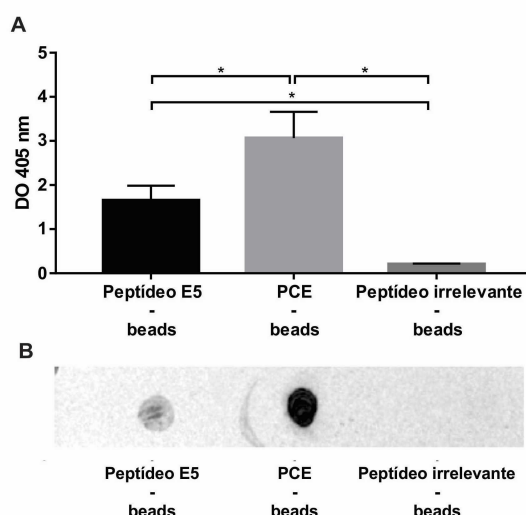
Paciente (Grupo, n°)	IR Elisa	Pico (eos/CGA)	Sexo	Disfagia/ Impactação alimentar	Desordens atópicas	Aspectos histológicos	Aspectos endoscópicos
C 07	1,241	0	F	Sim	DA, AA, RA	EID	NL
C 13	1,184	0	M	Não	—	NL	NL
C 15	1,206	0	M	Não	PA	EID	NL
C 17	1,324	0	M	Sim	AA	EID	NL
C 23	1,976	0	F	Não	—	EID	NL
C 33	1,550	0	M	Não	—	EID	NL
C 52	1,123	0	M	Não	—	EID	NL
C 59	2,231	0	M	Não	—	HMB, EID	NL
CE 35	1,958	1	F	Sim	—	EID	NL
CE 40	1,182	2	F	Sim	RA	EID	NL
CE 68	1,249	2	M	Sim	DA	EID	Edema
G 25	1,258	0	M	Sim	—	EID	Exsudato, Edema
GE 06	1,365	7	F	Não	RA, PA	degranulação de Eo	Estrias longitudinais, exsudato
GE 84	1,738	11	M	Sim	RA	HMB, EID e degranulação de Eo	Estenose
E 19	0,816	25	M	Sim	RA	EID	Estrias longitudinais, edema
E 79	0,406	50	F	Não	DA, AA	EID	NL

C, Controle sem eosinófilos; CE, Controle com ≤ 15 eosinófilos/CGA; G, Doença do refluxo gastroesofágico sem eosinófilos; GE, Doença do refluxo gastroesofágico com ≤ 15 eosinófilos/CGA; E, Esofagite eosinofílica; DA, Dermatite atópica; AA, Alergia alimentar; RA, Rinite alérgica; PA, Pais atópicos; EID, Espaços intercelulares dilatados; HMB, Hiperplasia da membrana basal; Eo, eosinófilo; NL, normal; M, masculino; F, feminino.

4.5 ELISA e *Dot blot* com peptídeo sintético

Ensaio de ELISA e *Dot blot* com o peptídeo sintético E5 acoplado em microesferas magnéticas foram realizados para avaliar a reatividade do peptídeo sintético contra a proteína catiônica eosinofílica. Com estes testes foi possível identificar a sensibilidade da seleção e da produção do peptídeo E5, visto que o mesmo se ligou positivamente a PCE (Figura 14). Após análise estatística do teste de ELISA, o peptídeo E5 demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com peptídeo irrelevante acoplado às microesferas magnéticas (Figura 14A).

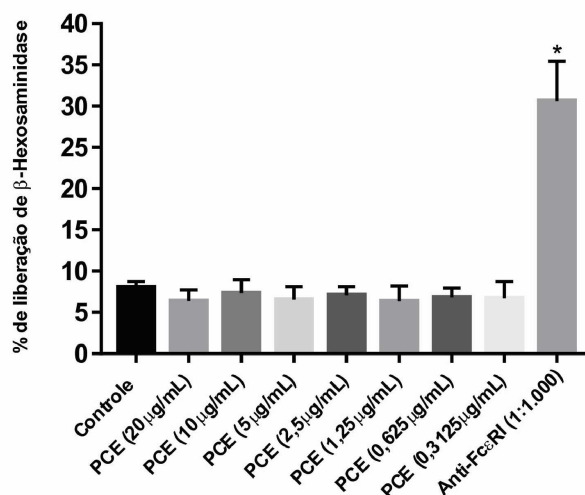
Figura 14. ELISA e *dot blot* com peptídeo E5. (A) ELISA com peptídeo E5 acoplado a microesferas magnéticas (*beads*), como controle positivo foi utilizado a PCE acoplada às microesferas magnéticas e peptídeo irrelevante acoplado a microesferas magnéticas como controle negativo, $*p < 0,05$. (B) *Dot blot* com 4uL na membrana de cada grupo de microesferas magnéticas acopladas (*beads*), nas mesmas condições do Elisa.



4.6 Tratamento de mastócitos humanos LAD2 com proteína catiônica eosinofílica (via independente de IgE)

Ensaio de liberação da enzima lisossomal β -hexosaminidase foi realizado para verificar se a PCE poderia estimular as células LAD2 a degranularem independentemente de IgE. Neste experimento, em 24h de estímulo de PCE em diferentes concentrações (20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 $\mu\text{g/mL}$), não resultou na degranulação das células LAD2 em relação ao controle negativo (células LAD2 não estimuladas) e do controle positivo (anti-Fc ϵ RI) (Figura 15).

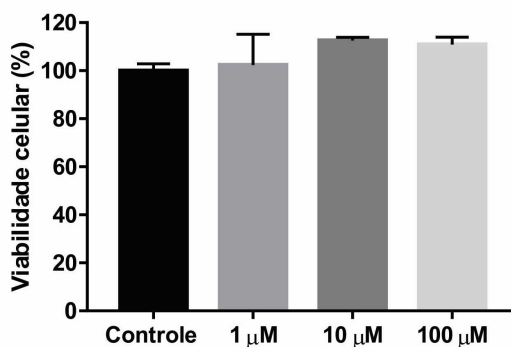
Figura 15. Tratamento de células LAD2 com Proteína Catiônica Eosinofílica (PCE). Foram utilizadas diferentes concentrações da PCE (20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 $\mu\text{g/mL}$). Como controle negativo foram utilizadas células LAD2 sem estímulo e como controle positivo foi utilizado anti-Fc ϵ RI (1:1.000) para induzir a degranulação das células LAD2 através da ativação do receptor Fc ϵ RI. Não houve diferença estatística entre os tratamentos com PCE e a porcentagem de liberação da β -hexosaminidase basal foi de 7-8% nas células não estimuladas. Apenas houve diferença estatística entre o controle e o estímulo de anti-Fc ϵ RI (n=3, média, D.P, * p< 0,05, Teste T).



4.7 Ensaio de citotoxicidade

Ensaio de citotoxicidade realizado em células LAD2 mostrou que o peptídeo E5 testado nas concentrações de 1 μM , 10 μM e 100 μM não teve efeito na viabilidade das células e não apresentaram diferença estatística em comparação com o controle (LAD2 sem tratamento) (Figura 16).

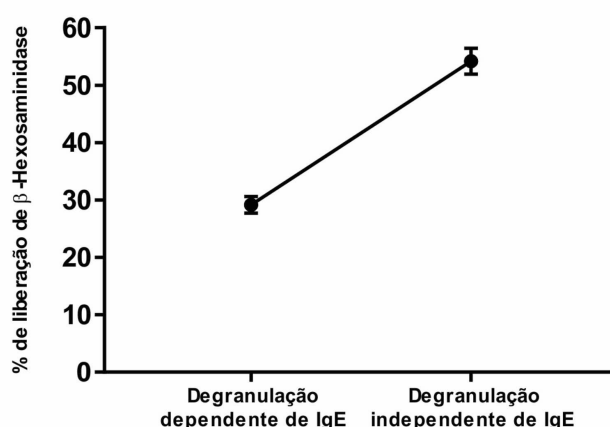
Figura 16. Ensaio de citotoxicidade com peptídeo E5 em células LAD2. O peptídeo E5 não mostrou diferença estatística quando comparado com o controle, indicando que as concentrações testadas não têm efeito citotóxico nas células usadas.



4.8 Ensaio de degranulação de mastócitos humanos LAD2 sensibilizados e não sensibilizados por IgE

Ensaio de liberação da β -hexosaminidase foi realizado a partir da degranulação de células LAD2 estimuladas por IgE-Bet v1 em comparação com a degranulação de células LAD2 independente de IgE. Neste experimento, foi possível verificar que a degranulação independente de IgE conseguiu estimular as células a degranularem, ocorrendo aumento de 25% em comparação com a degranulação dependente de IgE (Figura 17).

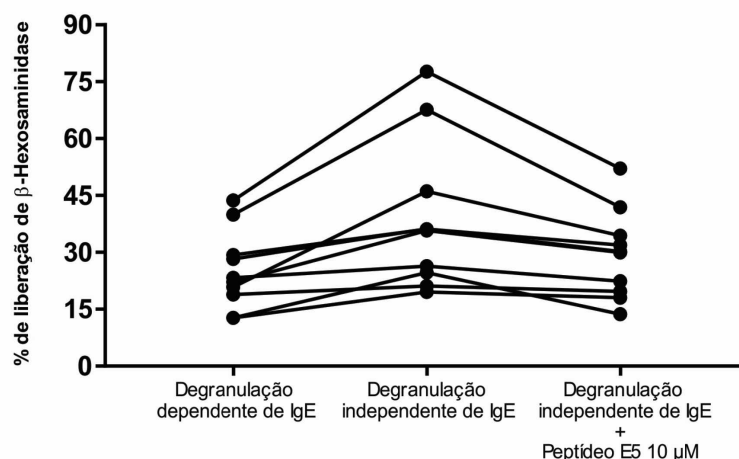
Figura 17. Degranulação de células LAD2. O soro de paciente alérgico à Bet v 1 foi utilizado para a degranulação dependente de IgE específico, e na degranulação independente de IgE foi utilizado as proteínas degranuladas por LAD 2. Ocorreu aumento de 25% na liberação de β -hexosaminidase na degranulação independente de IgE em comparação com a degranulação dependente de IgE. A porcentagem de liberação da β -hexosaminidase basal foi de 5-7% nas células não estimuladas (n=3, média, D.P, $p<0,05$, Teste T).



4.9 Tratamento da degranulação de mastócitos humanos LAD2 com peptídeo E5

Ensaio de liberação da β -hexosaminidase foi realizado a partir da degranulação de células LAD2 estimuladas por IgE-Bet v1 em comparação com a degranulação de células LAD2 independente de IgE sem tratamento e com tratamento com o peptídeo E5 10 μ M. Neste experimento, foi possível verificar que o peptídeo E5 conseguiu diminuir a degranulação independente de IgE em comparação com a degranulação independente de IgE utilizando o soro de 10 pacientes alérgicos à Bétula (Figura 18).

Figura 18. Tratamento da degranulação de mastócitos humanos LAD2 com peptídeo E5. Foram usados soros de pacientes alérgicos para a degranulação dependente de IgE específico à Bet v1, degranulação independente de IgE e degranulação independente de IgE + Peptídeo E5 10 μ M. (n=10, p< 0,05 One way ANOVA, teste de comparação múltipla de Tukey).



4.10 Análise de espectrometria de massa

Todas as proteínas identificadas apresentaram compatibilidade com o banco de dados “Human Uniprot” após a análise dos espectros. Foram encontradas 159 proteínas com intensidade de sinal $> 1 \times 10^4$ distribuídas nos três tipos de condições de tratamentos das células LAD2 (IgE-dependente, IgE-independente e degranulação basal como controle) (Figura 19). Pode-se perceber que há 11 proteínas em comum entre todas as condições de degranulação, 50 proteínas em comum entre as degranulações IgE-dependente e IgE-independente, e na condição de IgE-independente teve um enriquecimento de 79 proteínas exclusivas que não foram encontradas nas outras condições. Foi realizada a categorização funcional das proteínas identificadas, com base no bancos de dados EBI (*European Bioinformatics Institute*), *Gene Ontology* (GO), UniprotKB pelo *Software Tool for Researching Annotations of Proteins* (STRAP). Em relação ao atributo “Processos biológicos” houve um enriquecimento de proteínas na degranulação IgE-independente, que podem participar em processos celulares, em processos de regulação, localização, e em processos do sistema imune (Figura 20A). No atributo “Componente Celular” houve um enriquecimento de proteínas localizadas no citoplasma, organelas intracelulares, meio extracelular, membrana plasmática, citoesqueleto, núcleo, ribossomo, cromossomo e

endossomo (Figura 20B). Já no atributo de “Função Molecular” houve um enriquecimento de proteínas com funções de atividade estrutural, atividade catalítica e de ligação (Figura 20C). No presente estudo também foram utilizados mapas de calor (*heatmaps*) para visualização da variação de expressão de proteínas nas condições analisadas. As cores do mapa de calor correspondem aos níveis de expressão normalizados das proteínas em uma escala de cores. Proteínas mais abundantes são indicadas no gradiente de cor em tons vermelho e proteínas menos abundantes em uma dada condição são indicadas no gradiente em tons de cor verde (Figura 21). A maioria das proteínas da intersecção entre as três condições aumentou seu sinal de intensidade na degranulação IgE-independente (Figura 21A) e também ocorreu aumento do sinal de intensidade da maioria das 50 proteínas da intersecção entre as degranulações IgE-dependente e IgE-independente, indicando que houve degranulação dessas proteínas pelo estímulo IgE-independente (Figura 21B). As 79 proteínas exclusivamente encontradas na degranulação IgE-independente estão mostradas na Tabela 6.

