

Immunochemical profile of commercial D. pteronyssinus vaccines for immunotherapy

Ernesto A. Taketomi¹, Deise A. O. Silva², Jair P. Cunha Jr³, Erika A. L. Pereira⁴, Mônica C. Sopelete⁴,
Foued S. Espíndola⁵, Walfrido Antunes⁶

* Trabalho vencedor do Prêmio Oswaldo Seabra no XXVII Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia

1 - Professor Titular de Imunologia e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia/UFU; 2 - Pesquisadora do Laboratório de Imunologia/UFU; 3 - Professor Substituto da Disciplina de Imunologia e Pós-Graduando em Genética e Bioquímica (Doutorado)/UFU; 4 - Pós-Graduandas (Mestrado) em Imunologia e Parasitologia Aplicadas/UFU; 5 - Professor Titular de Bioquímica/UFU; 6 - Médico Especialista em Alergia e Imunologia Clínica, Recife, PE.

Resumo

Objetivo: Analisar diferentes vacinas de alérgenos contendo *D. pteronyssinus* comercialmente disponíveis com a finalidade de caracterizar o perfil imunológico das mesmas e levar ao conhecimento dos médicos especialistas que utilizam estas vacinas como estratégia terapêutica em doenças alérgicas.

Métodos: Dosagem de proteína e polissacarídeo, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), quantificação dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 por ELISA e imunorreatividade alérgica para detecção de IgE específica por ELISA e *Immunoblotting* foram realizados.

Resultados: Observou-se grande heterogeneidade das vacinas em relação à concentração protéica e perfil eletroforético. As vacinas 2, 3 e 4 apresentaram bandas protéicas em SDS-PAGE, em número e intensidade variáveis. Somente na vacina 2 foram detectados valores extremamente altos de Der p 1 (409,9 mg/ml) e Der p 2 (210,7 mg/ml). Imunorreatividade alérgica para IgE foi observada somente em três amostras de vacinas, com níveis de IgE significativos e comparáveis detectados apenas nas vacinas 2 e 3. Por outro lado, *immunoblotting* IgE demonstrou padrão de reconhecimento antigênico somente com a vacina 2, denotando a presença de quantidades significativas de frações alérgicas na referida vacina, como comprovado pelos resultados obtidos de concentração protéica, perfil eletroforético e dosagem de alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2).

Conclusões: Os resultados indicam que as vacinas de *D. pteronyssinus* analisadas apresentam doses dos respectivos

A figura 1 representa o perfil eletroforético das oito amostras de vacinas de *D. pteronyssinus* utilizando-se SDS-PAGE a 14%. Somente nas amostras de vacinas 2, 3 e 4 foram visualizadas frações protéicas coradas pelo nitrato de prata com pesos moleculares (PM) na faixa de 10 a 97 kDa. Na vacina 2, inúmeras bandas com PM estimados de 12, 14, 17, 19, 22, 25, 28, 32, 34, 41, 46, 54, 60, 66, 80 e 97 kDa foram identificadas. Na vacina 3, uma forte banda protéica na faixa de 54-60 kDa pôde ser identificada, além de duas outras frações (48 e 97 kDa) menos intensamente coradas. A vacina 4 revelou somente uma única banda de aproximadamente 14 kDa. Por outro lado, não foram visualizadas bandas protéicas em outras amostras de vacina, sendo que a vacina 6 revelou forte marcação sem definição de bandas.

Tabela 2 - Análise da imunorreatividade alérgica para detecção de IgE específica em oito vacinas de alérgenos contendo *D. pteronyssinus* por ELISA.

Vacinas	IgE específica a <i>D. pteronyssinus</i>	
	mg (IC) ^a	
	Soros Controles Positivos ^b	Soros Controles Negativos ^c
1	nd	nd
2	199,5 (118,0 - 337,3)	nd
3	118,3 (24,8 - 564,9)	nd
4	nd	nd
5	nd	nd
6	nd	nd
7	17,3 (16,1 - 18,4)	nd
8	nd	nd

alérgenos muito aquém das doses comprovadamente efetivas recomendadas. Assim, as vacinas alergênicas devem ser melhor caracterizadas quanto à potência total e ao teor do alérgeno principal, antes de serem disponibilizadas no mercado.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2001; 24(5):173-182 composição alergênica, Der p 1, Der p 2, *D. pteronyssinus*, imunoterapia, vacina alergênica

Abstract

Objective: To analyze different commercially available allergen vaccines with *D. pteronyssinus* in order to characterize the immunochemical profile of the vaccines and also to provide information to certified allergists that employ them as a therapeutic strategy in allergic diseases.

