



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



**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE IgG4
ESPECÍFICO AO ALÉRGENO rBio t 5 E TRATAMENTO DE MODELO
EXPERIMENTAL NA ASMA AGUDA**

KARINE CANUTO LOUREIRO DE ARAÚJO

Orientador: Prof. Dr. Jair Cunha Pereira Junior

Uberlândia –MG

2019



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



**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE IgG4
ESPECÍFICO AO ALÉRGENO rBio t 5 E TRATAMENTO DE MODELO
EXPERIMENTAL NA ASMA AGUDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Genética e Bioquímica da Universidade Federal
de Uberlândia, para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Bioquímica.

KARINE CANUTO LOUREIRO DE ARAÚJO

Orientador: Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior

Uberlândia –MG

2019

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

A663d

2019

Araújo, Karine Canuto Loureiro de, 1988

Desenvolvimento de imunoensaio para detecção de IgG4 específico ao alérgeno rBlo t 5 e tratamento de modelo experimental na asma aguda [recurso eletrônico] / Karine Canuto Loureiro de Araújo. - 2019.

Orientador: Jair Pereira da Cunha Junior.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1260>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. 2. Alergia. 3. Asma. 4. Tratamento. I. Cunha Junior, Jair Pereira da, 1974, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica			
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 08/2019 - PPGGB			
Data:	Trinta e um de julho de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento: 18:57
Matrícula do Discente:	11523GBI012			
Nome do Discente:	Karine Canuto Loureiro de Araújo			
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de novos ensaios para detecção de anticorpos IgG4 e tratamento em modelo experimental de alergia.			
Área de concentração:	Bioquímica			
Linha de pesquisa:	Estrutura e função de proteínas.			
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Aplicação de processos biotecnológicos para o desenvolvimento de novos ensaios imunológicos para diagnóstico, monitoramento e promoção à saúde dos pacientes, com alergia respiratória – PPSUS 2013 FAPEMIG.			

Aos trinta e um 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: Profª. Drª. Greice Japolla, Profª. Drª. Angélica de Oliveira Gomes, Profª. Drª. Elisângela Rosa da Silva, Drª. Cláudia Mendonça Rodrigues e Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, 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. Jair Pereira da Cunha Júnior, 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 **Jair Pereira da Cunha Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2019, às 18:57, 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 **Elisângela Rosa da Silva, Professor(a) Substituto(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2019, às 18:58, 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 **CLÁUDIA MENDONÇA RODRIGUES, Usuário Externo**, em 31/07/2019, às 19:00, 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 **Greice Japolla, Usuário Externo**, em 31/07/2019, às 19:02, 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 **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 31/07/2019, às 19:03, 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 **1367924** e o código CRC **9A28D3E2**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desaninar com as dificuldades.

Aos meus pais, que sempre me motivaram e entenderam os momentos de aflição. Agradeço por terem me mostrado o quanto era importante estudar e não desistir dos meus objetivos. Eles são os responsáveis por toda a minha trajetória.

Aos meus irmãos, por me apoiarem, torcerem por mim e vibrarem com as minhas conquistas.

Ao meu namorado, Rodrigo, por ser meu parceiro e me confortar nos momentos mais difíceis, por me tranquilizar e acreditar no meu sucesso.

Ao Professor Dr. Jair por sempre estar a minha disposição e pelas lições como pesquisador, orientador e professor. Por estar sempre dividindo os seus conhecimentos de forma clara, e por ser um exemplo para todos que almejam ser no futuro um bom profissional.

Ao Professor Dr. Ernesto, pela confiança de ceder a utilização de toda estrutura do laboratório e pelos ensinamentos e todo auxílio que me prestou.

Aos amigos dos laboratórios de Alergia e Imunologia Clínica Hellen, Vinicius, Laura, Alessandro por terem colaborado com a execução do meu projeto, e também por terem tornado os meus dias de trabalho mais leves e divertidos junto com a nossa amiga Alessandra e Alfredo. Agradecer especialmente as minhas amigas Hellen e Greice por compartilharem comigo vários momentos da vida e por torcer por mim. Obrigada por formarmos uma ótima equipe.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação e Laboratório de Imunologia: Ana Claudia, Max, Zilda pela solicitude nos momentos necessários.

Aos integrantes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, que me auxiliaram nos momentos necessários, sempre se colocando à disposição para me auxiliarem, em especial à Janaína de Souza.

As agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo incentivo e apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama representativo para acoplamento de antígenos às beads funcionalizadas.....	37
Figura 2 - Purificação de Blo t 5 em resina de Níquel.....	40
Figura 3 - Produção de anticorpos policlonais.....	41
Figura 4 - Analise de funcionalização das beads magnéticas.....	43
Figura5 - ELISA bead para detecção de anticorpos IgG4.....	44
Figura 6 - Ensaios para detecção de IgG4 específicos a rBlo t 5.....	45
Figura 7 - Indução de resposta alérgica pulmonar em modelo murinho.....	60
Figura 8 - Detecção sérica de IgE, IgG2a e IgG1 em modelos experimentais de asma aguda submetidos a diferentes tratamentos.....	62
Figura 9 - Detecção de IgE, IL-5 e IL-10 no homogenato pulmonar em modelos experimentais de asma aguda submetidos a diferentes tratamentos.....	63
Figura 10 - Análise do efeito dos tratamentos em cortes histopatológicos de modelo de asma aguda.....	65
Figura 11 - Análise dos parâmetros respiratórios.....	67

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Métodos moleculares para detecção de anticorpos específicos a alérgenos	46
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA: ácido araquidônico
 ABTS: *2,2 -diazino-bis-3- ethyl-benzothiazoline sulfonic acid*
 Ig: imunoglobulina
 ARLT: antagonistas dos receptores de leucotrienos
B. tropicalis: *Blomia tropicalis*
 BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
 Blo t 5: alérgeno *Blomia tropicalis* grupo 5
 BSA: soro albumina bovina
Bt: *Blomia tropicalis*
 CBG: Centro de Biotecnologia e Genética
 CCDs: *Cross-reactive Carbohydrate Determinants*
 CRD: *Component Resolved Diagnosis*
 CD: *cluster of differentiation*
 CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
 CEUA: Comitê de Ética na Utilização de Animais
 CyPGs: prostaglandinas de ciclopentenona (cyPGs)
 CI: corticóides inalatórios
 DCs: células dendríticas
Der f: *Dermatophagoides farinae*
Der p: *Dermatophagoides pteronyssinus*
 DO: Densidade ótica
E. coli: *Escherichia coli*
 EFB: Ensaio de fluorescência baseado em *beads* magnéticas
 ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática
 UE: União Europeia
 FAST: *Flow Cytometric Cellular Allergen Stimulation Test*
 Fc ϵ RI: receptor de alta afinidade para imunoglobulina E
 FDA: Food and Drug Administration
 FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*
 g: força gravidade
 GM-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
 H₂SO₄: Ácido Sulfúrico
 N: normal
 H₂O₂: peróxido de hidrogênio
 His-tag: polyhistidine tag
 i.n.: intranasal
 i.p.: intraperitoneal
 IE: índice ELISA
 IF: imunofluorescência
 IFN- γ : interferon gama
 IL: interleucina
 IPTG: Isopropil-D-1-thiogalactopyranoside
 ISAC: *Immuno Solid Phase Allergen Chip*
 ITE: imunoterapia alérgeno específica
 ITSC: imunoterapia subcutânea
 ITSL: imunoterapia sublingual

IUIS: União Internacional das Unidades Imunológicas
kDa: quilodalton
Kg: quilograma
kU/L: quilo unidades por litro
LAMA: antagonista muscarínico de longa ação
LB: linfócitos B
LTC4: leucotrieno C4
µg: microgramas
M: molar
Mg: miligramas
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
mL: mililitros
Mm: milimolar
MMP-9: metaloproteases 9
NaCl: cloreto de sódio
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NHS: N-Hidroxisuccinimida
NK: *Natural Killer*
Nm: nanomolar
NPC2: NPC Intracellular Cholesterol Transporter 2
OMS: Organização Mundial de Saúde
OVA: ovalbumina
pb: pares de base
PBS: Solução salina tamponada com fosfato
PBS -T: Solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween
PBS-TM: Solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween com molico
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PE: peroxidase
PGD2: prostaglandina D2
PGJ2: protaglandinas J2
PGs: prostaglandinas
pH: potencial hidrogeniônico
PM: peso molecular
PMSF: protease Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPAR: receptores ativados por proliferador de peroxissoma
pUC57: Vetores de expressão derivados de pUC de vetor plasmidial
rBlo t: Antígeno recombinante de *Blomia tropicalis*
rpm: rotações por minuto
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB: soro fetal bovino
T CD4 +: linfócitos T CD4+
T CD8+: linfócitos T CD8+
T.A.: temperatura ambiente
TAB: testes de ativação de basófilos
TBM: Teste de Broncoprovocação com Metacolina
TCP: Teste Cutâneo de Puntura
TGF-β: Fator de transformação do crescimento beta
Th: T helper
TNF-α: fator de necrose tumoral α

Treg: linfócito T regulatório

TSLP - Linfoopoietina Estromal Tímica

TZDs: tiazolidinedionas

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

15d-PGJ2: 15-desoxi-A12,14-prostaglandina J2

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	14
1.INTRODUÇÃO	16
1.1Alergia	16
1.2 <i>Blomia tropicalis</i>	17
1.3 Resposta imune na patogênese de doenças alérgicas.....	19
1.4 Diagnóstico da alergia	20
1.5 Tratamento das doenças alérgicas.....	23
1.5.1 Imunoterapia Alérgeno Específica (ITE)	24
1.5.2 Corticosteroides	25
1.5.3 15-desoxi-A12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2)	27
1.6 Modelos experimentais de alergia respiratória	28
2.OBJETIVOS.....	30
2.1Geral	30
2.2 Específicos	30
3.JUSTIFICATIVA	31
CAPITULO 1 DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO BASEADO EM MICROESFERAS MAGNÉTICAS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG4 ANTI-Blo t 5	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Produção de proteína recombinante Blo t 5.....	33
4.2 Purificação de rBlo t 5	34
4.3 Produção de anticorpo policlonal anti-rBlo t 5	34
4.3.1 Detecção de anticorpos IgG anti-rBlo t 5 em amostras de soros de camundongos ..	35
4.4 Mensuração de IgG4 específico a rBlo t 5 em soro de pacientes	36
4.5 Acoplamento do alérgeno rBlo t 5 à microesferas contendo grupo químico N-hidroxisuccinimida (NHS)	36
4.5.1 Análise de conjugação das <i>beads</i> NHS.....	38
4.5.2 Ensaio de fluorescência baseado em <i>beads</i> magnéticas (EFB) para detecção de anticorpos IgG4 específicos a rBlo t 5	39
4.6 Análise estatística.....	39
5.RESULTADOS	40
5.1 Produção e purificação de rBlo t 5	40
5.2 Produção de anticorpos anti-rBlo t 5	41

5.3 Análise de funcionalização das <i>beads</i> NHS	42
5.4 ELISA <i>beads</i> para detecção de IgG4	44
5.5 Ensaio de fluorescência baseado em <i>beads</i> magnéticas (EFB) para detecção de anticorpos IgG4	44
5.6 Vantagens da nova plataforma de detecção de IgG4	45
6. DISCUSSÃO	47
CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DE FORMAS DE TRATAMENTO DE ASMA AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR SENSIBILIZAÇÃO COM OVALBUMINA (OVA)	53
7. MATERIAL E MÉTODOS	54
7.1 Animais.....	54
7.2 Protocolo de indução de asma experimental em camundongos.....	54
7.3 Tratamentos no modelo de asma experimental.....	54
7.4 Análise do parâmetro respiratório.....	55
7.5 ELISA para detecção de anticorpos IgG e subclasses	56
7.6 ELISA para detecção de IgE	56
7.7 Ensaio de detecção de IL-5 e IL-10	57
7.8 Análise histológica.....	57
7.9 Análise estatística.....	58
8. RESULTADOS	59
8.1 Protocolo de indução de asma aguda experimental.....	59
8.2 Tratamento de modelos experimentais de asma aguda com furoato de fluticasona e 15d-PGJ2	61
8.3 Detecção de IgE, citocinas IL-5 e IL-10 no homogenato de animais tratados.....	63
8.4 Análise histológica em modelos experimentais de asma aguda.....	64
8.5 Avaliação do parâmetro respiratório em animais tratados	66
9. DISCUSSÃO	68
10. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO I	92
ANEXO II.....	93

RESUMO

Doenças alérgicas representam uma condição médica comum, que tem aumentado nas últimas décadas, e por isso é considerada um problema de saúde pública. A exposição a alérgenos presentes na poeira doméstica é um importante fator de risco para o desenvolvimento do processo alérgico. O ácaro *Blomia tropicalis* é reconhecidamente indutor de alergias respiratórias em regiões tropicais, sendo o alérgeno Blo t 5 considerado de maior importância. A pesquisa *in vitro* de anticorpos IgE e IgG4, como ferramenta diagnóstica, é importante no acompanhamento do quadro imunológico de pacientes submetidos à imunoterapia para possibilitar melhor prognóstico em resposta a alergia, e também para indicar tratamentos específicos de acordo com o perfil imunológico de cada indivíduo. Assim, os objetivos do trabalho são desenvolver uma plataforma de detecção fluorescente que facilite o monitoramento de anticorpos IgG4 alérgenos específicos, e avaliar o efeito da associação das drogas furoato de fluticasona e 15d- PGJ2 no tratamento da asma aguda em modelo experimental. Para desenvolver uma plataforma de detecção de IgG4,抗ígenos de rBlo t 5 foram acoplados às microesferas magnéticas N-Hidroxisuccinimida (NHS). Resultados *in vitro* realizados para detecção de IgG mostraram que as *beads* foram funcionalizadas com alérgeno Blo t 5. Foi desenvolvido um ensaio de fluorescência baseado em beads magnéticas (EFB), onde observou-se a discriminação entre as amostras de pacientes positivas e negativas específicas a IgG4. A ferramenta é vantajosa por ser rápida e por utilizar baixa quantidade de amostra (5 μ L de soro) quando comparada a outros testes disponíveis. Após diagnóstico e monitoramento do quadro do paciente alérgico, o indivíduo é submetido a diferentes tipos de tratamentos. Para o alívio sintomático de indivíduos asmáticos, são utilizados principalmente corticosteroides, porém esses medicamentos possuem reações adversas. O modelo experimental de asma foi desenvolvido em camundongos Balb/c em protocolo de 14 dias. Os animais foram sensibilizados via i.p. no dia 0, e desafiados por 5 dias, do dia 6 ao dia 10 com solução de OVA adsorvida em solução de PBS via i.n., e posteriormente foram tratados em diferentes condições de 15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) e/ou furoato de fluticasona. O grupo sensibilizado com OVA exibiu aumento nos níveis de IgE no soro e homogenato comparados ao grupo controle negativo (PBS). Com a finalidade de compreender o

melhor tratamento para casos de asma aguda e qual o mecanismo desencadeado pela combinação das drogas, furoato de fluticasona e 15d- PGJ2, foram dosados anticorpos (IgE/ IgG/ IgG1/ IgG2a) e citocinas (IL-10/ IL-5). Para consolidar os resultados foram feitas análises histológicas e avaliação de parâmetro respiratório de cada condição dos tratamentos propostos. Observa-se que em comparação ao grupo de camundongos induzidos por OVA, o grupo de animais tratados com as drogas isoladamente exibiram na análise histológica uma redução na inflamação das vias aéreas. As análises mostram também que a combinação das drogas furoato de fluticasona com 15d-PGJ2 não é eficiente para tratar modelo experimental da asma aguda, já que animais que receberam esta associação de fármacos demonstraram maior infiltrado inflamatório pulmonar, maior depósito de colágeno neste órgão e não apresentaram melhorias nos parâmetros de função de respiratória. Devido aos efeitos adversos mais graves causados pela intervenção com glicocorticoides, é importante avaliar novas formas de tratamento para alergia.

Palavras-chave: alergia, asma, anticorpos IgG4, diagnóstico, EFB, furoato de fluticasona, rBlo t 5, tratamento, 15d-PGJ2.

ABSTRACT

Allergic diseases represent a common medical condition, which has increased in recent decades, and is therefore considered a public health problem. Exposure to allergens in household dust is an important risk factor for the development of the allergic process. The *Blomia tropicalis* mite is known to induce respiratory allergies in tropical regions, being the Blo t 5 allergen considered of major importance. In vitro screening for IgE and IgG4 antibodies, as a diagnostic tool, is important in monitoring the immune status of patients undergoing immunotherapy to enable better prognosis in response to allergy, and to indicate specific treatments according to the immunological profile of each individual. Thus, the objectives of this work are to develop a fluorescent detection platform that facilitates the monitoring of specific allergen IgG4 antibodies, and to evaluate the effect of the combination of fluticasone furoate and 15d-PGJ2 drugs in the treatment of acute asthma in an experimental model. To develop an IgG4 detection platform, rBlo t 5 antigens were coupled to the N-Hydroxysuccinimide (NHS) magnetic microspheres. In vitro results for IgG detection showed that the beads were functionalized with Blo t 5 allergen. A fluorescence-based magnetic beads (EFB) assay was developed, where discrimination between specimens from positive and negative patients specific to IgG4. The tool is advantageous in that it is fast and uses a small amount of sample (5µL of serum) when compared to other available tests. After diagnosis and monitoring of the allergic patient's condition, the individual is submitted to different types of treatments. For symptomatic relief of asthmatic individuals, corticosteroids are mainly used, but these medications have adverse reactions. The experimental asthma model was developed in Balb / c mice in a 14-day protocol. Animals were sensitized via i.p. on day 0, and challenged for 5 days, from day 6 to day 10 with OVA solution adsorbed in PBS solution via in, and subsequently treated under different conditions of 15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2 (15d -PGJ2) and / or fluticasone furoate. The OVA sensitized group exhibited increased serum IgE and homogenate levels compared to the negative control group (PBS). In order to understand the best treatment for acute asthma cases and the mechanism triggered by the combination of drugs, fluticasone furoate and 15d-PGJ2, antibodies (IgE / IgG / IgG1 / IgG2a) and cytokines (IL-10 / IL-5). To consolidate the results, histological analyzes and respiratory parameter evaluation of each condition of the proposed treatments were performed. Compared to the group of mice

induced by OVA, the group of animals treated with drugs alone exhibited a reduction in airway inflammation in the histological analysis. Analyses also show that the combination of fluticasone furoate drugs with 15d-PGJ2 is not efficient to treat an experimental model of acute asthma, since animals that received this combination of drugs showed greater pulmonary inflammatory infiltrate, higher collagen deposition in this organ and not showed improvements in respiratory function parameters. Due to the more serious adverse effects caused by glucocorticoid intervention, it is important to evaluate new forms of treatment for allergy.

Keywords: allergy, asthma, IgG4 antibodies, diagnosis, EFB, fluticasone furoate, rBiot 5, treatment, 15d-PGJ2.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alergia

Os primeiros relatos de problemas de saúde considerados como alergias datam de mais de 3000 anos do Egito, Roma e China. As doenças alérgicas representam uma condição médica comum, que por razões desconhecidas tem aumentado nas últimas décadas em várias áreas do planeta, e por isso é considerada um problema de saúde pública, além de ser relatada como causa frequente de morbidade principalmente em crianças. A maioria dos indivíduos afetados apresentam manifestações clínicas de rinite, conjuntivite, eczema e asma relacionadas com a exposição a um ou vários alérgenos (VON MUTIUS et al., 2000, FERRANTE, LA GRUTTA, 2018).

O desenvolvimento da alergia é complexo e multifatorial, e sua expressão depende da interação entre fatores genéticos e ambientais. No caso de predisposição genética, descendentes de pais com a doença terão maior probabilidade de desenvolve-la, sendo importante a investigação de antecedentes que manifestaram o quadro alérgico (SOUSA et al., 2010; FERREIRA, INACIO 2018).

O progresso no campo da alergia iniciou em 1869, quando Dr. Charles H. Blackley demonstrou que o pólen era a causa aparente da doença que acometia grande parte da população, a febre do feno (FOTOPOULOU et al., 2018). Os progressos continuaram ao longo dos anos 1900 com o estabelecimento da imunoterapia, uma forma de tratamento, que utilizava extratos alergênicos naturais. Em 1921, Prausnitz e Kustner mostraram que em indivíduos alérgicos a sensibilidade local na pele poderia ser detectada no soro. Com essa descoberta, surgiu o teste de Prausnitz-Kustner, amplamente usado entre 1921 e 1960, que possibilitaria futuramente a descoberta da imunoglobulina E (IgE) (PRAUSNITZ, KUSTNER, 1921, PLATTS-MILLS, 2015; PLATTS-MILLS et al., 2016), e posteriormente seria substituído por um teste mais seguro, o teste cutâneo de puntura (TCP) (BUNNANG et al., 2002).

A alergia é definida como uma reação de hipersensibilidade mediada por mecanismos imunológicos que levam a sinais e sintomas. A atopia é definido como uma predisposição genética para produção específica de IgE contra antígenos específicos e pode ser detectada pela positividade no teste cutâneo de puntura (TCP)

(BALDACCI, OMENAAS, ORYSZCYN, 2001; BROZEK et al., 2017; NİKSARLIOĞLU et al., 2019). Portanto, a atopia refere-se a um fator de risco para alergias, o que não significa necessariamente que o paciente irá desenvolver a doença. Observa-se que apenas cerca de 50% dos pacientes atópicos desenvolvem o quadro de alergia. Porém, nem todo quadro de alergia ocorre pelo mesmo mecanismo dependente de IgE (embora seja o mais comum) (JOHANSSON et al., 2004).

As alergias podem afetar diversos sistemas gerando diferentes sintomatologias clínicas no trato respiratório causando rinite e asma, no sistema cutâneo culminando em urticária e dermatite, ou no sistema ocular resultando em conjuntivite e ceratoconjuntivite, e podem ainda gerar uma condição de síndrome hipereosinofílica ou anafilaxia, quando afetam diversos sistemas ao mesmo tempo (SANCHEZ, SANCHEZ, CARDONA, 2018).

As fontes mais importantes para sensibilização alérgica entre os aeroalérgenos, são os ácaros da poeira domiciliar. Sabe-se que cerca de 10% da população mundial e 90% de pacientes com asma alérgica são sensíveis à ácaros. No Brasil, a prevalência das doenças alérgicas encontradas é alta em comparação a outros países da América Latina e do mundo. A prevalência dos sintomas relacionados à asma apresenta valores médios de 20%, variando de uma região para outra (RUBINI et al., 2017).

As espécies de ácaros clinicamente mais importantes são *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*), *Dermatophagoides farinae* (*Der f*) e *Blomia tropicalis* (*Bt*). Estudos conduzidos no Brasil, nas cidades de São Paulo, Salvador, Uberlândia e Uberaba indicam um prodominância de ácaros das espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae* nos estados de Minas Gerais e Bahia. Entretanto, *B. tropicalis* foi descrita como principal agente causal da asma ou rinite alérgica em pacientes que residem no estado de São Paulo (RIZZO et al., 1997; CHAN et al., 2008; YOKOYAMA, 2014).

1.2 *Blomia tropicalis*

A descrição do gênero *Blomia* ocorreu pela primeira vez em Taiwan e Suriname, o que levou a análises taxonômicas que culminou na caracterização por Van Bronswijk e de Cock, na década de 1970, como um ácaro de armazenamento da espécie *B. tropicalis* (*Bt*) (VAN BRONSWIJK, COCK, 1974; DA SILVA et al., 2017).

Nesta espécie, diversos alérgenos de Bt já foram descritos e sabe-se que são capazes de induzir produção de IgE específica, sendo que a maioria dos alérgenos apresenta índices iguais ou superiores a 50% em testes de ligação à IgE (CHAN et al., 2008; YOKOYAMA, 2019).

Desde as primeiras descrições de sua relevância alergênica, houve um avanço considerável no isolamento de seus componentes alergênicos, abordados por grupos de pesquisa que aplicam abordagens genômicas e proteômicas avançadas. Assim, houve necessidade de desenvolver uma nomenclatura sistemática para alérgenos no início dos anos 80, pois alguns alérgenos foram identificados e os nomes eram inconsistentemente usados nas publicações. Foram identificados 25 componentes de ligação a IgE de *B. tropicalis*, sendo que 13 já são oficialmente aceitos como alérgenos pelo subcomitê de nomenclatura da União Internacional das Unidades Imunológicas (IUIS) (CARABALLO et al., 1994; DA SILVA et al., 2017).