Figura 19. Diagrama de Venn de proteínas identificadas e suas intersecções entre as diferentes condições de degranulação de células LAD2 (IgE-dependente, IgE-independente e degranulação basal). Foram identificadas 159 proteínas com intensidade de sinal $> 1 \times 10^4$. Há 11 proteínas em comum entre todas as condições e 79 proteínas exclusivas encontradas na degranulação IgE-independente.

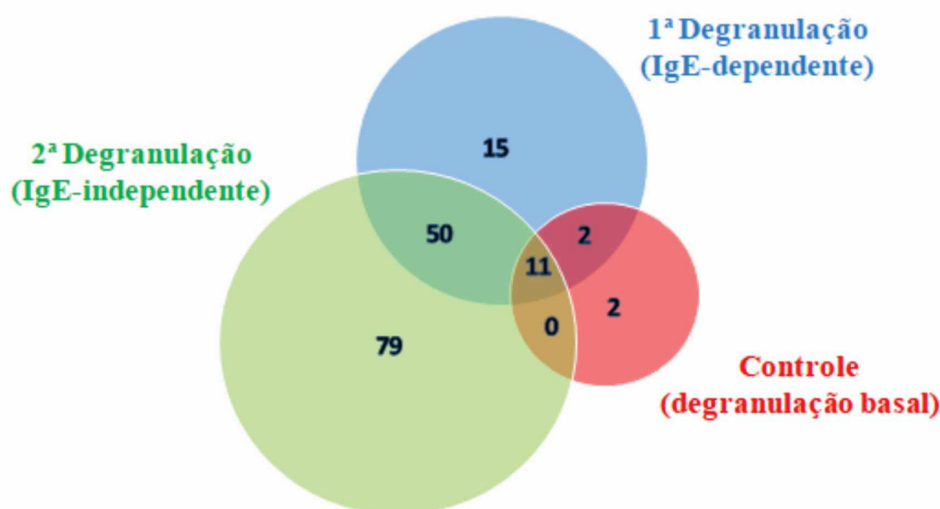


Figura 20. Categorização funcional das proteínas identificadas em cada tipo de degranulação. Foram analisadas as anotações para (A) Processo Celular, (B) Componente Celular e (C) Função Molecular de todas as 159 proteínas identificadas na espectrometria de massa.

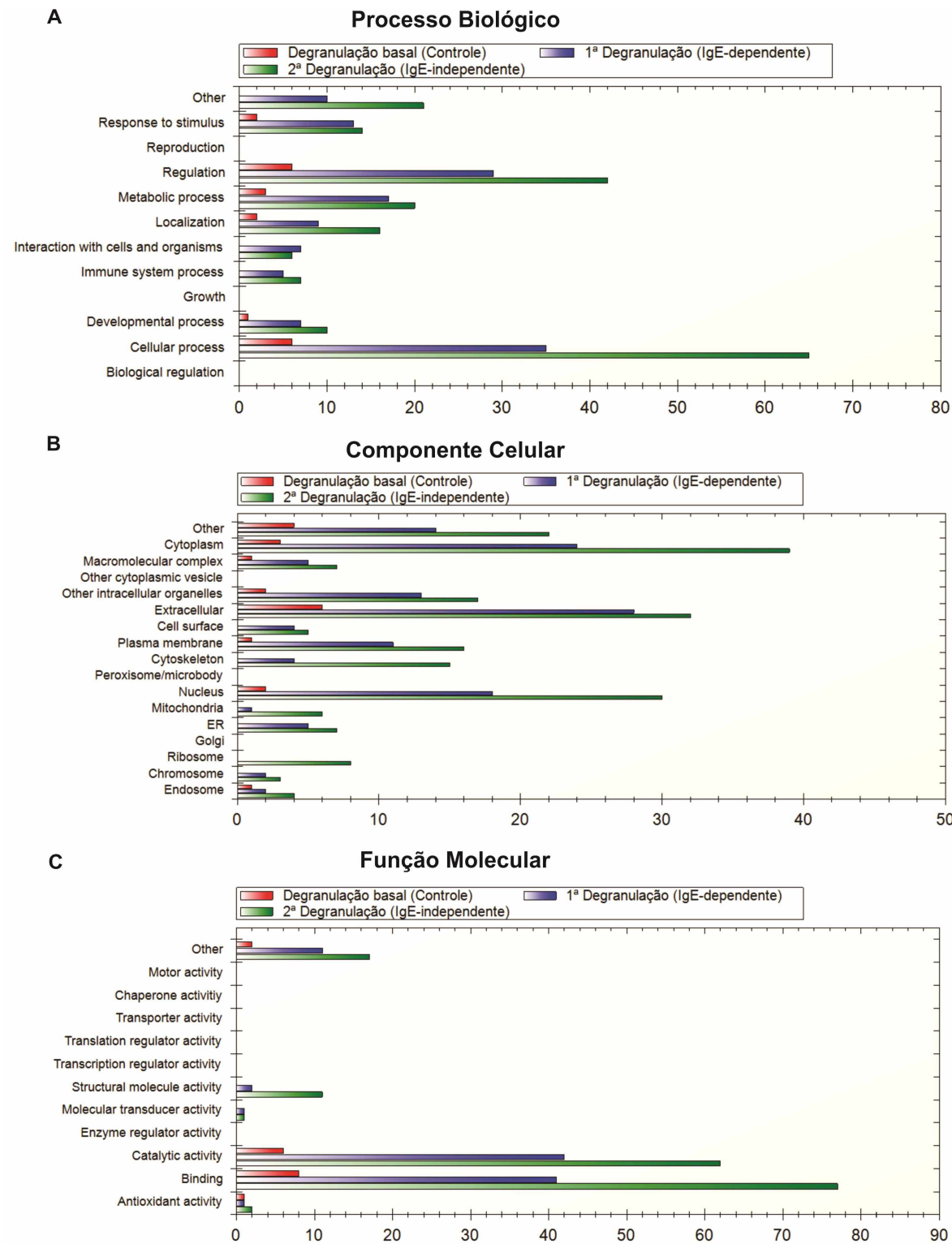


Figura 21. Análise do perfil proteômico entre as condições de degranulações. (A) Comparação entre a intensidade de sinal das 11 proteínas da inteseccção entre as 3 condições de degranulação (Controle, IgE-dependente e IgE-independente). (B) Comparação entre a intensidade de sinal das 50 proteínas da intersecção entre degranulação IgE-dependente e IgE-independente. A expressão das proteínas pode ser observada de acordo com a cor apresentada (verde: menor expressão; vermelho: maior expressão).

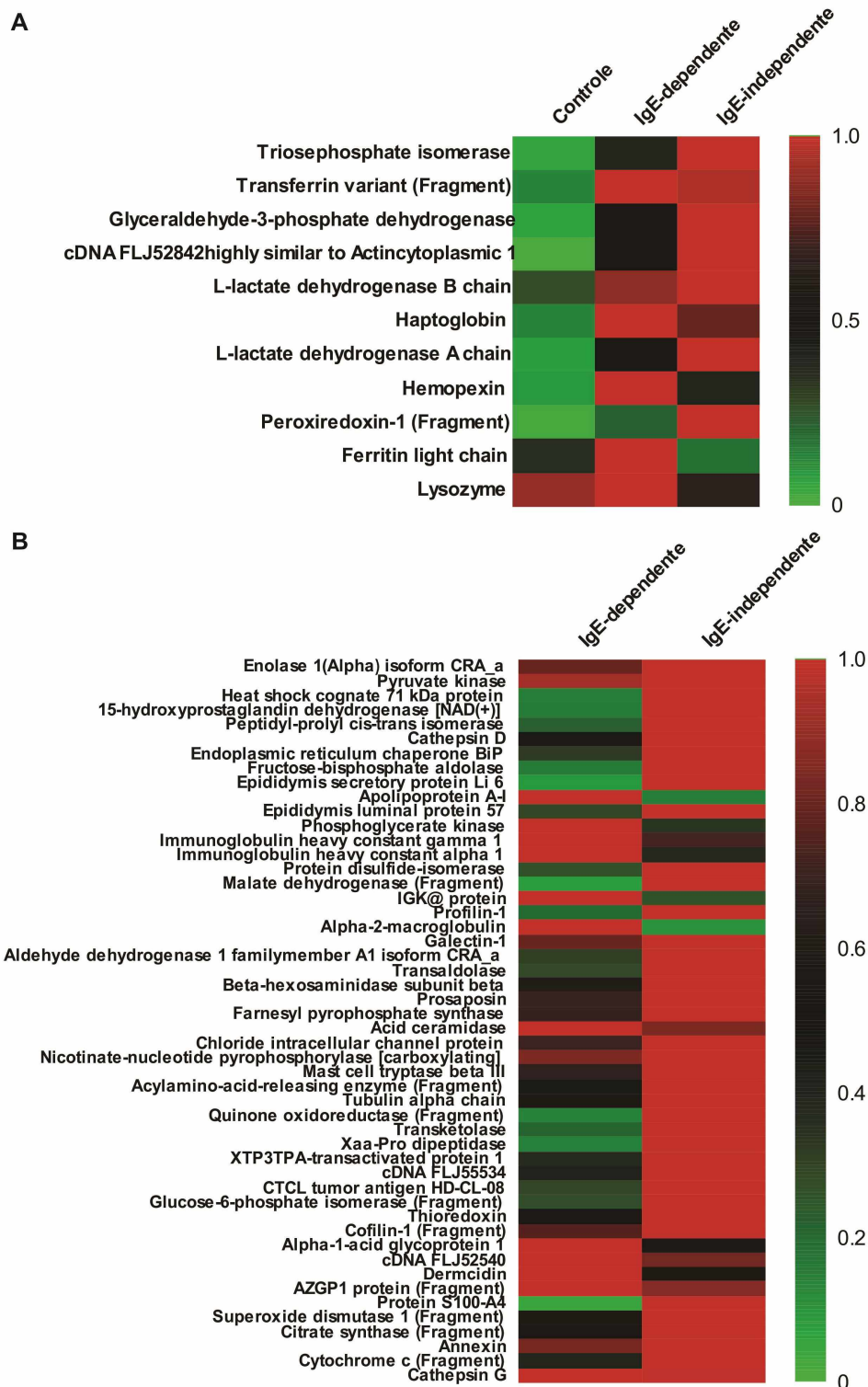


Tabela 6. Proteínas identificadas somente na degranulação IgE-independente.

