UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

Amanda Rodrigues Maia

Tropomiosina de barata *Periplaneta americana*: papel na imunoterapia sublingual em modelo experimental de hiper-responsividade brônquica e na investigação da resposta IgE em pacientes com dermatite atópica

Ribeirão Preto

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

Tropomiosina de barata *Periplaneta americana*: papel na imunoterapia sublingual em modelo experimental de hiper-responsividade brônquica e na investigação da resposta IgE em pacientes com dermatite atópica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica - Investigação Biomédica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP para obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica-Investigação Biomédica.

Aluna: Amanda Rodrigues Maia

Orientadora: Prof. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Maia, Amanda Rodrigues

Tropomiosina de barata *Periplaneta americana*: papel na imunoterapia sublingual em modelo experimental de hiper-responsividade brônquica e na investigação da resposta IgE em pacientes com dermatite atópica, 2019.

57p.: il. + 2 CDs

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Clínica Médica-Investigação Biomédica.

Orientadora: Arruda, Luisa Karla de Paula.

1. Doenças alérgicas. 2. Asma. 3. Dermatite atópica. 4. Sensibilização. 5. Tropomiosina. 6. Imunoterapia sublingual. 7. ELISA quimérico.

Nome: Maia, Amanda Rodrigues

Título: Tropomiosina de barata *Periplaneta americana*: papel na imunoterapia sublingual em modelo experimental de hiper-responsividade brônquica e na investigação da resposta IgE em pacientes com dermatite atópica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica - Investigação Biomédica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP para obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica-Investigação Biomédica.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Agradecimentos

Agradeço primeiro a Deus por ter preparado a minha entrada neste mestrado e me ajudado durante todo trabalho.

A toda a minha família, e em especial aos meus pais, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos.

A minha avó pela amorosa preocupação e atenção comigo.

A minha orientadora Prof. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda pela oportunidade de fazer este trabalho e pela atenção dada durante a execução dele.

A Adriana Santos Moreno e Luana Sella Motta Maia pela ajuda na elaboração de aulas e trabalhos escritos.

A Vanessa Maciel B. da Fonseca, Camila Mira Sandy e Amanda Goulart pela ajuda especial dada durante o trabalho.

Aos colegas de laboratório: Luana Sella Motta Maia, Adriana Santos Moreno, Marina Mendonça Dias, Wagner Narciso Campos, Sarah Sella Langer e Daniel Cordeiro pela companhia, ajuda pessoal e profissional em muitos momentos e pelas conversas.

Agradeço aos técnicos da FMRP-USP cujo trabalho foi muito importante para o andamento do meu projeto.

Agradeço às agências de fomento FAPESP e ao CNPq pela concessão de bolsa de mestrado para a realização do projeto.

Sou grata pelos amigos que fiz durante o mestrado!

“Não tenhas medo, que eu estou contigo. Não te assustes, que sou o teu Deus. Eu te dou coragem, sim, eu te ajudo. Sim, eu te seguro com minha mão vitoriosa.”