Alérgenos sensibilizantes de ácaros da poeira doméstica, são divididos em grupos, identificados com base no peso molecular e sequência homóloga. Os alérgenos de *Blomia tropicalis* já identificados são do grupo 2 (representados pela proteína epididimal também conhecida como proteína ligadora de colesterol- NPC2); grupo 5 (função desconhecida); grupo 7 (função bactericida); grupo 12 (ligantes de quitina); grupo 13 (proteínas de ligação a ácidos graxos); grupo 19 (homólogo a peptídeo anti-microbiano). Alguns desses alérgenos identificados possuem funções enzimáticas, tais como alérgenos do grupo 1 (cisteína-proteases); grupo 3 (tripsinas); grupo 4 (amilases); grupo 6 (quimiotripsinas); grupo 8 (Glutationa S-transferases), grupos 10 e 11 (tropomiosina e paramiosina respectivamente) (PITTNER, 2004; DA SILVA et al., 2017).

Dentre os alérgenos avaliados de *B. tropicalis*, Blo t 5 é considerado o grupo de maior importância, pois apresenta reatividade à IgE em 40 à 60% dos casos de indivíduos sensíveis a esta espécie de ácaro (LIAW et al., 2001, TSAI et al., 2003, CUI et al., 2018). Sabe-se que Blo t 5 contém um peptídeo sinal de 17 resíduos e uma proteína madura de 117 resíduos, porém sua função molecular permanece desconhecida. Assim, sua análise estrutural possibilitaria uma abordagem para decifrar sua possível função e entender sua alergenicidade, na resposta imune da alergia, contribuindo com o desenvolvimento de reagentes hipoalergênicos para aplicação clínica (CHAN et al., 2008; DA SILVA et al., 2017).

1.3 Resposta imune na patogênese de doenças alérgicas

Como já mencionado, as alergias têm múltiplas causas e, embora a IgE seja o mecanismo prevalente para desenvolver-las não é a única via responsável. As reações de hipersensibilidade tipo I são caracterizadas pela produção de anticorpos IgE específicos contra alérgenos (ACEVEDO et al., 2012). A resposta imune inata e adaptativa no desenvolvimento das doenças alérgicas se iniciam quando as células apresentadoras de抗ígenos (APCs) capturam os alérgenos e os processam, via complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC II), apresentando-os às células T CD4 + *naives*. Após a fase de sensibilização, quando houver o próximo contato do indivíduo com o抗ígeno, a grande maioria dos asmáticos apresentam a resposta inflamatória aguda, também chamada de fase imediata. Assim, as células T CD4 + *naives* se diferenciam em células Th2 específicas que irão produzir citocinas do perfil Th2 orquestrando a resposta inflamatória alérgica (LAMBRECHT et al., 2014; DULLAERS et al., 2017; TAKETOMI et al., 2017).

Quando células T CD4+ *naives* são ativadas mediante a liberação de IL-4 por APCs, haverá ativação de STAT 6, que por sua vez ativará o fator de transcrição GATA 3, levando a transcrição de genes que codificam citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) e à codificação do fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (BULEK et al., 2010; GEORAS; REZAEE, 2014; TAKETOMI et al., 2017).

A presença de citocinas, IL-4, IL-13 e IL-5, são responsáveis por induzir a proliferação de várias populações de células que expressam Fc ϵ RI (receptor de alta afinidade para IgE) presentes em mastócitos, basófilos, e eosinófilos levando ao estabelecimento da fase de sensibilização. Ao se ligarem a IgE, mastócitos sofrem mudanças e liberam uma série de mediadores lipídicos pré-formados (histamina) e neoformados, tais como leucotrienos, prostaglandinas, e citocinas, que são as principais responsáveis pelos sintomas característicos da rinite alérgica, incluindo espirros, coceira e congestão nasal (ROITT, 1999, ABBAS, 2003, HUNT et al., 2008).

Os mediadores induzem o aumento da permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, contração da musculatura lisa, dano epitelial e hiperreatividade brônquica. Estas alterações resultantes do remodelamento e inflamação interferem na arquitetura das vias aéreas, em caso de alergias respiratórias, levando

à persistência da doença observada em alguns pacientes (COHN et al, 2004, SCHMIT et al., 2017).

Alguns alérgenos podem estimular perfil de células Th2 utilizando outros mecanismos. Alérgenos proteolíticos se ligam a receptores de reconhecimento padrões (PRRs), tais como receptores protease-ativadores (PARs), ou a receptores semelhantes ao Toll (TLRs), induzem resposta inflamatória. Este mecanismo pode ser desencadeado também pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por células danificadas. Este efeito pró-inflamatório favorece a produção de citocinas como linfoipoietina estromal tímica (TSLP), interleucina 25 (IL-25) e interleucina 33 (IL-33). IL-25 e IL-33 podem levar a uma regulação positiva de NF- κ B que junto com TSLP ativam STAT-5 resultando no aumento da expressão de genes de perfil Th2 (LAMBRECHT, HAMMAD, 2014; DIVEKAR, KITA, 2015; TAKETOMI et al., 2017).

A quimiotaxia de eosinófilos é o mecanismo principal na reação tardia, causada por mediadores inflamatórios que são advindos da reação imediata que recrutam diversas células inflamatórias, tais como: mastócitos, linfócitos T e eosinófilos, os quais migram para o local (diapedese), rompendo e remodelando o tecido, causando diversos sintomas no indivíduo alérgico (MIN, 2010; STONE, PRUSSIN, METCALFE, 2010).

1.4 Diagnóstico da alergia

Para diagnosticar qualquer processo alérgico é necessária uma combinação de investigação clínica e testes diagnósticos. Para determinar se a etiologia é alérgica é necessário avaliar a presença de um mecanismo subjacente de hipersensibilidade. As medidas de função pulmonar e provas de responsividade das vias aéreas, além da anamnese, têm sido utilizadas para complementar alguns estudos de prevalência de alergia em crianças (LENNEY et al., 2018). A maioria das condições alérgicas é frequentemente subdiagnosticada, e este desconhecimento a respeito do quadro clínico do paciente alérgico, se torna um obstáculo inicial à escolha da medicação para tratamentos. Neste sentido, muitas pessoas vivem com limitação da qualidade de vida e não recebem o tratamento adequado (DENNIS et al., 2004, CARABALLO et al., 2016).

O conhecimento a cerca da atividade específica de componentes moleculares e o desenvolvimento de um *pool* de alérgenos pode ser útil para o monitoramento da

alergia. Os painéis desenvolvidos para este fim compreendem grupos de alérgenos mais prevalentes, como por exemplo alérgenos alimentares ou de alérgenos inalantes. O resultado negativo ajuda no diagnóstico diferencial, pois poupa a execução de múltiplos testes. Em casos de resultado positivo deve-se prosseguir na investigação para identificação específica do agente sensibilizador (PLATTS-MILLS et al., 1997, VON MUTIUS, 2000, SOUSA et al., 2010). Portanto, a pesquisa *in vitro* de IgE e o desenvolvimento de um teste específico relacionado à gravidade da doença oferece uma importante contribuição para o diagnóstico de alergia, sendo que sua correta interpretação é fundamental considerar os resultados.

O teste cutâneo de puntura (TCP) é a ferramenta diagnóstica mais comum usada pelo alergologista, sendo considerado o principal método para confirmar sensibilização alérgica mediada por IgE. É caracterizado pela introdução do antígeno na pele, o que leva ao desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade imediata (MOGHTADERI et al., 2015).

Quando o alérgeno se liga à IgE na superfície de mastócitos e basófilos de indivíduos sensibilizados, há liberação de histamina e como, consequência, os sinais e sintomas como eritema, pápula e prurido. Entretanto, uma variedade de fatores pode influenciar o resultado de TCPs, entre eles, o local usado para teste cutâneo, a hora do dia, a idade, o sexo, a raça, o tratamento medicamentoso concomitante, e ainda qualidade da composição e conteúdo de alérgenos, sendo estas últimas, análises obrigatórias para obter resultados confiáveis. Ainda assim, é a primeira escolha de método diagnóstico por ser considerado pouco invasivo e possuir boa reprodutibilidade. Além disso, tem caráter educativo para os pacientes uma vez que permite visualizar na pele a resposta inflamatória alérgica (MOTTA et al., 2005, WAGNER, RUDERT, 2019).

A determinação de IgE específica *in vitro* é frequentemente utilizada sob condições clínicas especiais (doenças de pele, pacientes com alto risco de anafilaxia à exposição a alérgenos). Os métodos mais utilizados atualmente na sorologia para detecção de IgE baseiam-se no princípio bioquímico de imobilização do alérgeno em uma fase sólida, que é incubada com soro ou amostra de plasma e, em seguida, detectada por anti-IgE acoplada a uma enzima que permite geração e leitura de sinais por espectrofotometria, fluorometria ou quimiluminiscência (PEREIRA et al., 2005; ECKMAN et al., 2009; VALERIO et al., 2015).

A determinação de IgEs pode ser feita por testes *singleplex* (monocomponentes), como a tecnologia ImmunoCAP, ou *multiplex*, como a plataforma ISAC -*ImmunoCAP Solid-Phase Allergen Chip*. O maior portfólio de componentes pode ser oferecido por testes comerciais que medem os níveis de IgE específicos de maneira quantitativa (componentes ImmunoCAP ®; ThermoScientific) ou semi-quantitativos (ImmunoCAP ® ISAC; ThermoScientific) (CANONICA et al., 2013; VAN HAGE et al., 2017; BOJCUKOVA et al., 2019).

ImmunoCAP é um ensaio imunoenzimático fluorescente, calibrado com o padrão internacional de referência para IgE da Organização Mundial de Saúde (OMS) expresso em kU/L. ImmunoCAP®Isac consiste em um imunoensaio, baseado em *microarray*, que permite determinar anticorpos IgE específicos à 112 componentes alergênicos obtidos de extratos naturais ou proteínas recombinantes. Entretanto, ao usar o ISAC, é possível que anticorpos da classe IgG gerado como resultado da ativação do sistema imunológico em pacientes alérgicos, possa interferir na ligação do alérgeno a IgE. Os resultados da IgE medidos no ImmunoCAP e ISAC podem, portanto, divergir potencialmente devido a concentração de IgGs (CANONICA et al., 2013, LUPINEK et al., 2014, KOS et al., 2017).

Os testes de ativação de basófilos (TAB), também são utilizados na investigação da alergia, principalmente para detecção de alérgenos inalantes, porém, não se realiza habitualmente na rotina laboratorial, pois são dispendiosos e não estão disponíveis para a maioria dos clínicos. Alguns TAB baseiam-se na liberação de mediadores como a histamina e o LTC4, outros baseiam-se na observação microscópica direta da degranulação dos basófilos, outros na avaliação da expressão por citometria de fluxo de marcadores de ativação como o CD63. Basófilos, quando ativados, liberam mediadores e aumentam a expressão de determinados marcadores, que podem ser detectados por citometria de fluxo (RAMOS et al., 2013; SANTOS et al., 2014; DENG, YIN, 2019).

O marcador de ativação de basófilos, CD203c, foi descrito com importante marcador para diferenciar clinicamente as fases de sensibilização e alergia. A descoberta desses marcadores foi responsável pelo desenvolvimento do FAST (*Flow Cytometric Cellular Allergen Stimulation Test*) que permite quantificar marcadores celulares, e propriedades como tamanho, complexidade e fenótipo celular. Seu fundamento no diagnóstico da alergia é baseado no fato de que basófilos, ao serem

sensibilizados pela ligação de IgE ao receptor de superfície FcεRI, ativam-se na presença do alérgeno expressando alta concentração de marcadores de superfície como CD45, CD63, CD69 e CD203c que poderão ser detectados na superfície celular (CARRAPATOSO et al., 2005, PEREZ et al., 2014; LÖTZSCH et al., 2016).

Existem ainda outros recursos menos onerosos, simples e também sensíveis para determinar IgE específica tais como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Além destas técnicas utilizadas, outras ferramentas laboratoriais estão disponíveis para complementação do diagnóstico da doença alérgica como hemograma e a análise de secreções, que podem detectar eosinofilia (BOM et al., 2013).

1.5 Tratamento das doenças alérgicas

As alergias são condições difíceis de tratar, e independentemente do tipo de alergia, o tratamento consiste de três etapas: a profilaxia, imunomodulação e farmacoterapia. Quando não se pode evitar o contato com alérgenos, os tratamentos atuais para as doenças alérgicas incluem a imunoterapia alérgeno específico (ITE) ou a utilização de fármacos, tais como corticosteroides, anti-histamínicos ou antileucotrienos, por exemplo (NOH, PARK, HA, 2019).

A imunoterapia alérgeno-específica é um tratamento imunomodulador antígeno-específico utilizado para dessensibilizar o paciente em relação ao agente causal da alergia. Protocolos de dessensibilização tem como objetivo induzir um estado de tolerância que pode ser transitória ou duradoura. O resultado depende do tempo que determinado alérgeno é administrado (SMALDINI et al., 2015; FERREIRA, INACIO, 2018).

O manejo farmacológico da rinite baseia-se no uso de esteroides nasais e anti-histamínicos. Para o alívio sintomático da asma, são utilizados principalmente corticosteroides e agonistas de receptores β2 adrenérgicos de longa duração (SOYKA et al., 2012). Porém, o uso de antagonistas dos receptores de leucotrienos (ARLT), o tiotrópico, um antagonista muscarínico de longa ação (LAMA), e anti-IgE (omalizumabe) (BRODIE et al., 2015, McIVOR, McIVOR, 2017) podem ser considerados de acordo com a gravidade dos sintomas e o perfil de segurança (LIENDO et al., 2017).

1.5.1 Imunoterapia Alérgeno Específica (ITE)

A ITE, introduzida em 1901, ainda é uma forma de tratamento capaz de modificar o quadro imunológico das doenças atópicas. Os principais objetivos da imunoterapia específica a alérgenos são diminuir os sintomas desencadeados por alérgenos e prevenir a recorrência da doença a longo prazo. Os alérgenos podem ser administrados via subcutânea (imunoterapia subcutânea- ITSC), com quantidades gradualmente crescentes até se atingir uma dose que seja eficaz na indução da tolerância imunológica (MOOTE, KIM, ELLIS, 2018).

As formulações de comprimidos sublinguais utilizados na imunoterapia sublingual (ITSL) é outra forma de administração da imunoterapia. Estas formulações podem ser autoadministradas de forma regular sob a língua, e diferente da ITSC, não requerem uma dosagem extensa do extrato de alérgeno. Atualmente, existem apenas 4 comprimidos para ITSL aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) disponíveis nos Estados Unidos e Canadá: Oralair®, Grastek®, Ragwitek® and Acarizax™ (gramíneas-5 -alérgenos do grupo 5, capim-Timóteo, *Tília cordata*, ácaros) para o tratamento da rinite alérgica (MOOTE, KIM, ELLIS, 2018; MERCK CANADA INC., 2017; ALK-ABELLÓ A/S, 2017; RICE et al., 2018).

A ITE é geralmente realizada com extratos naturais. Assim, uma vez que utilizados mais alérgenos do que necessário para a dessensibilização, novas sensibilizações podem ser induzidas (ABRAMSON, PUY, WEINER, 2010). O conteúdo alergênico dos extratos é difícil de padronizar, especialmente porque cada paciente pode ser sensibilizado a diferentes componentes alergênicos. Com o advento de alérgenos recombinantes a ITSL tem mostrado resultados mais promissores (JAYE, 2019).

A imunoterapia bem sucedida tem sido associada a uma mudança na resposta imune do tipo 2 (Th2) das células T auxiliares, que estão associadas ao desenvolvimento de condições atópicas, a um melhor equilíbrio com mais respostas imunes Th1. Na resposta imune inicial da ITE observa-se a produção de anticorpos específicos da classe IgE e subclasse IgG1, com posterior aumento de níveis de anticorpos da classe IgA e subclasse IgG4 alérgeno-específicos (AKDIS; AKDIS, 2014).

Na ITE, observa-se a indução de células T reguladoras (Treg), específicas para alérgenos, que produzem a citocina anti-inflamatória, a interleucina 10 (IL-10), e fator de crescimento transformador (TGF-β). Foi demonstrado que a IL-10 reduz os níveis de anticorpos imunoglobulina E (IgE) e aumenta os níveis de anticorpos IgG4, que se torna predominante na ITE prolongada. O anticorpo IgG4 é conhecido por sua ação ‘bloqueadora’, ao competir com anticorpos da classe IgE e por capturar o alérgeno antes que este chegue à célula efetora (COX et al., 2011; MOOTE, KIM, ELLIS, 2019).

A redução de IgE associado ao aumento dos níveis de IgG1, IgG4 e IgA culmina na regulação negativa da resposta alérgica em pacientes submetido à imunoterapia com alérgenos. A ITE também reduz o recrutamento de mastócitos, basófilos e eosinófilos para a pele, nariz, olhos e mucosa brônquica após a exposição a alérgenos. Outro efeito conhecido pelo aumento de anticorpos IgG4 é o bloqueio da liberação de histamina dependente de IgE, induzida por alérgenos nos basófilos (TILL, 2004; PASSALACQUA, 2007; FUJITA et al., 2012; SATITSUKSANOA et al., 2018).

1.5.2 Corticosteroides

A condição de asma, é uma síndrome complexa, com diferentes fenótipos clínicos em adultos e em crianças. Este quadro é desenvolvido pela resposta alérgica, que desencadeia um quadro de hiperresponsividade brônquica das vias aéreas inferiores, ocasionando sintomas como sibilância, aperto no peito, tosse e dispneia (MINCHAM et al., 2019). A grande variedade de apresentações clínicas e de evolução é um obstáculo para uma classificação, passo importante para definições diagnósticas e terapêuticas (ARENDS et al., 2005; CAMPOS, 2007).

Embora 60% dos pacientes asmáticos tenham relatado quadro clínico completamente controlados, de acordo com critérios estabelecidos pela organização médica GINA (*Global Initiative for Asthma*), apenas 8% dos indivíduos preenchem os critérios da diretriz de asma bem controla (GINA, 2017). No tratamento da asma brônquica, os corticosteroides são os mais potentes e fisiológicos dos anti-inflamatórios, considerados, portanto, os principais medicamentos e mais utilizados atualmente. Sabe-se que quando utilizados por via inalatória e/ou sistêmica, há um controle de forma eficiente da sintomatologia, proporcionando melhora na qualidade

de vida do paciente. Entretanto, estes medicamentos apresentam desvantagens por gerar efeitos secundários indesejáveis como distúrbios no humor, transtorno no apetite, anormalidade dos índices glicêmicos em pacientes diabéticos, descontrole da pressão arterial, e distúrbios de imunidade (MINISTERIO DA SAUDE, 2010; BRUNTON, 2012; BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2018).

Para caracterização do quadro da asma, a responsividade dos indivíduos ao tratamento é considerada. Assim, pacientes que apresentam graves sintomas e limitação ao fluxo de ar, podem ser classificados com quadro grave de asma. Porém se responderem bem ao tratamento e necessitar de uma dose baixa de medicação controladora, pode ser caracterizada como asma leve ou moderada (IV DIRETIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006).

Dentre as mudanças estruturais que ocorrem na asma grave, o remodelamento das vias aéreas, está associado ao pior prognóstico clínico e de maior risco de morbidade e mortalidade. Esse processo inflamatório crônico pode ocorrer pela atuação de enzimas proteolíticas como triptase, quimase e metaloproteases (MMP-9) de mastócitos e eosinófilos. As alterações estruturais que ocorrem no remodelamento brônquico podem ser resultado da produção exacerbada de fatores de crescimento pró-fibróticos, como por exemplo o TGF- β (*transforming growth factor β*), que estimula fibroblastos a se diferenciarem em miofibroblastos (MATTOS et al., 2002; BERGERON et al., 2010). Alguns estudos mostraram que o efeito de corticosteroides sobre ações na remodelação das vias aéreas na asma pode ocorrer devido a inibição de TGF- β (LACHAPELLE et al., 2018).

Além disso, foi descrito que os corticosteroides têm efeitos também sobre a transcrição de genes, aumentando a transcrição de genes de citocinas regulatórias, como IL-10 e suprimindo a transcrição de genes pró-inflamatórios, como TNF- α , e de moléculas de adesão endotelial. Sua ação pode culminar na indução do apoptose em células inflamatórias, diminuindo a lesão do epitélio nas vias respiratórias e permeabilidade vascular, e seus efeitos sistêmicos podem ser diminuídos e até eliminados caso sejam utilizados diretamente nas vias respiratórias através de inalação (BRUNTON, 2012).

O Dipropionato de Beclometasona, um corticosteroide inalatório (CI), tem sua eficiência sistêmica comprovada ao ser administrado de forma tópica (RAISSY et al., 2013). Os CIs disponíveis mais utilizados como fármacos antiasmáticos, são a

Beclometasona, a Fluticasona, Budesonida e a Ciclesonida. Foi realizado um estudo comparativo com essas drogas, onde demonstrou-se que a Fluticasona é o medicamento mais efetivo em relação ao tempo que mantém o paciente livre de sintomas e que promove melhor sensação de bem-estar. Entretanto, é uma droga de alto custo, sendo inacessível a grande parte da população que é acometida por doenças alérgicas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2013).

1.5.3 15-desoxi-A12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2)

As prostaglandinas (PGs) são compostos lipídicos sintetizados a partir do ácido araquidônico (AA), que é composto por 20 ácidos graxos poli-insaturados contendo carbono. Sua produção pode aumentar em resposta a diversos estímulos, produzindo amplo espectro de efeitos biológicos, entre eles hemostasia, trombose, secreção gastrintestinal, contração vascular, aglutinação de plaquetas e mediação inflamatória (RICCIOTTI, FITZGERALD, 2011).

As PGs têm uma gama diversificada de ações, dependendo do seu tipo e destino da célula. Elas são divididas em PGs convencionais, como PGD2, e PGs de ciclopentenona (cyPGs), como a 15-desoxi-A12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2). 15d-PGJ2 é um dos cyPGs mais bem definidos, e suas funções são principalmente dependentes ou independentes de um receptor ativado por proliferador (principalmente o subtipo gama, PPAR γ). Entre suas ações, já foram descritas atividades anticancerígenas significativas, propriedades antiinflamatórias e anti-angiogênicas (LEE et al, 2016; BEHL et al., 2016).

A família de receptores de hormônios nucleares ativados por proliferadores de peroxissomo (PPAR), compreendendo PPAR α , PPAR β / δ e PPAR γ , está envolvida na patogênese da asma. Sabe-se que a ligação de agonistas a esses receptores modula a intensidade, duração e resultados de respostas inflamatórias, e que os alvos celulares desta função anti-inflamatória são as células inflamatórias do sistema imune, e células estruturais das vias aéreas que desempenham papéis significantes durante a inflamação (DESVERGNE; WAHLI, 1999; LI et al., 2008).

Como agonistas do receptor PPAR α pode-se destacar ácidos graxos poliinsaturados e saturados e eicosanoides, bem como derivados sintéticos do ácido fíbrico e ácido pirinâmico. Já em relação a PPAR γ , foram descritos ácidos graxos

saturados e poliinsaturados, derivados dos eicosanóides, como a 15-desoxi-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) já citada, ácidos graxos nitrados, e tiazolidinedionas (TZDs) (LI et al., 2008; BELVISI, MITCHELL, 2009; WAHLI, MICHALIK, 2012; BANNO et al., 2018).

1.6 Modelos experimentais de alergia respiratória

Modelos murinos para sensibilização alérgica têm sido amplamente utilizados para analisar os mecanismos da doença, bem como para compreender o comportamento das células, modificações genéticas, e características inflamatórias. Além disso, tem sido útil no desenvolvimento de testes com a finalidade de prever a segurança de novos agentes terapêuticos desenvolvidos para doenças alérgicas, que objetivam reduzir sintomas como a inflamação pulmonar, a hipersecreção de muco, a hiper-responsividade das vias aéreas e a produção de IgE específica (SHIN, TAKEDA, GELFAND, 2009; KAIKO, FOSTER, 2011).