Acesso	Descrição	Intensidade do Sinal
O60760 HPGDS_HUMAN	Hematopoietic prostaglandin D synthase	3,08E+06
tr A3R0T7 A3R0T7_HUMAN	Liver histone H1e	1,72E+06
tr B4DTT0 B4DTT0_HUMAN	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	1,10E+06
P16401 H15_HUMAN	Histone H1.5	9,98E+05
P63104 1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta	9,68E+05
tr A0A0S2Z3G9 A0A0S2Z3G9_HUMAN	Actinin alpha 4 isoform 1 (Fragment)	9,04E+05
tr B3KTA3 B3KTA3_HUMAN	Fascin	6,76E+05
tr K7EM49 K7EM49_HUMAN	6-phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating (Fragment)	6,41E+05
tr H7C0X8 H7C0X8_HUMAN	Macrophage-capping protein (Fragment)	6,38E+05
tr A0A0S2Z377 A0A0S2Z377_HUMAN	Annexin (Fragment)	5,84E+05
tr A0A087WTS8 A0A087WTS8_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 4	5,39E+05
tr D3DTE6 D3DTE6_HUMAN	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	5,33E+05
tr Q53G71 Q53G71_HUMAN	Calreticulin variant (Fragment)	4,98E+05
P62258 1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	4,85E+05
tr B4DL49 B4DL49_HUMAN	cDNA FLJ58073 moderately similar to Cathepsin B (EC 3.4.22.1)	4,64E+05
tr B4DLL8 B4DLL8_HUMAN	cDNA FLJ59335 highly similar to Transmembrane glycoprotein NMB	4,26E+05
tr B7Z4B2 B7Z4B2_HUMAN	Aminopeptidase	4,18E+05
tr K7EN27 K7EN27_HUMAN	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1 (Fragment)	4,12E+05
tr B4E0K9 B4E0K9_HUMAN	Alpha-mannosidase	3,80E+05
tr B4E1G2 B4E1G2_HUMAN	Serine hydroxymethyltransferase	3,58E+05
tr Q59GX5 Q59GX5_HUMAN	L-plastin variant (Fragment)	3,51E+05
tr A2A2D0 A2A2D0_HUMAN	Stathmin (Fragment)	3,35E+05
P01859 IGHG2_HUMAN	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	3,34E+05
tr F5H0C8 F5H0C8_HUMAN	Gamma-enolase	3,12E+05
tr C9JRL4 C9JRL4_HUMAN	Malate dehydrogenase cytoplasmic (Fragment)	3,03E+05
tr Q6IPH7 Q6IPH7_HUMAN	RPL14 protein	3,00E+05
tr V9HWC6 V9HWC6_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2,89E+05
tr C9J4N6 C9J4N6_HUMAN	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic (Fragment)	2,78E+05

Continuação da Tabela 6.

tr B4DS71 B4DS71_HUMAN	cDNA FLJ57081 moderately similar to WD repeat protein 1	2,72E+05
tr Q1RMG2 Q1RMG2_HUMAN	Adenosylhomocysteinase	2,63E+05
tr J3KRE2 J3KRE2_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	2,38E+05
P00390 GSHR_HUMAN	Glutathione reductase mitochondrial	2,22E+05
P58546 MTPN_HUMAN	Myotrophin	2,08E+05
tr B4DW08 B4DW08_HUMAN	cDNA FLJ50886 highly similar to Aconitate hydratase mitochondrial	1,91E+05
tr E9PMA9 E9PMA9_HUMAN	Ribonuclease inhibitor	1,75E+05
tr U3KQT1 U3KQT1_HUMAN	S-formylglutathione hydrolase (Fragment)	1,74E+05
tr V9HWH6 V9HWH6_HUMAN	Purine nucleoside phosphorylase	1,73E+05
tr Q3KPI8 Q3KPI8_HUMAN	ANP32A protein	1,70E+05
tr G3V2V8 G3V2V8_HUMAN	Epididymal secretory protein E1 (Fragment)	1,61E+05
tr Q6B823 Q6B823_HUMAN	Histone H4 (Fragment)	1,53E+05
tr Q6LET0 Q6LET0_HUMAN	Tetraspanin (Fragment)	1,43E+05
tr R4GN08 R4GN08_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 (Fragment)	1,39E+05
tr F2Z2Q9 F2Z2Q9_HUMAN	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	1,28E+05
tr A0A024R1Y2 A0A024R1Y2_HUMAN	ATP-citrate synthase	1,24E+05
P61956 SUMO2_HUMAN	Small ubiquitin-related modifier 2	1,22E+05
tr E9PJD9 E9PJD9_HUMAN	60S ribosomal protein L27a	1,21E+05
tr Q5T3N1 Q5T3N1_HUMAN	Annexin (Fragment)	1,21E+05
tr B7Z1V7 B7Z1V7_HUMAN	cDNA FLJ51811 highly similar to Stress-70 protein mitochondrial	1,20E+05
tr B3KUZ8 B3KUZ8_HUMAN	Aspartate aminotransferase	1,18E+05
P62857 RS28_HUMAN	40S ribosomal protein S28	1,17E+05
tr Q86Z22 Q86Z22_HUMAN	Epididymis secretory protein Li 297	1,16E+05
tr E9PQ63 E9PQ63_HUMAN	Carbonyl reductase [NADPH] 1	1,13E+05
Q14019 COTL1_HUMAN	Coactosin-like protein	1,11E+05

Continuação da Tabela 6.

tr E9PG15 E9PG15_HUMAN	14-3-3 protein theta (Fragment)	1,11E+05
P15018 LIF_HUMAN	Leukemia inhibitory factor	1,10E+05
tr Q8TB95 Q8TB95_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor (Fragment)	1,09E+05
O15511 ARPC5_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	1,07E+05
tr Q13584 Q13584_HUMAN	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	1,05E+05
tr A8MUD9 A8MUD9_HUMAN	60S ribosomal protein L7	1,05E+05
Q07021 C1QBP_HUMAN	Compl. component 1 Q subcomponent-binding protein mitochondrial	1,01E+05
tr H0YAB0 H0YAB0_HUMAN	Prelamin-A/C (Fragment)	1,01E+05
tr H0YAG8 H0YAG8_HUMAN	Alcohol dehydrogenase class-3 (Fragment)	1,01E+05
tr H0Y875 H0Y875_HUMAN	Calumenin (Fragment)	9,57E+04
tr Q7L4N0 Q7L4N0_HUMAN	CAPZB protein (Fragment)	9,27E+04
tr H7C1A7 H7C1A7_HUMAN	N-acylglucosamine 2-epimerase (Fragment)	8,77E+04
tr Q5T8U2 Q5T8U2_HUMAN	60S ribosomal protein L7a	8,58E+04
tr B3KMOV2 B3KMOV2_HUMAN	Glucosamine-6-phosphate isomerase	8,41E+04
tr A0A087WVQ6 A0A087WVQ6_HUMAN	Clathrin heavy chain	8,34E+04
P62851 RS25_HUMAN	40S ribosomal protein S25	8,16E+04
tr G3V1Y7 G3V1Y7_HUMAN	Myosin light polypeptide 6	8,15E+04
tr B7Z1L5 B7Z1L5_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase	7,77E+04
tr E9PQ96 E9PQ96_HUMAN	40S ribosomal protein S3	6,94E+04
tr D3DS95 D3DS95_HUMAN	HCG21173 isoform CRA_a	6,90E+04
tr H0YDD8 H0YDD8_HUMAN	60S acidic ribosomal protein P2 (Fragment)	5,99E+04
tr Q96IR1 Q96IR1_HUMAN	RPS4X protein (Fragment)	5,92E+04
tr B4DMC6 B4DMC6_HUMAN	cDNA FLJ60696 highly similar to Elongation factor 2	5,76E+04
tr Q2VPJ6 Q2VPJ6_HUMAN	HSP90AA1 protein (Fragment)	5,52E+04
tr Q6PJT4 Q6PJT4_HUMAN	MSN protein (Fragment)	5,39E+04
tr B4E1T6 B4E1T6_HUMAN	cDNA FLJ54342 highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1	4,79E+04

4.11 Análise de dados *in Silico*

A identificação de possíveis proteínas com homologia ao peptídeo E5 foi realizada pelo BLASTp, com o banco de dados de sequências de proteínas Swissprot restrito a Homo sapiens (taxid:9606). Todas as proteínas obtidas no blastp foram avaliadas, entretanto, apenas os principais resultados encontrados para 8 proteínas estão sendo apresentados na Tabela 7, bem como a análise feita do alinhamento pelo Clustal W. Foi observado que a sequência do peptídeo E5 alinha principalmente com receptores acoplados a proteína G importantes em processos inflamatórios/alergias como *G-protein coupled receptor 1*, *B1 bradykinin receptor (BDKRB1)*, *Leucontriene B4 receptor 2*, *ProstaglandinD2 receptor 2*, *C-XC chemokine receptor type 5*, *C5a anaphylatoxin chemotactic receptor 2*, *C3a anaphylatoxin chemotactic receptor* e receptor de neuropeptídeo, *Neuropeptide S receptor*, que também é importante em processos alérgicos.

Tabela 7. Alinhamento da sequência do peptídeo E5 (YPLHNWWSPYHF) com proteínas, mostrando as similaridades encontradas com as proteínas anotadas no banco de dados do GeneBank pelo BLAST, com a função, os números de acesso no Swissprot e valores do escore e da identidade.

Proteína	Função	SwissProt	Alinhamento	E-Value	Identidade %
B1 bradykinin receptor (BDKRB1)	Sua ativação leva a um aumento na concentração do íon Ca^{2+} citosólico, resultando em respostas inflamatórias crônicas e agudas na alergia.	P46663	Query 7 WSPYHF 12 W PYHF Sbjct 263 WAPYHF 268	0,9	83,33%
C-X-C chemokine receptor type 5	Facilita o posicionamento de linfócitos em folículos linfóides para criar centros germinativos (GCs).	P32302	Query 7 WSPYH 11 WSPYH Sbjct 272 WSPYH 276	2.6	100%
G-protein coupled receptor 1	Receptor quimiotático de leucócitos associado à regulação da inflamação.	P46091	Query 7 WSPYH 11 W PYH Sbjct 259 WTPYH 263	22	80%
Leukotriene B4 receptor 2	Receptor que medeia a síntese de citocinas Th2 nos mastócitos, como a interleucina IL-13, durante a inflamação alérgica.	Q9NPC1	Query 7 WSPYH 11 W PYH Sbjct 237 WAPYH 241	22	80%
C5a anaphylatoxin chemotactic receptor 2	Receptores de mediadores pró-inflamatórios na asma alérgica que recrutam células inflamatórias, induzem edema e causam broncoconstrição.	Q9P296	Query 7 WSPYH 11 W PYH Sbjct 246 WAPYH 250	22	80%
C3a anaphylatoxin chemotactic receptor		Q16581	Query 7 WSPYH 11 W PYH Sbjct 390 WTPYH 394	22	80%
Prostaglandin D2 receptor 2	Receptor expresso, principalmente, pelas células-chave envolvidas nas respostas imunes tipo 2 e é associado a respostas fisiológicas e patológicas, particularmente aquelas associadas à alergia e inflamação.	Q9Y5Y4	Query 7 WSPYH 11 W PYH Sbjct 259 WGPYH 263	44	80%
Neuropeptide S receptor	Promove a mobilização de depósitos intracelulares de Ca^{2+} na asma e está envolvido na patogênese da asma e outras doenças mediadas por IgE.	Q6W5P4	Query 7 WSPY 10 WSPY Sbjct 287 WSPY 290	63	100%

5 DISCUSSÃO

5.1 Seleção e abordagem do diagnóstico da Esofagite Eosinofílica

Atualmente o padrão de cuidados para diagnosticar a EEO e monitorar a resposta à terapia requer endoscopias múltiplas, e por isso há uma necessidade urgente de um biomarcador menos invasivo da atividade da doença. A mensuração de biomarcadores no sangue periférico tem sido usada para a detecção de esofagite eosinofílica, mas não tem sido útil até agora. Dentre esses biomarcadores como, por exemplo, a IgE total, proteína catiônica eosinofílica (PCE), neurotoxina derivada de eosinófilos, triptase, numerosas citocinas e uma fração do óxido nítrico exalado têm sido estudados (DELLON et al., 2012; DELLON et al., 2014, SCHLAG et al., 2015). Apenas os eosinófilos do sangue periférico mostram ter uma correlação significativa com o grau de eosinofilia esofágica e sua diminuição, após tratamento com corticosteróides ou IBP (inibidor de bomba de prótons), embora sua acurácia para o diagnóstico e sua avaliação da atividade da doença sejam sub-ótimos (LUCENDO et al., 2017).

Os eosinófilos contêm grânulos citoplasmáticos únicos que degranulam após estímulos e liberam mediadores tóxicos, que podem causar dano tecidual e inflamação (ROTHENBERG et al., 2009). Estudos demonstraram que a presença desses produtos de degranulação no tecido esofágico pode ser utilizada como auxílio diagnóstico para ajudar a distinguir os pacientes com EEO (KEPHART et al., 2010; MUELLER et al., 2008). Na maioria desses métodos, os anticorpos têm sido usados para a detecção de PCE ou outros biomarcadores de eosinófilos. Neste estudo, selecionamos por *phage display* peptídeos com 12 aminoácidos que se ligam a PCE em muco esofágico e que têm um potencial de utilidade clínica na avaliação de pacientes EEO. O desempenho clínico do ensaio de *phage*-ELISA foi validado usando um grande número de amostras de muco esofágico de pacientes. Ao longo dos ciclos da seleção do *phage display*, observamos um enriquecimento gradual dos títulos de fago e escolhemos um peptídeo candidato (E5) com afinidade em faixas nanomolares e ligação específica à PCE.