Methods: Protein and polysaccharide measurements, SDS-PAGE electrophoresis, Der p 1, Der p 2, and Der f 1 allergen quantitation by ELISA and allergen immunoreactivity for the detection of specific IgE by ELISA and immunoblotting were performed.

Results: A great heterogeneity of the vaccines was observed with regard to protein concentration and electrophoretic profile. The vaccines 2, 3, and 4 showed protein bands in SDS-PAGE with variable number and intensity. High values of Der p 1 (409.9 mg/ml) and Der p 2 (210.7 mg/ml) were only detected in the vaccine 2. Allergen immunoreactivity for IgE was observed in three vaccine samples, with significant and comparable IgE levels in the vaccines 2 and 3. On the other hand, immunoblotting IgE revealed antigen recognition pattern only with the vaccine 2, indicating the presence of significant amounts of allergenic fractions in that vaccine as confirmed by results obtained in its protein concentration, electrophoretic profile, and major allergen content (Der p 1 and Der p 2).

Conclusions: The results indicate that the analyzed *D. pteronyssinus* vaccines present allergen doses below what has been proved to be effective. Thus, allergen vaccines should be better characterized in relation to total potency and major allergen content before they have become commercially available.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2001; 24(5): 173-182 allergen content, allergen vaccine, Der p 1, Der p 2, *D. pteronyssinus*, immunotherapy.

Introdução

A imunoterapia (IT) específica com alérgenos é largamente utilizada pela maioria de alergistas do mundo inteiro, embora muitos especialistas argumentam que a comprovação científica existe apenas para poucos alérgenos como pólenes, ácaros da poeira domiciliar e veneno de abelha¹. A IT está indicada para pacientes atópicos que

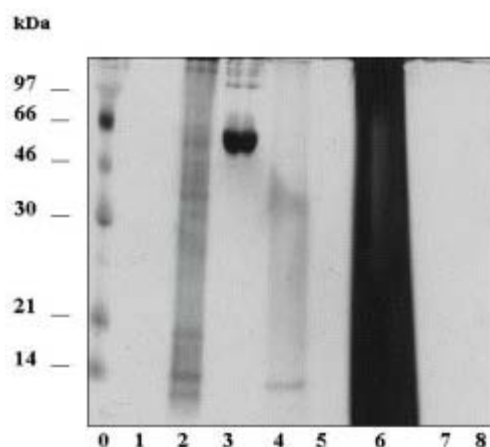
a. Média geométrica (mg) e intervalo de confiança (IC) de 95% dos níveis de IgE específica em EU/ml.

b. Soros de pacientes asmáticos IgE positivos a *D. pteronyssinus* confirmados por testes cutâneos e ELISA (n=3).

c. Soros de indivíduos controles não atópicos confirmados por testes cutâneos e ELISA (n=3).

nd: não detectado

Figura 1 - Perfil eletroforético de oito vacinas de alérgenos contendo *D. pteronyssinus* em SDS-PAGE a 14%. O gel foi corado pelo método de nitrato de prata. Linhas 1 a 8 indicam as respectivas vacinas. Linha 0 representa padrão de peso molecular (kDa).



Immunoblotting IgE foi realizado somente para as amostras de vacinas 2, 3 e 7, considerando os resultados obtidos por ELISA para a detecção dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 (tabela 1) e a detecção de IgE específica na análise de imunoreatividade alergênica (tabela 2). Como demonstrado na figura 2, padrão de reconhecimento antigênico por anticorpos IgE específicos foi obtido somente com a vacina 2 (linhas 1, 2 e 3). O principal antígeno imunodominante que reagiu com anticorpos IgE presentes nos três soros de pacientes asmáticos foi a fração protéica de 14 kDa. Além deste, outros componentes antigênicos (17-19, 25, 28-30, 46, 54-60, 66, 80 e 97 kDa) foram identificados nos diferentes soros de pacientes com asma atópica. Entre os indivíduos não atópicos (fig. 2, linhas 4, 5 e 6), nenhuma reatividade de IgE específica a componentes antigênicos pôde ser visualizada. Os controles da reação (fig. 2, linhas 7 e 8) bem como todos os resultados obtidos com as vacinas 3 e 7 demonstraram ausência total de qualquer reatividade antigênica.