A asma alérgica é causada predominantemente por um perfil de resposta celular do tipo Th2. Os primeiros modelos experimentais de asma foram desenvolvidos em uma variedade de espécies animais. Embora as cepas C57BL /6 e A/J também tenham sido utilizadas com sucesso no desenvolvimento em modelos experimentais de doença alérgica respiratória, estudos mostraram que camundongos BALB/c é a linhagem de animais mais propensas a desenvolver resposta imune do perfil Th2, portanto são mais utilizadas (GUEDERS et al., 2009; WANG et al., 2019).

Os camundongos podem ser sensibilizados com uma série de proteínas, tais como a Ovalbumina (OVA) ou extrato de ácaros, sendo utilizados como adjuvantes o hidróxido de alumínio ou baixas doses de endotoxinas. Este processo resultará em uma resposta Th2 polarizada e produção de IgE específica ao alérgeno (CONRAD et al., 2009).

A IgE é o principal anticorpo investigado para confirmação do quadro alérgico em camundongos. Entretanto, outros fatores imunológicos também são analisados, tais como citocinas, fatores de crescimento de colônia de granulócitos, marcadores de superfície celular e análises histológica (SHILOVSKIY et al., 2019). Uma vez que a sensibilização tenha ocorrido, a administração repetida de alérgenos leva ao desenvolvimento de características da asma alérgica humana, com quadros de

inflamação eosinofílica, secreção de muco e remodelação das vias aéreas (COHN et al., 1997; LAMBRECHT, HAMMAD, FAHY, 2019).

Nos modelos de indução de asma, geralmente observa-se a presença de linfócitos Th2 acompanhado de um aumento significativo do número total de células no lavado broncoalveolar (LBA), produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e de anticorpos IgE e IgG1 OVA-específicos (VIEIRA et al., 2007). Além disso, tem sido demonstrado recentemente a importância de citocinas descritas como a IL-25, IL-33, TSLP, IL-23 e IL-17 (WAKASHIN et al., 2008; CHOW et al. 2009, CHAN et al., 2019).

Modelos experimentais de asma aguda em camudongos têm sido reproduzido com as características da asma, como altos níveis de imunoglobulina E (IgE) sérica total e específica, inflamação das vias aéreas, hipertrofia epitelial, hiperplasia de células caliciformes e hiperresponsividade das vias aéreas (AHR). Por outro lado, protocolos de asma crônica apresentam desvantagens como broncoconstricção tardia não-fisiológica, falta de cronicidade em resposta ao alérgeno e tolerância após exposição repetida ao alérgeno (AUN et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver novos ensaios para detecção de anticorpos IgG4 específico ao alérgeno rBlo t 5, e novos esquemas de tratamento em modelo experimental de asma aguda.

2.2 Específicos

- Produzir e purificar o alérgeno recombinante Blo t 5 (rBlo t 5) do ácaro *Blomia tropicalis*.
- Realizar a conjugação de microesferas magnéticas (*beads*) com alérgeno rBlo t 5.
- Verificar a eficiência de conjugação do alérgeno rBlo t 5 por meio da utilização de testes imunológicos.
- Verificar a capacidade de um ensaio imunoenzimático baseado microesferas magnéticas (*beads*) em detectar amostras positivas e negativas para anticorpos IgG4.
- Desenvolver um ensaio de fluorescência baseado em microesferas magnéticas (EFB) para detecção de anticorpos IgG4 específicos ao alérgeno rBlo t 5.
- Induzir asma aguda em modelo experimental de camundongos BALB/c utilizando ovalbumina (OVA).
- Comparar a expressão de citocinas pró-inflamatória (IL-5) e anti-inflamatória (IL-10) em camundongos sensibilizados a OVA submetidos a diferentes tratamentos.
- Analisar infiltrado inflamatório e deposição de fibras colágenas em cortes histológicos em modelo experimental de asma tratados furoato de fluticasona e/ou 15d-PGJ2.
- Avaliar parâmetro respiratório de camundongos tratados com furoato de fluticasona e/ou 15d-PGJ2.
- Analisar por meio dos resultados obtidos, qual a melhor condição de tratamento para asma aguda em modelos experimentais.

3. JUSTIFICATIVA

Pelas características epidemiológicas e pela diversidade de possíveis fenótipos, a alergia é considerada de difícil direcionamento em relação a tratamentos. Assim, tem sido despertado cada vez mais o interesse do conhecimento em relação à sua fisiopatologia, à compreensão dos desencadeantes do processo inflamatório, e métodos diagnóstico. Sabe-se que o uso de medicamentos que oferecem ao paciente um alívio sintomático é generalizado, e a Imunoterapia Alérgeno Específica (ITE) é recomendada em alguns casos específicos, porém é considerado um método mais invasivo que algumas vezes tem resposta não satisfatória por não ter um acompanhamento eficiente no quadro clínico dos indivíduos alérgicos.

A ITE é uma opção capaz de modificar o curso natural das doenças alérgicas, que tem como consequência, a produção de anticorpos IgG4, que são importantes para predição do quadro do processo alérgico. Com a finalidade de analisar o perfil de mudanças no processo alérgico são necessários a realização de testes laboratoriais que possibilitem detectar níveis de IgE e IgG4 específicos a alérgenos. O estudo desenvolvido implica no desdobramento de um método que facilite o acompanhamento de pacientes utilizando a detecção de anticorpos IgG4 alérgenos específicos, de forma mais vantajosa em relação aos testes disponíveis.

Atualmente os corticosteroides são a base do tratamento da asma, atuando como eficazes anti-inflamatórios. Embora, paradoxalmente em altas doses, causem efeitos adversos e atue no remodelamento estrutural das vias áreas. Portanto, a busca por terapias farmacológicas que possam reduzir as doses de corticosteroides ou mesmo substituí-las no tratamento da asma, se faz necessária e de alta prioridade, principalmente para indivíduos asmáticos cujos sintomas não são bem controlados pelas medicações disponíveis atualmente.

CAPÍTULO 1

*DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO BASEADO EM
MICROESFERAS MAGNÉTICAS PARA DETECÇÃO DE
ANTICORPOS IgG4 ANTI-Blo t 5*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de proteína recombinante Blo t 5

As etapas de clonagem gênica e transformação bacteriana foi realizada em colaboração como o Prof. Carlos Priminho Pirovani do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Bahia. Para seleção da sequência gênica codificante do alérgeno Blo t 5 utilizou-se os dados armazenados nos bancos de genes, disponíveis no sítio do National Center for Biotechnology Information - NCBI (código de acesso U59102). O gene codificante da proteína rBlot 5 (537 pares de bases - pb) do ácaro *B. tropicalis* foi clonado no vetor pET28a (Merk Millipore, Massachusetts, USA) utilizando os sítios de clonagem para as enzimas de restrição BamHI/Xhol. Este tipo de construção gênica introduz sequência gênica codificante de uma cauda de histidina (6x His; His-tag) upstream / down stream do gene de *Blo t 5* facilitando no processo de purificação das proteínas recombinantes por meio de cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

Para produção de proteínas recombinantes, a cepa bacteriana de *Escherichia coli* BL21 (DE3) códon plus foi então transformada com o plasmídeo recombinante e cultivadas em meio de cultura Lúria Bertani ágar (LB-ágar) suplementado com canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (20 µg/mL). Clones de *E. coli* transformados com o gene de interesse foram selecionados e utilizados para produção do alérgeno recombinante Blo t 5 (*rBlo t 5*). Para a expressão de *rBlo t 5*, 1L (um litro) de cultura bacteriana foi mantida sob agitação a 200 rpm à temperatura de 37°C até a cultura atingir uma densidade óptica (DO) entre 0,7 e 0,8 no comprimento de onda de 600 nm. A seguir, adicionou-se 0,2 mM de isopropyl-β-D- thiogalactopyranoside (IPTG) ao meio de cultivo bacteriano, sendo estes incubados a 37°C sob agitação 200 rpm por 5 horas. A cultura foi centrifugada a 3.000 xg à 4°C durante 20 min, sendo o sobrenadante descartado e o pellet armazenado à -20°C para utilização posterior na purificação de rBlot 5. A expressão da proteína rBlo t 5 foi verificada utilizando análise do conteúdo protéico das amostras por SDS-PAGE 14% como previamente descrito por Laemmli (1970).

4.2 Purificação de *rBlo t 5*

As proteínas *rBlo t 5* em fusão His-tag foram purificadas a partir do lisado de *E. coli* em condições não desnaturantes utilizando cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA agarose (GE Healthcare®) conforme protocolo do fabricante (Sigma, HisTrap™ High Performance). Para purificação proteica, a massa celular (pellet bacteriano) foi suspensa em 3 mL de tampão para lise celular (50 mM Tris pH 8,0; 500 mM de NaCl, 0,2% de Triton X-100, 10 mM de Imidazol, 200mM de Sacarose) contendo 1 mM do inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). Após a suspensão celular em tampão de lise, foi adicionada a lisozima 1 mg/mL e o material foi homogeneizado e incubado no gelo por 15 min. Posteriormente, a amostra foi sonicada em amplitude 20 em 6 ciclos de 10 segundos com intervalo de 10 segundos entre cada sonicação. Em seguida centrifugada a 10.000 x g por 30 min, à 4°C. O pellet foi descartado e sobrenadante foi então coletado.

A purificação da *rBlo t 5* em resina de Ni-NTA agarose (GE Healthcare®) foi realizada com aplicação de 10 mL do sobrenadante na resina. Em seguida, a resina foi lavada com 5 mL do tampão de lavagem contendo 50 mM Tris (pH 8,0), 500 mM NaCl, seguida de nova lavagem com tampão contendo 50 mM de Tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,2% de Triton X-100 e 10 mM de Imidazol. Para eluição da amostra foi utilizado um tampão 50 mM Tris (pH 8,0) suplementado com 200 mM de Imidazol. As frações contendo as proteínas eluídas foram analisadas em SDS-PAGE 14%. As amostras contendo *rBlo t 5* foram selecionadas e dialisadas por 4 trocas em solução tamponada fosfato (PBS) por período 24 horas. O conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Por fim, a resina agarose Ni-NTA foi regenerada utilizando solução (tampão 50 mM Tris, pH 8,0; 500mM de Imidazol, 1M NaCl), lavada com água ultrapura e armazenada com etanol 20%, conforme instruções do fabricante.

4.3 Produção de anticorpo policlonal anti-*rBlo t 5*

A produção de anticorpos policlonais anti-*rBlo t 5* foi realizada no Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os protocolos utilizados estão de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo comitê de ética na utilização de animais - CEUA da UFU (105/15) (Anexo I).

Camundongos machos Balb/c, pesando entre 20 a 25 gramas, provenientes de Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, foram sensibilizados de acordo com protocolo previamente descrito (OLIVEIRA, 2018). Foi feita a injeção intraperitoneal (i.p.) de 20 µg de *rBlo t 5* por quatro vezes, em intervalos de uma semana, até o 25º (D25) dia do protocolo. Sete dias após a última sensibilização (D32), os animais foram, nebulizados com 10µg de *rBlo t 5* por 3 dias seguidos. O sucesso da imunização foi monitorado por ELISA indireto utilizando amostras de sangue obtidas pelo plexo orbital, nos dias 21 (D21) e 40 (D40) do protocolo.

4.3.1 Detecção de anticorpos IgG anti-*rBlo t 5* em amostras de soros de camundongos

Para detecção de IgG específica a *rBlo t 5* no soro de camundongos Balb/c imunizados, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 3 µg/poço de *rBlo t 5* diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M; pH 9,6), *overnight* à 4°C. No dia seguinte, elas foram lavadas com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) e os sítios inespecíficos de ligação dos poços foram bloqueados com PBS-T Mólico 5% (PBS-TM 5%) por 1 hora a temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBS-T e adicionadas as amostras de soro diluídas (1:50) em PBS-TM 1%, seguido de incubação por 1 hora à 37°C. Após lavagens foi adicionado aos poços, 50 µL (1:1000) do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, E.U.A.) por 1 hora a 37°C. A reação foi desenvolvida com 10 mM 2,2'-diazino-bis-3- ethyl-benzothiazoline sulfonic acid (ABTS; ® Sigma-Aldrich, EUA) em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de água oxigenada. Toda reação foi desenvolvida em triplicata. As medições de absorbância foram realizadas a 405 nm utilizando o *Espectrofotômetro de Microplacas* (*Epoch BioTek Instruments, Inc., USA*), e os níveis de anticorpos IgG foram expressos em Índice ELISA (IE) (IE = DO amostra/ *cut off*). O *cut-off* é a média aritmética dos valores de DO dos soros controles negativos acrescidos de três desvios padrões. Foram considerados como positivos os valores de IE acima de 1,0.

4.4 Mensuração de IgG4 específico a rBlo t 5 em soro de pacientes

Amostras de sangue de 10 pacientes com sintomas alérgicos foram coletados no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica de Uberlândia (UFU). O soro obtido foi aliquotado em duas amostras, e foram armazenados e congelados (-20 ° C) até o uso. O consentimento por escrito para utilização das amostras foi obtido por meio de um Termo de Consentimento livre e esclarecido de todos os pacientes adultos que aceitaram participar da pesquisa e a aprovação ética foi concedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Brasil (Protocolo 3.342.127) (Anexo II).

Para identificar IgG4 anti-Blo t 5 nos soros de pacientes, foi realizado o ensaio imunoenzimático, ELISA indireto. Placas de microtitulação de alta afinidade, com 96 poços Corning Incorporated Costar® (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com rBlo t 5 (30µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato 0.06 M (pH 9.6) por 18 horas à 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas (150 µL/poço) com PBS-T contendo BSA 1% (PBS-T/BSA 1%) por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, os soros foram diluídos 1:5 em PBS-T/BSA 1%, adicionados em duplicata (50 µL/poço) e incubados por 1 hora a T.A., seguido da incubação com anticorpo secundário biotinilado anti-IgG4 humano (Sigma-Aldrich) diluído 1:1000 em PBS-T/BSA 1% (50 µL/poço) por 1 hora a 37°C. A reação prosseguiu com a adição do conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma), diluído 1:500 em PBS-T/BSA 1% (50 µL/poço), que foi incubada a 37°C durante 30 minutos à temperatura ambiente. O ensaio (reação) foi desenvolvido com ABTS (®Sigma-Aldrich, EUA) em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de água oxigenada. As medições de absorbância foram conduzidas a 405 nm utilizando o Espectrofotômetro de Microplacas (Epoch BioTek Instruments, Inc., USA), e os níveis de anticorpos foram expressos em IE. Sendo considerados como positivos os valores de IE acima de 1,0.

4.5 Acoplamento do alérgeno rBlo t 5 à microesferas contendo grupo químico N-hidroxisuccinimida (NHS)

O protocolo de conjugação das *beads* N-Hidroxisuccinimida (NHS) (Pierce™ NHS Activated Magnetic Beads) ao antígeno foi realizado segundo orientações do

fabricante (Thermo Scientific™) (Fig. 1). A concentração final das esferas magnéticas acopladas à proteína é de 10 mg / mL. As microesferas magnéticas (300 μ L) foram colocados em tubos de microcentrifuga e lavados em solução de lavagem (ácido clorídrico 1 mM) gelado por 15 segundos. Com o auxílio de um suporte magnético, as *beads* foram coletadas e descartado o sobrenadante. As microesferas magnéticas (300 μ L) foram incubadas com 300 μ L de solução proteica (90 μ g de *rBlo t 5* em tampão Borato 50mM, pH 8,5) e agitadas durante 2h a temperatura ambiente. As *beads* coletadas foram lavadas com tampão glicina 0,1M (pH 2,0) três vezes, e posteriormente com água ultrapura. Em seguida, foi adicionado às microesferas, etanolamina (3M, pH 9,0) e incubadas por 2h à temperatura ambiente sob agitação. Após esse período, foram lavadas com água ultrapura e estocadas em tampão de armazenamento constituído de 50 mM borato (pH 8,0) suplementado com azida sódica a 0,05% à 4°C. Para controle da conjugação das *beads* com a proteína de interesse (*rBlo t 5*), foi realizado o acoplamento às *beads* com a proteína colágeno, utilizando protocolo descrito acima.

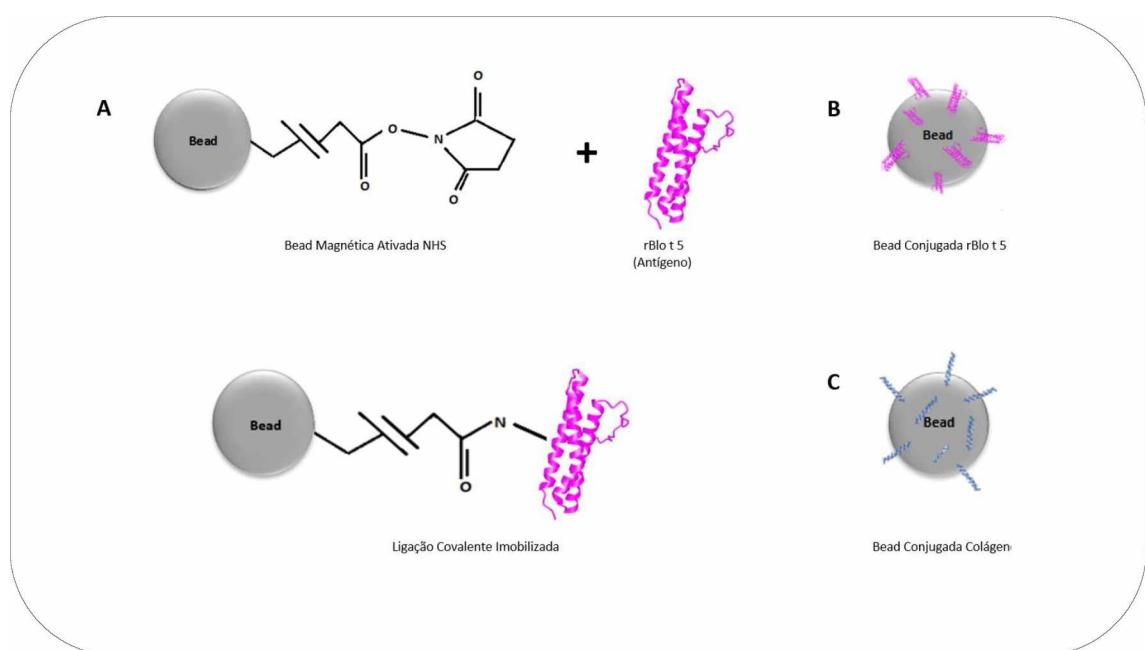


Figura 1. Diagrama representativo para acoplamento de antígenos às beads funcionalizadas. (A) As esferas magnéticas ativadas contêm grupos funcionais N-hidroxi-succinimida (NHS) que ao serem incubadas com proteínas reagem espontaneamente com aminas primárias formando ligações amida estáveis. As ligações covalentes formadas na superfície das beads são altamente resistentes. Após o processo de conjugação, as microesferas apresentam um terminal funcional acoplado com antígenos recombinantes de *Bloomia tropicalis* (*rBlo t 5*) (B) ou acoplados a colágeno (C).

4.5.1 Análise de conjugação das *beads* NHS

Para confirmar a ligação covalente das *beads* com *rBlo t 5*, foi realizado ELISA utilizando um *pool* de soros positivos e um *pool* de soros negativos para IgG provenientes de amostras dos soros de camundongos imunizados com este antígeno. Microtubos contendo as microesferas magnéticas foram incubados por 1h com 50 µL/poço das amostras de soro (diluído 1:50 em PBS-TM 5%) à 37°C. Após este período, com auxílio de um suporte magnético, as esferas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% Tween 20. Em seguida, foram adicionados 50µL/tubo do conjugado anti-IgG de camundongo biotinilado diluído em PBS-TM 1% (1:1000) (Sigma Aldrich), sendo incubadas novamente a 37 °C, por 45 minutos. A reação foi incubada com estreptavidina-peroxidase (Sigma Aldrich) (diluída 1:500) e revelada com ABTS (Sigma Aldrich) em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de água oxigenada. As medições de absorbância foram conduzidas a 405 nm no espectrofotômetro de microplacas (*Epoch BioTek Instruments, Inc., USA*) e os resultados foram expressos em D.O. As reações foram realizadas em triplicatas.

Para obtenção de imagens fluorescentes que comprovem o acoplamento, um ensaio de fluorescência foi realizado nas mesmas condições acima descrita para detecção de IgG. Após incubação das *beads* por 1h com amostra de soro de camundongos positiva e negativa para *rBlo t 5*, foi adicionado às *beads* acopladas a *rBlo t 5* e ao colágeno, anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) (1:1000) (Sigma Aldrich). A reação foi incubada por 45 minutos a T.A., e as imagens foram adquiridas por meio do microscópio de fluorescência invertido digital EVOS (®EVOS FL Imaging System, Thermo Fisher, São Paulo, Brasil). As imagens foram obtidas por contraste de fase (CF) e pela excitação no azul (470/22 nm) correspondente ao comprimento de onda de absorção do Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). A sobreposição das imagens (SP) foi realizada no aparelho (®EVOS FL Imaging System).

4.5.2 Ensaio de fluorescência baseado em *beads* magnéticas (EFB) para detecção de anticorpos IgG4 específicos a *rBlo t 5*

Para detecção de IgG4 no soro de pacientes, 100 μ L das *beads* magnéticas revestidas de antígeno *rBlo t 5* e colágeno, foram utilizados para analisar 10 amostras diferentes, sendo que os testes foram realizados em duplicata. Foi adicionado em cada tubo de micro centrífuga 5 μ L de *beads*, e em seguida aplicado 25 μ L/tubo de soro diluído (1:5) em PBS-T/BSA 1% por 30min a temperatura ambiente sob agitação. Com auxílio de uma estante magnética a reação foi lavada três vezes com 100 μ L de PBS-T, e adicionados 25 μ L/tubo do anti- IgG4 humano conjugado com FITC (Sigma-Aldrich) diluído 1:1000 em PBS-T/BSA 1%, sendo incubadas novamente a 37 °C por 45 minutos. As *beads* foram lavadas com PBS-T duas vezes e suspensas para um volume final de 50 μ L com tampão carbonato-bicarbonato 0.06 M (pH 9.6). As medições de fluorescência foram conduzidas a 480-520 nm usando o espectofotômetro SpectraMax M2 (SpectraMax® M2, Molecular Devices). Os resultados foram registrados e o valor do *cut-off* foi definido como a média aritmética dos valores de fluorescência dos soros controles negativos acrescidos de três desvios padrões. Os dados foram expressos em índice de fluorescência (IF), sendo que IF= fluorescência da amostra / valor de *cut-off*.

4.6 Análise estatística

As diferenças de significância foram analisadas para distribuição não paramétrica, e foi utilizado o teste Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Os dados obtidos estão expressos como mediana e intervalo de confiança. A análise estatística foi feita utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc).

5. RESULTADOS

5.1 Produção e purificação de rBlo t 5

Após a purificação de rBlo t 5 em resina de Níquel, foi confeccionado o cromatograma do processo de purificação, utilizando as amostras obtidas nesta metodologia (Fig. 2A). A figura 2A mostra a presença de 3 picos proteicos principais, sendo o primeiro correspondente ao aplicado à resina ('flow through'), o segundo à fração obtidas na eluição com tampão contendo imidazol 200 mM, e o terceiro pico corresponde a proteínas removidas da resina com tampão de regeneração. As frações contendo o alérgeno purificado foram selecionadas por meio do cromatograma e então, analisadas por SDS-PAGE 14% (Fig 2B). As frações representativas da purificação são demonstradas na figura 2B, onde NI é o extrato protéico de bactérias não induzidas, I é o extrato bactérico induzido com IPTG e rBlo t 5 a proteína purificada. A análise eletroforética da fração purificada demonstra a presença de uma banda com massa molecular esperada para Blo t 5 de aproximadamente 14 kDa. Também é possível verificar a presença de um possível dímero estável em SDS de massa molecular aparente de 30 kDa.