Ao longo do desenvolvimento de ensaios de *phage*-ELISA baseados na ligação do peptídeo com a PCE, demonstramos que o peptídeo pode eficientemente detectar PCE no muco esofágico a uma concentração de menos de 25 pg/ μ L. Esses resultados sugerem que a sensibilidade de 84,62% e a especificidade de 82,72% do ensaio baseado no peptídeo E5 pode ser uma ferramenta útil para o diagnóstico da EEO, uma vez que apenas os achados endoscópicos isolados não estabelecem de forma confiável o diagnóstico da EEO (KIM et al, 2012; VAN RHIJN et al, 2016) e também esses peptídeos selecionados podem ser usados como uma alternativa ao anticorpo para a detecção de PCE. Pacientes com $IR \geq 1$ tiveram associação significativa com distúrbios atópicos, já que 64% dos 25 pacientes com $IR \geq 1$ apresentaram alguma alergia. Dentre os distúrbios atópicos analisados, a rinite alérgica foi encontrada em 40% dos pacientes $IR \geq 1$, e este pode ser o principal parâmetro de confusão para o diagnóstico de EEO em pacientes não-EEO. Isso é digno de nota, uma vez que a PCE pode estar elevada em outras doenças atópicas, como asma ou rinite alérgica (MONERET-VAUTRIN et al., 2006). Sabe-se que a rinite alérgica é, significativamente, mais comum entre os pacientes com EEO em comparação aos controles, mas ainda não é comprovado que atopia predisponha a EEO (GONZÁLEZ-CERVERA et al., 2017). Observamos que 50% dos pacientes do grupo EEO apresentaram alergia alimentar, já que a EEO é uma forma de alergia alimentar distinta, mediada por IgE e comum em pacientes com EEO (LUCENDO et al., 2014).

A contagem do pico de eosinófilos (PEC) de 15 ou mais eosinófilos intra-epiteliais em pelo menos 1 CGA de biópsia esofágica permanece o limiar de consenso para o diagnóstico histológico da doença ativa. No entanto, características patológicas que não são a inflamação eosinofílica estão associadas à EEO ativa. Recentemente, um estudo descreveu um sistema de pontuação histológica EEO (EoEHSS), que fornece um método padronizado para avaliar, objetivamente, a gravidade e extensão de múltiplas características patológicas da EEO dentro de biópsias esofágicas. A pontuação composta pelo sistema EoEHSS superou a PEC na diferenciação de pacientes com EEO tratada e não tratada (COLLINS et al., 2017). No nosso estudo, os pacientes não-EEO com $IR > 1$, considerados falso-positivos pela histopatologia, possuem elementos do sistema EoEHSS, como por exemplo, espaços intercelulares

dilatados (EID) e hiperplasia da membrana basal (HMB), que são elementos histológicos que são associados a EEO ativa, e isso demonstra que, possivelmente, identificamos pacientes EEO nos grupos de pacientes controle e doença do refluxo que o diagnóstico padrão não tenha identificado pela contagem de eosinófilos na biópsia e, deste modo, a sensibilidade e especificidade do ensaio de *phage*-ELISA pode ser ainda maior. Nesse contexto, vale ressaltar que a dilatação dos espaços intercelulares pode ser um evento incitante que permite a penetração do antígeno na barreira epitelial para apresentação a células dendríticas esofágicas (VAN RHIJN et al., 2015). Além disso, a maioria dos pacientes não-EEO possuem aspectos endoscópicos, desordens atópicas e disfagia que são características da EEO (LUCENDO et al. 2017).

Com relação aos dois pacientes EEO $R \leq 1$, possivelmente durante o procedimento da coleta do muco esofágico não foi obtida uma quantidade suficiente para a identificação da PCE no ensaio de *phage*-ELISA. Embora um desses pacientes possua aspectos endoscópicos normais e não possua disfagia, que são características da EEO, ele possui alergias associadas, contagem de eosinófilos e espaços intercelulares dilatados (EID) na histopatologia, que são importantes na identificação da EEO segundo o último consenso (LUCENDO et al. 2017).

Após análise da relação entre os níveis de PCE no muco esofágico e eosinofilia no tecido esofágico em todos os grupos, encontramos uma correlação positiva entre esses parâmetros, o que corrobora com vários estudos com pacientes pediátricos (CHENG et al., 2012; KONIKOFF et al., 2006) e em adultos (PARFITT et al., 2006) que notaram que os indivíduos EEO apresentam níveis séricos ou plasmáticos elevados de PCE (MIN SB et al., 2017).

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que examina o muco esofágico como um substituto da eosinofilia esofágica usando um diagnóstico baseado na ligação do peptídeo na PCE, selecionado por *phage display*. Até agora, estudos publicados em referência ao uso de PCE como biomarcador para monitorar pacientes, em tratamento com dietas, mostram reduções consistentes, mas insignificantes nos níveis de PCE após a restrição dietética, e outros estudos mostraram reduções significativas na resposta ao

tratamento farmacológico com corticosteróides ou IBPs (MUELLER et al., 2008; MIN SB et al., 2017). Nesse sentido, o uso do peptídeo ligante a PCE, além de ser utilizado para o diagnóstico, pode ser um bom marcador de inflamação ou monitoramento de pacientes em tratamento.

5.2 Abordagem terapêutica

Diante da perspectiva diagnóstica e sabendo que o peptídeo selecionado é ligante da proteína catiônica eosinofílica (PCE), que é uma proteína de eosinófilo capaz de induzir a degranulação de mastócito independente de IgE (GALDIERO et al. 2017; SUBRAMANIAN et al., 2016), nesse estudo não foi possível verificar a degranulação de células LAD2 quando estimuladas por PCE, o que infere que as células LAD2, especificamente, não respondem a este estímulo ou que a PCE nativa utilizada, obtida de eosinófilos de pacientes saudáveis, seja uma forma menos ativa da proteína e não consiga estimular as células LAD2. Deste modo, a nossa proposta foi realizar um ensaio de degranulação de mastócitos utilizando um *pool* de proteínas provindas de mastócitos degranulados via IgE para verificar se este peptídeo poderia diminuir a resposta de degranulação quando utilizadas essas proteínas. E, por sua vez, ser usado como uma possível ferramenta terapêutica na exacerbação de alergias, visto que foi observado um aumento significativo de proteínas degranuladas/secretadas por mastócitos estimulados pela via independente de IgE.

Os dados da proteômica demonstraram um aumento significativo de proteínas degranuladas pela via independente de IgE, sendo 79 proteínas exclusivas degranuladas nesta condição. Estas proteínas possuem função molecular de ligação e atividade catalítica, evidenciando um papel de exacerbação da resposta mastocitária em alergias. Algumas dessas proteínas exclusivas já estão descritas na literatura tendo papéis relevantes em alergias, como, por exemplo, a proteína mais abundante encontrada na degranulação independente de IgE, *Hematopoietic prostaglandin D synthase (hPGDS)*, que é uma enzima bifuncional que catalisa a conversão de PGH₂ em PGD₂, uma prostaglandina envolvida na contração/relaxamento da musculatura lisa e um potente inibidor da agregação plaquetária (XUE et al., 2014). A PGD₂

produzida principalmente por mastócitos é um potente mediador para promover a inflamação alérgica das vias aéreas (WEN et al., 2016). Existem estudos que sugerem que o eixo TSLP/CRTH2/hPGDS/PGD2 pode potencializar uma interação colaborativa entre células do perfil TH2 para amplificar a inflamação eosinofílica, resultando no desenvolvimento de desordens gastrointestinais eosinofílicas (ROTHENBERG et al., 2010; WANG et al. 2006). As *Histone H1* e *Histone H4*, que são proteínas nucleares encontradas em abundância na degranulação independente de IgE, em alguns estudos é sugerido que tenham um papel de mediador endógeno do tipo alarmina atuante nos mastócitos, e que seu bloqueio tenha um potencial terapêutico para a hiperreatividade do tipo 1 mediada por mastócitos (WESTMAN et al., 2015; NAKANO et al., 2016). Outra proteína abundante encontrada foi a *Fascin*, que é uma proteína agregadora de F-actina que estabiliza os filopódios e regula a dinâmica de adesão nas células em migração (JAYO et al., 2016). A *Annexin A6*, por sua vez, regula a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares e regula também a sinalização e proliferação em células T (CORNELLY et al., 2016). Com relação a Stathmin, um estudo identificou e forneceu evidências da indução da expressão gênica de Stathmin 1 (STMN1) em resposta à ativação de IgE mais Ag (SADRODDINY et al., 2011).

A utilização do peptídeo E5 conseguiu diminuir a degranulação independente de IgE de mastócitos humanos (LAD2) quando foi utilizado o *pool* de proteínas degranuladas via IgE. Esse tipo de estimulação IgE-independente é causada por compostos polibásicos (LAGUNOFF et al. 1983) que compartilham características estruturais similares essenciais para sua atividade. Estes incluem cargas positivas associadas com uma estrutura hidrofóbica tal como o terminal carboxilo da substância P ou o anel aromático do composto 48/80 (ARIDOR et al. 1990). Os compostos polibásicos parecem liberar histamina por um mecanismo comum (SAGI-EISENBERG et al. 1985). Eles ativam diretamente uma proteína G sensível à toxina pertússis que é acoplada à ativação de PLC (Gsp) e outra Proteína G sensível à toxina pertússis acoplada a exocitose ($\text{Gi}3\alpha$), que é independente do PLC (ARIDOR et al., 1993; GALDIERO et al.; 2017; SUBRAMANIAN et al., 2016).

Os dados de bioinformática do alinhamento do peptídeo E5 com proteínas do banco de dados demonstraram associações interessantes do

peptídeo E5 com proteínas importantes em alergias que, por sua vez, pode estar mimetizando receptores importantes para via da degranulação IgE-independente e dessa forma, impedindo que ocorra a degranulação de mastócitos por essa via. Como, por exemplo, a *B1 bradykinin receptor (BDKRB1)* que já foi descrita como um receptor acoplado a proteína G expresso nas vias aéreas em várias células residenciais e/ou imunes, geralmente associado ao recrutamento de eosinófilos e neutrófilos, como IL-4, IL-13, TNF- α , IL-6 e IL-8, via MAPK intracelular e sinalização de NF- κ B que está implicado no desenvolvimento de inflamação crônica das vias aéreas, responsividade e remodelação (uma característica importante da asma grave) (RICCIARDOLO et al., 2018), o *Neuropeptide S receptor*, outra proteína alinhada com o peptídeo, já foi descrito como um receptor acoplado a proteína G para o neuropeptídeo S (NPS) que promove a mobilização de depósitos intracelulares de Ca^{2+} na asma (BERNIER et al., 2006) e está envolvido na patogênese da asma e outras doenças mediadas por IgE (VENDELIN et al. 2005; XU et al., 2004). O *C-X-C chemokine receptor type 5* e seu ligante CXCL 13 já foi descrito que facilita o posicionamento de linfócitos em folículos linfóides para criar centros germinativos (GCs). Nessas estruturas, as células B, com o auxílio de células T auxiliares foliculares (TFH), proliferam e sofrem recombinação e hipermutação somática de troca de classe para secretar anticorpos de alta afinidade (ALLEN et al., 2004; ALLEN et al., 2007). A *G-protein coupled receptor 1* é descrito como um receptor quimiotático de leucócitos associado à inflamação/RARRES2, sugerindo um papel para este receptor na regulação da inflamação (BARNEA et al., 2008). A estimulação de receptores acoplados a proteína G leva ao acúmulo de Ca^{2+} citosólico a partir dos reservatórios intracelulares, o que, por sua vez, facilita a contração do músculo liso das vias aéreas (DRUEY, 2009).

O *Leukotriene B4 receptor 2 (BLT2)*, outra proteína alinhada com o peptídeo, medeia a síntese do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e citocinas Th2, como a interleucina IL-13, nos mastócitos durante a inflamação alérgica (KWON e KIM, 2019). A *C3a anaphylatoxin chemotactic receptor* e *C5a anaphylatoxin chemotactic receptor 2* são receptores de mediadores pró-inflamatórios da asma alérgica que recrutam células inflamatórias, induzem edema e causam broncoconstrição (LAMBRECHT, 2006; KÖHL et al., 2006). A

Prostaglandin D2 receptor 2 (DP2) é expresso, principalmente, pelas células-chave envolvidas nas respostas imunes tipo 2, incluindo células TH2, células linfóides inatas tipo 2 e eosinófilos. A via do receptor DP2 é um alvo terapêutico novo e importante para a asma, porque o aumento da produção de PGD2 induz quimiotaxia e degranulação de células inflamatórias significativas através da sua interação com o receptor DP2 (DOMINGO et al., 2018).

A utilização de peptídeos com potencial diagnóstico e/ou terapêutico é uma forma mais barata e com alta qualidade, além de serem facilmente controlados quimicamente para o uso no teste de ELISA e outras reações sorológicas. Os resultados promissores encontrados com o peptídeo E5 reforçam a hipótese de que a utilização do peptídeo possa diminuir a degranulação de mastócitos pela via independente de IgE na exacerbação da alergia. É importante, portanto, que esse peptídeo seja utilizado em outros testes confirmatórios como, por exemplo, testes *in vivo*.