Figura 2 - Caracterização dos componentes antigênicos das vacinas 2, 3 e 7 reconhecidos por anticorpos IgE séricos através de immunoblotting. Linhas 1, 2 e 3 (+) representam soros de pacientes asmáticos IgE positivos a *D. pteronyssinus*. Linhas 4, 5 e 6 (-) representam

apresentam mecanismos envolvendo a produção de anticorpos da classe IgE específicos a alérgenos clinicamente relevantes².

A IT consiste em injetar quantidades crescentes de alérgenos que causam e/ou provocam doenças alérgicas em pacientes com a finalidade de reduzir a sensibilidade aos mesmos. Alguns estudos bem controlados têm provado a utilidade de tal tratamento, embora efeitos alérgicos adversos e pobre eficácia, às vezes, devido ao uso de produtos inapropriados em pacientes mal selecionados, têm levado a críticas da terapia e algumas restrições de sua utilização, particularmente na Europa³.

A qualidade da vacina de alérgenos é crítica para a imunoterapia. O emprego de vacinas bem caracterizadas e com potência padronizada é de suma importância para a definição do esquema terapêutico com o intuito de obter melhor eficácia e menor risco de anafilaxia. A padronização de vacinas de alérgenos se baseia na detecção *in vivo* (testes cutâneos) e *in vitro* (RAST, ELISA) de anticorpos IgE aos alérgenos. Além disso, a composição da vacina pode ser determinada por métodos como a focalização isoelétrica, eletroforese em SDS-PAGE, *immunoblotting* IgE e radioimunoeletroforese cruzada (CRIE)².

Atualmente, a maioria das vacinas de alérgenos disponível comercialmente é baseada em extratos protéicos derivados de fontes naturais. Estas proteínas podem ser parcialmente purificadas ou quimicamente modificadas; contudo, as preparações utilizadas retêm tanto os epítopos reconhecidos por células B como células T⁴.

Estudos sobre exposição alérgica têm demonstrado que os ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae* constituem a principal fonte de alérgenos da poeira domiciliar, particularmente Der p 1, Der p 2 e Der p 15^{5,6}. Estes alérgenos são potentes imunógenos que induzem respostas de células T e anticorpos das classes IgE e IgG específicos em indivíduos alérgicos a ácaros da poeira domiciliar⁷.

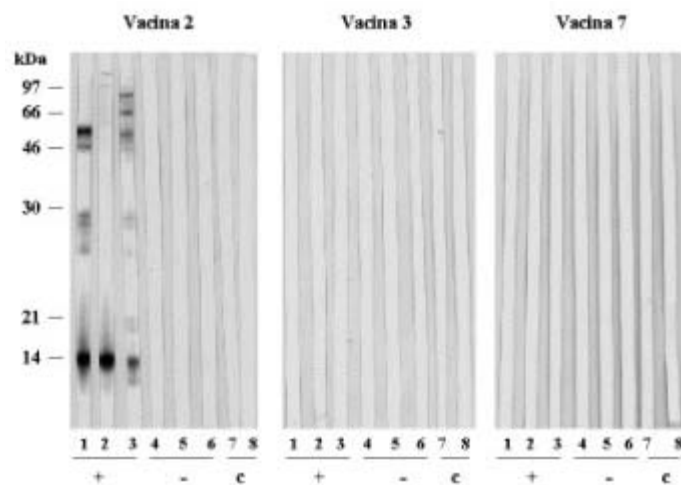
Recentemente foram elaboradas diretrizes internacionais para a IT com alérgenos com a participação de inúmeros especialistas de várias partes do mundo com a finalidade de obter melhor entendimento e maior segurança desse tipo de tratamento².

Desta forma, o presente estudo objetivou analisar diferentes vacinas de alérgenos de *D. pteronyssinus* comercialmente disponíveis com a finalidade de caracterizar o perfil imunológico das mesmas e levar ao conhecimento dos médicos especialistas que utilizam estas vacinas como estratégia terapêutica em doenças alérgicas.

Material e Métodos

Vacinas de alérgenos de *D. pteronyssinus* para imunoterapia

soros de indivíduos controles não atópicos. Linhas 7 e 8 (c) representam controles da reação, na ausência de anticorpos primários e secundário, respectivamente. Padrões de peso molecular são mostrados à esquerda (kDa).