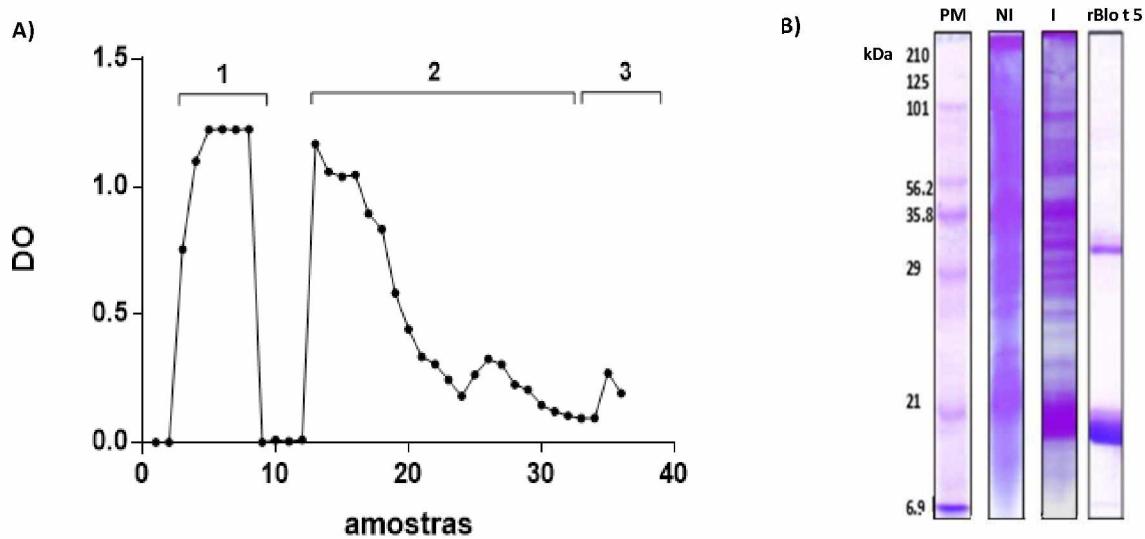


Figura 2. Purificação do alergeno recombinante Blo t 5 em resina de Níquel. A) Cromatograma das frações eluídas da coluna (1- void da coluna; 2 – amostras extraídas com tampão de eluição; 3- tampão de regeneração). B) Eletroforese SDS-PAGE 14%. Padrão de Peso Molecular (PM), Colônia controle não induzida (NI), Colônia induzida (I), Proteína recombinante Blo t 5 purificada (rBlo t 5).

5.2 Produção de anticorpos anti-rBlo t 5

Após purificação da proteína rBlot 5, foram realizadas as imunizações em camundongos. Por meio do ELISA indireto específico ao antígeno, observa-se a produção de antissoros capazes de reagir especificamente com rBlot 5 (Fig. 3). As amostras de soro de animais injetados com PBS (controle) e imunizados com rBlo t 5 foram avaliados nos dias 21 e 40, após imunizações. Os camundongos do grupo tratado com PBS apresentou, como esperado, valores de IE < 1,0 nos dias 21 e 40. Já o grupo de camundongos imunizados com rBlo t 5 apresentou valor médio de IE < 1,0 no dia 21, enquanto, no dia 40 os animais apresentam positividade com valor médio de IE de 3,14. Estes soros foram utilizados posteriormente para confirmar acoplamento das beads ao alérgeno rBlo t 5.

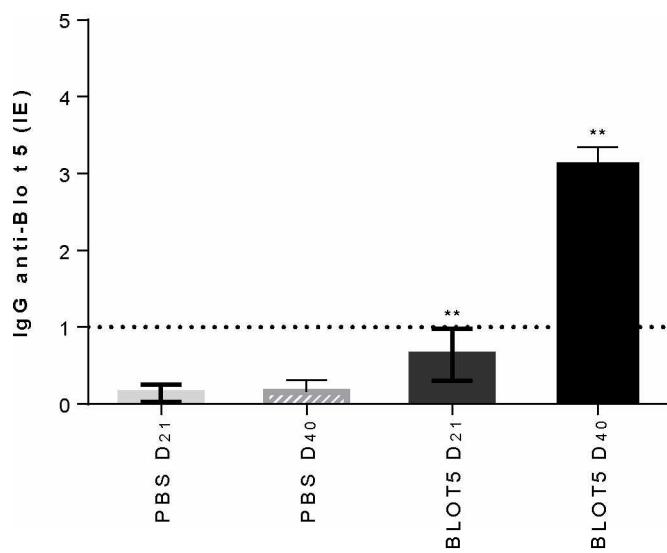


Figura 3. Produção de anticorpos policlonais. A resposta sorológica dos animais imunizados foi analisada após a penúltima dose de sensibilização (D21) e após o último desafio (D40). Os níveis de anticorpos estão expressos em Índice ELISA (IE). As linhas tracejadas indicam o valor de *cut off* (IE > 1,0). A análise estatística foi feita utilizando Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$. * representa diferença significativa comparada ao grupo PBS.

5.3 Análise de funcionalização das *beads* NHS

Realizou-se a avaliação do acoplamento do antígeno *rBlot* 5 às microesferas magnéticas conjugadas com grupo químico NHS por meio do teste ELISA bead. No ensaio realizado com *beads* acopladas ao alérgeno *rBlo t 5* (figura 4A), observa-se que amostras positivas de camundongos para IgG anti-*rBlo t 5* apresentaram reatividade com valor médio de DO de 1,4, enquanto o soro negativo para IgG específico à *Blo t 5*, apresentou valores de médios de DO de 0,19. Como controle realizado com tampão PBS ao invés de incubação com soro e com a adição de anticorpo secundário, observa-se DO média de 0,02. O ELISA bead realizado com *beads* acopladas à colágeno (Fig 4B) não apresentou reatividade quando ensaiado com amostras soro positivo ou negativo para IgG específico à *rBlo t 5*.

O teste de acoplamento também foi validado por meio de ensaio de imunofluorescência, onde observa-se que somente *beads* acopladas com *rBlo t 5* foram capazes de reagir com soro anti-*Blo t 5* (Fig.4 C-E). Não foram observadas reatividades de *beads* acopladas à *rBlot* 5 com soro negativo (Fig.4 F-H) ou com o controle da reação realizado com a incubação de PBS e anticorpo secundário acoplado a FITC (Fig.4 I-L). Como esperado, o ensaio de fluorescência realizado com *beads* acoplada à colágeno não apresentou reatividade específica com amostras de soro positivo (IgG anti- *rBlo t 5*) (Fig.4 M-O) ou negativas (Fig.4 P-R) ou com o controle de reação (Fig.4 S-U). Os resultados obtidos pelos ensaios confirmam que as *beads* foram funcionalizadas com o alérgeno *rBlo t 5*.

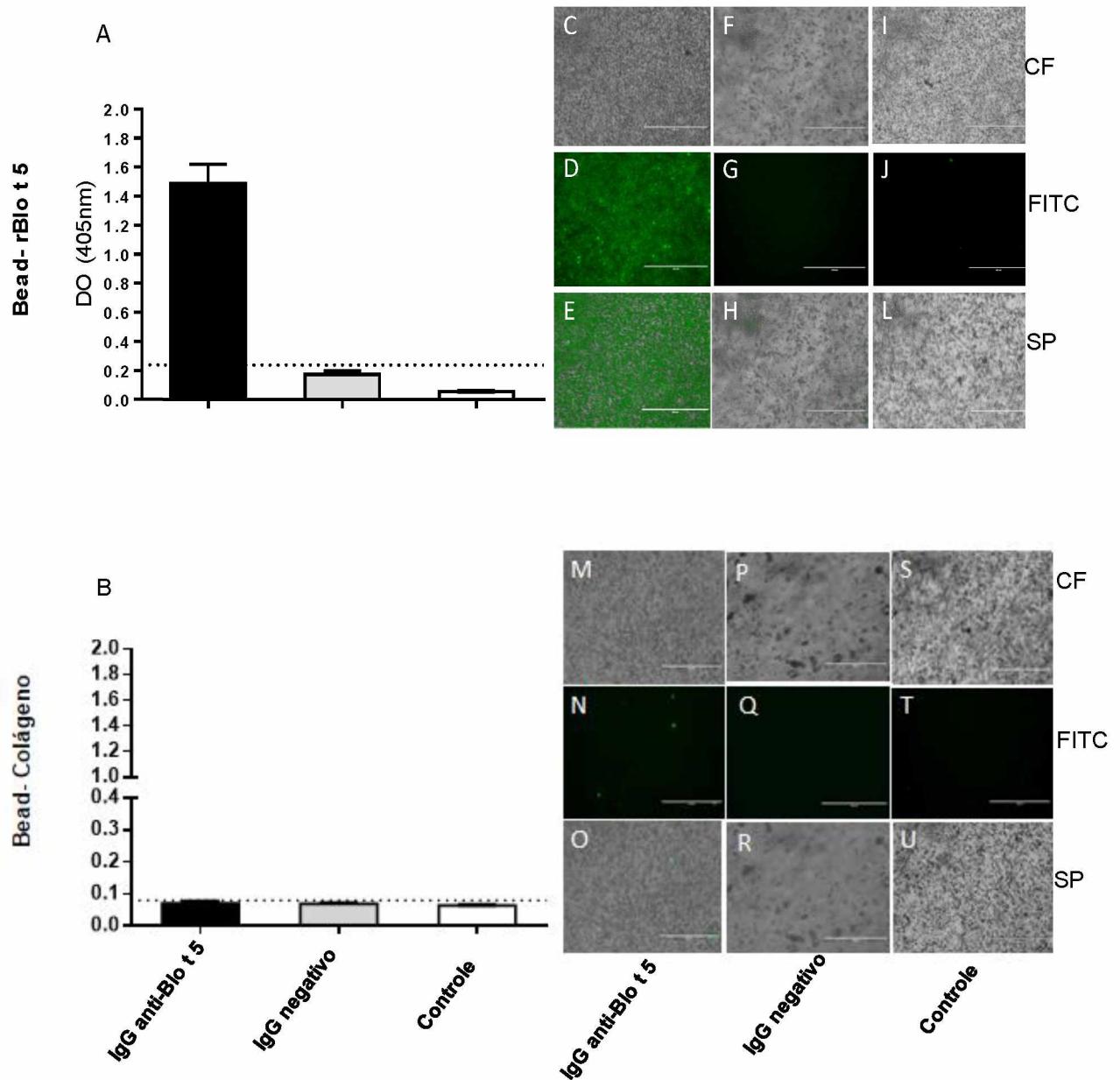


Figura 4. Analise de funcionalização das beads magnéticas. O acoplamento foi testado em beads conjugadas com rBlo t 5 (A) e colágeno (B) por meio do teste de ELISA beads, utilizando soro de camundongos sensibilizados ou não com antígeno rBlo t 5. A análise de fluorescência para confirmação de acoplamento foi realizada em microscópio de fluorescência Evos (C - U), na cor verde (D,G,J,N,Q,T), em contraste de fase (C,F,I,M,P,S) e sobreposição das marcações (E,F,L,O,R,U). As beads acopladas a rBlo t 5 e colágeno foram testadas respectivamente com soro anti-Blo t 5 (C-E), (M-O), e soro irrelevante (F-H), (P-R). Como controle negativo (blank) das reações de ELISA utilizou-se PBS para testar beads acopladas a rBlo t 5 (I-L) e colágeno (S-U). CF= contraste de fase; FITC = análise por Isotiocianato de Fluoresceína; SP= sobreposição das imagens.

5.4 ELISA *beads* para detecção de IgG4

Amostras de soro (n=10) de pacientes foram testadas para IgG4 utilizando ELISA *beads* (Fig. 5). As amostras foram testadas para *beads* acopladas a rBlo t 5 (Fig. 5A) e a colágeno (Fig. 5B). Os resultados obtidos mostram que o teste realizado com as *beads* magnéticas NHS acopladas a rBlo t 5 é eficaz na discriminação das amostras, com a diferença significativa entre amostras positivas (mediana=1) e negativas (mediana = 0,20) para detecção IgG4 (Fig. 5A). As *beads* conjugadas com colágeno apresentaram mediana com valor aproximado de 0,8 para amostras positivas ou negativas para IgG4 (Fig. 5B).

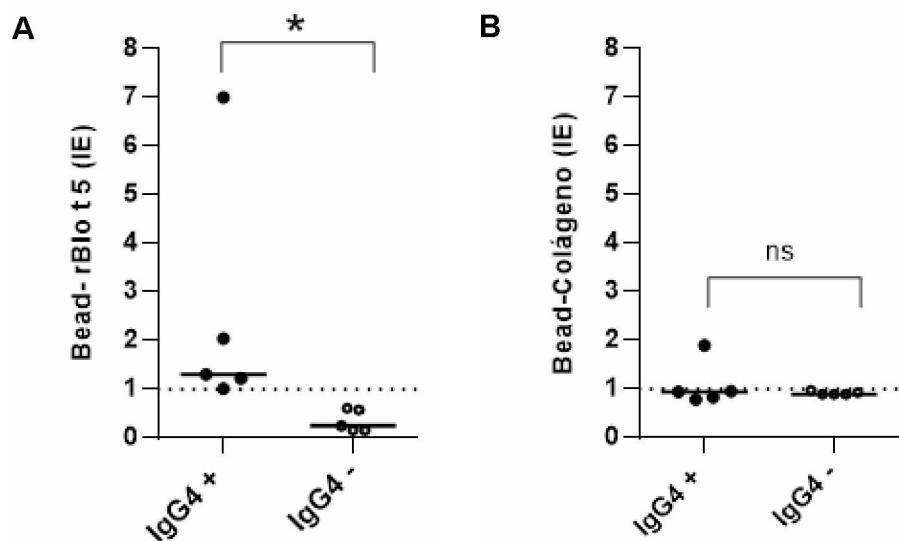


Figura 5. ELISA bead para detecção de anticorpos IgG4. As beads foram acopladas a rBlo t 5 (A) e colágeno (B). Foram utilizadas 10 amostras de soro, sendo 5 amostras positivas e 5 amostras negativas testadas por ELISA indireto. Os resultados das reações foram representados através do índice ELISA (IE) de cada amostra. A análise estatística foi feita utilizando o teste de Mann Whitney, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$.

5.5 Ensaio de fluorescência baseado em *beads* magnéticas (EFB) para detecção de anticorpos IgG4

Amostras testadas pelo ELISA *beads* foram analisadas pelo ensaio de fluorescência baseado em *beads* magnéticas (EFB) (n=10) (Fig. 6B). Para validação do ensaio, as amostras foram testadas para ELISA indireto convencional (Fig. 6B). Nota-se diferença significativa entre amostras positivas (mediana=5,9) e negativas

(mediana=0,43) detectadas por EFB (Fig. 6B). Da mesma forma, o ELISA convencional detecta diferenças significativas entre as amostras positivas e negativas, porém com valores de mediana diferentes, onde os valores de mediana para o teste convencional para amostras positivas e negativas são respectivamente de 3,56 e 0,45. No EFB detectou-se uma amostra com IF de 1,03, enquanto pelo ELISA indireto apresentou IE de 1,73. Entretanto, a diferença nos resultados da detecção de IgG4 pode ter ocorrido devido a utilização de diferentes alíquotas de soro durante o desenvolvimento do teste.

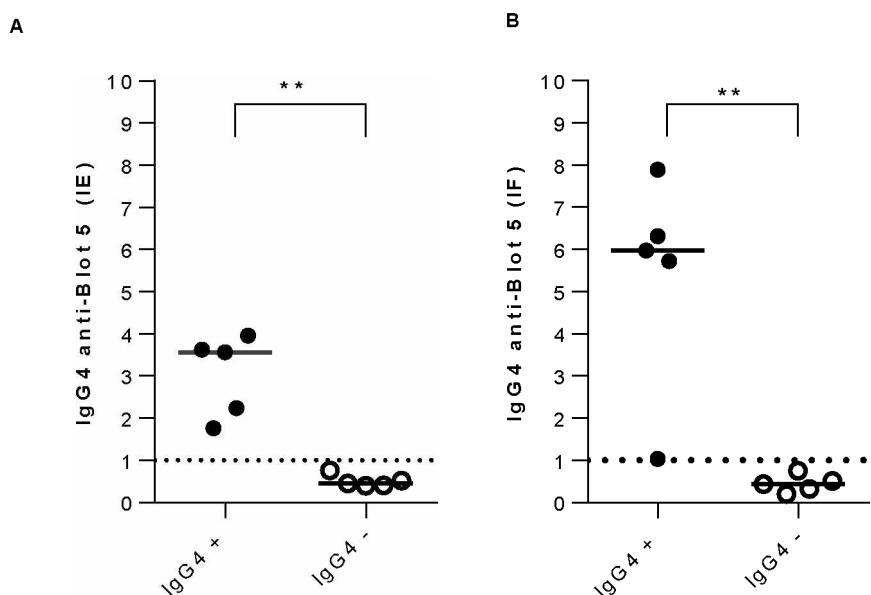


Figura 6. Ensaios para detecção de IgG4 específicos a rBlo t 5. Foram testadas 10 amostras de soro, sendo 5 amostras positivas e 5 amostras negativas testadas por ELISA indireto (A) e EFB (B). Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE) (A) e Intensidade de Fluorescência (IF) (B) de cada amostra. A análise estatística foi feita utilizando o teste de Mann Whitney, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$.

5.6 Vantagens da nova plataforma de detecção de IgG4

Com a finalidade de comparar o desempenho da nova plataforma desenvolvida (EFB) para detecção de IgG4 realizou-se o levantamento de preços, tempo gasto para execução dos testes e volume de amostra necessária para realização do ELISA convencional, ImunnoCAP, ImunnoCAP Isac utilizados

rotineiramente em laboratórios (Tabela 1). Observa-se que EFB é vantajoso em relação aos demais testes ao analisar tempo e custo da reação. Enquanto EFB tem custo de R\$1,41 por amostra, ELISA e ImunnoCAP tem custos respectivos de R\$1,47, R\$80. Os valores em dólares dos testes para uma amostra foram calculados e estão demonstrados na tabela 1. Com exceção do ImunnoCAP Isac, que possibilita teste simultâneo à 112 alérgenos, com custo de R\$2426, os demais testes são realizados para um único alérgeno. O tempo para realização do teste EFB foi otimizado, e pode ser realizado em até 2h após acoplamento das *beads* que levaria um tempo total de 7h. Em relação ao volume de amostra necessária para realização dos ensaios, observa-se que EFB requer uma quantidade menor de soro (5µL) quando comparado aos demais testes

Tabela 1. Métodos para detecção de anticorpos específicos a alérgenos

Métodos	Tempo (h)	Volume (µL)	Valores em R\$ (U\$)
EFB	7	5	1,41 (0,37)
ELISA	23	24	1,47 (0,39)
ImunnoCAP	3,5	40	80,00 (20,94)
*ImunnoCAP Isac	4	30	2426,00 (635,08)

Fonte: Dados *ImunnoCAP* e *Isac* obtidos de thermoscientific.com/phadia. O teste de diagnóstico ImmunoCAP Isac detecta anticorpos para 112 alérgenos simultâneos. Os valores foram calculados com base na cotação do dólar no dia 10/07/19 (U\$1 = R\$3,76).

6. DISCUSSÃO

A sensibilização de indivíduos com alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, é um dos fatores de risco mais importantes para desenvolvimento de doenças alérgicas em pacientes geneticamente susceptíveis. Os métodos mais utilizados para diagnóstico de alergia e seu tratamento se baseam na utilização de extratos alergênicos naturais. Entretanto, extratos alergênicos produzidos a partir da fonte natural possuem algumas desvantagens como a presença de determinantes antigênicos de reatividade cruzada (CCDs - *Cross-reactive Carbohydrate Determinants*) e ainda antígenos encontrados em vários alimentos vegetais, que podem resultar em ensaios laboratoriais falsos positivos para doenças alérgicas (IGETEI et al., 2017). Neste contexto, extratos naturais são fontes heterogêneas de alérgenos, o que dificulta o diagnóstico e avaliação do quadro dos pacientes que desenvolvem a resposta alérgica a um determinado tipo de antígeno (CHAPMAN et al., 2000; ARRUDA et al., 2013; BREHLER, 2013).

Durante as últimas décadas, avanços nas áreas de bioquímica de proteínas e biologia molecular acelerou a descoberta e caracterização de alérgenos gerados por técnicas de produção de proteínas recombinantes. Estes antígenos são aplicados na padronização de produtos alergênicos utilizados no diagnóstico da alergia e desenvolvimento de novas terapias. Recentemente, com advento de ensaios em *microarrays* de proteínas tornou-se possível investigar a sensibilização à mais de 100 alérgenos purificados (BEYER et al., 2015).

Por meio das técnicas de produção de proteínas recombinantes, alguns aeroalérgenos, responsáveis pela sensibilização de 70% a 85% de pacientes diagnosticados com asma ou rinite alérgica, puderam ser produzidos e purificados. A disponibilidade destes alérgenos ampliou as possibilidades do diagnóstico resolvido por componentes (*Component Resolved Diagnosis*, CRD), empregando métodos como a tecnologia com microchips e imunoensaios. Alérgenos purificados (naturais / n) ou recombinantes (r) produzidos por tecnologia genética são empregados para diagnósticos de IgE sérica. Entretanto os alérgenos recombinantes são vantajosos em relação a extratos naturais por não possuem CCDs. ImmunoCAP™ (Phadia / Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suécia) ou Immulite (Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, CA, EUA) são imunoensaios aprovados pelo FDA que dão resultados

quantitativos dos níveis de IgE em kU/L (ARRUDA et al., 2013; TREUDLER, SIMON, 2013).

Os alérgenos de ácaros são conhecidos como um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento do quadro de doenças alérgicas respiratórias. Entretanto, a sensibilização pelo ácaro da espécie *B. tropicalis* foi descrita como sendo um dos principais fatores associados a doenças alergênicas em países tropicais (CHUA et al., 2007; LAHIANI et al., 2018). O extrato total de *B. tropicalis* mostrou conter pelo menos 30 componentes proteicos e entre estes, alérgenos do grupo 5 são desencadeadores de doenças alérgicas com até 90% de reatividade à IgE, e respondem por 60% da reatividade total de IgE atribuída aos extratos de HDM (WANG, 2013; THOMAS, 2013; GONZALES-PEREZ et al., 2019).

Portanto, Blo t 5 é um alvo potencial para abordagens diagnósticas na alérgica mediada por *B. tropicalis*. Em nosso estudo foi possível obtenção da proteína Blo t 5 recombinante purificada por técnicas de cromatografia de afinidade. A metodologia resultou em quantidade satisfatória da proteína que permitiu sua aplicação no desenvolvimento de uma prova de conceito para um teste imunológico para detecção de anticorpos IgG4 baseado em fluorescência.

Sabe-se que a produção de IgG4 se associa com os níveis de IgE, e sua quantificação tem relevância para o acompanhamento das doenças alérgicas. Durante o processo alérgico alergia, a IL-4 produzida por células Th2 induz *switch* de anticorpos para IgE, enquanto IL-10 induz em células B a produção de anticorpos IgG4 (SATOGUINA et al., 2005; OKAMOTO et al., 2012). Por outro lado, a exposição a alguns alérgenos transportados pelo ar pode favorecer, em indivíduos não atópicos, o desenvolvimento da tolerância imunológica através de respostas de células T regulatórias com produção de anticorpos IgG, caracterizada por uma alta razão IgG4 / IgE (JONES et al., 2009; VAN DE Veen, AKDIS, 2016).

Os anticorpos IgG4 específicos para alérgenos exercem papel imunomodulador com atividade anti-inflamatória por meio de diferentes mecanismos de interação dos抗ígenos com as células (ISHIZAKA et al., 1990). Eles podem atuar como anticorpos bloqueadores ao competirem com IgE pela ligação de alérgenos a células que expressam receptores Fc_εRI para IgE, incluindo mastócitos e basófilos. Por outro lado, anticorpos IgG4 podem competir com anticorpos IgE que estejam solúveis pelo antígeno. A IL-10 secretada por células T reguladoras durante a

imunoterapia suprime potencialmente a produção de IgE e aumenta simultaneamente a produção de IgG4 (SATOGUINA et al., 2005; PLATTS-MILLS et al., 2001; ITOH et al., 2010; MOUSALLEM, BURKS, 2012; OKAMOTO et al., 2012).

Assim, a dosagem da IgG4 tem papel essencial no monitoramento de pacientes que recebem a imunoterapia. Muitas vezes há desistências ou falhas de adesão ao tratamento pelo paciente, devido a um acompanhamento ineficiente para detecção de níveis de anticorpos que podem resultar em um tratamento não responsivo ao esquema imunoterápico. Para melhorar eficiência da resposta ao tratamento, seria necessário o acompanhamento do quadro imunológico para realização de ajustes das doses prescritas cada etapa de imunoterapia, através da coleta de soro antes do início e durante a ITE, com a dosagens de anticorpos IgE e IgG4 (JAMES, TILL, 2016; SHAMJI et al., 2017).