Isaías 41:10, Bíblia Sagrada – Tradução da CNBB

Maia, Amanda Rodrigues. **Tropomiosina de barata *Periplaneta americana*: papel na imunoterapia sublingual em modelo experimental de hiper-responsividade brônquica e na investigação da resposta IgE em pacientes com dermatite atópica**. 2019. 57f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A prevalência de doenças alérgicas incluindo asma e dermatite atópica aumentou nos últimos anos. A asma é uma doença crônica caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas e limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento. A elevada prevalência, mortalidade e custos associados tornam a doença um importante problema de saúde pública que requer atenção. A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele, caracterizada por prurido intenso, eritema, escoriações, liquenificação na pele entre outras características. A DA causa profundo impacto na vida do indivíduo e da família e geralmente mostra os primeiros sintomas durante a infância. Ambas as doenças podem ser associadas a sensibilização a alérgenos. Nosso grupo mostrou que entre pacientes com rinite e/ou asma alérgicos a barata a tropomiosina da barata *Periplaneta americana* é um alérgeno principal. Em invertebrados, a tropomiosina induz resposta IgE e reatividade cruzada entre invertebrados incluindo ácaros, barata, camarão e parasitas. No presente estudo, produzimos tropomiosina recombinante de barata (alérgeno Per a 7) com elevado grau de pureza e com quantidades mínimas de endotoxina. Em modelo experimental de asma em camundongos, com sensibilização e desencadeamento com Per a 7 recombinante, houve aumento do número de células totais, e de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos no lavado broncoalveolar. Alérgeno Per a 7 recombinante foi também utilizado em ELISA quimérico para investigar a resposta IgE a este alérgeno em 112 pacientes com dermatite atópica. A idade dos pacientes variou de 3 a 67 anos com média de 24,9 ($\pm$ 15,4) anos, com 75 indivíduos do sexo feminino (67%). Nos 112 pacientes, o SCORAD apresentou média de 43,1 ($\pm$ 18,1) e foram relatadas asma e rinite em 42 e 85 indivíduos, respectivamente. Níveis de IgE total apresentaram ampla variação, de 14,2 a 63.000 UI/mL, com média geométrica de 2.193 UI/mL. A idade de início dos sintomas e o tempo de doença apresentaram médias, respectivamente, de 9,5 ($\pm$ 12,9) e 15,4 ($\pm$ 12,3) anos. Trinta pacientes (26,8%) apresentaram níveis detectáveis de IgE para Per a 7 recombinante, com variação de 2,3 a 3.191 UI/mL. A razão de IgE específica para Per a7/IgE total nestes pacientes variou de 0,03% a 33,8%. Dividindo os pacientes em sensibilizados e não sensibilizados ao alérgeno de barata, observamos que não houve diferença significativa entre os grupos com relação à idade de início dos sintomas, tempo de doença, SCORAD, presença de rinite ou asma e níveis de IgE total. Nossos resultados mostraram que o alérgeno Per a 7 recombinante induziu resposta inflamatória com características semelhante à observada em humanos, em modelo experimental de asma em camundongos. Frequência menor de reatividade IgE ao alérgeno Per a 7 foi observada entre pacientes com dermatite atópica em nosso meio, quando comparada à observada previamente em pacientes com asma e/ou rinite. Não houve associação entre a presença de sensibilização IgE ao alérgeno Per a 7 e a gravidade da dermatite atópica, presença de asma ou rinite, idade de início e tempo de doença, e níveis de IgE total. Entretanto, a investigação do perfil de sensibilização IgE tem importância ao se considerar o uso de imunoterapia alérgeno-específica em pacientes com dermatite atópica.

Palavras-chave: Doenças alérgicas. Asma. Dermatite atópica. Sensibilização. Tropomiosina. Imunoterapia sublingual. ELISA quimérico.

Maia, Amanda Rodrigues. **Tropomyosin of cockroach *Periplaneta americana*: role in sublingual immunotherapy in an experimental model of bronchial hyperresponsiveness and in the investigation of IgE response in patients with atopic dermatitis.** 2019. 57f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The prevalence of allergic diseases has increased in recent years, including asthma and atopic dermatitis. Asthma is a chronic disease resulting from airway hyperresponsiveness and variable airflow limitation, reversible spontaneously or with treatment. The high prevalence, mortality, and associated costs make the disease an important public health problem which requires attention. Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease, as asthma has high prevalence, and it is characterized by intense itching, erythema, excoriations, lichenification in the skin among other characteristics. The AD causes profound impact on individual and family's life and usually shows the first symptoms during childhood. Both diseases could be related and associated with sensitization to allergens. In the case of asthma, allergy to cockroach is well known to be related with the disease. In 1999, a Brazilian study in our group has shown that among patients with allergic rhinitis and /or asthma the tropomyosin of the American cockroach *Periplaneta americana* (Per a 7) is a major allergen. This protein is present in vertebrates and invertebrates, and was related to induction of IgE response and cross-reactivity against among invertebrates, including mites, cockroaches, shrimp and parasites. In the present study, we produced recombinant tropomyosin from cockroach (Per a 7 allergen) with high purity and minimal amounts of endotoxin. In an experimental model of asthma in mice, with sensitization and triggering with recombinant Per a 7, there was an increase in the number of total cells, and eosinophils, neutrophils and lymphocytes in the bronchoalveolar lavage. Per a 7 allergen was also used in chimeric ELISA to investigate IgE response to this allergen in 112 patients with atopic dermatitis. Patients' ages ranged from 3 to 67 years, mean of 24.9 ($\pm$ 15.4) years, 75 female subjects (67%). In the 112 patients, a mean of SCORAD presented 43.1 ($\pm$ 18.1) and asthma and rhinitis were reported in 42 and 85 individuals, respectively. Total IgE levels varied from 14.2 to 63.000 IU / mL, with a geometric mean of 2,193 IU / mL. The age at onset of symptoms and disease time presented averages, respectively, of 9.5 ($\pm$ 12.9) and 15.4 ($\pm$ 12.3) years. Thirty patients (26.8%) had detectable IgE recombinant Per a 7 levels, ranging from 2.3 to 3191 IU / mL. The ratio of IgA specific for Per a 7 / total IgE in these patients ranged from 0.03% to 33.8%.