Discussão

O sucesso da IT depende do uso de vacinas de alérgenos de alta qualidade, adequadamente padronizadas e fabricadas de forma consistente, isto é, produtos mais reprodutíveis para a terapia². Há muita confusão sobre o significado da padronização neste contexto. Basicamente, padronização significa que toda vez que um novo lote de um produto é feito, dentro de certas especificações definidas, deve obedecer a um padrão interno. O ideal seria que estas especificações fossem uma propriedade do produto alérgico que está relacionada com ou responsável pela atividade terapêutica desejada. Se a reatividade da célula T é certamente responsável pelos efeitos terapêuticos das vacinas de alérgenos, então a reprodutibilidade deveria ser medida para confirmar a consistência entre os lotes. Porém, a avaliação do nível de reatividade da célula T de qualquer vacina é atualmente impraticável; assim, outras propriedades imunológicas das vacinas podem ser utilizadas³.

Os resultados deste estudo permitiram caracterizar, pela primeira vez no Brasil, o perfil imunológico de oito amostras de vacinas de alérgenos contendo *D. pteronyssinus* procedentes de diferentes fornecedores utilizando vários procedimentos bioquímicos e imunológicos.

Analisando o conteúdo de proteínas, o método de Lowry não se mostrou adequado para estas amostras de vacinas, sendo assim adotado o método de Bradford. Foi observada grande heterogeneidade das vacinas comercialmente disponíveis, já que a maioria delas apresentou níveis extremamente baixos ou não detectáveis de proteína. Tal fato é de extrema relevância e preocupação, uma vez que os principais alérgenos derivados de *D. pteronyssinus* como Der p 1 e Der p 2 são de natureza protéica. Estes resultados de concentração protéica estão refletidos no perfil eletroforético

Foram analisadas 8 vacinas de alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* comercialmente disponíveis para imunoterapia, identificadas por números de 1 a 8, transferidas em volumes de 1 ml para um mesmo tipo de frasco, de forma que os fornecedores desconheciam esta análise e os pesquisadores desconheciam a fonte das respectivas vacinas.

Todas as amostras foram submetidas a vários parâmetros de análise.

Dosagem de Proteína e de Polissacáride

As concentrações protéicas de todas as amostras foram determinadas por dois métodos: Low-ry et al⁸ e Bradford⁹, utilizando soro albumina bovina (Sigma Chemical Co.) como proteína de referência para a curva padrão. A concentração de polissacáride foi realizada segundo a técnica de antrona¹⁰, utilizando dextrose (Sigma Chemical Co.) como polissacáride de referência para a curva padrão.

ELISA para quantificação dos níveis de alérgenos de ácaros

Alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) e de *D. farinae* (Der f 1) foram mensurados por ELISA tipo *sandwich* como descrito por Luczynska et al.¹¹, com modificações. Em resumo, microplacas de poliestireno (Immulon 2⁰, Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA, USA) foram sensibilizadas separadamente com anticorpos monoclonais de camundongos anti-Der p 1 (clone 5H8), anti-Der p 2 (clone 1D8) e anti-Der f 1 (clone 6A8) na concentração protéica de 1mg/poço em tampão carbonato 0,06M, pH 9,6 por 18 horas a 4 °C. As placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,2 (PBS) contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T acrescido de soroalbumina bovina a 1% (PBS-T-BSA) por 1 h em temperatura ambiente (TA). Etapas subsequentes foram realizadas utilizando PBS-T-BSA como diluente e lavagens em PBS-T foram efetuadas entre as etapas da reação. As placas foram incubadas com amostras das vacinas de alérgenos (não diluídas, 1:5 e 1:25) por 1 h em TA. Subseqüentemente, foram adicionados anticorpos biotinilados anti-alérgenos de *Dermatophagoides* do grupo 1 (clone 4C1; 1:1000) e do grupo 2 (clone 7A1; 1:3000), incubados por 1 h em TA e o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis., USA) diluída 1:1000 foi incubada por 30 min em TA. O ensaio foi revelado pela adição de substrato enzimático (ABTS a 0,01 M em tampão citrato-fosfato a 0,07 M, pH 4,2 e H₂O₂ a 0,03%). A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, USA) a 405 nm. Padrões de referência contendo níveis conhecidos de cada alérgeno foram incluídos em cada placa, em duplicata, para obter curvas controles variando de 125 a 0,5 ng/ml. As amostras das vacinas de alérgenos que apresentaram valores de

obtido para as amostras de vacinas. Assim, as vacinas 2, 3 e 4 foram as que apresentaram bandas protéicas em SDS-PAGE, tanto em número como em intensidade, diretamente proporcional à sua concentração protéica. Por outro lado, apesar do alto conteúdo protéico determinado na vacina 6, o seu perfil eletroforético não permitiu a identificação de qualquer banda e sim forte marcação indefinida ("arraste"), sugerindo a presença de outros componentes químicos. Cabe ressaltar que esta amostra foi novamente submetida à eletroforese em diferentes diluições (1:2, 1:4, 1:10, 1:50), e ainda assim não foram visualizadas definição de bandas (dados não mostrados). Dessa forma, utilizando-se do método de antrona, foi evidenciado alto conteúdo de polissacárides na vacina 6, o que justificaria o tipo do perfil eletroforético obtido nessa amostra.