Baseado na importância da detecção de anticorpos IgG4 e IgE na alergia, buscamos em nosso trabalho desenvolver uma nova plataforma diagnóstica para detecção de anticorpos IgG4 que otimize o tempo, custos e volume de amostra utilizada, em relação aos ensaios disponíveis. Vários ensaios e testes de diagnósticos têm utilizado partículas microesferas (*beads*) como base em reações imunológicas para diagnóstico e pesquisa. As *beads* são partículas de polímeros esféricos de diferentes tamanhos e compostas por diversos materiais que podem ser de poliestireno, sílica, ou compostos magnéticos. Elas apresentam superfícies ativadas com diversos grupamentos químicos para a ligação de uma infinidade de substâncias (ALMEIDA, 2011). Neste estudo, utilizamos beads acopladas ao grupamento N-Hidroxisuccinimida (NHS).

Depois de ativadas, as microesferas podem ser preparadas para o acoplamento de ligantes. A adsorção de um ligante é um processo em que vários fatores físico-químicos estão envolvidos (PEULA-GARCIA et al., 2002). Cada acoplamento foi validado por ensaios de ELISA para detecção de IgG anti-Blo t 5. Os resultados *in vitro* realizados para detecção de IgG mostraram que as *beads* foram funcionalizadas com o alérgeno de interesse, permitindo, portanto, o desenvolvimento da plataforma de imunodiagnóstica baseada em beads. A aplicação desta abordagem metodológica tem permitido a detecção simultânea de anticorpos séricos específicos em doenças infecciosas e autoimunes à múltiplos抗ígenos (WHALEY et al., 2017, AVANISS-AGHAJANI et al. 2007).

Os testes moleculares e biomarcadores têm sido instrumentos de grande importância na detecção e prognóstico de doenças alérgicas. A identificação de biomarcadores pode ser baseada em abordagens de sistemas combinando transcriptômica, proteômica, epigenética e metabolômica. Alguns projetos são financiados pela União Europeia (UE), tais como MultiMod, U-BIOPRED (*Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcomes*), MeDALL (*Mechanisms of the Development of Allergy*), com a finalidade de melhorar ensaios clínicos e integrar os dados obtidos destes sistemas para fins de melhorar diagnóstico (AUFFRAY et al., 2010; BOUSQUET et al., 2011; BRUHN et al., 2014; LUPINEK et al., 2014).

ImunnoCAP e Isac são métodos laboratoriais moleculares para detecção de anticorpos IgE e IgG. ImunnoCAP consegue detectar subclasses de IgG, entretanto, pesquisas apontaram que amostras de soro que contém altos níveis destes anticorpos para determinados componentes moleculares, principalmente da subclasse IgG4, podem dificultar a detecção IgE, implicando em resultados que não condizem com o quadro clínico da doença (LUPINEK et al., 2014; KOS et al., 2017).

Isac analisa a sensibilização simultânea a diversos alérgenos, e é um método automatizado de fácil execução. Entretanto, só deve servir como *screening* em casos que o TCP e a pesquisa de IgE específica por ImmunoCAP não tenham sido suficientes para o diagnóstico. O Isac é um teste semiquantitativo, porém apresenta vantagem sobre teste ImmunoCAP por utilizar volumes menores de amostra (SHAMJI et al., 2019). Assim, definir métodos mais confiáveis para diagnóstico sobre o quadro imunológico do paciente e tratamento das doenças alérgicas é imprescindível (KOS et al., 2017).

A plataforma EFB desenvolvida possibilitou a discriminação de amostras positivas e negativas. EFB é um teste quantitativo, que tem a possibilidade de ser um mais eficaz em relação aos demais disponíveis. Porém, novos estudos serão realizados com a finalidade de prover a verificação da sensibilidade do teste desenvolvido, e se necessário realizar ajustes que possibilite obtenção de resultados mais seguros.

Assim como foi demonstrado no nosso estudo, o ensaio de ELISA necessita de 24 μ L de amostras de soro para sua execução, enquanto a plataforma atual do ISAC possibilita detecção simultânea de anticorpos IgE a 112 alérgenos diferentes

utilizando 30 μ L de soro obtidos do sangue venoso, e o ImunnoCap necessita de 40 μ L. Com a nova plataforma de detecção de anticorpos IgG4 desenvolvida, EFB, é possível reduzir a quantidade de amostra necessária para realização de testes alérgicos para 5 μ L.

O teste Isac é realizado num total de tempo de 4 horas, e os resultados obtidos são uma indicação semiquantitativa dos níveis de anticorpos IgE (LUPINEK et al., 2013), enquanto os métodos quantitativos ImunnoCAP e ELISA são realizados respectivamente em 3,5 horas e 23 horas. Ensaios realizados com *beads* requerem volumes relativamente pequenos de material de amostra (VIGNALI, 2000).

A redução para 30 minutos do tempo de incubação das amostras de soro e anticorpo anti-IgG4 conjugado com FITC foi otimizada na plataforma desenvolvida, sendo que todo o protocolo de conjugação das beads e do ensaio para detecção do anticorpo são realizados em um total de 7 horas. Deve-se ressaltar que as *beads* utilizadas no ensaio EFB, um teste quantitativo, apresentam potencial para ser reutilizadas após protocolos adequados de regeneração, permitindo desenvolvimento de uma nova reação com outras amostras de soro em apenas 2 horas.

A plataforma ISAC utiliza uma quantidade menor de alérgeno quando comparada ao sistema ImmunoCAP, o que pode reduzir sua sensibilidade quando a quantidade de IgE específica é baixa. Além disso, pode haver interferência de outros isótipos, principalmente quando há níveis muito elevados de IgG específica, como acontece durante a imunoterapia. Portanto, o ISAC não é geralmente recomendado para monitorização quantitativa de níveis de anticorpos IgE ao longo do tempo (CANONICA et al., 2013).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que não há divergência entre os dados obtidos no ELISA convencional indireto e o ensaio de fluorescência baseado em *beads* magnéticas (EFB) para detecção de IgG4. Os dados indicam também que o teste é eficaz e apresenta potencial para desenvolvimento futuro de uma plataforma de detecção de anticorpos, incluindo de anticorpos da classe IgE.

Pode-se inferir que o desenvolvimento desta plataforma possibilita o monitoramento de níveis de IgG4 relacionados a componentes moleculares específicos, como Blo t 5, que podem contribuir como parâmetro objetivo para o monitoramento da eficácia de esquema de ITE. O ensaio mostrou-se vantajoso por ser um teste de rápida execução, com utilização de menor volume para execução,

portanto, com potencial aplicação pediátrica, e ainda, com um custo menor por amostra do que outros disponíveis no mercado.

Neste trabalho pela primeira vez desenvolveu-se um ensaio de fluorescência que permite o desenvolvimento subsequente de uma plataforma multiplex para a detecção simultânea de anticorpos IgG4 e IgE para alérgenos de relevância clínica. A metodologia pode ainda ser aperfeiçoada utilizando-se diversos alérgenos recombinantes em um único teste.

CAPÍTULO 2

*AVALIAÇÃO DE FORMAS DE TRATAMENTO DE ASMA
AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
SENSIBILIZAÇÃO COM OVALBUMINA (OVA)*

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas de 6 semanas, pesando entre 20 a 25 gramas. Os animais foram provenientes de Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia – UFU e mantidos no Biotério da UFU. Foram acondicionados em gaiolas apropriadas, sob condições adequadas de luz e temperatura, recebendo água e ração *ad libitum*, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Os protocolos utilizados estão de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo comitê de ética na utilização de animais - CEUA da UFU (105/15).

7.2 Protocolo de indução de asma experimental em camundongos

O protocolo de indução foi desenvolvido conforme Godar e colaboradores (2018). O experimento foi realizado com 2 grupos de animais (n=5), grupo OVA e grupo PBS. No dia 0 (D0), os animais receberam injeção intraperitoneal de OVA (10 μ g/100 μ L de PBS) com o adjuvante hidróxido de alumínio (2mg/animal), ou PBS (100 μ L). Após 5 dias, os camundongos foram desafiados via intranasal (i.n.) com OVA (1 μ g/25 μ L de PBS) ou PBS (25 μ L) do sexto (D6) ao décimo dia (D10). No 14º dia do protocolo os camundongos foram anestesiados, com Xilazina (10mg/kg) e Cetamina (80mg/kg), e sacrificados por deslocamento cervical. O sangue e pulmão foram coletados e armazenados a -70ºC até o momento do uso. Para a preparação do homogenato, 100 mg do lobo esquerdo dos pulmões de camundongos foi coletado e colocado em 300 μ L solução contendo de inibidor de proteases (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich). Os tecidos foram levados para um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjen e homogeneizado 3 vezes por 15 segundos em intervalos de 1 minuto. Os experimentos foram conduzidos em triplicata (n = 15).

7.3 Tratamentos no modelo de asma experimental

No 8º e 10º dia do protocolo de indução de asma, os camundongos foram tratados com diferentes condições, 1 hora antes do desafio, via instilação intranasal.

Os grupos foram tratados nas seguintes condições: grupo PBS (controle negativo), induzido com PBS e tratado com PBS; grupo OVA (controle positivo), induzido com OVA e tratado com PBS; grupo 15d-PGJ2 30 (Sigma-Aldrich, EUA) induzido com OVA e tratado com 15d-PGJ2 30 (30 μ g/kg), (COUTINHO et al., 2017); grupo 15d-PGJ2 100, induzido com OVA e tratado com 15d-PGJ2 100 (100 μ g/kg); grupo FLU (furoato de fluticasona) (Avamys®) induzido com OVA e tratado com furoato de fluticasona (100 μ g/kg) (KANG et al., 2016); grupo FLU+ P 30, induzido com OVA e tratado com furoato de fluticasona (100 μ g/kg) associado a 15d-PGJ2 (30 μ g/kg); grupo FLU+ P100, induzido com OVA e tratado com furoato de fluticasona (100 μ g/kg) associado a 15d-PGJ2 (100 μ g/kg). No 14º (décimo quarto) dia do protocolo os camundongos foram eutanaziados como descrito no item 7.2, e o pulmão e sangue foram coletados para análises histopatológicas do pulmão e para a detecção de anticorpos e citocinas. Os experimentos foram conduzidos em triplicata com 5 animais (n=5) para cada grupo analisado.

7.4 Análise do parâmetro respiratório

A função pulmonar foi avaliada por obstrução ao fluxo aéreo induzida por metacolina (Sigma-Aldrich, EUA), usando espirômetro, que possui uma câmara hermética conectada a um nebulizador e um sensor espirométrico (Spirometer FE141, AD Instruments, Sydney, Austrália). A metacolina foi diluída em PBS em diferentes concentrações (6, 12,5 e 25 mg / mL) e administrada em aerossol (30 segundos, 50 μ L por inalação). A hiperreatividade brônquica foi avaliada por meio de valores do volume corrente, a frequência respiratória e o volume-minuto dos animais. Esses dados foram obtidos sob condições basais e também após o Teste de Broncoprovocação com Metacolina (TBM) (OLIVEIRA, 2016). Para realização da técnica, os camundongos foram anestesiados (Cetamina, 80mg/kg e Xilazina, 10mg/kg), e os dados basais mensurados por 3 minutos. Os resultados foram obtidos em volts e posteriormente processados pelo sistema Power Lab (AD Instruments, Sydney, Austrália) em volume corrente (mL). Em seguida, foi calculada por meio dos parâmetros obtidos, a frequência respiratória e o volume-minuto.

7.5 ELISA para detecção de anticorpos IgG e subclasses

O teste ELISA indireto foi realizado para a detecção de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a. Em placas para ELISA de 96 poços (Costar 3590, USA), os poços foram sensibilizados (50uL) com 30 µg/mL de OVA diluída em tampão carbonato bicarbonato (0,1M; pH = 9,6) e incubada *overnight* a 4°C. Posteriormente, ligações não específicas foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-TM 5%) por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem por três vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com amostras de soro diluídas em PBS-T com PBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado (PBS-TM 1%) (1:50) ou homogenato de pulmão por 1 hora a 37°C. Após lavagem por seis vezes, as placas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários de camundongo consistindo de anti-IgG1/ IgG2a mouse biotinilada (1:2000) (Sigma-Aldrich, EUA), seguido de incubação por 1 hora a 37°C. Em seguida, após lavagens, o conjugado anti-IgG produzido em cabra conjugado com peroxidase (PE) (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em PBS-TM 1% (1:1000) foi adicionado às placas para detecção de IgG. Para desenvolvimento da reação foi utilizado o substrato enzimático, constituído de uma solução de ABTS (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão citrato-fosfato, contendo 0,03% de H₂O₂ (Sigma-Aldrich, EUA). Para determinar os valores de densidade óptica (DO) foi utilizado o espectrofotômetro de Microplacas (*Epoch* BioTek Instruments, Inc., USA), a um comprimento de onde de 405 nm, e os níveis de anticorpos foram expressos em IE. Sendo que estes valores foram calculados como descrito acima, e foram considerados como positivos os valores de IE acima de 1,0.

7.6 ELISA para detecção de IgE

Para a quantificação de IgE, inicialmente preencheu-se uma placa de 96 poços com 3 µg/poço de solução OVA sendo esta incubada *overnight* a 4 °C. Os poços foram então lavados com solução PBS-T. Na sequência, foi adicionada solução PBS contendo 3% de soro albumina bovina (BSA) para bloqueio das reações inespecíficas, e a placa foi incubada por mais 1 hora a 37 °C. Os poços foram lavados e as amostras de soro foram adicionadas em duplicata, utilizando-se a diluição 1:5 em PBS com BSA 1%. As amostras de homogenato foram utilizadas sem diluição (pura). Após 2 horas

a 37 °C, os poços foram lavados e 50 µL de anti-IgE biotinilada (Sigma) diluída em PBS-BSA 0,1% (1:1000) foi adicionada. Decorrido 1 hora, a reação foi incubada com estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluída 1:500. Os poços foram então lavados e a reação foi revelada com a incubação com 50 µL de solução ABTS (Sigma), durante 30 minutos. A leitura da absorbância foi lida no espectrofotômetro de Microplacas (Epoch BioTek Instruments, Inc., USA), no comprimento de onda de 405 nm e os resultados foram expressos como IE. Sendo que foram considerados como positivos os valores de IE acima de 1,0

7.7 Ensaio de detecção de IL-5 e IL-10

A quantificação das citocinas IL-5 e IL-10 foram realizadas de acordo com instruções do fabricante (BD Biosciences, USA) por meio de ELISA. As placas de 96 poços (Costar 3590) foram sensibilizadas com anticorpo de captura em solução *coating buffer* (carbonato de sódio 0,1M, pH 9,5) com diluição de 1:250 e foram incubadas *overnight* a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (tampão salina fosfato com 0,05% Tween 20). Logo após a lavagem, o tampão diluente (tampão salina fosfato com 10% de soro fetal bovino – SFB –Sigma Aldrich) foi adicionado e incubado por uma hora à T.A. Cinquenta microlitros (50 µL) das amostras de homogenato de pulmão foram adicionadas nos poços e incubadas por 2 h a T.A. Posteriormente, as placas foram lavadas e foi acrescentado o anticorpo de detecção anti-IL-5 e anti-IL-10 biotinilado e estreptavidina conjugada com a enzima peroxidase (1:250). A reação foi revelada com TMB (BD Bioscience) ao abrigo da luz, e a reação foi interrompida com solução H₂SO₄, 2N para realizar a leitura em comprimento de onda 450 nm utilizando o Espectrofotômetro de Microplacas (Epoch BioTek Instruments, Inc., USA). Os resultados foram calculados pelo Microplate Manager® Software com base na curva padrão de citocinas do kit.

7.8 Análise histológica

Amostras de tecido obtidas dos pulmões direitos de todos os camundongos foram incluídos em parafina após fixação em formol a 4%. Posteriormente, foi realizado o corte dos tecidos em seções transversais de 5 mm de espessura. Para

avaliações de inflamação peribronquial e perivascular, de cada camundongo, 10 seções foram selecionadas aleatoriamente para procedimentos de coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) (TIMM, 2005; JARDIM et al., 2013). Para análise de deposição de fibras de colágeno foi realizada a coloração Picosirius red (DANYAN et al., 1989).

7.9 Análise estatística

As diferenças entre os grupos foram analisadas para distribuição não paramétrica, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dun. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. A análise estatística foi feita utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc).

8. RESULTADOS

8.1 Protocolo de indução de asma aguda experimental

Para confirmação do protocolo de indução de asma realizado em 14 dias (Fig. 7A), foram dosados níveis de IgE e IgG no soro e homogenato de animais induzidos a asma e tratados. O aumento de níveis de IgE foi confirmado pela detecção destes anticorpos no soro dos animais sensibilizados e desafiados com OVA, com diferença significativa ao comparar com o grupo PBS (grupo controle) (Fig. 7B). Níveis de IgE pulmonar foram dosados demonstrando uma tendência de aumentar os níveis no grupo de animais induzidos com OVA ao comparar-se com grupo PBS (Fig. 7C). Observou-se também aumento significativo de IgG no soro (Fig. 7D) e homogenato (Fig. 7E) ao se comparar os grupos OVA e PBS.

Após detecção de anticorpos por testes sorológicos, foi feita análise histológica do pulmão direito dos animais submetidos ao protocolo (Fig. 7F- K). Observa-se a presença de focos de infiltrados inflamatórios ao redor de vasos e bronquíolos no grupo OVA pela coloração por Hematoxilina e Eosina (H&E), em menor (Fig. 7G) e maior aumento (Fig. 7I). Nos bronquíolos de animais induzidos com OVA há presença de secreção (Fig. 7I), enquanto os bronquíolos do grupo PBS tem a aparência limpa, sem presença de secreções (Fig. 7H). A presença ou ausência de colágeno foi avaliada por Picosírius Red (PR) (Fig. 7J, K). O grupo OVA apresenta área mais extensa de deposição de colágeno (Fig. 7J) quando comparado ao grupo PBS (Fig. 7K).

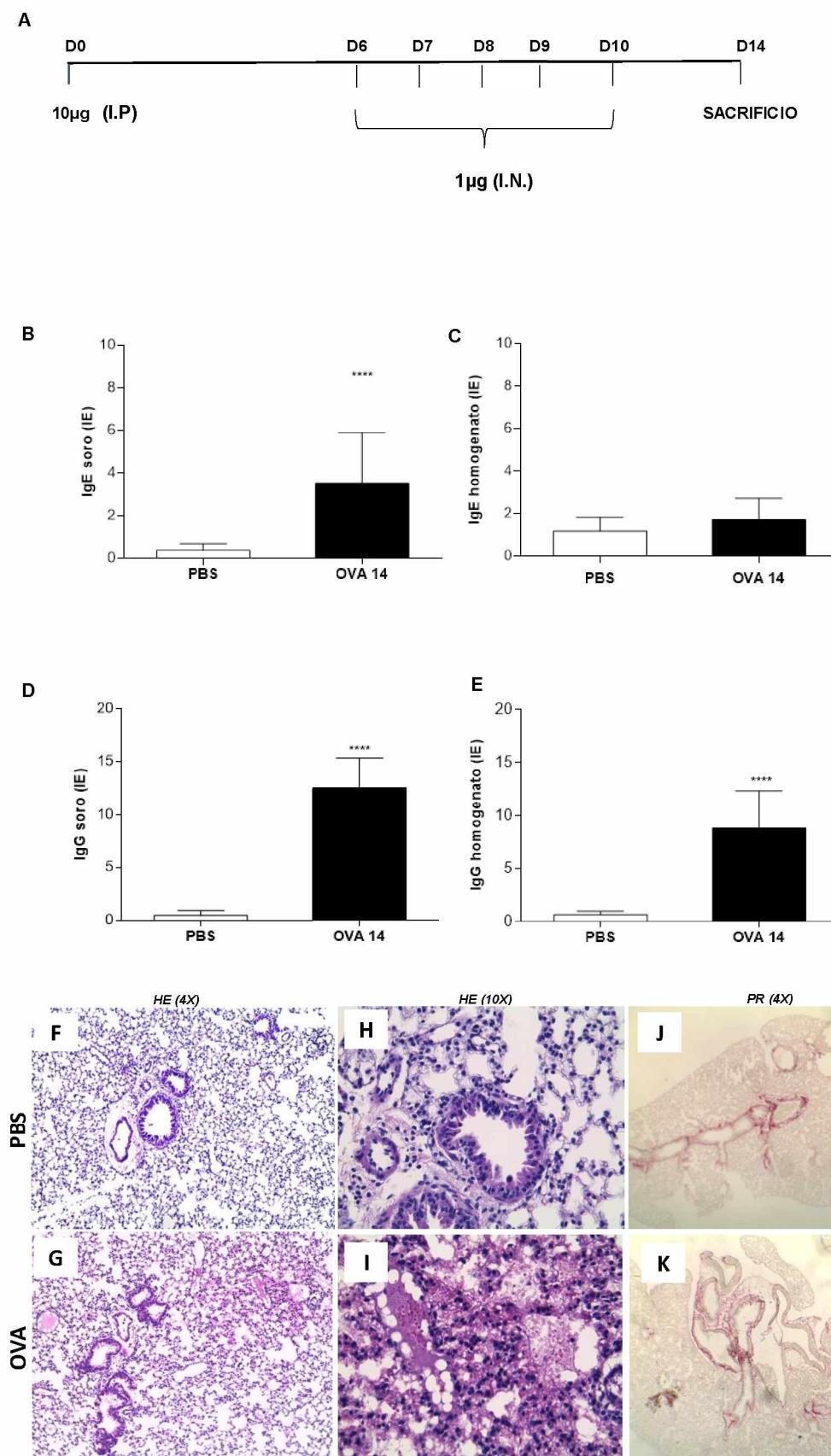


Figura 7. Indução de resposta alérgica pulmonar em modelo murino. Protocolo de indução de resposta pulmonar alérgica aguda (A). Detecção de IgE e IgG anti-OVA por ELISA indireto em amostras de soro (B, D) e homogenato de pulmão (C, E), respectivamente. Dados expressos em Índice ELISA

(I.E.). A análise estatística foi feita utilizando o teste de Mann Whitney, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$. Cortes histológicos de pulmão representativos dos grupos PBS e OVA corados por hematoxilina e eosina (H & E) no aumento de 4x e 10x (F-I) e picrosirius red (PR) em aumento de 4x (J-K). OVA: ovalbumina; i.p.: intra-peritoneal; i.n.: intranasal.

8.2 Tratamento de modelos experimentais de asma aguda com furoato de fluticasona e 15d-PGJ2

Após a confirmação do desenvolvimento do quadro inflamatório pulmonar em modelos experimentais, os animais foram submetidos a diferentes tratamentos uma hora antes do desafio com OVA ou PBS (Fig 8A). No dia 14 (D14) do protocolo, níveis séricos de IgE, IgG2a e IgG1 foram dosados. Observa-se ao comparar o grupo PBS com os demais grupos, aumento significativo nos níveis de IgE no soro de animais induzidos com OVA, tratados com 15d-PGJ2 a 30 μ g/kg, furoato de fluticasona (FLU) e furoato de fluticasona combinado com 15d-PGJ2 30 μ g/kg (FLU + P30). O tratamento mais efetivo para reduzir significativamente níveis de IgE no soro, comparado ao grupo OVA, é a combinação de furoato de fluticasona com 15d-PGJ2 100 μ g/kg (FLU + P100) (Fig 8B).

A produção de anticorpos IgG2a obteve IE positivo (IE > 1,0) para todas as condições, porém não houve diferença significativa (Fig 8C) ao se comparar os grupos tratados. Aumento significativo de níveis de IgG1 foram detectados no grupo de animais tratados com furoato de fluticasona (FLU) ao comparar-se com o grupo controle (PBS) (Fig 8D).