É possível observar com este estudo que a caracterização e validação de peptídeo, que mimetiza receptores importantes na via de degranulação de mastócitos, podem fornecer informações importantes para um melhor entendimento da alergia, bem como estudos dos alvos biológicos, que foram encontrados nos diferentes tipos de degranulações de mastócitos humanos LAD2, podem servir como estratégias diagnósticas e/ou terapêuticas no futuro.

6 CONCLUSÕES

- Este é o primeiro estudo que selecionou e identificou peptídeos pela metodologia de *phage display* capazes de detectar a presença de PCE em muco de pacientes com EEO com alta sensibilidade e especificidade. Nesse contexto, o muco esofágico é uma amostra mais fácil de obter do que a forma atual de diagnóstico que é realizado por procedimentos de endoscopia digestiva alta seguida da avaliação histopatológica das biópsias esofágicas.
- O peptídeo E5 ligante a PCE pode ser uma alternativa, custo-efetiva ao invés de anticorpos e uma ferramenta diagnóstica útil para auxiliar na detecção da esofagite eosinofílica no muco esofágico.
- A diminuição da degranulação de mastócitos via independente de IgE com a utilização do peptídeo E5 e o alinhamento do peptídeo E5 com proteínas importantes de granulócitos, principalmente de mastócitos, reforçam o potencial terapêutico desse peptídeo, que parece mimetizar receptores importantes da degranulação de mastócitos via IgE-independente.
- Foram identificadas 79 proteínas exclusivas na condição de degranulação independente de IgE, que fornecem informações importantes para um melhor entendimento da alergia, bem como o estudo de alvos biológicos que sirvam como estratégias diagnósticas e/ou terapêuticas.

Referências Bibliográficas

ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILLAI, SHIV. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. ISBN: 97885352816449

ACEVES, S. S. Remodeling and Fibrosis in Chronic Eosinophil Inflammation. **Dig Dis**, v. 32, p. 15-21, 2014. <https://doi.org/10.1159/000357004>

ACEVES, S. S.; et al. A symptom scoring tool for identifying pediatric patients with eosinophilic esophagitis and correlating symptom with inflammation. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 103, p. 401-406, 2009. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60359-6](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60359-6)

ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil granule proteins: form and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17406-15, 2014. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.546218>

AHLSTROM-EMANUELSSON, C. A. et al. Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before and during seasonal allergen exposure. **European Respiratory Society**, v. 24, n. 5, p. 750-7, 2004. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00133603>

AHMED, A.; MATSUI, S.; SOETIKNO, R. A novel endoscopic appearance of idiopathic eosinophilic esophagitis. **Endoscopy**, Califórnia, v. 32, n. 6, p. 33, 2000. <https://doi.org/10.1055/s-2000-83>

ALLEN, C. D.; OKADA, T.; CYSTER, J. G. Germinal-center organization and cellular dynamics. **Immunity**, v. 27, n. 2, p. 190–202, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.009>

ALLEN, C.D.; ANSEL, K.M., LOW, C.; LESLEY, R.; TAMAMURA, H.; FUJII, N. et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. **Nat Immunol**, v. 5, p. 943, 2004. <https://doi.org/10.1159/000357012>

ARIAS, A. et al. Systematic review with meta-analysis: the incidence and prevalence of eosinophilic esophagitis in children and adults in population-

based studies. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 43, n. 1, p. 3-15, 2016. <https://doi.org/10.1111/apt.13441>

ARIDOR, M.; RAJMALEVICH, G.; BEAVEN, M.; SAGI-EISENBERG, R. Activation of exocytosis by the heterotrimeric G protein Gi3. **Science**. v. 262, p. 1569–1572, 1993. <https://doi.org/10.1126/science.7504324>

ARIDOR, M.; TRAUB, L. M.; SAGI-EISENBERG, R. Exocytosis in mast cells by secretagogues: Evidence for direct activation of GTP-binding protein. **J Cell Biol**. v. 111, p. 909–917, 1990. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.3.909>

ATWOOD, S. E.; et al. Esophageal eosinophilia with dysphagia. A distinct clinicopathologic syndrome. **Dig Dis Sci**, v. 38, p. 109-116, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF01296781>

BARNEA, G.; STRAPPS, W.; HERRADA, G. et al. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 105, n. 1, p. 64–69, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710487105>

BOECHAT, J. L.; et al. Eosinophilic esophagitis prevalence in adults with dysphagia or heartburn: preliminary results. **World Allergy Organization Journal**, v. 8, p. A251, 2015. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-8-S1-A251>

BREITENEDER, H., PETTENBURGER, K., BITO, A. et al. The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v I, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. **EMBO J**, v. 8, p. 1935-1938, 1989. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03597.x>

BYSTROM, J.; GARCIA, R. C.; HAKANSSON, L.; KARAWAJCZYK, M.; MOBERG, L.; SOUKKA, J.; VENGE, P. Eosinophil cationic protein is stored in, but not produced by, peripheral blood neutrophils. **Clin Exp Allergy**. V. 32, n. 7, p. 1082-1091, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2002.01408.x>

BYSTROM, J.; TENNO, T.; HAKANSSON, L.; AMIN, K.; TRULSON, A.; HOGBOM, E.; VENGE, P. Monocytes, but not macrophages, produce the

eosinophil cationic protein. **Apmis**. v. 109, n. 7-8, p. 507-516, 2001.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2001.907804.x>

CALDWELL, J. M.; et al. Glucocorticoid-regulated genes in eosinophilic esophagitis: a role for FKBP51. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, p. 879-888, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.038>

CARLSON, M.; OBERG, G.; PETERSON, C.; VENGE, P. Releasability of human hypereosinophilic eosinophils is related to the density of the cells. **Br J Haematol**. v. 86, n. 1, p. 41-47, 1994. <https://doi.10.1128/CVI.13.5.584-593.2006>

CARR, S.; WATSON, W. Eosinophilic esophagitis. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. e, p. 2-8, 2011. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-7-S1-S8>

CHEHADE, M.; et al. Esophageal subepithelial fibrosis in children with eosinophilic esophagitis. **J Pediatr Gastro Nutr**, v. 45, p. 319-328, 2007. <https://doi.10.1097/MPG.0b013e31806ab384>

CHENG, E. et al. Eosinophilic esophagitis: interactions with gastroesophageal reflux disease. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 43, n. 2, p. 243-56, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2014.02.004>

CHENG, E; SOUZA, R. F.; SPECHLER, S. J. Tissue remodeling in eosinophilic esophagitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 303, p. G1175-8, 2012. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00313.2012>

CIPRANDI, G., COMITE, P., FERRERO, F., BIGNARDI, D., MINALE, P., VOLTOLINE, S., TROISE, C., MUSSAP, M. Birch allergy and oral allergy syndrome: the practical relevance of serum IgE to Bet v 1. **Allergy Asthma Proc**, v.37, p. 43-9, 2016. <https://doi.org/10.2500/aap.2016.37.3914>

COLLINS, M. H. Histopathology of Eosinophilic. Esophagitis. **Dig Dis**, v. 32, p. 68-73, 2014. <https://doi.org/10.1159/000357012>

COLLINS, M. H.; MARTIN, L. J.; ALEXANDER, E. S. et al. Newly developed and validated eosinophilic esophagitis histology scoring system and evidence

that it outperforms peak eosinophil count for disease diagnosis and monitoring.

Dis Esophagus. v. 30, n. 3, p. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.1111/dote.12470>

CONRAD, U.; SCHELLER, J. Considerations on antibody-phage display methodology. *Comb Chem High Throughput Screen*. v. 8, p. 117-26, 2005.

<https://doi.org/10.2174/1386207053258532>

CORNELY, R.; POLLOCK, A. H. Annexin A6 regulates interleukin-2-mediated T-cell proliferation. **Immunol Cell Biol**. v. 94, n. 6, p. 543-53, 2016.

<https://doi.org/10.1038/icb.2016.15>

CROESE, J. et al. Clinical and endoscopic features of eosinophilic esophagitis in adults. **Gastrointest Endoscop**, Australia, v. 58, n. 4, p. 516-522, 2003.

[https://doi.org/10.1067/S0016-5107\(03\)01870-4](https://doi.org/10.1067/S0016-5107(03)01870-4)

DALBY, K.; et al. Eosinophilic Oesophagitis in Infants and Children in the Region of Southern Denmark: A Prospective Study of Prevalence and Clinical Presentation. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v. 51, p. 280-282, 2010.

<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d1b107>

DEBROSSE, C. W.; et al. Identification, epidemiology, and chronicity of pediatric esophageal eosinophilia. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, p. 112-119, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.05.027>

DELLON, E. S. et al. Variability in Diagnostic Criteria for Eosinophilic Esophagitis: a Systematic Review. **Am J Gastroenterol**, North Carolina, v. 102, n. 1, p. 14, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01396.x>

DELLON, E. S.; CHEN, X.; MILLER, C. R.; WOOSLEY, J. T.; SHAHEEN, N. J. Diagnostic utility of major basic protein, eotaxin-3, and leukotriene enzyme staining in eosinophilic esophagitis. **Am J Gastroenterol**, v. 107:1503–11. 2012.

<https://doi.org/10.1038/ajg.2012.202>

DELLON, E. S.; et al. Clinical, endoscopic, and histologic findings distinguish eosinophilic esophagitis from gastroesophageal reflux disease. **Clin**

Gastroenterol Hepatol, v. 7, p. 1305-1313, 2009.

<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.cgh.2009.08.030>

DELLON, E. S.; et al. Prevalence of Eosinophilic Esophagitis in the United States. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 79, n. 4, p. 577-585, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.09.008>

DELLON, E. S.; LIACOURAS, C. A. Advances in clinical management of eosinophilic esophagitis. **Gastroenterology**, v. 147, p. 1238-1254, 2014.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.055>

DELLON, E. S.; LIACOURAS, C. A.; MOLINA-INFANTE, J.; FURUTA, G. T.; SPERGEL, J. M.; ZEVIT, N.; et al. Updated International Consensus Diagnostic Criteria for Eosinophilic Esophagitis: **Proceedings of the AGREE Conference**. **Gastroenterology**, v.155, p.1022–1033.e10, 2018.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.009>

DELLON, E. S.; SPECK, O.; WOODWARD, K.; COVEY, S.; RUSIN, S.; GEBHART, J. H. et al. Markers of eosinophilic inflammation for diagnosis of eosinophilic esophagitis and proton pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia: a prospective study. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v.12, p.2015–22, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.06.019>

DENARDI, F. G.; RIDDELL, R. H. Esophagus. In: STACEY E. MILLS. **Histology for pathologists**. 4. ed. Estados Unidos: Lippincott, 2012. p. 565-588. ISBN: 9781469827582

DOMINGO, C.; PALOMARES, O.; SANDHAM, D. A.; ERPENBECK, V. J.; ALTMAN, P. The prostaglandin D2 receptor 2 pathway in asthma: a key player in airway inflammation. **Respir Res**. v. 29, n. 19(1), p. 189, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0893-x>.

DRUEY, K.M. Regulation of G-protein-coupled signaling pathways in allergic inflammation. **Immunol Res**. v. 43, n. 1-3, p. 62–76, 2009.