Similarmente à análise da concentração protéica, altos níveis dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 foram detectados somente na vacina 2 quando comparado aos obtidos para as demais vacinas. Os níveis de Der p 1 (409,9 mg/ml) determinados na vacina 2 foram similares aos valores máximos (faixa de 68 a 385 mg/ml; média de 172 ± 74 mg/ml) encontrados por Nelson¹⁷ em análise de 28 vacinas de alérgenos contendo *D. pteronyssinus* disponíveis no mercado americano. Por outro lado, as vacinas 3 e 7 apresentaram quantidades de Der p 1 (0,11 e 0,21 mg/ml) extremamente inferiores aos limites mínimos relatados por este autor. Estes dados são de fundamental importância para o estabelecimento de doses de manutenção (7 a 12 mg de Der p 1) que têm sido efetivas em experimentos clínicos controlados de imunoterapia conduzidos por Ewan et al¹⁸, Haugaard et al¹⁹ e Olsen et al²⁰.

Os resultados deste estudo indicam que as vacinas de alérgenos comercialmente disponíveis no mercado nacional contendo *D. pteronyssinus* apresentam doses dos respectivos alérgenos muito aquém das doses recomendadas e comprovadamente efetivas. Neste contexto, somente a vacina 2 poderia se enquadrar como apropriada para a imunoterapia.

Outro método atual de padronização para vacinas de alérgenos consiste na capacidade de detecção *in vivo* ou *in vitro* de anticorpos IgE específicos. Em nosso estudo, empregamos testes *in vitro* (ELISA e *immunoblotting*) utilizando soros IgE positivos a *D. pteronyssinus*, de pacientes asmáticos, comprovados por testes cutâneos e ELISA frente a extratos alergênicos de referência (Bayer Corporation, EUA) comparado com soros controles negativos procedentes de indivíduos não atópicos. Desta forma, foi possível evidenciar imunorreatividade alérgica por ELISA-IgE somente em três amostras de vacinas, sendo que níveis de IgE significativos e comparáveis foram obtidos apenas nas vacinas 2 e 3, apesar de serem detectados níveis extremamente baixos de Der p 1 e Der p 2 na vacina 3. Tal fato sugere a presença de outros alérgenos nesta vacina que apresentaram reatividade com anticorpos IgE. A especificidade da reação em todas as amostras de vacinas foi comprovada pela ausência total de reatividade frente a soros controles negativos. Por outro lado, *immunoblotting* IgE

absorvência extrapolados acima da curva padrão dos respectivos alérgenos, foram novamente testadas em diluições maiores (1:125; 1:500; 1: 1000; 1:2000; 1:5000 e 1:10.000).

ELISA para detecção de anticorpos IgE específicos a alérgenos

Ensaio imunoenzimático ELISA para detecção de IgE específica foram realizados para avaliar a imunorreatividade das diferentes vacinas de alérgenos de *D. pteronyssinus*, segundo Mastrandrea *et al*¹², com modificações.

Microplacas de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc., USA) foram sensibilizadas (50 ml/poço) com as respectivas vacinas de *D. pteronyssinus* em diferentes diluições (1:5, 1:10 e 1:20) em tampão carbonato 0,06M, pH 9,6 por 18 horas a 4 °C. Paralelamente, os poços foram sensibilizados com extrato total de *D. farinae* (Bayer Corporation, USA) na diluição de 1/20 (1500 AU/ml) para realização da curva padrão. Em seguida, as placas foram lavadas e bloqueadas como anteriormente descrito e posteriormente incubadas com amostras de soros controles positivos (pacientes asmáticos IgE positivos a *D. pteronyssinus*) e negativos (indivíduos controles não atópicos), em duplicata, na diluição de 1:2 em PBS-T-BSA por 2 h a 37 °C. Após novas lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgE humana biotilado (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., EUA) a 1:1000 em PBS-T-BSA por 1 h a 37 °C. As etapas subsequentes (adição de conjugado estreptavidina-peroxidase e substrato enzimático) foram similares às descritas em ELISA para quantificação de alérgenos. Paralelamente, foram realizadas curvas controles utilizando um pool de soros de pacientes alérgicos a ácaros (UVA 87/01) contendo 1000 unidades RAST (RU)/ml de IgE anti-*D. farinae*. A curva controle variou de 250 a 0,5 RU/ml, em diluições duplas seriadas em PBS-T-BSA, em duplicata. Resultados foram expressos como unidades ELISA por mililitro (EU/ml) comparando-se com a curva controle (1 RU/ml foi arbitrariamente considerada equivalente a 1 EU/ml, segundo Silva *et al*¹³)