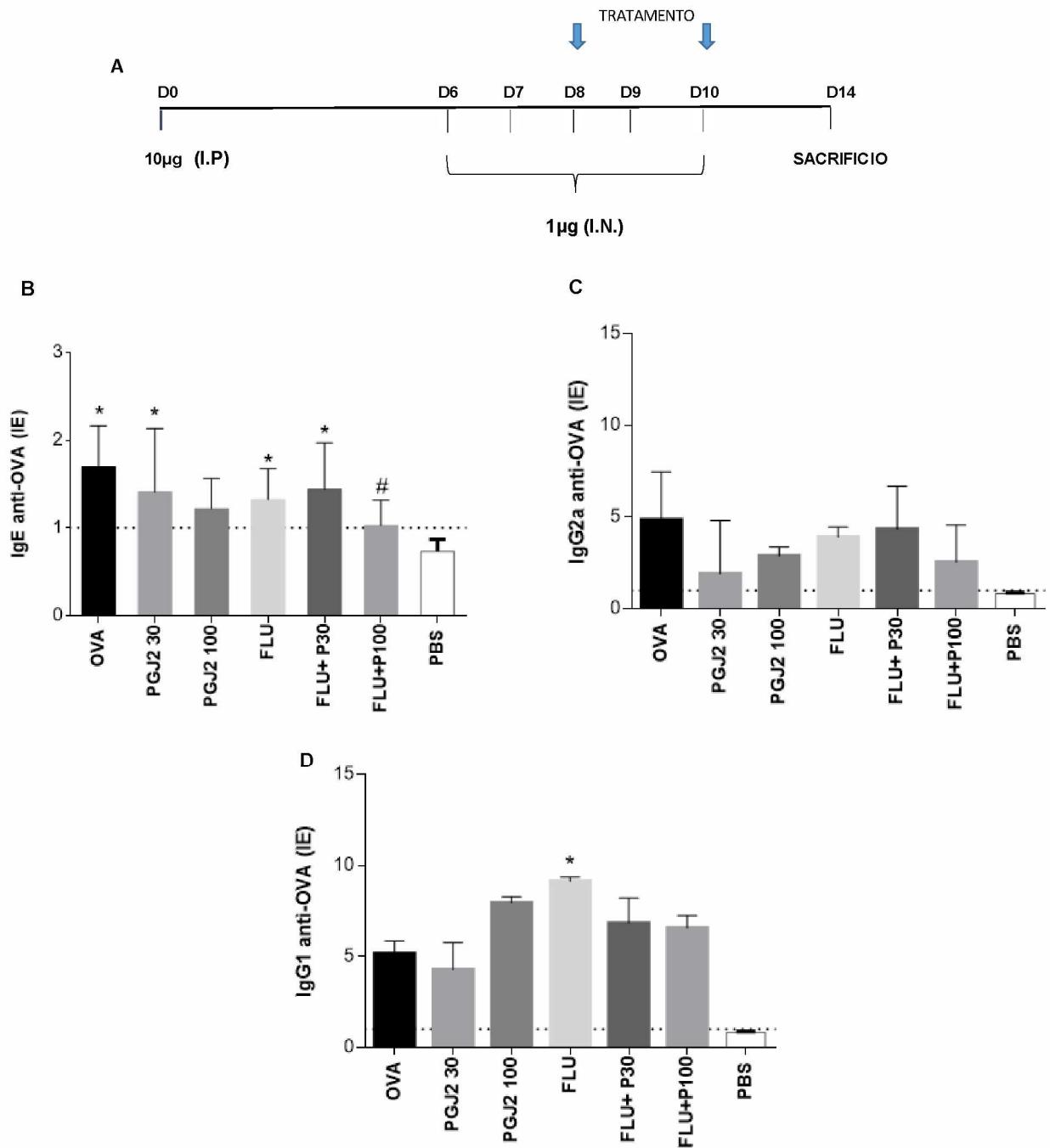


Figura 8. Detecção sérica de IgE, IgG2a e IgG1 em modelos experimentais de asma aguda submetidos a diferentes tratamentos. Protocolo de tratamento de modelos experimentais de asma aguda (A). Os níveis de IgE específico (B), IgG2a (C) e IgG1 (D) no soro dos animais foram detectados por ELISA indireto. Os dados estão expressos em Índice ELISA (IE). Diferença estatística obtida através do teste de Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$. Asterisco (*) representa a diferença significativa dos grupos em relação ao controle negativo (grupo PBS) e hastag (#) representa as diferenças em relação ao grupo OVA. OVA, ovalbumina; PGJ2 30, 15d-PGJ2 a 30µg/kg; PGJ2 100, 15d-PGJ2 a 100µg/kg; FLU, furoato de fluticasona 100µg/kg; FLU+ PGJ2 30, furoato de fluticasona 100µg/kg e 15d-PGJ2 a 30µg/kg; FLU+ PGJ2 100, furoato de fluticasona 100µg/kg e 15d-PGJ2 a 100µg/kg; PBS, solução salina.

8.3 Detecção de IgE, citocinas IL-5 e IL-10 no homogenato de animais tratados

Níveis de IgE específicos a OVA foram detectados por ELISA indireto. Observa-se redução significativa nos grupos tratados com 15d-PGJ2 100 µg/kg (PGJ2 100), furoato de fluticasona (FLU) e furoato de fluticasona combinada com 15d-PGJ2 100 µg/kg (FLU+P 100) quando comparado ao grupo OVA (Fig 9A).

ELISA para detecção de IL-5 revelou uma redução significativa no grupo tratado com furoato de fluticasona combinado com as diferentes concentrações de 15d-PGJ2 30 (FLU+P 30) e 100 µg/kg (FLU+P 100) (Fig 9B). Ao contrário, foi observada um aumento na produção de IL-10 no grupo tratado com 15d-PGJ2 30 µg/kg (PGJ2 30) quando comparado com o grupo OVA (Fig 9C).

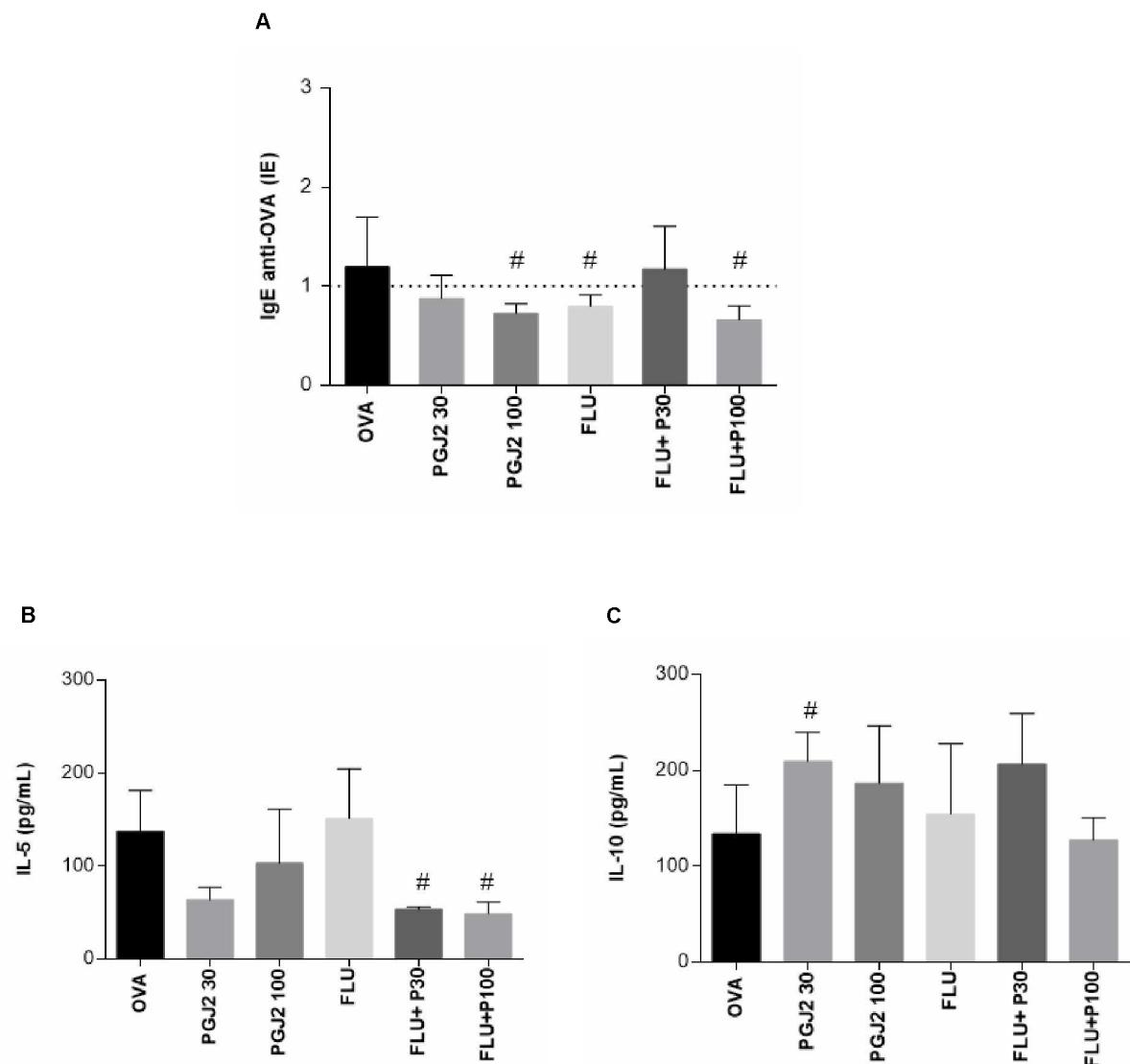


Figura 9. Detecção de IgE, IL-5 e IL-10 no homogenato pulmonar em modelos experimentais de

asma aguda submetidos a diferentes tratamentos. Foram quantificados níveis de IgE (A), expressos em Índice ELISA (IE), e citocinas IL-5 (B) e IL-10 (C), expressos em concentração (pg/mL). Os dados estão expressos em Índice ELISA (IE). Diferença estatística obtida através do teste de Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$. Asterisco (*) representa a diferença significativa dos grupos em relação ao controle negativo (grupo PBS) e hastag (#) representa as diferenças em relação ao grupo OVA. OVA, ovalbumina; PGJ2 30, 15d-PGJ2 a 30 μ g/kg; PGJ2 100, 15d-PGJ2 a 100 μ g/kg; FLU, furoato de fluticasona 100 μ g/kg; FLU+ PGJ2 30, furoato de fluticasona 100 μ g/kg e 15d-PGJ2 a 30 μ g/kg; FLU+ PGJ2 100, furoato de fluticasona 100 μ g/kg e 15d-PGJ2 a 100 μ g/kg; PBS, solução salina.

8.4 Análise histológica em modelos experimentais de asma aguda

A coloração de Picrosírius Red (PS) foi utilizada para corar fibras de colágeno e Hematoxilina e Eosina (H&E) para corar as células inflamatórias. A coloração com Picrosírius Red mostrou que houve deposição de colágeno nas condições em que as drogas eram combinadas, furoato de fluticasona associada a 15d-PGJ2 30 μ g/Kg (FLU+ PGJ2 30) (Fig. 10D) ou 15d-PGJ2 100 μ g/Kg (FLU+ PGJ2 100) (Fig 10E). As demais condições de tratamento, 15d-PGJ2 100 μ g/Kg (PGJ2 100) (Fig. 10A), 15d-PGJ2 30 μ g/Kg (PGJ2 30) (Fig. 10B), e furoato de fluticasona (FLU) (Fig. 10C), apresentam redução na deposição de fibras colágenas em relação ao grupo OVA (representado na fig. 8K por coloração PS).

Por meio da coloração por H&E, observa-se que nos grupos tratados com as drogas isoladas, 15d-PGJ2 100 μ g/Kg (PGJ2 100) (Fig. 10F), 15d-PGJ2 30 μ g/Kg (PGJ2 30) (Fig. 10G), e furoato de fluticasona (FLU) (Fig. 10H), não há presença de focos inflamatórios no pulmão. Já em relação aos grupos de animais tratados com a associação das drogas furoato de fluticasona e 15d-PGJ2 30 μ g/Kg (FLU+ PGJ2 30) (Fig. 10I), e furoato de fluticasona e 15d-PGJ2 100 μ g/Kg (FLU+ PGJ2 100) (Fig. 10J), observa-se a presença de infiltrados inflamatórios próximos ao redor de vasos e bronquíolos, indicando a presença de inflamação pulmonar.

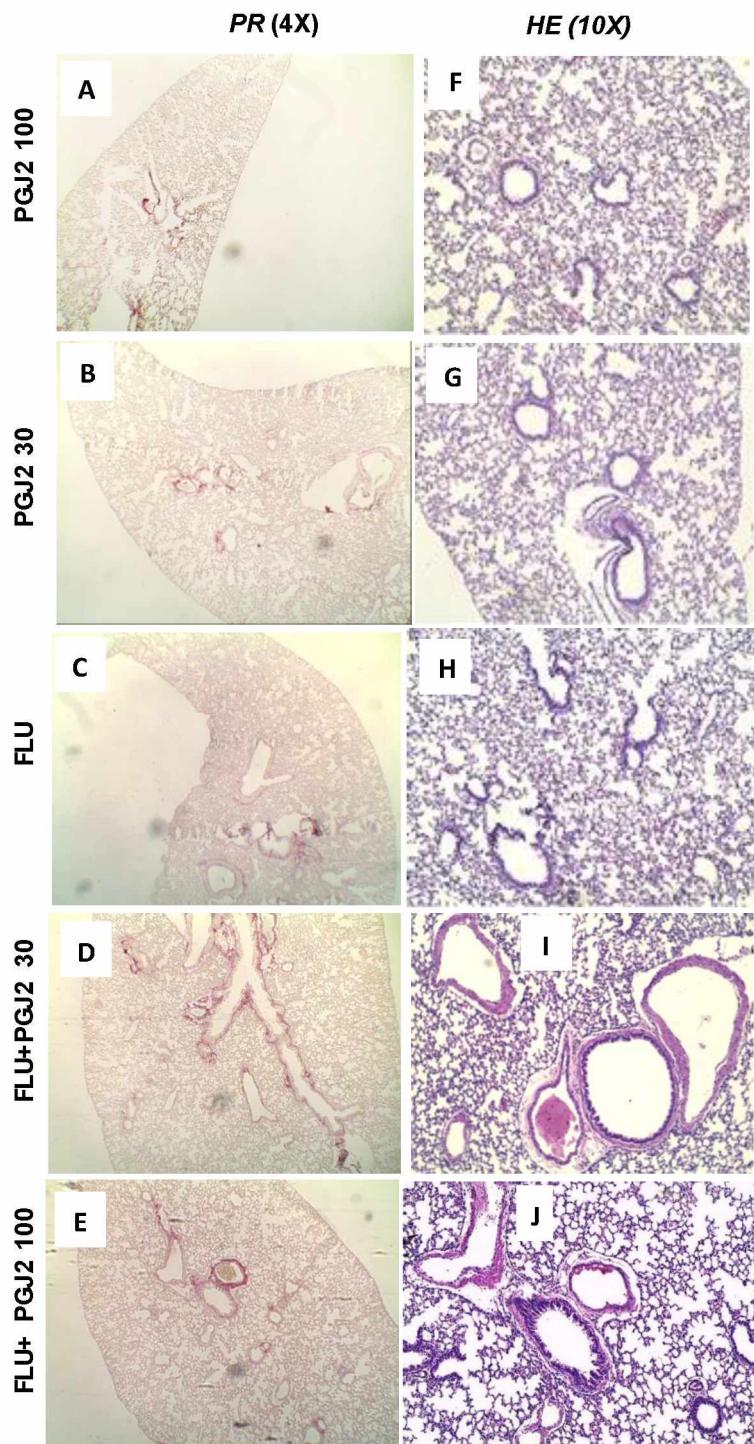


Figura 10. Análise do efeito dos tratamentos em cortes histopatológicos de modelo de asma aguda. Secções de tecidos pulmonares dos camundongos tratados corados com Picrosírius Red (PR) (A-E) e Hematoxilina e Eosina (H&E) (F-J), em aumento de 4x e 10x, respectivamente. Em (A, F) os cortes representam o pulmão do grupo de camundongos asmáticos tratados com 15d-PGJ2 100 μ g/kg (PGJ2 100); (B,G) 15d-PGJ2 30 μ g/kg (PGJ2 30); (C,H) furoato de fluticasona (FLU); em (D,I) os cortes do tecido pulmonar representam o grupo tratado com furoato de fluticasona associado a 15d-PGJ2 30 μ g/kg (FLU+ PGJ2 30), em (E,J) os cortes do tecido pulmonar representam o grupo tratado com furoato de fluticasona associado a 15d-PGJ2 100 μ g/kg (FLU+ PGJ2 100).

8.5 Avaliação do parâmetro respiratório em animais tratados

Análise da função respiratória basal e do volume corrente após realização do Teste de Broncoprovocação com Metacolina (TBM) foram mensurados através da espirometria no 14º dia do protocolo. A Fig. 11A representa o volume corrente do pulmão de camundongos tratados após a exposição às concentrações crescentes de Metacolina (6,25; 12,5 e 25 mg/mL). Observa-se que no grupo tratado com OVA e 15d-PGJ2 30 μ g/kg combinado com furoato de fluticasona (PGJ2 30 +FLU) há diferença significativa em relação ao grupo PBS em todas as doses utilizadas de metacolina. O grupo tratado com furoato de fluticasona apresentou redução significativa do volume corrente quando comparado ao grupo induzido com OVA em todas as concentrações de metacolina.

O volume corrente (Fig. 11B) e a frequência respiratória (Fig. 11C) utilizados pelos animais durante o ciclo respiratório foi analisado. Observa-se que no grupo OVA há maior volume corrente mobilizado em relação ao grupo PBS, enquanto nenhuma diferença na frequência respiratória foi detectada. O produto obtido do volume-minuto pela frequência respiratória está representado na figura 11D, com diferença significativa observada somente entre os grupos OVA e PBS.

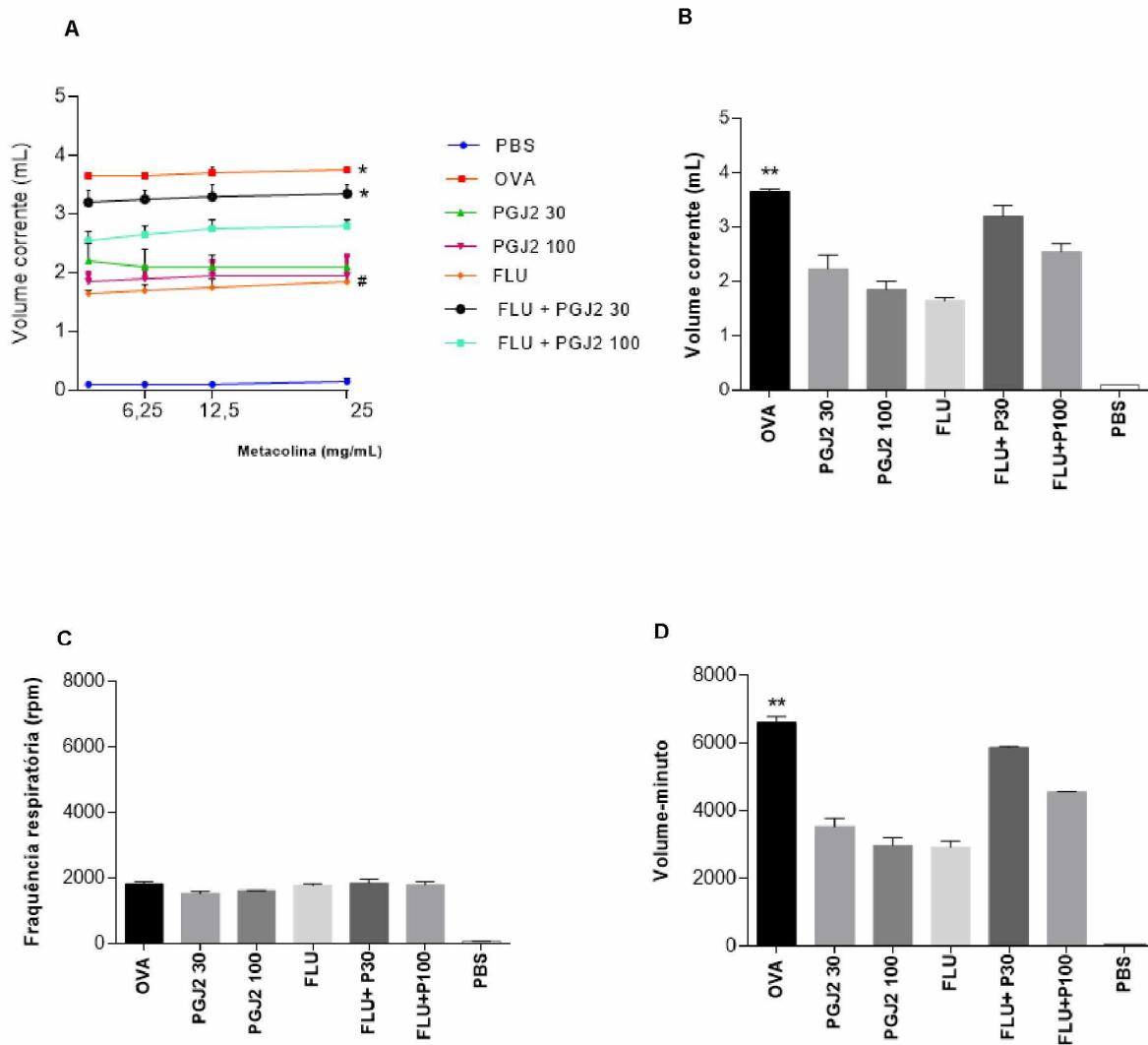


Figura 11. Análise dos parâmetros respiratórios. Análise da função respiratória basal e do volume corrente após realização do Teste de Broncoprovocação com Metacolina (TBM) com a exposição dos camundongos às concentrações crescentes de Metacolina (6.25, 12.5, 25 mg/mL) (A). O volume corrente mobilizado pelos animais durante o ciclo respiratório e a frequência respiratória está representado em (B) e (C) respectivamente. (D) representa o produto do volume corrente pela frequência respiratória. A análise estatística foi feita utilizando Kruskall-Wallis e pós teste de Dunn, sendo considerados significantes valores de $p < 0,05$. * representa diferença significativa comparada ao grupo PBS; # representa diferença significativa comparada ao grupo OVA. OVA, ovalbumina; PGJ2 30, 15d-PGJ2 a 30 μ g/kg; PGJ2 100, 15d-PGJ2 a 100 μ g/kg; FLU, furoato de fluticasona 100 μ g/kg; FLU+ PGJ2 30, furoato de fluticasona 100 μ g/kg associado a 15d-PGJ2 a 30 μ g/kg; FLU+ PGJ2 100, furoato de fluticasona 100 μ g/kg associado a 15d-PGJ2 a 100 μ g/kg; PBS, solução salina.

9. DISCUSSÃO

A asma é definida como uma doença crônica das vias aéreas com perfil heterogêneo caracterizada pela hiperresponsividade brônquica, inflamação pulmonar, resposta de remodelamento e obstrução das vias aéreas. Esta doença respiratória é um quadro comum na infância que pode causar morbidade significativa. Sua sintomatologia clínica é definida pela história de sintomas respiratórios tais como sibilância, respiração rápida e curta, aperto no peito e tosse que variam com o tempo e a intensidade, associados à variação do fluxo expiratório (PARK, 2014; MEYER, 2014; GINA, 2017).

A asma alérgica inclui episódios agudos que revertem espontaneamente ou com tratamento, ou episódios crônicos com mudanças estruturais que podem estar relacionadas a sintomas persistentes e redução da função pulmonar (LEMANSKE, BUSSE, 2010; GINA, 2017). Com o aumento de quadros recorrentes de asma no final dos anos 80 e início dos anos 90, vários países publicaram diretrizes sobre o diagnóstico e o manejo da asma. A preocupação global a cerca da crescente prevalência da asma e morbidade como sua consequência demandou a criação de uma “Conferência Internacional de Consenso sobre o Manejo da Asma”, onde ficou decidido a necessidade de implementar um programa para desenvolver recomendações baseadas em evidências para o tratamento da asma que poderia ser aplicável em todos os países do mundo (NAEP, 1992; BOULET et al., 2019).

A estratégia para considerar o tipo de tratamento adequado a cada paciente inclui uma análise individual que considera o fenótipo do paciente e possíveis reações adversas; a adaptação do tratamento; e revisão da resposta a intervenção escolhida. Esta análise, permite controlar e minimizar riscos futuros à efeitos indesejados em relação ao tratamento de escolha e possíveis recidivas do quadro da doença (BOULET et al., 2019).