<https://dx.doi.org/10.1007%2Fs12026-008-8050-0>

ERIKSSON, J.; WOSCHNAGG, C.; FERNVIK, E.; VENGE, P. A SELDI-TOF MS study of the genetic and post-translational molecular heterogeneity of eosinophil cationic protein. **J Leukoc Biol.** v. 82, n. 6, p. 1491-1500, 2007.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0507272>

FIOCCA, R.; MASTRACCI, L.; MILIONE, M.; PARENTE, P.; SAVARINO, V. Microscopic esophagitis and Barrets's esophagus: The histology report. **Dig Liver Dis**, v. 43, p.319-330, 2011. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(11\)60588-4](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(11)60588-4)

FUKUNAGA, K.; TAKI, M. Practical tips for construction of custom Peptide libraries and affinity selection by using commercially available phage display cloning systems. **J Nucleic Acids**, v. 2012, p. 295719, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1155/2012/295719>

FULKERSON, P. C.; ROTHENBERG, M. E. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 2, p. 117-29, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrd3838>

FURUTA, G. T.; LIACOURAS, C. A.; COLLINS, M. H.; GUPTA, S. K.; JUSTINICH, C.; PUTNAM, P. E.; et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. **Gastroenterology**, v. 133, n. 4, p. 1342-1363, 2007.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.017>

GALDIERO, M. R.; VARRICCHI, G.; SEAF, M.; MARONE, G.; LEVI-SCHAFFER, F.; MARONE, G. Bidirectional Mast Cell-Eosinophil Interactions in Inflammatory Disorders and Cancer. **Front Med.** v. 24, n. 4, p. 103. 2017.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00103>

GALLI, S. J.; TSAI, M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. **European Journal of Immunology**, v.40, p.1843-1851, 2010.
<https://dx.doi.org/10.1002%2Feji.201040559>

GLEICH, G. J.; LOEGERING, D. A.; BELL, M. P.; CHECKEL, J. L.; ACKERMAN, S. J.; MCKEAN, D. J. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 83, n. 10, p. 3146-3150, 1986. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3146>

GONZÁLEZ-CERVERA, J.; ARIAS, Á., REDONDO-GONZÁLEZ, O.; CANO-MOLLINEDO, M. M.; TERREEHORST, I.; LUCENDO, A. J. Association between atopic manifestations and eosinophilic esophagitis: A systematic review and meta-analysis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.118, p.582–590.e2, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.02.006>

GRIN, A.; STREUTKER, C. J. Esophagitis. Old Histologic Concepts and New Thoughts. **Arch Pathol Lab Med**, v. 139, p. 723-729, 2015. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0132-RA>

HAWINKELS, L. J.; VAN ROSSENBERG, S. M.; DE JONGE-MULLER, E. S.; MOLENAAR, T. J.; APPELDOORN, C.C.; VAN BERKEL, T. J.; SIER, C. F.; BIESSEN, E. A. Efficient degradation-aided selection of protease inhibitors by phage display. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 364, p. 549-55, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.032>

HERTVELDT, K.; BELIEN, T.; VOLCKAERT, G. General M13 phage display: M13 phage display in identification and characterization of protein-protein interactions. **Methods Mol Biol**. v. 502, p. 321-39, 2009. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-565-1_19

HOGAN, S. P. et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 5, p. 709-50, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02958.x>

HOLGAT, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews: Immunology**, v.8, p.218-230, 2008. <https://doi.org/10.1038/nri2262>

HOOGENBOOM, H. R. Overview of antibody phage-display technology and its application. **Methods Mol Biol**. v. 178, p. 1-37, 2002. <https://doi.org/10.1385/1-59259-240-6.001>

HYDE-DERUYSCHER, R.; PAIGE, L. A.; CHRISTENSEN, D. J.; HYDE-DERUYSCHER, N.; LIM, A.; FREDERICKS, Z. L.; KRANZ, J.; GALLANT, P.; ZHANG, J.; ROCKLAGE, S. M.; FOWLKES, D. M.; WENDLER, P. A.; HAMILTON, P. T. Detection of small-molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries. **Chem Biol**. v. 7, p. 17-25, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00062-4)

JACOBSEN, E. A. et al. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. **Blood**, v. 120, n. 19, p. 3882-90, 2012. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-330845>

JAYO, A.; MALBOUBI, M.; ANTOKU, S. et al. Fascin Regulates Nuclear Movement and Deformation in Migrating Cells. **Dev Cell**. v. 38, n. 4, p. 371–383, 2016. <https://doi:10.1016/j.devcel.2016.07.021>

JIAO, D.; et al. Similarities and Differences Among Eosinophilic Esophagitis, Proton Pump Inhibitor-Responsive Esophageal Eosinophilia, and Reflux Esophagitis: Comparisons of Clinical, Endoscopic, and Histopathological Findings in Japanese Patients. **J. Gastroenterol**, v. 522, p. 203-210, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1213-1>

BYSTROME, J.; AMIN, K.; BISHOP-BAILEY, D. Analysing the eosinophil cationic protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte. **Respiratory Research**. v. 12, p. 10, 2011. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-10>

KEHOE, J. W.; KAY, B. K. Filamentous phage display in the new millennium. **Chem Ver**, v. 105, n. 11, p.4056-72, 2005. <http://dx.doi.org/10.1021/cr000261r>

KEPHART, G. M.; ALEXANDER, J. A.; ARORA, A. S.; ROMERO, Y.; SMYRK, T. C.; TALLEY, N. J. et al. Marked deposition of eosinophil-derived neurotoxin

in adult patients with eosinophilic esophagitis. **Am J Gastroenterol**, v.105, p.298–307, 2010. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.584>

KIA, L.; HIRANO, I. Distinguishing GERD from eosinophilic oesophagitis: concepts and controversies. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 7, p. 379-386, 2015. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fnr-gastro.2015.75>

KIM, H. P.; VANCE, R. B.; SHAHEEN, N. J.; DELLON, E. S. The prevalence and diagnostic utility of endoscopic features of eosinophilic esophagitis: a meta-analysis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v.10, p.988–96.e5, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.04.019>

KITA, H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. **Immunological Reviews**, v. 242, n. 1, p. 161-77, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01026.x>

KÖHL, J.; BAELDER, R.; LEWKOWICH, I. P. et al. A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma. **J Clin Invest**. v. 116, n. 3, p. 783–796, 2006. <https://doi:10.1172/JCI26582>

KONIKOFF, M. R.; BLANCHARD, C.; KIRBY, C.; BUCKMEIER, B. K.; COHEN, M. B.; HEUBI, J. E. et al. Potential of Blood Eosinophils, Eosinophil-Derived Neurotoxin, and Eotaxin-3 as Biomarkers of Eosinophilic Esophagitis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v.4, p.1328–36, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.08.013>

KUEHN, H. S.; RADINGER, M.; GILFILLAN, A. M. Measuring Mast Cell Mediator Release. **Curr Protoc Immunol**. v. 91, n. 7.38, p. 1-7, 2010. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0738s91>

KWON, S. Y.; KIM, J. H. Role of Leukotriene B4 Receptor-2 in Mast Cells in Allergic Airway Inflammation. **Int J Mol Sci**. v. 14, n. 20, p.12, pii: E2897, 2019. <https://doi: 10.3390/ijms20122897>

LACY, P.; MOQBEL, R. Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 1, n. 1, p. 79-84, 2001. <https://doi.org/10.1097/00130832-200102000-0001>

LAGUNOFF, D.; MARTIN, T. W.; READ, G. Agents that release histamine from mast cells. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v. 23, p. 331–351, 1983. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.23.040183.001555>

LAMBRECHT, B.N. An unexpected role for the anaphylatoxin C5a receptor in allergic sensitization. **J Clin Invest**. v. 116, n. 3, p. 628–632, 2006. <https://doi.org/10.1172/JCI27876>

LANDRES, R. T.; KUSTER, G. G. R.; STRUM, W. B. Eosinophilic esophagitis in a patient with vigorous achalasia. **Gastroenterology**, California, v. 74, n. 6, p. 1298- 1300, 1978. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(78\)90710-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(78)90710-2)

LEE, S. C.; IBDAH, R.; VAN VALKENBURGH, C.; ROWOLD, E.; ABEGG, A.; DONNELLY, A.; KLOVER, J.; MERLIN, S.; MCKEARN, J. P. Phage display mutagenesis of the chimeric dual cytokine receptor agonist myelopoietin. **Leukemia**, v. 15, p. 1277-85, 2001. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402163>

LIACOURAS, C. A. et al. Eosinophilic esophagitis: clinical presentation in children. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 43, n. 2, p. 219-29. Jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2014.02.012>

LIACOURAS, C. A.; FURUTA, G. T.; HIRANO, I.; ATKINS, D.; ATTWOOD, S. E.; BONIS, P. A. et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. **J Allergy Clin Immunol**, USA, v. 128, n. 1, p. 3-20, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.040>

LUCENDO, A. J.; ARIAS, A.; TENIAS, J. M. Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: a systematic review with meta-analysis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.113, p.624–9, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.08.004>

LUCENDO, A. J.; et al. Manometric findings in adult eosinophilic oesophagitis: a study of 12 cases. **Eu J Gastroenterol Hepatol**, v. 19, n. 5, p. 417-424, 2007.

<https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e328010bd69>

LUCENDO, A. J.; MOLINA-INFANTE, J.; ARIAS, Á.; VON ARNIM, U.; BREDENOORD, A. J.; BUSSMANN, C. et al. Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. **United Eur Gastroenterol J**, v.5, p.335–58, 2017. <https://dx.doi.org/10.1177%2F2050640616689525>

MAEDA, T.; MAHARA, K. et al. RNase 3 (ECP) is an extraordinarily stable protein among human pancreatic-type RNases. **J Biochem (Tokyo)**. v. 132, n. 5, p. 737-742, 2002. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003281>

MALM-ERJEFALT, M. et al. Circulating eosinophils in asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis lack morphological signs of degranulation. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 35, n. 10, p. 1334-40, 2005.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02335.x>

MASUDA, E. S.; SHIMITZ, J. Syk inhibitors as treatment for allergic rhinitis. **Pulmonary Pharmacology e Therapeutics**, v.21, p.461-467, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.06.002>

MAZZEO, C. et al. Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 6, p. 1603- 13, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.026>

MCCONNELL, S. J.; DINH, T.; LE, M. H.; BROWN, S. J.; BECHERER, K.; BLUMEYER, K.; KAUTZER, C.; AXELROD, F.; SPINELLA, D. G. Isolation of erythropoietin receptor agonist peptides using evolved phage libraries. **Biol Chem**. v. 379, p. 1279-86, 1998.

<https://doi.org/10.1515/bchm.1998.379.10.1279>

MIN, S. B.; NYLUND, C. M.; BAKER, T. P.; ALLY, M.; REINHARDT, B.; CHEN, Y-J. et al. Longitudinal Evaluation of Noninvasive Biomarkers for Eosinophilic

Esophagitis. **J Clin Gastroenterol**, v.51, p.127–35, 2017.

<https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000621>

MOAWAD, F. J.; et al. Eosinophilic esophagitis: current perspectives from diagnosis to management. **Ann. N. Y. Sci**, v. 1380, p. 204-217, 2016.

<https://doi.org/10.1111/nyas.13164>

MONERET-VAUTRIN, D-A. Le dosage de la protéine cationique des éosinophiles est-il un marqueur utile pour l'interniste? **La Rev Médecine Interne**, v.27, p.679–83, 2006. <https://doi.10.1016/j.revmed.2006.02.007>

MONTSEIRIN, J.; VEJA, A.; CHACON, P.; CAMACHO, M. J.; EL BEKAY, R.; ASTURIAS, J. A.; MARTINEZ, A.; GUARDIA, P.; PEREZ-CANO, R.; CONDE, J. Neutrophils as a novel source of eosinophil cationic protein in IgE-mediated processes. **J Immunol**. v. 179, n.4, p. 2634-2641, 2007.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2634>

MUELLER, S.; NEUREITER, D.; AIGNER, T.; STOLTE, M. Comparison of histological parameters for the diagnosis of eosinophilic oesophagitis versus gastro-oesophageal reflux disease on oesophageal biopsy material.

Histopathology, v.53, p.676–84, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.03187.x>

MUIR, A. B. et al. Esophageal epithelial cells acquire functional characteristics of activated myofibroblasts after undergoing an epithelial to mesenchymal transition. **Experimental Cell Research**, v. 330, n. 1, p. 102-10, 2015.

<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.yexcr.2014.08.026>

MULDER, D.; J, JUSTINICH, C. J. Understanding eosinophilic esophagitis: the cellular and molecular mechanisms of an emerging disease. **Mucosal**

Immunology, v. 4, n. 2, p. 139-147, 2011. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.88>

NAIM, R. et al. Transforming growth factor-beta10antisense modulates the expression of hepatocyte growth factor/scatter factor in keloid fibroblast cell culture. **Aesthetic Plast Surg**. v. 32, n. 2, p. 346-52, 2008.

<https://doi.10.1007/s00266-007-9078-6>

Nakano T, Kamei R, Fujimura T, et al. Impact of Histone H1 on the Progression of Allergic Rhinitis and Its Suppression by Neutralizing Antibody in Mice. **PLoS One**. v. 11, n. 4, p. e0153630, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153630>

NGO, P. et al. Eosinophils in the esophagus--peptic or allergic eosinophilic esophagitis? Case series of three patients with esophageal eosinophilia. **American Journal of Gastroenterology**, v. 101, n. 7, p. 1666-70, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00562.x>

ORLANDO, R. C. POWELL, D. W.; CARNEY, C. N. Pathophysiology of acute acid injury in rabbit esophageal epithelium. **J. Clin Invest**, v. 68, p.286-293, 1981. <https://dx.doi.org/10.1172%2FJCI110246>

PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: concept, innovations, applications and futures. *Biotechnol Adv.*, v. 28, n. 6, p.849-58, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004>

PAPADOPOULOU, A. et al. Management guidelines of eosinophilic esophagitis in childhood. **JPGN**, v. 58, n. 1, p. 107-118, 2014. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182a80be1>

PARFITT, J. R.; GREGOR, J. C.; SUSKIN, N. G.; JAWA, H. A.; DRIMAN, D. K. Eosinophilic esophagitis in adults: distinguishing features from gastroesophageal reflux disease: a study of 41 patients. **Mod Pathol**, v.19, p.90-6, 2006. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800498>

PARMLEY, SL; SMITH, G. Antibody-selectable filamentous fd phagevectors: affinity purification of target genes. *Gene*, v. 73, p. 305-18, 1988. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90495-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90495-7)

PATEL, R. V.; HIRANO, I. New Developments in the Diagnosis, Therapy, and Monitoring of Eosinophilic Esophagitis. **Current Treatment Options in Gastroenterology**, v.16, n.1, p15-26, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11938-018-0167-1>

PEETIUK, S. P.; MILLER, C. K.; KAUL, A. Eosinophilic esophagitis in infants and toddlers. **Dysphagia**. v. 22, n. 1, p. 44-48, 2007.