Dividing the patients into sensitized and not sensitized to the cockroach allergen, we observed that there was no significant difference between the groups regarding the age of onset of symptoms, disease time, SCORAD, presence of rhinitis or asthma, and total IgE levels. Our results showed that recombinant Per a 7 allergen induced an inflammatory response with characteristics similar to that observed in humans in an experimental model of asthma in mice. Minor frequency reactivity of IgE Per a 7 allergen was observed among patients with atopic dermatitis in our group, when compared to that previously observed in patients with asthma and / or rhinitis. There was no association between the presence of IgE sensitization to the Per 7 allergen and the severity of atopic dermatitis, presence of asthma or rhinitis, age at onset and disease time, and total IgE levels. However, the investigation of the IgE sensitization profile is important when considering the use of allergen-specific immunotherapy in patients with atopic dermatitis.

Keywords: Allergic diseases. Asthma. Atopic dermatitis. Sensitization. Tropomyosin. Sublingual immunotherapy. Chimeric ELISA.

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema do protocolo de imunoterapia sublingual utilizado no trabalho.	24
Figura 2	Análise por SDS-PAGE em gel com gradiente 8-25%, corado com nitrato de prata, de preparação representativa de tropomiosina recombinante de <i>P. americana</i> , alérgeno rPer a 7.	29
Figura 3	Contagem de células totais.	30
Figura 4	Contagem diferencial de células.	31

Lista de tabelas

Tabela 1	Grupos experimentais.	24
Tabela 2	Comparação entre grupos de pacientes sensibilizados e não sensibilizados a Per a 7.	33
Tabela 3	Dados clínicos dos pacientes com dermatite atópica.	52

Lista de siglas

DA	Dermatite atópica
IT	Imunoterapia alérgeno-específica
ITSC	Imunoterapia subcutânea
ITSL	Imunoterapia sublingual
IL	Interleucina
TGF- β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
INF- γ	<i>Interferon-gama</i>
Ig	Imunoglobulina
Treg	linfócito T regulador
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Tc1	Linfócito T citotóxico 1
rPer a 7	Tropomiosina recombinante de <i>Periplaneta americana</i>
M	Molar
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliácridamida
LBA	Lavado broncoalveolar
BMMY	Meio de cultura contendo metanol
BMGY	Meio de cultura contendo glicerol
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
SCORAD	<i>Scoring Atopic Dermatitis</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
TCLE	Termo de consentimento e livre esclarecimento
UI/mL	Unidades internacionais/mililitro
UE/mL	Unidades de endotoxina/mililitro
UE/ μ g	Unidades de endotoxina/micrograma
mg	Miligrama
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
mL	Mililitro