Com a finalidade de desenvolver a investigação da regulação imunológica na asma e na rinite alérgica têm sido amplamente utilizados camundongos como modelos experimentais. O modelo de inflamação pulmonar alérgica em camundongos é importante também na avaliação de terapêuticas experimentais desta doença. Estes animais se reproduzem e amadurecem rápido, além de que há ampla disponibilidade de reagentes e marcadores da resposta imune para este modelo (KUMAR et al., 2000;

MALM-ERJEFÄLT et al., 2005; GUALDI, 2010). Portanto, este estudo utilizou linhagens de BALB/c para análise do quadro imunológico após tratamentos. Vários estudos destacam que camundongos desta linhagem desenvolve inflamação pulmonar semelhantemente ao perfil imunológico que se observa em humanos, e ainda com intenso recrutamento de células como mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, hipersecreção de muco, hiperresponsividade das vias aéreas, e ainda aumento da produção de IgE específica (NIALS, UDIN, 2008).

Injeções intraperitoneais e desafios inalatórios com ovalbumina (OVA) são conhecidas como um dos protocolos mais utilizados para induzir doenças alérgicas (GUEDERS et al, 2009). Os resultados obtidos neste estudo corroboram com outras pesquisas que apontam a OVA como potente indutor de asma alérgica. Por meio da análise da detecção de níveis de anticorpos IgE pode-se observar aumento significativo no soro de camundongos induzidos com OVA ao comparar com camundongos do grupo controle (PBS). Além disso, nota-se nos cortes histológicos a presença de células inflamatórias infiltradas ao redor de vasos e bronquiolos, e alterações no parâmetro respiratório indicando dificuldade respiratória no grupo OVA.

No tratamento de doenças alérgicas, tornou-se evidente a necessidade do uso de medicamentos anti-inflamatórios em larga escala (PAUWELS et al., 2003; REDDEL et al., 2017). Os corticosteróides inalatórios (CI) são atualmente o tipo de tratamento anti-alérgico mais eficiente e seguro, e sua ação responde melhor comparado aos anti-histamínicos tópicos ou orais para tratamento das alergia. É indicado para pacientes com sintomas de asma infrequentes, ou para aqueles que possuem fatores de risco para exacerbações. Pacientes que respondem bem a terapia com CI apresentam uma melhora na função pulmonar em pelo menos 50% dos casos (CHUNG et al., 2018).

Furoato de fluticasona é um dos corticosteróides mais utilizados para tratamento da asma grave. O radical furoato confere a estes glicocorticóides uma maior potência e seletividade ao receptor mineralocorticoide. As cadeias laterais dos ésteres de furoato proporcionam uma alta ação lipofílica, qualidade que pode facilitar a sua absorção pela mucosa nasal. É um composto sintético que possui 18 vezes mais afinidade pelo receptor de corticosteróides em comparação à dexametasona, que é considerada o padrão de referência (BELVISI et al., 2005; WALLACE et al., 2008). A ligação do esteroide ao receptor de glicocorticosteróide resulta em um novo

complexo molecular que se liga a regiões promotoras-estimuladoras de genes alvos, resultando em regulação positiva ou negativa do gene e seu produto. Embora possa melhorar a função pulmonar do paciente, a eficácia não é muito satisfatória para os casos mais avançados de doença alérgica (VALERA et al., 2009).

Doses acima de 500 µg/dia de CI atingem um platô e não ocorre aumento de eficácia, além disso esses medicamentos não são indicados para lactantes. Assim, na tentativa de evitar casos que necessitam de doses maiores de glicocorticoides, pesquisadores propuseram a associação de outras drogas, tais como β_2 -agonista de longa ação (HOLT et al., 2001; DE MOURA, CAMARGOS, DE BLIC, 2002).

Doses diferentes por terem características farmacológicas também diferentes, podem afetar a segurança alterando o índice terapêutico de glicocorticoides. Os riscos de efeitos adversos podem ser minimizados pelo uso de doses menores de corticosteroides associados a outras drogas. Portanto, neste estudo avaliamos o uso combinado do furoato de fluticasona, um corticosteroide com 15-desoxi-A12,14-PGJ2, uma prostaglandina com atividade anti-inflamatória.

Embora alguns estudos mostraram que drogas β_2 -agonista são ineficazes para o tratamento da asma (VERBERNE et al., 1993; KNORR et al., 2001), foi demonstrado que a combinação de salmeterol (β_2 -agonista) com propionato de fluticasona apontaram melhorias na resolução do processo alérgico quando comparado ao tratamento com propionato de fluticasona isoladamente (BATEMAN et al., 2019). O aumento do uso de β_2 -agonistas indica piora no controle da doença e sinaliza a necessidade de reavaliar o tratamento para alcançar o controle dos sintomas com outras drogas.

A 15-desoxi-A12,14-PGJ2 (15d-PGJ2) atua na resolução da inflamação protegendo células e tecidos em locais inflamados, por meio de mecanismos como o bloqueio da infiltração de leucócitos e a apoptose de polimorfonucleares infiltrados (FARNESI ASSUNÇÃO et al., 2012, COUTINHO et al., 2017). Esse mediador lipídico foi o primeiro ligante endógeno identificado de receptores ativados por proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ), além de ativar o fator de transcrição NF fator 2 relacionado ao eritróide 2 (NRF2) através da formação de adutos com o inibidor de NRF2 KEAP1. Sabe-se que tanto o PPAR γ quanto o NRF2 têm papel antiinflamatório através de ações que pode alterar a expressão de citocinas, quimiocinas e genes pró-inflamatórios. Diversos estudos mostraram que o 15d-PGJ2 tem potencial terapêutico

em modelos animais de doença inflamatória (FORMAN et al.; 1995; SCHER, PILLINGER, 2005; BAIRD, DINKOVA, 2011; SURH et al., 2011; NOLAN et al., 2015).

A ativação de células Th2 pode ocorrer pela liberação de citocinas, tais como a linfopoiética estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33 do epitélio, que podem ser induzidas por estímulos externos (alérgenos). Ao serem ativadas, as células Th2 liberam citocinas pró-inflamatórias que são expressas na submucosa brônquica de pacientes asmáticos, tais como IL-4, IL-5 e IL-13 (CHUNG, 2018).

Neste contexto, nossos dados mostraram uma redução nos níveis de IL-5 em animais tratados com furoato de fluticasona combinada com 15d-PGJ2 (nas concentrações de 30 e 100 μ g/mL) em comparação ao grupo OVA. No entanto, quando camundongos foram tratados somente 15d-PGJ2 (nas concentrações de 30 e 100 μ g/mL) ou furoato de fluticasona não foram observadas redução nos níveis de IL-5 em comparação a OVA. Este resultado contrasta com estudo realizado por Coutinho e colaboradores, que utilizando as mesmas doses de 15d-PGJ2 (30 e 100 μ g/mL) para o tratamento, observaram uma inibição da produção da citocina IL-5 induzidas pelo alérgeno OVA no tecido pulmonar (COUTINHO et al., 2017). As diferenças observadas entre nossos dados e os dados para o tratamento com 15d-PGJ2 descritos por Coutinho e colaboradores (2017), podem ser explicadas pelas diferenças no modelo de indução de alergia respiratória, já que nosso modelo é de asma aguda (14 dias de indução) e o descrito por estes autores é de asma crônica (28 dias).

Ao contrário da IL-5 que é característica de um perfil pró-inflamatório na alergia, IL-10 apresenta ação regulatória, por inibir a proliferação e a produção de células Th1, Th2 e Th17. A supressão de células T alérgeno-específicas tem sido associada a aumento da produção de IL-10 por células T reguladoras (TILL, 2004; VERHAGEN, 2006; PASSALACQUA, 2007). Em nosso trabalho observamos um aumento dos níveis de IL-10 no grupo tratado com 15d-PGJ2 30 μ g/kg, corroborando com os dados de análise histológica, onde este grupo de animais apresenta redução do infiltrado inflamatório em comparação a animais não tratados, porém não houve redução significativa de níveis de IgE sérico e pulmonar. A análise histológica das condições tratadas com 15d-PGJ2 mostra que houve redução do depósito de colágeno e de infiltrado inflamatório.

A redução na deposição de colágeno no grupo de animais tratados com 15d-PGJ2 poderia ser explicada pela diminuição de níveis TGF- β , assim como confirmado

por estudos realizados por Buress e colaboradores (2005), que mostraram que agonistas do PPAR γ , como 15d-PGJ2, têm atividades antiinflamatórias e podem ter potencial como agentes antifibróticos, por meio do bloqueio de TGF- β em fibroblastos pulmonares que induzem a diferenciação miofibroblástica e produção excessiva de colágeno (BURGESS et al., 2005).

Apesar da combinação de furoato de fluticasona e 15d-PGJ2 100 μ g/mL reduzir o nível sérico e pulmonar de IgE, a análise histológica indica que esta combinação, em modelos experimentais de asma, não é efetiva para reduzir a deposição de fibras colágenas quando compara-se com o tratamento das drogas isoladas. Considerando que 15d-PGJ2 e furoato de fluticasona podem ativar diferentes vias nas células, a combinação destas drogas podem ter produzido um efeito antagônico entre elas, reduzindo a eficácia do tratamento.

Vários estudos têm demonstrado o papel de células Th9 na participação do processo alérgico. Na presença de IL-4 e TGF- β , células T *naive* desenvolvem-se em células Th9, com a consequente produção de IL-9. A IL-9 é uma citocina pleiotrópica que influencia várias funções distintas de diferentes células-alvo, tais como células T, células B, mastócitos e células epiteliais das vias aéreas, ativando STAT1, STAT3 e STAT5 (KOCH, SOPEL, FINOTTO, 2016). Células Th9 são encontradas nos gânglios linfáticos e no trato respiratório, especialmente durante as fases iniciais da doença alérgica, e a IL-9 é conhecida como suficiente para causar hiperresponsividade brônquica através de seus efeitos sobre o epitélio respiratório e a liberação aumentada de citocinas Th2 (TEMANN, RAY, FLAVELL, 2002; TEMANN et al., 2007). Assim, mais estudos devem ser conduzidos para esclarecer o fenômeno imune subjacente ao tratamento com 15d-PGJ2, com quantificação dos níveis de outras citocinas, incluindo a análise de TGF- β e IL-4.

Estudos anteriores mostraram que os glicocorticóides, tais como propionato de fluticasona e dexametasona, podem ser uma terapia útil para prevenir a remodelação tecidual da *transição epitélio-mesenquimal* (EMT) induzida por TGF- β 1 por meio de vias de sinalização MAPK e Snail/Slug (YANG et al., 2017). O TGF- β atua como um potente estimulador para a formação do tecido conjuntivo durante o reparo da ferida e em condições fibróticas, é conhecida por induzir *transição epitélio-mesenquimal* (EMT) perderem as junções célula-célula, induzindo a sua separação das células circundantes e estimulando adquirir características de células mesenquimais. Seu

efeito parece ser mediado por um mecanismo indireto envolvendo o fator de crescimento do tecido conjuntivo. Estes dados corroboram com a análise histológica, no tratamento com furoato de fluticasona, apresentada em nossos resultados onde observamos redução de fibras colágenas que podem estar associadas a níveis de TGF- β . Chetta e colaboradores (2006) também relataram que altas doses de fluticasona inibem a remodelação das vias aéreas reduzindo tanto a vascularização submucosa quanto a espessura da membrana basal (CHETTA et al., 2006).

Os efeitos antifibróticos dos agonistas de PPAR γ , 15d-PGJ2, nem sempre são mediados por mecanismos dependentes deste receptor. Assim, uma hipótese levantada para análise de todas as condições de tratamento, é que 15d-PGJ2 tenha atuado por via independente de TGF- β , que quando associada a furoato de fluticasona, possa estar induzindo a produção desta citocina. Esta possibilidade será investigada em estudos futuros de nosso grupo.

Em cerca de 5 a 10% dos pacientes, a asma é refratária ao tratamento com corticosteroides e muitas vezes leva a internações hospitalares. Devido aos efeitos adversos mais graves causados pela intervenção com glicocorticoides, é importante avaliar novas formas de tratamento para alergia. Portanto, é importante aprimorar o conhecimento a cerca da ação das drogas, a nível molecular e imunológico, e suas combinações farmacológicas como forma de desenvolver novas estratégias terapêuticas que podem proporcionar melhoria na qualidade de vida de pacientes acometidos por doenças alérgicas.

10. CONCLUSÕES

- No presente trabalho, alérgeno recombinante Blo t 5, do ácaro *Blomia tropicalis*, foi produzido e purificado permitindo o acoplamento em às microesferas magnéticas conjugadas com o grupo químico N-Hidroxisuccinimida (NHS).
- A estratégia de acoplamento do alérgeno rBlo t 5 às microesferas magnéticas permitiu o desenvolvimento da prova de conceito de novo teste imunológico baseado em fluorescência (EFB) para detecção de anticorpos IgG4 alérgeno específicos.
- O teste EFB conseguiu discriminar amostras positivas e negativas para anticorpos IgG4 específicos para rBlo t 5 utilizando somente 5 µL de amostra com tempo execução relativamente rápido, e ainda um baixo custo por amostra.
- No presente estudo foi reproduzido um modelo experimental de asma aguda induzido por ovalbumina (OVA), confirmado pelo aumento dos níveis de IgE sérica e pulmonar, presença de infiltrado inflamatório pulmonar e alteração de parâmetros respiratórios.
- O tratamento de animais com asma aguda utilizando furoato de fluticasona (100 µg/kg) ou 15d-PGJ2 (100 µg/kg) reduziu a produção de IgE pulmonar concomitante à redução de infiltrado inflamatório neste órgão.
- As combinações farmacológicas furoato de fluticasona com 15d-PGJ2 não são efetivas para o tratamento do modelo experimental da asma aguda, já que animais que receberam esta associação de fármacos demonstraram maior infiltrado inflamatório pulmonar, deposição de fibras colágenas neste órgão e piores parâmetros de função de respiratória.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. (4^a Edição), Livraria e Editora Revinter Ltda, 2003.

ABRAMSON, M. J.; PUY, R. M.; WEINER, J. M. Injection Allergen Immunotherapy for Asthma. The Cochrane database of systematic reviews, n. 8, p. CD001186, 2010. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001186.pub2>.

ACEVEDO, N. et al. Particular characteristics of allergic symptoms in tropical environments: Follow up to 24 months in the FRAAT birth cohort study. *BMC Pulmonary Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-12-13>

AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 133, n. 3, p. 621-631, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1088>

AGOSTINIS, F.; FORTI, S.; DI BERARDINO, F. Grass Transcutaneous Immunotherapy in Children with Seasonal Rhinoconjunctivitis. *Allergy*, v. 65, n. 3, p. 410-411, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02189.x>

ARENDE, E. E. et al. Corticóide inalatório: efeitos no crescimento e na supressão adrenal. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132005000400012>

ARRUDA, L. K. et al. Recombinant allergens: role in diagnosis and in allergen-specific immunotherapy. *Brazilian Journal of Allergy and Immunology (BJAI)*, v. 1, n. 4, p. 211-218, 2013. <https://doi.org/10.5935/2318-5015.20130027>

ANTÓ, J.M. et al. Understanding the complexity of IgE-related phenotypes from childhood to young adulthood: a Mechanisms of the Development of Allergy (MeDALL) seminar. *J. Allergy Clin. Immunol.* v. 129, n.4, p. 943-54.e4, 2012.

AUFFRAY, C. et al. An integrative systems biology approach to understanding pulmonary diseases. *Chest*. V. 137, n.6, p.1410-1416, 2010.
<https://doi.org/10.1378/chest.09-1850>

AUN, M.V. et al. Animal models of asthma: utility and limitations. *J. Asthma Allergy*. v.10, p.293-301, 2017. <https://doi.org/10.2147/JAA.S121092>

BACHARIER, L.B. et al. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy*. v. 63, n. 1, p.5-34, 2008.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01586.x>

BAIRD, L.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. The Cytoprotective Role of the Keap1-Nrf2 Pathway. *Archives of toxicology*, v. 85, n. 4, p. 241-272, 2011.
<https://doi.org/10.1007/s00204-011-0674-5>.

BALDACCI, S., OMENAAS, E., ORYSZCZYN, M.P. Allergy markers in respiratory epidemiology. *Eur. Respir. J.* v. 17, n. 4, p.773-790, 2001.
<https://doi.org/10.1183/09031936.01.17407730>.

BANNO, A. et al. PPARs: Key Regulators of Airway Inflammation and Potential Therapeutic Targets in Asthma. *Nuclear Receptor Research*, v. 5, 2018.
<https://doi.org/10.11131/2018/101306>.

BAPTISTELLA, E. et al. Allergen-Specific Immunotherapy in Patients 55 Years and Older: Results and Review of Literature. *International archives of otorhinolaryngology*, v. 17, n. 4, p. 375-379, 2013.
<https://doi.org/10.1055/s-0033-1353138>.

BATEMAN, E. D. et al. Global Initiative for Asthma 2016-Derived Asthma Control with Fluticasone Propionate and Salmeterol: A Gaining Optimal Asthma Control (GOAL) Study Reanalysis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, v. 123, n. 1, p. 57- 63.e2, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.04.018>.

BEHL, T. et al. Implications of the endogenous PPAR-gamma ligand, 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2, in diabetic retinopathy. *Life Sciences*, v. 14, p. 153-193, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.054>

BELVISI, M. G.; MITCHELL, J. A. Targeting PPAR receptors in the airway for the treatment of inflammatory lung disease. *British Journal of Pharmacology*, v. 158, n. 4, p. 994-1003, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00373.x>

BOJCUKOVA, J., et al. Comparison of two multiplex arrays in the diagnostics of allergy. *Clinical and Translational Allergy*, v. 9, n. 31, 2019.
<https://doi.org/10.1186/s13601-019-0270-y>

BOULET, L.-P. et al. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Disponível em: <<https://ginasthma.org/>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

BOUSQUET, J. et al. MeDALL (Mechanisms of the Development of ALLergy): an integrated approach from phenotypes to systems medicine. *Allergy*.v.66, n.5, p.596-604, 2011

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BREHLER, R., GRUNDMANN, S., STÖCKER, B. Cross-reacting carbohydrate determinants and hymenoptera venom allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, v.13, n. 4, p. 360-364, 2013. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e328362c544>

BRODLIE, M. et al. Leukotriene receptor antagonists as maintenance and intermittent therapy for episodic viral wheeze in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v.19, n.10, 2015.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD008202.pub2>

BROŽEK, J.L. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J. Allergy Clin. Immunol.* v. 140, n.4, p. 950-958, 2017.

BRUNTON, L.L. et al. GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 12a Edição. Porto Alegre (RS): Mc Graw Hill/Artmed, 2012.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. As bases farmacológicas da terapêutica Goodman & Gilman. (13ª edição), Rio de Janeiro: Editora Mc-Grawhill, 2018.

BRUHN, S. et al. A generally applicable translational strategy identifies S100A4 as a candidate gene in allergy. *Sci. Transl. Med.*v.6,p.218ra4, 2014
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007410>

BULEK, K. et al. Epithelium: The Interplay between Innate and Th2 Immunity. *Immunology and cell biology*, v. 88, n. 3, p. 257-268, 2010.
<https://doi.org/10.1038/icb.2009.113>

BUNNAG, C. et al. Adverse reactions to allergen injection: The Siriraj experience. *Siriraj Hosp Gaz.* v. 54, p. 517-23, 2002.

CAMPOS, H.S. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróideAsthma: its origins, inflammatory mechanisms and the role of the corticosteroid. *Rev. Bras. Pneumol.* Sanit., Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 47-60, dez. 2007. <https://doi.org/10.5123/S1982-32582007000100007>

CANONICA, G. W. et al. A WAO-ARIA-GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organization Journal*, v. 6, n.1, p. 1-17, 2013. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-6-17>

CARABALLO, L. et al. Identification of allergens from the mite *Blomia tropicalis*. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, v. 24, n. 11, p. 1056-60, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1994.tb02743.x>

CARABALLO, L. et al. Particularities of allergy in the TropicsWorld Allergy Organization Journal, v. 9, n. 1, p. 20, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40413-016-0110-7>

CARRAPATOSO, I.; CADINHA, S.; SANZ, M. L. Aplicação do teste de activação dos basófilos no estudo de reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos. Rev Port Imunoalergologia, v. 13, n.2, p.153-164, 2005.

CHAN, S. L. et al. Nuclear Magnetic Resonance Structure and IgE Epitopes of Blo t 5, a Major Dust Mite Allergen. The Journal of Immunology, v. 181, n. 4, p. 2586-2596, 2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2586>

CHAPMAN, M. D. et al. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 106, n. 3, p. 409-418, 2000. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.109832>

CHETTA, A. et al. Reference Values for the 6-Min Walk Test in Healthy Subjects 20-50 Years Old. Respiratory medicine, v. 100, n. 9, p. 1573-1578, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.01.001>

CHONG NETO, H. et al. Diretrizes da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e Sociedade Brasileira de Pediatria para sibilância e asma no pré-escolar. Arquivos de asma, alergia e imunologia, v. 2, 2019. <https://doi.org/10.5935/2526-5393.20180003>

CHOW, J.Y. et al. Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33: implications for allergic inflammation. Cell. Mol. Immunol. v.7, p. 26-34, 2010. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.106>

CHUNG, K. F. Precision Medicine in Asthma: Linking Phenotypes to Targeted Treatments. Current opinion in pulmonary medicine, v. 24, n. 1, p. 4-10, 2018. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000434>

COHN, L. et al. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. The Journal of experimental medicine, v. 186, n. 10, p. 1737-47, 1997. <https://doi.org/10.1084/jem.186.10.1737>

COHN, L.; ELIAS, J. A.; CHUPP, G. L. AsthmA: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. Annual Review of Immunology, v. 22, n. 1, p. 789-815, 2004. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104716>

COMPALATI, E. et al. Specific Immunotherapy for Respiratory Allergy: State of the Art According to Current Meta-Analyses. Annals of allergy, asthma & immunology :

official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology, v. 102, n. 1, p. 22-28, 2009. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60103-2](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60103-2)

CONRAD, M.L. et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin. Exp. Allergy.* v. 38, n.8, p. 1246-1254, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03260.x>

COTTIN, V. Eosinophilic Lung Diseases. *Clinics in Chest Medicine*, v. 37, n. 3, p. 535-556, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.04.015>

COUTINHO, D. S. et al. 15-deoxy-delta-12,14-Prostaglandin J2 inhibits lung inflammation and remodeling in distinct murine models of Asthma. *Frontiers in Immunology*, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00740>

COX, L. et al. Allergen immunotherapy: A practice parameter third update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.034>

CRISTINA, E. et al. Uso de técnicas de análise histológica e imunohistoquímica em Odontologia. *Arch Health Invest*, 2013.

CUERVO-PEREZ, J. F.; CAMILO ARANGO, J.; CARDONA-ARIAS, J. A. Evaluación de técnicas inmunológicas in vitro para el diagnóstico de alergias: metanálisis 2000-2012. *Revista Española de Salud Pública*, 2014. <https://doi.org/10.4321/S1135-57272014000100005>

CUI, Y.; WANG, Q.; JIA, H. Consideration of methods for identifying mite allergens. *Clinical and Translational Allergy*, v. 8, n. 1, p. 14, 27 dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13601-018-0200-4>

DA SILVA, Eduardo S. et al. Allergens of *Blomia tropicalis*: an overview of recombinant molecules. *International archives of allergy and immunology*, v. 172, n. 4, p. 203-214, 2017. <https://doi.org/10.1159/000464325>

DAYAN, D. et al. Are the polarization colors of Picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*, 1989. <https://doi.org/10.1007/BF00266843>

DE, L.; TIMM, L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. *Caderno La Salle XI*, 2005.

DE SÁ, D. C.; FESTA NETO, C. Inflammasomes and dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2016. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20165577>

DENG, S; YIN, J. Clinical utility of basophil activation test in diagnosis and predicting severity of mugwort pollen-related peach allergy. *World Allergy Organization Journal*, v. 12, n. 6, p. 100043, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.waojou.2019.100043>

DENNIS, R. et al. Asthma and other allergic conditions in Colombia: A study in 6 cities. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 2004.
[https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61265-3](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61265-3)

DESVERGNE, B; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.*, Chevy Chase, v. 20, n. 5, p. 649-688, 1999.
<https://doi.org/10.1210/edrv.20.5.0380>

DIVEKAR, R.; KITA, H. Recent Advances in Epithelium-Derived Cytokines (IL-33, IL-25, and Thymic Stromal Lymphopoietin) and Allergic Inflammation. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, v. 15, n. 1, p. 98-103, 2015.
<https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000133>

DOS SANTOS, R. V.; TITUS, R. G.; LIMA, H. C. Objective evaluation of skin prick test reactions using digital photography. *Skin Research and Technology*, 2007.