<https://doi.org/10.1007/s00455-006-9040-9>

PETERSON, C. G.; JORNVALL, H.; VENGE, P. Purification and characterization of eosinophil cationic protein from normal human eosinophils.

Eur J Haematol. v. 40, n. 5, p. 415-423, 1988. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1988.tb00850.x>

PICUS, D.; FRANK, P. H. Eosinophilic esophagitis. **AJR**, Chicago, v. 136, n. 5, p.1001-1003, 1981. <https://doi.org/10.2214/ajr.136.5.1001>

PLOSS, M. et al. Selection of peptides binding to metallic borides by screening M13 phage display libraries. **BMC Biotechnol**, v.14, p. 12, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-12>

POUS, J.; MALLORQUI-FERNANDEZ, G. et al. Three-dimensional structure of human RNase 1 delta N7 at 1.9 Å resolution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**. v. 57, n. 4, p. 498-505, 2001.

<https://doi.org/10.1107/s0907444901001147>

PRASAD, G. A.; et al. Epidemiology of eosinophilic esophagitis over three decades in Olmsted County, Minnesota. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 7, p. 1055–1061, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.06.023>

PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.111, p.S486-S493, 2003.

<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jaci.2009.11.017>

PUTNAM, P. E. Evaluation of the child who has eosinophilic esophagitis.

Immunol Allergy Clin N Am, Cincinnati, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.iac.2008.09.013>

RAVELLI, A. M.; et al. Dilated intercellular spaces: a major morphological feature of esophagitis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 45, n. 5, p. 510-5, 2006.

<http://dx.doi.org/10.1097/01.mpg.0000215312.78664.b9>

RAVELLI, A.; et al. Dilated intercellular spaces in eosinophilic esophagitis. **J**

Pediatr Gastroenterol Nutr, v. 59, p. 589-593, 2014.

<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000491>

RICCIARDOLO, F. L. M.; FOLKERTS, G.; FOLINO, A.; MOGNETTI, B.

Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling. **Eur J**

Pharmacol. v. 15, n. 827, p. 181-188, 2018. [https://doi:](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.03.017)

[10.1016/j.ejphar.2018.03.017](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.03.017)

ROSENBERG, H. F. Recombinant human eosinophil cationic protein.

Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity. **J Biol Chem**. v. 270, n.

14, p. 7876-7881, 1995. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.7876>

ROSENBERG, H. F.; ACKERMAN, S. J.; TENEN, D. G. Human eosinophil cationic protein. Molecular cloning of a cytotoxin and helminthotoxin with ribonuclease activity. **J Exp Med**. v. 170, n. 1, p. 163-176, 1989.

<https://doi.org/10.1084/jem.170.1.163>

ROSENBERG, H. F.; DYER, K. D.; TIFFANY, H. L.; GONZALEZ, M. Rapid

evolution of a unique family of primate ribonuclease genes. **Nat Genet**. v. 10, n.

2, p. 219-223, 1995. <https://doi.org/10.1038/ng0695-219>

ROTHENBERG, M. E.; SPERGEL, J. M.; SHERRILL, J. D. ET AL. Common

variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. **Nat Genet**. v.

42. N. 4, p. 289–291, 2010 [https://doi:10.1038/ng.547](https://doi.org/10.1038/ng.547)

ROTHENBERG, M. E. Biology and treatment of eosinophilic esophagitis.

Gastroenterology, v.137, p.1238–49, 2009.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.007>

ROWLEY, M. J.; O'CONNOR, K.; WIJEYEWICKREMA, L. Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions.

Biotechnol Annu Rev. v. 10, p. 151-88, 2004. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(04\)10006-9](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(04)10006-9)

RUSSEL, M. Filamentous phage assembly. **Mol Microbiol.** v. 5, p. 1607-13, 1991. <http://dx.doi.org/10.1038/260283a0>

SADRODDINY, E.; MOIR, A. J. A.; HELM, B. A novel insight to the functional role of Stathmin 1 in IgE-mediated activation of RBL-2H3 cells. **Iran J Allergy Asthma Immunol.** v. 10, n. 2, p. 73-80, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12242-011-9380-7>

SAGI-EISENBERG, R.; FOREMAN, J. C.; SHELLY, R. Histamine release induced by histone and phorbol ester from rat peritoneal mast cells. **Eur J Pharmacol.** v. 113, p. 11–17, 1985. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(85\)90337-1](https://doi.org/10.1016/0014-2999(85)90337-1)

SAVARINO, E.; et al. Clinical, endoscopy, histological and radiological characteristics of Italian patients with eosinophilic oesophagitis. **Dig Liver Dis.** v. 47, n. 12, p. 1033-1038, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.08.013>

SCHLAG, C.; MIEHLKE, S.; HEISEKE, A.; BROCKOW, K.; DRUG, A.; VON ARNIM, U. et al. Peripheral blood eosinophils and other non-invasive biomarkers can monitor treatment response in eosinophilic oesophagitis. **Aliment Pharmacol Ther.** v.42, p.1122–30, 2015. <https://doi.org/10.1111/apt.13386>

SCHOEPPFER, A. M.; et al. Delay in Diagnosis of Eosinophilic Esophagitis Increases Risk for Stricture Formation in a Time-Dependent Manner. **Gastroenterology**, v. 145, p. 1230-1236, 2013. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.015>

SCHOEPPFER, A. M.; et al. Development and validation of a symptom-based activity index for adults with eosinophilic esophagitis. **Gastroenterol** v. 147, p. 1255-1266, 2014. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.08.028>

SCHOOLTINK, H.; ROSE-JOHN, S. Designing cytokine variants by phage-display. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 8, p. 173-9, 2005. <https://doi.org/10.2174/1386207053258550>

SIDHU, S. S.; KOIDE, S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. **Curr Opin Struct Biol.** v. 17, p. 481-7, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.08.007>

SINGLA, M. B.; et al. Early comparison of inflammatory vs. fibrostenotic phenotype in eosinophilic esophagitis in a multicenter longitudinal study. Clin. Tranl. **Gastroenterol** v. 6, p: e 132, 2015. <https://doi.org/10.1038/ctg.2015.62>

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v.228, n.4705, p.1315-7, 1985. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

SORRENTINO, S.; GLITZ, D. G. Ribonuclease activity and substrate preference of human eosinophil cationic protein (ECP). **FEBS Lett.** v. 288, n. 1-2, p. 23-26, 1991. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80994-e](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80994-e)

SPERGE, J. M.; DELLON, E. S.; LIACOURAS, C. A.; HIRANO, I.; MOLINA-INFANTE, J.; BREDENOORD, A. J. et al. Summary of the updated international consensus diagnostic criteria for eosinophilic esophagitis: AGREE conference. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.121, p.281–4, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.05.035>

SPERGEL, J. M. et al. Predictive value for skin prick test and atopy patch test for eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol, Philadelphia**, v. 119, n. 2, p. 509-511, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.11.016>

STEINER, S. J.; KERNEK, K. M.; FITZGERALD, J. F. Severity of basal cell hyperplasia differs in reflux versus eosinophilic esophagitis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 45, p. 506-509, 2006. <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000221906.06899.1b>

STONE, K.D., PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cell, basophils, and eosinophils. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, p.S73-80, 2010. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jaci.2009.11.017>

SUBRAMANIAN, H.; GUPTA, K.; ALI, H. Roles of Mas-related G protein-coupled receptor X2 on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions, and chronic inflammatory diseases. **J Allergy Clin Immunol.** v. 138, n. 3, p.700-10, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.051>

SUR, S.; GLITZ, D. G.; KITA, H.; et al. Localization of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein in neutrophilic leukocytes. **J Leukoc Biol.** v. 63, n. 6, p. 715-722, 1999. <https://doi.org/10.1159/000024091>

TAYLOR, M. L.; METCALFE, D. D. Mast cells in allergy and host defense. **Asthma and Allergy Proceedings**, v.22, p.115-119, 2001. <https://doi.org/10.2500/108854101778148764>

TEITELBAUM, J. E.; et al. Eosinophilic esophagitis in Children: Immunopathological Analysis and Response to Fluticasone Propionate. **Gastroenterology**, v. 122, p. 1216-1225, 2002. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32998>

TOBEY, N. A.; et al. Dilated intercellular spaces: A morphological feature of acid reflux damaged human esophageal epithelium. **Gastroenterol**, v. 111, p. 1200-1205, 1996. <https://doi.org/10.1053/gast.1996.v111.pm8898633>

UHM, T. G. et al. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 4, n. 2, p. 68-79, 2012. <https://doi.org/10.4168/aair.2012.4.2.68>

VAN RHIJN, B. D. et al. Rapidly increasing incidence of eosinophilic esophagitis in a large cohort. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 25, n. 1, p. 47-52 e5, 2013. <https://doi.org/10.1111/nmo.12009>

VAN RHIJN, B. D.; VERHEIJ, J.; SMOUT A. J. P. M.; BREDENOORD, A. J. The Endoscopic Reference Score shows modest accuracy to predict histologic remission in adult patients with eosinophilic esophagitis. **Neurogastroenterol Motil**, v.28, p.1714–22, 2016. <https://doi.org/10.1111/nmo.12872>

VAN RHIJN, B.; WARNERS, M.; CURVERS, W.; VAN LENT, A.; BEKKALI, N.; TAKKENBERG, R. et al. Evaluating the Endoscopic Reference Score for eosinophilic esophagitis: moderate to substantial intra- and interobserver reliability. **Endoscopy**, v.46. p.1049–55, 2014. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1377781>

VAN RHIJN, B. D.; VERHEIJ, J., VAN DEN BERGH WEERMAN, M. A. et al. Histological response to fl uticasone propionate in patients with eosinophilic esophagitis is associated with improved functional esophageal mucosal integrity. **Am JGastroenterol.** v. 110, p. 1289-97, 2015. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.247>

VINDIGNI, C.; et al. Eosinophilic esophagitis: an Italian experience. **Rev Esp Enferm Dig**, v. 2012, p.15-19, 2010. <https://doi.10.4321/S1130-01082010000100003>

WANG, Y. H.; ITO, T.; WANG, Y.H.; HOMEY, B.; WATANABE, N.; MARTIN, R., et al. Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. **Immunity**,;24:827–38 , 2006. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.03.019>

WARNERS, M. J. et al. Systematic Review: Disease Activity Indices in Eosinophilic Esophagitis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 112, n. 11, p. 1658-1669, 2017. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.363>

WELLER, P. F., SPENCER, L. A. Functions of tissue-resident eosinophils. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 12, p. 746-760, 2017. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.95>

WEN T, ROTHENBERG ME, WANG YH. Hematopoietic prostaglandin D synthase: Linking pathogenic effector CD4(+) T(H)2 cells to proeosinophilic inflammation in patients with gastrointestinal allergic disorders. **J Allergy Clin Immunol.** V.137, n. 3, p. 919–921, 2016. <https://doi.10.1016/j.jaci.2015.11.032>

WESTMAN J, PAPAREDDY P, DAHLGREN MW, et al. Extracellular Histones Induce Chemokine Production in Whole Blood Ex Vivo and Leukocyte

Recruitment In Vivo. **PLoS Pathog.** v. 11, n. 12, p. e1005319, 2015.

<https://doi.10.1371/journal.ppat.1005319>

XUE L, SALIMI M, PANSE I, et al. Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. **J Allergy Clin Immunol.** v. 133, n. 4, p. 1184–1194, 2014. <https://doi.10.1016/j.jaci.2013.10.056>

ZANCONATO, S et al. Selection dynamic of Escherichia coli host in M13 combinatorial peptide phage display libraries. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 75, n.4, p.812-5, 2011. <https://doi.org/10.1271/bbb.110099>

ZHANG, Z. et al. T cell co-stimulatory molecules: a co-conspirator in the pathogenesis of eosinophilic esophagitis? **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 6, p. 1497-506, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10620-013-2599-8>

ANEXOS

Anexo I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PARA RESPONSÁVEL LEGAL DO MENOR DE IDADE

Prezado(a) senhor(a), o(a) menor, pelo qual o(a) senhor(a) é responsável, está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada “Caracterização Fenotípica de Pacientes Pediátricos Portadores de Eosinofilia Esofágica e Investigação de Biomarcadores Aplicados ao Diagnóstico da Esofagite Eosinofílica”, sob a coordenação dos pesquisadores Prof. Luiz Ricardo Goulart Filho e Profa. Cristina Palmer Barros.