Eletroforese em gel de poli(acrilamida) com do-decil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para evidenciar os principais polipeptídeos de cada vacina de *D. pteronyssinus*, as amostras foram submetidas a eletroforese vertical em gel de poli(acrilamida) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), segundo Laemmli¹⁴. Inicialmente, foi empregado gel gradiente de acrilamida na concentração de 5-22% e com gel de empilhamento de 5%. Todas as amostras foram eletroforéticamente separadas em condições redutoras (2-β-mercaptoetanol a 10%) e não redutoras. As amostras foram preparadas para eletroforese por 3 min a 100 °C em tampão de amostra (sacarose 2%, SDS 1%, Tris 31 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,02%), sendo aplicados 10 mL de cada amostra por poço. Paralelamente, foi aplicado padrão de peso molecular

demonstrou padrão de reconhecimento antigênico somente com a vacina 2, denotando a presença de quantidades significativas de frações alergênicas na referida vacina, como comprovado pelos resultados obtidos de concentração protéica, perfil eletroforético e dosagem de alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2). A fração protéica de 14 kDa reconhecida pelos três soros de pacientes asmáticos provavelmente corresponde ao principal alérgeno imunodominante dos grupos 2 e 5 (Der p 2, Der p 5) de *Dermatophagoides* spp. O reconhecimento variável de outros componentes antigênicos reflete a multi-sensibilização diferenciada de cada paciente para possíveis alérgenos de outros grupos presentes na vacina 2, como por exemplo, a fração de 25 kDa (grupo 1, Der p 6), 28-30 kDa (grupo 3), 54-60 kDa (grupo 4)²¹. Embora apresentando uma forte banda protéica na faixa de 54-60 kDa em SDS-PAGE, a vacina 3 não revelou qualquer padrão de reconhecimento antigênico por anticorpos IgE específicos em soros de pacientes asmáticos, sugerindo que a principal fração imunodominante que deve estar presente nas vacinas alergênicas de *D. pteronyssinus* seja os alérgenos dos grupos 2 e 5 (Der p 2 e Der p 5) de 14 kDa. Apesar dos resultados de ELISA para detecção de IgE específica e immunoblotting IgE terem sido obtidos utilizando um número limitado de soros, estes refletem um perfil heterogêneo de reatividade das diferentes vacinas analisadas. Mesmo assim, estes dados podem não ser necessariamente verdadeiros para todos os soros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*.

Os resultados obtidos demonstram claramente que as vacinas alergênicas devem ser melhor caracterizadas quanto à potência total e ao teor do alérgeno principal, antes de serem colocadas no mercado. Desta forma, a consistência de cada lote pode ser monitorada com precisão, facilitando as comparações objetivas entre as vacinas alergênicas, uma vez que técnicas de ELISA baseada em anticorpos monoclonais específicos a diferentes alérgenos podem ser atualmente empregadas.

Finalmente, espera-se que este estudo seja de extrema utilidade para todos os alergistas brasileiros e médicos de outras especialidades que utilizam imunoterapia em doenças alérgicas, bem como fornecer diretrizes para o monitoramento da produção consistente de vacinas alergênicas de diferentes fornecedores. Com isto, os pacientes de todo o Brasil submetidos à imunoterapia com alérgenos deverão ser beneficiados com a obtenção de melhores resultados, proporcionando assim maior credibilidade médica e popular da imunoterapia com alérgenos.

Referências Bibliográficas

1. Johansson SGO. New approaches to immunologic treatment of allergy [Editorial]. *Allergy* 1997;52: 601.
2. Bousquet J, Lockey ZR, Malling HJ. Imunoterapia com alérgenos: vacinas terapêuticas para doenças alérgicas. Informe da Organização Mundial da Saúde. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2000;23:5-55.

(Rainbow Markers, Amersham Life Science) variando de 14,3 a 220 kDa. Posteriormente, SDS-PAGE na concentração de 14% foi utilizado para melhor visualização e resolução das bandas protéicas na faixa de 10 a 97 kDa, sob as mesmas condições acima descritas. Após a eletroforese, os géis foram submetidos à coloração com nitrato de prata segundo o método de Blum *et al*¹⁵. A imagem do gel, ainda hidratado, foi digitalizada mediante uso de *scanner*.