DULLAERS, M. et al. House dust mite-driven asthma and allergen-specific T cells depend on B cells when the amount of inhaled allergen is limiting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 140, n. 1, p. 76- 88.e7, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.020>

ECKMAN, J.; SAINI, S. S.; HAMILTON, R. G. Diagnostic evaluation of food-related allergic diseases. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 2009.
<https://doi.org/10.1186/1710-1492-5-2>

FARNESI-DE-ASSUNÇÃO, T. S. et al. PPAR- γ agonists, mainly 15d-PGJ 2, reduce eosinophil recruitment following allergen challenge. *Cellular Immunology*, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.11.010>

FERREIRA, F.; INACIO, F. Patologia associada ao trigo: Alergia IgE e não IgE mediada, doença celíaca, hipersensibilidade não celíaca, FODMAP. *Rev Port Imunoalergologia*, v. 26, n. 3, p. 171-187, 2018.

FERRANTE, G; LA GRUTTA, S. The burden of pediatric asthma. *Frontiers in pediatrics*, v. 6, p. 186, 2018. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00186>

FORMAN, B. M. et al. 15-Deoxy-Delta 12, 14-Prostaglandin J2 Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR Gamma. *Cell*, v. 83, n. 5, p. 803-812, 1995.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90193-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90193-0)

FOSTER, P. S. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *Journal of Experimental Medicine*, v. 183, n. 1, p. 195-201, 1996.
<https://doi.org/10.1084/jem.183.1.195>

FOSTER, P. S. et al. Modeling T H 2 responses and airway inflammation to understand fundamental mechanisms regulating the pathogenesis of asthma. *Immunological Reviews*, 2017. <https://doi.org/10.1111/imr.12549>

FOTOPOULOU, M. et al. A short period of breastfeeding in infancy, excessive house cleaning, absence of older sibling, and passive smoking are related to more severe atopic dermatitis in children. *European Journal of Dermatology*, 2018.

FUJITA, H. et al. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clinical and Translational Allergy*, v. 2, n. 1, p. 2, 2012. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-2-2>

GARCÍA MILIÁN, A. J.; SANTOS MUÑOZ, L.; CIRIA MARTÍN, A. Inmunología y consumo de medicamentos: reacciones adversas de baja frecuencia tipo B. *Revista Médica Electrónica*, v. 40, n. 2, p. 406-419, 2018.

GEORAS, S. N.; REZAAE, F. Epithelial Barrier Function: At the Front Line of Asthma Immunology and Allergic Airway Inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 134, n. 3, p. 509-520, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.05.049>

GINA - Global Initiative for Asthma - Bethesda: Global Initiative for Asthma (2006). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Disponível em: <<https://ginasthma.org/>> Acesso em: 23 março, 2019.

GLEICH, G. The Biology of the Eosinophilic Leukocyte. *Annual Review of Medicine*, 1993. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.44.1.85>

GODAR, M. et al. A bispecific antibody strategy to target multiple type 2 cytokines in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 142, n. 4, p. 1185-1193. e4, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.06.002>

GUEDERS, M. M. et al. Mouse Models of Asthma: A Comparison between C57BL/6 and BALB/c Strains Regarding Bronchial Responsiveness, Inflammation, and Cytokine Production. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society*, v. 58, n. 12, p. 845-854, 2009.
<https://doi.org/10.1007/s00011-009-0054-2>

HOLT, S. et al. Dose-Response Relation of Inhaled Fluticasone Propionate in Adolescents and Adults with Asthma: Meta-Analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 323, n. 7307, p. 253-256, 2001. <https://doi.org/10.1136/bmj.323.7307.253>

HUNT, J. et al. Attenuation of IgE affinity for Fc ϵ RI radically reduces the allergic response in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804742200>

IGETEI, Joseph E. et al. Antigenic cross-reactivity between *Schistosoma mansoni* and pollen allergens from the birch tree (*Betula verrucosa*) and Timothy grass (*Phleum pratense*): involvement of shared glycan epitopes and implications for the hygiene hypothesis. *International journal for parasitology*, v. 48, n. 5, p. 345-357, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.12.005>

IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J. bras. pneumol.*, São Paulo , v. 32, supl.7, p.S447-S474, Nov. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180637132006001100002&lng=en&nrm=iso> Accesso em 19 junho. 2019. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132006001100002>

ISHIZAKA, A. et al. The inductive effect of interleukin-4 on IgG4 and IgE synthesis in human peripheral blood lymphocytes. *Clinical and experimental immunology*, v. 79, n. 3, p. 392-396, 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb08101.x>

ITOH, N.; ITAGAKI, Y.; KURIHARA, K. Rush Specific Oral Tolerance Induction in School-Age Children with Severe Egg Allergy: One Year Follow Up. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, v. 59, n. 1, p. 43-51, 2010. <https://doi.org/10.2332/allergolint.09-OA-0107>

JAMES, L.K., TILL, S.J. Potential Mechanisms for IgG4 Inhibition of Immediate Hypersensitivity Reactions. *Curr. Allergy Asthma Rep.* v.16,n.3,p. 23,2016. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0600-2>

JOHANSSON, S.G., et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(5):832-836. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.591>

JONES, S. M. et al. Clinical Efficacy and Immune Regulation with Peanut Oral Immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 124, n. 2, p. 292-300, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.022>

KAIKO, G.E., FOSTER, P.S. New insights into the generation of Th2 immunity and potential therapeutic targets for the treatment of asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* v. 1, p. 38-45, 2011. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e328342322f>

KANG, H. S. et al. Different anti-remodeling effect of nilotinib and fluticasone in a chronic asthma model. *The Korean journal of internal medicine*, v. 31, n. 6, p. 1150-1158, 2016. <https://doi.org/10.3904/kjim.2015.002>

KNORR, B. et al. Montelukast, a Leukotriene Receptor Antagonist, for the Treatment of Persistent Asthma in Children Aged 2 to 5 Years. *Pediatrics*, v. 108, n. 3, p. E48, 2001. <https://doi.org/10.1542/peds.108.3.e48>

KOCH, S.; SOPEL, N.; FINOTTO, S. Th9 and Other IL-9-Producing Cells in Allergic Asthma. *Seminars in immunopathology*, v. 39, n. 1, p. 55-68, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0601-1>

KOS, S. et al. Preliminary study in specific activity of molecular components in allergy: Implications for diagnostics and relationship with disease severity. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0726>

LACHAPELLE, P. et al. Safer Approaches to Therapeutic Modulation of TGF-Beta Signaling for Respiratory Disease. *Pharmacology & therapeutics*, v. 187, p. 98-113, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.010>

LAHIANI, S. et al. Cross-Reactivity between Major IgE Epitopes of Family 5 Allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis*. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 178, n. 1, p. 10-18, 2019. <https://doi.org/10.1159/000492871>

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. Allergens and the Airway Epithelium Response: Gateway to Allergic Sensitization. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 134, n. 3, p. 499-507, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.06.036>

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H.; FAHY, J. V. The Cytokines of Asthma. *Immunity*, v. 50, n. 4, p. 975-991, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.018>

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

LEE, D. et al. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. *Pharmacology and Therapeutics*, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.01.003>

LENNEY, W. et al. Improving the global diagnosis and management of asthma in children. *Thorax*, 2018. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-211626>

LIENDO, V.L et al. Topical tacrolimus for the treatment of severe allergic keratoconjunctivitis in children. *Arq. Bras. Oftalmol.* v.80, n.4,p. 211-214, 2017. <https://doi.org/10.5935/0004-2749.20170052>

LI, Y. et al. Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR γ . *Nature Structural and Molecular Biology*, 2008. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1447>

LIAW, S.-H. et al. Acid-Induced Polymerization of the Group 5 Mite Allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 285, n. 2, p. 308-312, jul. 2001. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5184>

LIN, A. A.; FREEMAN, A. F.; NUTMAN, T. B. IL-10 Indirectly Downregulates IL-4-Induced IgE Production by Human B Cells. *ImmunoHorizons*, v. 2, n. 11, p. 398-406, 2018. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800076>

LÖTZSCH, Bianca et al. Exploratory analysis of CD63 and CD203c expression in basophils from hazelnut sensitized and allergic individuals. *Clinical and translational allergy*, v. 6, n. 1, p. 45, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13601-016-0134-7>

LUPINEK, C. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip. *Methods*. v.66,n.1,p.106-119,2014. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.10.008>

MCIVOR, E.; MCIVOR, R. A. The evolving role of tiotropium in asthma. *Journal of Asthma and Allergy*, 2017. <https://doi.org/10.2147/JAA.S140577>

MINCHAM, K. T. et al. Early Life Ovalbumin Sensitization and Aerosol Challenge for the Induction of Allergic Airway Inflammation in a BALB/c Murine Model. *Bio-protocol*, v. 9, n. 5, p. e3181, 2019. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3181>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário terapêutico nacional 2010: Rename 2010. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

MOGHADERI, M.; HOSSEINI TESHNIKI, S.; FARJADIAN, S. Sensitization to common allergens among patients with allergies in major Iranian cities: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology and health*, v. 39, p. e2017007, 2017. <https://doi.org/10.4178/epih.e2017007>

MOOTE, W.; KIM, H.; ELLIS, A. K. Allergen-specific immunotherapy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, v. 14, n. S2, p. 53, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0282-5>

MOTTA, A. A.; KALIL, J.; BARROS, M. T. Testes Cutâneos. *Rev. bras. alerg. imunopatol.*, 2005.

MOURA, J. A. R. de; CAMARGOS, P. A. M.; BLIC, J. de. Tratamento profilático da asma. *Jornal de Pediatria*, v. 78, p. S141-S150, 2002.
<https://doi.org/10.1590/S0021-75572002000800005>

MOUSALLEM, T.; BURKS, A. W. Immunology in the Clinic Review Series; Focus on Allergies: Immunotherapy for Food Allergy. *Clinical and experimental immunology*, v. 167, n. 1, p. 26-31, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04499.x>

NIKSARLIOĞLU, E.Y. et al. Prevalence of atopy and allergic rhinitis in patients with adult non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Turk. J. Med. Sci.* v. 49, n.2, p.551-557, 2019. <https://doi.org/10.3906/sag-1807-229>

NOH, G., PARK, C.K.; HA, Chang, W. Immunotherapy of lidocaine allergy by intravenous desensitization using IFN-gamma from a case: Overcoming impediments using IFN-gamma during desensitization. *Clinical case reports*, v. 7, n. 5, p. 903, 2019. <https://doi.org/10.1002/ccr3.2038>

OKAMOTO, S. et al. Predictive value of IgE/IgG4 antibody ratio in children with egg allergy. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, v. 8, n. 1, p. 9, 2012.
<https://doi.org/10.1186/1710-1492-8-9>

OLIVEIRA, V.J. Efeitos da natação sobre os parâmetros morfológicos e imunológicos em um modelo murino de inflamação pulmonar induzido pelo alérgeno recombinante Blo t 5 do ácaro *Blomia tropicalis*. 2018. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) -Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

PAPADOPOULOS, N.G. et al. International consensus on (ICON) pediatric asthma. *Allergy*. v. 67, n.8, p. 976-977, 2012.

PAUWELS, R. A. et al. Early Intervention with Budesonide in Mild Persistent Asthma: A Randomised, Double-Blind Trial. *Lancet* (London, England), v. 361, n. 9363, p. 1071-1076, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12891-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12891-7)

PAVEGLIO, S. et al. FcRn-mediated intestinal absorption of IgG anti-IgE/IgE immune complexes in mice. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 42, n. 12, p. 1791-1800, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.04043.x>

PEULA-GARCIA, J. M.; MOLINA-BOLIVAR, J. A.; VELASCO, J.; ROJAS, A.; GALISTEO-GONZALEZ, F. Interaction of bacterial endotoxine (lipopolysaccharide) with latex particles: application to latex agglutination immunoassays. *J Colloid Interface Sci*, v. 245, n. 2, p. 230-6, 2002. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7958>

PEREIRA, E. A. L.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ALMEIDA, K. C.; ALVES, R.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. *Allergy*, Copenhagen, v. 60, n. 3, p. 401-406, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00738.x>

PITTNER, G. et al. Component-Resolved Diagnosis of House-Dust Mite Allergy with Purified Natural and Recombinant Mite Allergens. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, v. 34, n. 4, p. 597-603, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.1930.x>

PLATTS-MILLS, T. et al. Sensitisation, Asthma, and a Modified Th2 Response in Children Exposed to Cat Allergen: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Lancet* (London, England), v. 357, n. 9258, p. 752-756, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04168-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04168-4)

PLATTS-MILLS, T. A. et al. IgA and IgG anti-ragweed antibodies in nasal secretions. Quantitative measurements of antibodies and correlation with inhibition of histamine release. *Journal of Clinical Investigation*, v. 57, n. 4, p. 1041-1050, 1976. <https://doi.org/10.1172/JCI108346>

PLATTS, M.T.A. et al. IgE in the diagnosis and treatment of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.137, p. 1662-1670, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.010>

PLATTS, M.T.A. et al. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.,100,p. (6 Pt 1):S2-24,1997. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70292-6](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70292-6)

PLATTS, M.T.A. The allergy epidemics: 1870-2010. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.136, p.3-13, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.048>

RAISSY, H. H. et al. Inhaled corticosteroids in lung diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1164/rccm.201210-1853PP>

RAMOS, R. E. M.; LYRA, N. R. S.; OLIVEIRA, C. M. de. Alergia alimentar: Reações e métodos diagnóstico. *Journal of Management & Primary Health Care*, 2013. <https://doi.org/10.14295/jmphc.v4i2.170>

REDDEL, H. K. et al. Should Recommendations about Starting Inhaled Corticosteroid Treatment for Mild Asthma Be Based on Symptom Frequency: A Post-Hoc Efficacy Analysis of the START Study. *Lancet* (London, England), v. 389, n. 10065, p. 157-166, 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31399-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31399-X)

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2011. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>

RICE, J. L. et al. Allergen-Specific Immunotherapy in the Treatment of Pediatric Asthma: A Systematic Review. *Pediatrics*, 2018. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-3833>

RIZZO, M. C. et al. IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in São Paulo, Brazil. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, v. 7, n. 4, p. 242-8, 1997.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, C. E.; SOSSA-BRICEÑO, M. P.; CASTRO-RODRIGUEZ, J. A. Cost-utility analysis of the inhaled steroids available in a developing country for the management of pediatric patients with persistent asthma. *Journal of Asthma*, 2013. <https://doi.org/10.3109/02770903.2013.767909>

RUBINI, N.P.M, et al. Guia práctico sobre controle ambiental para pacientes com rinite alérgica. *Arq Asma Alerg Imunol*, v.7, n. 1, p. 22, 2017. <https://doi.org/10.5935/2526-5393.20170004>

SÁNCHEZ, J.; SÁNCHEZ, A.; CARDONA, R. Preguntas comunes en alergias. Enfoque práctico para el diagnóstico y manejo en atención primaria. *Revista Alergia México*, v. 65, n. 3, p. 117, 2018. <https://doi.org/10.29262/ram.v65i3.309>

SANTOS, A. F. et al. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 134, n. 3, p. 645-652, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.04.039>

SANTOS DA SILVA, E. et al. Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 172, n. 4, p. 203-214, 2017. <https://doi.org/10.1159/000464325>

SATITSUKSANO, P. et al. Modified Allergens for Immunotherapy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11882-018-0766-x>

SATOGUINA, J. S. et al. T Regulatory-1 Cells Induce IgG4 Production by B Cells: Role of IL-10. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), v. 174, n. 8, p. 4718-4726, 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4718>

SCHER, J. U.; PILLINGER, M. H. 15d-PGJ2: The Anti-Inflammatory Prostaglandin? *Clinical immunology* (Orlando, Fla.), v. 114, n. 2, p. 100-109, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.09.008>

SCHMIT, D. et al. Allergic airway inflammation induces migration of mast cell populations into the mouse airway. *Cell and Tissue Research*, v. 369, n. 2, p. 331-340, 25 ago. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2597-9>

SCHOOS, A. M. M. et al. Disagreement between skin prick test and specific IgE in young children. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015. <https://doi.org/10.1111/all.12523>

SHAMJI, M.H. et al. Nasal allergen-neutralizing IgG4 antibodies block IgE-mediated responses: Novel biomarker of subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.143, n.3, p. 1067-1076, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.039>

SHAMJI, M.H., et al. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI position paper. *Allergy*. v.72,p.1156-1173,2017. <https://doi.org/10.1111/all.13138>

SHILOVSKIY, I.P. et al. Experimental protocol for development of adjuvant-free murine chronic model of allergic asthma. *J. Immunol. Methods*. v.468, p.10-19, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.03.002>

SHIN, Y. S.; TAKEDA, K.; GELFAND, E. W. Understanding asthma using animal models. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 2009. <https://doi.org/10.4168/aaair.2009.1.1.10>

SMALDINI, P. L. et al. Orally-induced intestinal CD4+ CD25+ FoxP3+ treg controlled undesired responses towards oral antigens and effectively dampened food allergic reactions. *PLoS ONE*, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141116>

SOYKA, M. B.; HOLZMANN, D.; AKDIS, C. A. Regulatory cells in allergen-specific immunotherapy. *Immunotherapy*, v. 4, n. 4, p. 389-396, 2012. <https://doi.org/10.2217/imt.12.10>

SOUSA, S., et al. Sensibilização a ácaros num grupo de crianças atópicas do interior norte de Portugal. *Acta Pediatr Port*. v.41, p.201-204, 2010.

SURH, Y.-J. et al. 15-Deoxy-Delta12,14-Prostaglandin J2, an Electrophilic Lipid Mediator of Anti-Inflammatory and pro-Resolving Signaling. *Biochemical pharmacology*, v. 82, n. 10, p. 1335-1351, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.100>

TAKETOMI, E. A. et al. Allergen-Specific Immunotherapy Follow-Up by Measuring Allergen-Specific IgG as an Objective Parameter. In: *Immunotherapy - Myths, Reality, Ideas, Future*. [s.l.] InTech, 2017. p. 382-401. <https://doi.org/10.5772/66711>

TEMANN, U.-A. et al. IL9 Leads to Airway Inflammation by Inducing IL13 Expression in Airway Epithelial Cells. *International immunology*, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2007. <https://doi.org/10.1093/intimm/dx1117>

TEMANN, U.-A.; RAY, P.; FLAVELL, R. A. Pulmonary Overexpression of IL-9 Induces Th2 Cytokine Expression, Leading to Immune Pathology. *The Journal of clinical investigation*, v. 109, n. 1, p. 29-39, 2002. <https://doi.org/10.1172/JCI200213696>

THOMAS, W. R. Innate Affairs of Allergens. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, v. 43, n. 2, p. 152-163, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.04059.x>

TODO BOM, A. et al. Alergia Alimentar. Imprensa da Universidade de Coimbra, 2013. <https://doi.org/10.14195/978-989-26-0658-3>

TSAI, J.-J. et al. Identification of the major allergenic components in Blomia tropicalis and the relevance of the specific IgE in asthmatic patients. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, v. 91, n. 5, p. 485-489, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61518-9](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61518-9)

VALERA, F. C. P. et al. Evaluating Budesonide Efficacy in Nasal Polyposis and Predicting the Resistance to Treatment. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, v. 39, n. 1, p. 81-88, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03144.x>

VALÉRIO, M. et al. Food Allergens—an Overview on Molecular Properties and Diagnosis. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, p. 52-60, 2015. <https://doi.org/10.9734/JAMPS/2015/16073>

VAN BRONSWIJK, J. E.; DE COCK, A. W. The genus Blomia Oudemans (Acarı : Glycyphagidae). II. Comparison of its species. *Acarologia*, v. 15, n. 3, p. 490-505, 1974.

VAN HAGE, M.; HAMSTEN, C.; VALENTA, R. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 140, n. 4, p. 974-977, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.008>

VERBERNE, A. A. et al. Effect of a Single Dose of Inhaled Salmeterol on Baseline Airway Caliber and Methacholine-Induced Airway Obstruction in Asthmatic Children. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 91, n. 1 Pt 1, p. 127-134, 1993. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(93\)90305-Y](https://doi.org/10.1016/0091-6749(93)90305-Y)

VIEIRA, R. P. et al. Aerobic Exercise Decreases Chronic Allergic Lung Inflammation and Airway Remodeling in Mice. *American Journal of Respiratory and*

Critical Care Medicine, v. 176, n. 9, p. 871-877, nov. 2007.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200610-1567OC>

VIGNALI, D.A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J. Immunol. Methods.* v.243, n.1, p.243-255, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00238-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00238-6)

VON MUTIUS, E. The burden of childhood asthma. *Arch. Dis. Child.* v. 82, Suppl 2:II2-5, 2000. https://doi.org/10.1136/adc.82.suppl_2.ii2

WAGNER, N.; RUDERT, M. Sensitivity and specificity of standardised allergen extracts in skin prick test for diagnoses of IgE-mediated respiratory allergies. *Clinical and Translational Allergy*, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13601-019-0248-9>

WAHLI, W.; MICHALIK, L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.001>

WAKASHIN, H. et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* v. 178, n.10, p.1023-1032,2008. <https://doi.org/10.1164/rccm.200801-086OC>

WALLACE, D. V et al. The Diagnosis and Management of Rhinitis: An Updated Practice Parameter. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 122, n. 2 Suppl, p. S1-S84, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.06.003>

WANG, J.-Y. The Innate Immune Response in House Dust Mite-Induced Allergic Inflammation. *Allergy, asthma & immunology research*, v. 5, n. 2, p. 68-74, 2013.
<https://doi.org/10.4168/aair.2013.5.2.68>

WANG, Z. et al. Next Generation Sequencing for Long Non-coding RNAs Profile for CD4+ T Cells in the Mouse Model of Acute Asthma. *Front. Genet.* v.10, p. 545, 2019. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00545>

WOOLCOCK, A. J. Worldwide Trends in Asthma Morbidity and Mortality. Explanation of Trends. *Bulletin of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, v. 66, n. 2-3, p. 85-89, 1991.

YANG, H.-W. et al. Glucocorticoids Ameliorate TGF-Beta1-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Airway Epithelium through MAPK and Snail/Slug Signaling Pathways. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 3486, 2017
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02358-z>

YAN CHUA, K. et al. The Blomia tropicalis Allergens. *Protein & Peptide Letters*, 2007. <https://doi.org/10.2174/092986607780363862>

YOKOYAMA, N. H. Sensibilização ao extrato de *Blomia tropicalis*, na ausência de alum, requer a molécula adaptadora MyD88. 2014. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315

Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;

e-mail:ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 208/15 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 105/15

Projeto Pesquisa: “Avaliação do efeito de aeroalégenos de importância médica humana e experimental formulados com moléculas imunomoduladoras ou lipossomos envolvidos na fisiopatologia da alergia respiratória induzida em camundongos isogênicos”.

Pesquisador Responsável: Prof. Jair Pereira da Cunha Junior

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 01 de dezembro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de proteínas antigênicas de aeroalérgenos reconhecidas por anticorpos das classes IgE, IgG1 e IgG4 de pacientes com doenças alérgicas

Pesquisador: Ernesto Akio Taketomi

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 09978918.6.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.342.127

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um atendimento das pendências do parecer nº 3.289.567 de 26 de abril de 2019.

Segundo os pesquisadores:

"Os抗igenos indutores do processo alérgico estão amplamente distribuídos na natureza e representam componentes de diversos organismos, incluindo aqueles provenientes de plantas, animais e ainda fungos. Alguns dos alérgenos conhecidos são constituídos de partículas extremamente diminutas, como por exemplo, grãos de pólen, esporos de fungos, ácaros domiciliares, entre outros. Estes alérgenos facilmente carreados pelo ar são denominados aeroalérgenos. Há pouca informação em relação aos aeroalérgenos, por isso, o tratamento de indivíduos alérgicos é difícil. Assim, se faz necessário a busca de aeroalérgenos os quais tenham valor para diagnosticar alergias e para monitoramento de imunoterapia específica com aeroalérgenos."

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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