Nesta pesquisa nós estamos procurando caracterizar melhor as crianças e adolescentes que apresentam um tipo de inflamação alérgica do esôfago, que apresenta sintomas que se parecem muito com os sintomas da Doença do refluxo esofágico, como por exemplo queimação, vômitos, dificuldade para engolir, entre outros. Nosso objetivo é encontrar técnicas clínicas e laboratoriais que possam diferenciar estas duas doenças, além de desenvolver um exame que possa diagnosticar e classificar os pacientes.

Na realização de rotina do exame de endoscopia digestiva alta solicitado pelo médico da criança, habitualmente deve ser puncionada uma veia para administração de medicamentos e soro, e são também colhidos quatro pequenos fragmentos do esôfago para análise microscópica. No caso de participação nesta pesquisa ao puncionar a veia serão coletados 2 tubos com até 5ml de sangue. E quando a criança dormir sob o efeito do anestésico será coletada pequena quantidade de saliva da boca, pequena quantidade de líquido do esôfago e dois fragmentos de biópsia do esôfago para estudo e descoberta de novos exames. Na participação do (a) menor nesta pesquisa, o senhor (a) também deverá responder um questionário sobre os sintomas, diagnósticos e tratamentos que a criança possui até o momento. Além disso, as imagens da endoscopia do esôfago serão gravadas para atender aos objetivos do estudo e poderão auxiliar no acompanhamento do diagnóstico correto. Após a realização da Endoscopia Digestiva o (a) menor será agendado(a) para o acompanhamento ambulatorial (no Ambulatório de Gastroenterologia) onde o(a) senhor(a) tomará conhecimento do resultado do exame e o(a) menor receberá a condução diagnóstica apropriada, podendo ser necessária a realização do exame de pHmetria esofágica para avaliar a doença do refluxo ácido. Se forem observadas células associadas a um processo alérgico-inflamatório nas biópsias do esôfago será prescrito o tratamento indicado e nova endoscopia digestiva será realizada após 8 semanas.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido por uma das duas pesquisadoras que realizará o exame da criança. As médicas pesquisadoras são responsáveis pelo Setor de Endoscopia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia: Dra. Cristina Palmer Barros e Dra. Marisa Rodrigues de Faria. Neste momento o(a) senhor(a) poderá esclarecer qualquer dúvida.”

Em nenhum momento o(a) menor será identificado(a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

O(A) menor não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.
Com a participação do(a) menor na pesquisa, não são previstos riscos maiores dos naturalmente envolvidos nos exames de Endoscopia Digestiva e pHmetria Esofágica. Os benefícios serão ter os resultados de exames cuidadosamente analisados por uma equipe técnica de pesquisa capacitada para oferecer o melhor esclarecimento diagnóstico para os sintomas apresentados pelo(a) menor.
O(A) menor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.
Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor.
Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor, poderá entrar em contato com:

Médica e Pesquisadora Responsável:

Profa Cristina Palmer Barros CRM-MG 32093
Universidade Federal de Uberlândia – Departamento de Pediatria.
Av. Pará 1720 – Bloco 2H – Campos Umuarama – Telefone: (34) 3218-2264.
Serviço de Gastroenterologia Pediátria – Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia - Telefone: (34) 32182164 – 32182127

Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos

Universidade Federal de Uberlândia. Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; Telefone: 34-32394131

Uberlândia, de de 20.....

Assinatura do pesquisador responsável

Eu, _____, responsável
legal pelo(a) menor, _____,
consinto na sua participação no projeto citado acima, caso ele(a) deseje, após ter sido
devidamente esclarecido.

Responsável pelo(a) menor participante da pesquisa

Anexo II. Termo de Assentimento para o menor com mais de 12 anos.

ANEXO II: TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O MENOR COM MAIS DE 12 ANOS E FALTANDO 1 DIA PARA 18 ANOS

Você sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada “Caracterização Fenotípica de Pacientes Pediátricos Portadores de Eosinofilia Esofágica e Investigação de Biomarcadores Aplicados ao Diagnóstico da Esofagite Eosinofílica”, sob a coordenação dos pesquisadores Prof. Luiz Ricardo Goulart Filho e Profa. Cristina Palmer Barros.

Nesta pesquisa nós estamos procurando caracterizar melhor as crianças e adolescentes que apresentam um tipo de inflamação alérgica do esôfago, que apresenta sintomas que se parecem muito com os sintomas da Doença do refluxo esofágico, como por exemplo queimação, vômitos, dificuldade para engolir, entre outros. Nosso objetivo é encontrar técnicas clínicas e laboratoriais que possam diferenciar estas duas doenças, além de desenvolver um exame que possa diagnosticar e classificar os pacientes.

Na realização de rotina do exame de endoscopia digestiva alta solicitado pelo seu médico, habitualmente deve ser puncionada uma veia para administração de medicamentos e soro, e são também colhidos quatro pequenos fragmentos do esôfago para análise microscópica. Caso aceite participar desta pesquisa, ao puncionar sua veia serão coletados 2 tubos com até 5ml de sangue. E quando você dormir sob o efeito do anestésico será coletada pequena quantidade de saliva da sua boca, e pequena quantidade de líquido do esôfago e dois fragmentos de biópsia do esôfago para estudo e descoberta de novos exames. Na sua participação nesta pesquisa você também deverá responder um questionário sobre os sintomas, diagnósticos e tratamentos que possui até o momento. Além disso, as imagens da endoscopia do esôfago serão gravadas para atender aos objetivos do estudo e poderão auxiliar no acompanhamento do diagnóstico correto. Após a realização da Endoscopia Digestiva você será agendado(a) para o acompanhamento ambulatorial (no Ambulatório de Gastroenterologia) onde você tomará conhecimento do resultado do exame e receberá a condução diagnóstica apropriada, podendo ser necessária a realização do exame de pHmetria esofágica para avaliar a doença do refluxo ácido. Se forem observadas células associadas a um processo alérgico-inflamatório nas biópsias do esôfago será prescrito o tratamento indicado e nova endoscopia digestiva será realizada após 8 semanas.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido por uma das duas pesquisadoras que realizará o seu exame. As médicas pesquisadoras são responsáveis pelo Setor de Endoscopia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia: Dra. Cristina Palmer Barros e Dra. Marisa Rodrigues de Faria. Neste momento, você poderá esclarecer qualquer dúvida.”

Em nenhum momento você será identificado(a). 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.

Com sua participação na pesquisa, não são previstos riscos maiores dos naturalmente envolvidos nos exames de Endoscopia Digestiva e pHmetria Esofágica. Os benefícios serão ter os resultados de exames cuidadosamente analisados por uma equipe técnica de pesquisa capacitada para oferecer o melhor esclarecimento diagnóstico para os sintomas apresentados.

Mesmo se seu responsável legal, tendo consentido na sua participação na pesquisa, você não é obrigado participar da mesma se não desejar. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa você poderá entrar em contato com:

Médica e Pesquisadora Responsável:

Profa Cristina Palmer Barros CRM-MG 32093

Universidade Federal de Uberlândia – Departamento de Pediatria.

Av. Pará 1720 – Bloco 2H – Campos Umuarama – Telefone: (34) 3218-2264.

Serviço de Gastroenterologia Pediátria – Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia - Telefone: (34) 32182164 – 32182127

Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos

Universidade Federal de Uberlândia. Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; Telefone: 34-32394131

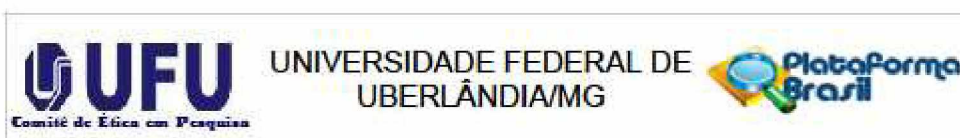
Uberlândia, de de 20.....

Assinatura do pesquisador responsável

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

Participante da pesquisa

Anexo III.Parecer Consubstanciado do CEP.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização Fenotípica de Pacientes Pediátricos Portadores de Eosinofilia Esofágica e Investigação de Biomarcadores Aplicados ao Diagnóstico da Esofagite Eosinofílica

Pesquisador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36787714.0.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG
Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 930.413

Data da Relatoria: 04/12/2014

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: A esofagite eosinofílica (EEo) é uma doença inflamatória que tem como característica importante a dificuldade de passagem do alimento do esôfago para o estômago. Sua incidência parece aumentar, e ocorre em proporção relevante de pacientes com doença de refluxo gastroesofágico (DRGE). As duas doenças mostram muitas similaridades, e a distinção é atualmente feita com teste terapêutico pelo uso de inibidores de bombas de prótons. Contudo, persistem problemas nessa distinção.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar fenotipicamente pacientes pediátricos portadores de eosinofilia esofágica através da descrição de suas características clínicas, histológicas, endoscópicas e bioquímicas. Desenvolver e avaliar o papel de biomarcadores na Esofagite Eosinofílica e seus espectros fenotípicos como forma de aprimorar o diagnóstico e a classificação da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores: Os procedimentos médicos que serão realizados são inerentes à investigação e tratamento das doenças de interesse. Portanto, não se identifica aumento

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 930.413

significativo de risco para os participantes. Medidas satisfatórias para resguardo de sigilo de informações pessoais foram apresentadas. Há potencial de benefício indireto, mediante a identificação de marcadores moleculares da EEO.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Deverão ser avaliados indivíduos menores de idade (0 a 18 anos), com indicação de endoscopia digestiva alta para investigação diagnóstica proveniente de médico assistente. Serão excluídos casos que apresentarem complicações durante o exame, com outras co-morbidades relacionadas à EEO, que fizerem uso de medicação corticosteroide, ou que não seguirem o protocolo do estudo. Estima-se a investigação de 2.000 participantes, divididos em condições clínicas de interesse específico. A investigação se divide em duas fases. Na primeira fase, os participantes serão submetidos a endoscopia (digestiva alta) e biópsia; as amostras serão avaliadas em exame anátomo-patológico para investigação de esofagite eosinofílica e em seguida os pacientes serão mantidos em acompanhamento ambulatorial – pacientes com diagnóstico de esofagite eosinofílica serão mantidos em tratamento com inibidor de bomba de prótons; em seguida, tais pacientes serão submetidos a nova endoscopia e finalmente os casos serão divididos segundo a condição do paciente. Na segunda fase, as amostras biológicas obtidas (tecido lesionado, líquido esofágico, saliva, e sangue periférico) serão utilizadas em ensaios laboratoriais de biologia molecular para identificar e caracterizar potenciais marcadores da EEO. Registros médicos serão utilizados para caracterização da amostra e obtenção de dados de interesse específico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados de forma satisfatória.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer 878.285 foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 930.413

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Maio de 2018.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Outubro de 2018.

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

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

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 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- 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 466/12), 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 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 466/12). 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

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 930.413

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).

UBERLÂNDIA, 09 de Janeiro de 2015

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "IA", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Página 04 de 04

Anexo IV. Pedido nacional de patente.



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 016923 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Tipo da Pessoa: Pessoa Jurídica

CNPJ: 25648387000118

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Av. João Naves de Ávila, 2121 - Campus Santa Mônica - Reitoria

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP: 38400-902

País: Brasil

Telefone: (34)3239 4977

Fax:

Email: propriedade@intelecto.ufu.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 07/08/2017 às 16:16, Petição 870170056514

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PEPTÍDEOS LIGANTES À PROTEÍNA CATIÔNICA EOSINOFÍLICA E SUAS APLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA

Resumo: A presente invenção refere-se à seleção, caracterização e utilização de peptídeos ligantes da Proteína Catiônica Eosinofílica (PCE) no diagnóstico imunológico da Esofagite Eosinofílica e de doenças alérgicas/inflamatórias, controle da inflamação e tratamento de doenças alérgicas e inflamatórias. Nesse contexto, a invenção compreende 24 peptídeos desenvolvidos a partir do seu potencial de reconhecimento da proteína catiônica eosinofílica recombinante humana. Um desses ligantes selecionados foi escolhido a título de exemplificação para ser validado para o diagnóstico imunológico da Esofagite Eosinofílica (EEo) em amostras de muco esofágico de pacientes pediátricos portadores da doença.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 07/08/2017 às 16:16, Petição 870170056514.