Immunoblotting IgE

Após a eletroforese, as frações protéicas foram transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,4 mm de acordo com o método de Towbin *et al*¹⁶, utilizando sistema semi-úmido de transferência (LKB Multiphor Novablot II, Pharmacia UK) por 2 h a 120 mA. O sucesso da transferência foi confirmado pela visualização das frações pré-co-radas do padrão de peso molecular sobre a membrana de nitrocelulose. Tiras de nitrocelulose de 3mm de largura foram bloqueadas em PBS-T contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé) por 2 h em TA e a seguir incubadas por 24 h a 4°C com anticorpos primários consistindo de amostras de soros controles positivos (pacientes asmáticos IgE positivos a *D. pteronyssinus*) e negativos (indivíduos controles não atópicos), na diluição de 1:5 em PBS-T contendo leite molico a 1% (PBS-T-M). Após lavagens (6 x 5 min) com PBS-T-M, as tiras foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgE humana biotilado (Kierkegaard & Perry Laboratories Inc., EUA) a 1:500 em PBS-T-M por 20 h a 4°C. Após novas lavagens, as tiras foram incubadas por 2 h em TA com estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) a 1:500 em PBS-T-M. Após lavagens finais, as bandas protéicas reativas foram visualizadas pela adição de 5 mg do substrato enzimático 3,3'-tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB) em 10 ml de PBS com 1% de H₂O₂. A reação foi interrompida por lavagens em água destilada e os pesos moleculares das bandas protéicas foram estimados segundo o padrão de peso molecular de referência.

Análise estatística

Análise estatística consistiu na determinação de médias geométricas (gm) com intervalo de confiança (IC) de 95% dos valores de IgE específicos obtidos na análise de imunorreatividade alérgica das diferentes vacinas de alérgenos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

A tabela 1 demonstra os resultados da dosagem de proteína e de polissacaríde determinada em oito vacinas de alérgenos de *D. pteronyssinus* para imunoterapia pelos métodos de Bradford⁹ e Martirani¹⁰, respectivamente. A dosagem de proteína também foi realizada pelo método de Lowry *et al*⁸, porém os resultados revelaram valores extremamente altos, sugerindo a presença de substâncias

3. Wheeler AW, Drachenberg KJ. New routes and formulations for allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 1997;52:602-612.
4. Platts-Mills TAE, Mueller GA, Wheatley LM. Future directions for allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin Immunol* 1998;102:335-343.
5. Arruda LK, Rizzo MC, Chapman MD, Fernandez-Caldas E, Baggio D, Platts-Mills, TAE, Naspitz CK. Exposure and sensitization to house dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. *Clin Exp Allergy* 1991;21:433-439.
6. Sopena MC, Silva DAO, Arruda LK, Chapman MD, Taketomi EA. *Dermatophagoides farinae* (Der f 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) allergen exposure among subjects living in Uberlândia, Brazil. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122:257-263.
7. Smith AM, Yamaguchi H, Platts-Mills TAE, Fu SM. Prevalence of IgG anti-Der p 2 antibodies in children from high and low antigen exposure groups: Relationship of IgG and subclass antibody responses to exposure and allergic symptoms. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 86:102-109.
8. Lowry OH, Rosebrough A, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
10. Martirani I, Hoxter G, Wajchenberg BL, Marian I, Cintra ABU. Determination of polysaccharide hexoses and hexosamines in normal human sera. *J Lab Clin Med* 1959;54:773-779.
11. Luczynska CM, Arruda LK, Platts-Mills TAE, Miller JD, Lopez M, Chapman MD. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, Der p I and Der f I. *J Immunol Methods* 1989;118: 227-235.
12. Mastrandrea F, Serio G, Minardi A, Coradduzza G, Maietta G, Iacobelli A, *et al*. IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy. *Allergy* 1997;52:1115-1119.
13. Silva DAO, Gervasio AM, Sopena MC, Arruda-Chaves E, Arruda LK, Chapman MD, *et al*. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. (submitted) 2000.
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227,680-685.
15. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987;8:93-99.
16. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.
17. Nelson HS. The use of standardized extracts in allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:41-45.
18. Ewan PW, Alexander MM, Snape C, Ind PW, Agrell B, Dreborg S. Effective hyposensitization in allergic rhinitis using a potent partially purified extract of house dust mite. *Clin Allergy* 1998;18:501-508.
19. Haugaard L, Dahl R, Jacobsen L. A controlled dose response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite, clinical efficacy and side effects. *J. Allergy Clin Immunol* 1993;91:709-722.
20. Olsen OT, Larsen KR, Jacobsen I, Svendsen UG. A 1 year, placebo-controlled, double-blind house-dust mite immunotherapy study in asthmatic adults. *Allergy* 1997;52:853-859.
21. Platts-Mills TAE, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD. Indoor allergens and asthma: Report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:S1-S24.