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de siglas

1.	Introdução	13
1.1	Asma: aspectos gerais	13
1.2	Dermatite atópica: aspectos gerais	15
1.3	Tropomiosina: pan-alérgeno em invertebrados	16
1.4	Imunoterapia alérgeno-específica como tratamento para doenças alérgicas	17
2.	Objetivos	21
3.	Pacientes e métodos	22
3.1	Produção e purificação de tropomiosina recombinante de barata <i>Periplaneta americana</i> (alérgeno Per a 7)	22
3.2	Dosagem de endotoxina bacteriana	23
3.3	Animais	23
3.4	Avaliação da eficácia da imunoterapia sublingual (ITSL) com tropomiosina recombinante de <i>P. americana</i> no tratamento de asma experimental induzida por rPer a 7	23
3.5	Lavado broncoalveolar (LBA)	24
3.6	Avaliação da função pulmonar	25
3.7	Pacientes	25
3.8	Determinação da IgE total	26
3.9	Quantificação de IgE específica para tropomiosina recombinante de barata <i>Periplaneta americana</i> (rPer a 7)	26
3.10	Análise dos dados	27
4.	Considerações éticas	28
5.	Resultados	29
5.1	Produção da proteína recombinante alérgeno rPer a 7	29
5.2	Modelo experimental de imunoterapia sublingual com rPer a 7	29

5.3	Resposta IgE ao alérgeno Per a 7 em pacientes com dermatite atópica	33
6.	Discussão	34
7.	Conclusões	37
8.	Referências bibliográficas	38
9.	Anexos	43

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a prevalência das doenças alérgicas incluindo asma, rinite, conjuntivite, dermatite atópica, e alergia alimentar têm aumentado progressivamente. Estima-se que 20% da população mundial tenha algum tipo de alergia. As doenças alérgicas apresentam impacto marcante não só para os pacientes, mas também para suas famílias e para o país no qual eles residem, pelo comprometimento da qualidade de vida e da produtividade. A identificação e a redução da exposição a alérgenos é importante para o diagnóstico e manejo das doenças alérgicas. Em pacientes com alergias respiratórias incluindo asma e rinite, os principais alérgenos são os inalantes intra-domiciliares, principalmente os derivados de ácaros e baratas, entretanto, outros alérgenos, como os derivados de cão, gato e fungos também são relevantes (PAWANKAR, 2014; THOMSEN, 2015; WEIDINGER; NOVAK, 2016; ANTUNES et al., 2017). Em pacientes com dermatite atópica, a sensibilização IgE para alimentos como leite de vaca, ovo, trigo, soja e amendoim ocorre em aproximadamente 40% das crianças acometidas nos primeiros anos de vida, enquanto que em crianças maiores e adultos a sensibilização a alérgenos inalantes, particularmente a alérgenos de ácaros, ocorre com maior frequência, mas ainda pode haver sensibilização a alimentos como peixe, camarão, nozes e castanhas em menor frequência (WEIDINGER; NOVAK, 2016).

1.1 Asma: aspectos gerais

A asma é definida como uma doença crônica resultante de hiper-responsividade das vias aéreas e limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento. Sua principal característica é a inflamação crônica da mucosa brônquica, que ocorre mesmo em pacientes assintomáticos ou com formas leves da doença, determinando importantes peculiaridades com relação à prevenção e tratamento. Nos indivíduos suscetíveis, essa inflamação provoca episódios recorrentes de chiado, dispneia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2018). É um importante problema de saúde pública devido à sua elevada prevalência e morbidade (SOLÉ et al., 2015), bem como pelos altos custos e potencial de causar morte por crise aguda de asma.

Estima-se que pelo menos 300 milhões de indivíduos tenham asma no mundo atualmente (PAWANKAR, 2014), com prevalência em crianças variando de 2,6% na Indonésia até 15,3% na Austrália entre os anos 2000 e 2003 (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2018). O *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) fase 3 investigou aproximadamente 1.200.000 crianças de 233 centros em 98 países (MALLOL et al., 2013). Solé

et al. (2014) sintetizaram os estudos realizados no Brasil, revelando que a prevalência de asma em nosso meio é uma das maiores do mundo, de 24,3% entre crianças e 19% em adolescentes, sem relação com o status socioeconômico (SOLÉ et al., 2014). Os resultados indicam que a asma entre crianças e adolescentes no Brasil é um problema preocupante (AMORIM; DANELUZZI, 2001; RONCADA et al., 2016; MELO et al., 2017). Anualmente, ocorrem cerca de 346.000 mortes por asma no mundo (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2018). Desta forma torna-se importante o conhecimento da fisiopatologia e dos fatores de risco para essa doença, para que estratégias eficazes de tratamento e prevenção sejam adotadas (BARRETO et al., 2014; MELO et al., 2017).