Endereço para correspondência:

interferentes (dados não mostrados). Somente as vacinas 2 e 6 apresentaram valores expressivos de conteúdo protéico (1,82 e 7,70 mg/ml, respectivamente) em relação às demais vacinas. As vacinas 1, 5, 7 e 8 revelaram valores extremamente baixos ou em níveis não detectáveis. Quanto ao conteúdo de polissacárides, a vacina 6 apresentou o valor mais alto (9 mg/ml), cerca de 11 vezes superior à vacina 2 (0,81 mg/ml) e 15 vezes superior à vacina 7 (0,59 mg/ml). As demais amostras apresentaram níveis bem baixos ou não detectáveis.

Tabela 1 - Dosagens de proteína, polissacáride e alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) e de *D. farinae* (Der f 1) determinadas em oito vacinas de alérgenos contendo *D. pteronyssinus* para imunoterapia.

Vacinas	Proteína ^a (mg/ml)	Polissacáride ^b (mg/ml)	Alérgenos ^c		
			Der p 1 (µg/ml)	Der p 2 (µg/ml)	Der f 1 (µg/ml)
1	0,03	nd	nd	nd	nd
2	1,82	0,81	409,9	210,7	nd
3	0,38	nd	0,11	0,63	nd
4	0,13	0,09	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd
6	7,70	9,00	nd	nd	nd
7	0,01	0,59	0,21	0,01	0,13
8	nd	nd	nd	nd	nd

^a Método de Bradford⁹

^b Método de Antrona¹⁰

^c ELISA tipo sandwich¹¹

nd: não detectado

Níveis dos alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) e de *D. farinae* (Der f 1) determinados por ELISA tipo sandwich¹¹ nas oito amostras de vacinas estão também demonstrados na tabela 1. Somente na vacina 2 foram detectados valores extremamente altos de Der p 1 e Der p 2 (409,9 e 210,7 mg/ml, respectivamente). As vacinas 3 e 7 apresentaram conteúdo de Der p 1 (0,11 e 0,21 mg/ml, respectivamente) aproximadamente 4000 e 2000 vezes inferior à vacina 2. Em relação ao conteúdo de Der p 2 foram detectados níveis de 0,63 e 0,01 mg/ml, respectivamente para os extratos 3 e 7, valores cerca de 330 e 20.000 vezes inferiores aos obtidos para o extrato 2. Não foram encontrados níveis detectáveis de Der p 1 e Der p 2 nas demais vacinas. Em contraste, nenhuma vacina apresentou níveis detectáveis do alérgeno Der f 1, exceto a vacina 7, embora em baixos níveis (0,13 mg/ml).

As amostras de vacinas foram analisadas por ELISA quanto à imunoreatividade alérgica para detecção de anticorpos IgE específicos. Como observado na tabela 2, níveis de IgE específica nos soros controles positivos foram demonstrados apenas com as vacinas 2 (mg: 199,5 EU/ml; 95% IC: 118,0 – 337,3 EU/ml), 3 (mg: 118,3 EU/ml; 95% IC: 24,8 – 564,9 EU/ml), e 7 (mg: 17,3 EU/ml; 95% IC: 16,1 – 18,4 EU/ml), sendo que as vacinas 2 e 3 revelaram níveis significativa-

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas,
Universidade de FeAvenida Pará, 1720 – Bloco 4C, Campus Umuarama
38400-902 - Uberlândia - MG - Brasil.
Tel: 0XX-34-218.2195
Fax: 0XX-34-218.2333
E-mail: taketomi@ufu.brderal de Uberlândia

mente superiores à vacina 7 ($p < 0,05$). As vacinas restantes falharam em detectar IgE específica no soro de pacientes asmáticos IgE positivos a *D. pteronyssinus*. Por outro lado, todas as vacinas mostraram-se não reativas para soros controles negativos de indivíduos não atópicos.



[\[Home Page SBAI\]](#) [\[Índice Geral\]](#) [\[Índice do Fascículo\]](#)

A Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia é publicação oficial da Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia.
Copyright 2001- SBAI -Av. Prof. Ascendino Reis, 455 - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 04027-000