Infecções respiratórias virais, mudanças climáticas, exercício físico ou exposição a substâncias e partículas irritantes ou que causem reação alérgica nas vias aéreas, somadas à predisposição genética à asma, levam a grande probabilidade de desenvolvimento da doença (FARAHANI et al., 2014; GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2016). O fenótipo asmático também inclui hiper-responsividade e remodelamento das vias aéreas juntamente com elevada produção de muco (HIROTA et al., 2011; FARAHANI et al., 2014). Sabe-se que alérgenos de baratas, ácaros, pelos de animais domésticos, pólen e fungos estão relacionados à asma e a quadros de piora da doença, inclusive com necessidade de intervenção hospitalar (SANTOS et al., 1999; ARRUDA et al., 2001; PERZANOWSKI; PLATTS-MILLS, 2009; POMÉS; ARRUDA, 2014; MELO et al., 2017).

Existem diversos medicamentos de uso crônico que podem ser utilizados no controle da asma que incluem corticosteroides inalatórios, β_2 agonistas de ação prolongada, inibidores de leucotrienos, anticorpos monoclonais anti-IgE e anti IL-5, entre outros. Esses medicamentos podem ser utilizados em conjunto (combinações) ou sozinhos e agem diminuindo a hiper-responsividade e a inflamação das vias aéreas. A escolha do medicamento e da dose utilizada depende de avaliação médica (FALK; HUGHES; RODGERS, 2016). Entretanto, estes tratamentos não modificam a história natural da doença, e na maioria dos pacientes com asma moderada e grave, a suspensão do tratamento leva ao reaparecimento dos sintomas.

A asma alérgica é caracterizada por resposta do tipo 2, induzida por apresentação de antígeno a células T via células dendríticas. Esse tipo de resposta induzida pelas citocinas IL-25 e IL-33 é caracterizada pela produção das interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13, pela produção de anticorpos IgE alérgeno-específicos e pela ativação de basófilos, mastócitos e eosinófilos. Outras interleucinas também são importantes na doença como a IL-9, IL-22 e IL-17 (MARTINS, 2015; FARAHANI et al., 2014; BAZETT et al., 2016; KAPPEN et al., 2016; OZDEMIR et al., 2016).

1.2 Dermatite atópica: aspectos gerais

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele, de elevada prevalência, caracterizada por prurido intenso, eritema, escoriações, liquenificação na pele, e xerose, com localização das lesões de acordo com a idade do indivíduo. Acomete principalmente crianças, que iniciam com sintomas nos primeiros meses ou anos de vida, mas pode perdurar até a vida adulta. Nos Estados Unidos, estima-se que 10,7% das crianças sofrem com essa doença. De maneira geral, nos países desenvolvidos a prevalência é de 1 a 3% em adultos e 10 a 20% em crianças. (GUENICHE et al., 2008; KAPUR; WATSON; CARR, 2018; YANG et al., 2018). De acordo com o ISAAC (*The International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) fase três, na América Latina a prevalência de sintomas de DA entre crianças de 6-7 anos e 13-14 anos foi de 9,8 a 10,2% e 6,3 a 10,1%, respectivamente (MALLOL et al., 2013).

Estudos demonstram que há relação entre dermatite atópica e outras doenças como a rinite alérgica, asma, depressão, colite ulcerativa, ansiedade, propensão a doenças cardiovasculares, alergia alimentar, obesidade, déficit de atenção, artrite reumatoide, prejuízos no desenvolvimento social das crianças afetadas, entre outros, o que mostra a importância do diagnóstico, tratamento e acompanhamento adequados dos pacientes (GUENICHE et al., 2008; WERFEL et al., 2016; KAPUR; WATSON; CARR, 2018; YANG et al., 2018).

A etiopatogenia da dermatite atópica é multifatorial, visto que diversos fatores estão envolvidos na doença como alterações no sistema imune e na barreira cutânea, além de fatores ambientais, alteração no microbioma da pele e do intestino. Mutações no gene que codifica filagrina, importante componente da barreira cutânea, foram identificadas como fator de risco genético para DA (GUENICHE et al., 2008; SALIMI et al., 2013; WERFEL et al., 2016; KAPUR; WATSON; CARR, 2018; YANG et al., 2018; PALLER et al., 2019).

Medidas iniciais no tratamento da doença incluem a hidratação da pele, e em pacientes em que há um alérgeno específico identificado, evitar o contato com este alérgeno. Na maior parte dos casos é necessário também o uso de anti-inflamatórios tópicos como corticosteroides tópicos e inibidores da calcineurina, e em casos refratários e muito graves, imunossupressores sistêmicos como corticosteroides sistêmicos, ciclosporina e metotrexato, e imunobiológico Dupilumabe. Pacientes com DA tem susceptibilidade aumentada a infecções por vírus e bactérias, e em casos de infecções na pele causadas por esses agentes, são necessários tratamentos específicos (KAPUR; WATSON; CARR, 2018; YANG et al., 2018).

Subtipos incluem DA associada à atopia ou extrínseca, em que pacientes apresentam níveis elevados de IgE total e específica, representando a maior parte dos casos da doença,

enquanto a DA não associada a atopia ou intrínseca não apresenta essas alterações (WERFEL et al., 2016). A presença de níveis elevados de IgE total e específica em grande parte dos pacientes com DA (WEIDINGER; NOVAK, 2016) mostra que sensibilização a alérgenos é algo comum na doença.

1.3 Tropomiosina: pan-alérgeno em invertebrados

Tropomiosinas têm sido identificadas como moléculas indutoras de resposta IgE e associadas a reatividade cruzada IgE para invertebrados, incluindo barata, ácaros, camarão e outros crustáceos e moluscos, *A. lumbricoides* e outros parasitas (REESE; AYUSO; LEHRER, 1999; SANTOS et al., 1999, 2008; ARRUDA et al., 2001; JEONG; HONG; YONG, 2006; ALBRECHT et al., 2008; BECKER et al., 2012). Nosso grupo identificou pela primeira vez a tropomiosina de *Periplaneta americana* como alérgeno principal de barata (alérgeno Per a 7) (SANTOS et al., 1999); em seguida, nosso grupo também descreveu a sequência de cDNA que codifica tropomiosina de *Ascaris lumbricoides*, a qual apresentou alto grau de homologia com tropomiosinas de diferentes invertebrados, incluindo outros parasitas, barata, ácaros e camarão. Ensaios de imunofluorescência, utilizando anticorpo monoclonal específico para tropomiosina de ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, mostraram a presença de tropomiosina em larva L₃ (estágio evolutivo durante a passagem pulmonar) de *A. lumbricoides* (SANTOS et al., 2008).

Tropomiosina pertence a uma família de proteínas altamente conservadas com múltiplas isoformas. É encontrada em células musculares e não musculares de todas as espécies de vertebrados e invertebrados. Atua como a principal molécula regulatória do sistema contrátil em células musculares e constitui importante componente do citoesqueleto em células não musculares (REESE; AYUSO; LEHRER, 1999; SEREDA; HARTMANN; LUCIUS, 2008). As tropomiosinas de invertebrados são alergênicas, enquanto tropomiosinas de vertebrados não são alergênicas. Na tentativa de esclarecer a alergenicidade de tropomiosinas de invertebrados, fragmentos resultantes da digestão com Pepsina A de tropomiosinas de várias espécies foram estudados; verificou-se que fragmentos maiores de tropomiosinas de caranguejo, camarão, barata e, principalmente, ácaros, provavelmente sobrevivem à digestão gástrica, comparados com fragmentos de tropomiosina de galinha, gado, coelho. Os fragmentos maiores de tropomiosina de invertebrados podem entrar na corrente sanguínea e assumir uma estrutura tridimensional, cuja estabilidade se aproxima da molécula intacta, sugerindo que moléculas maiores, derivadas de tropomiosinas de invertebrados, tenham maior habilidade de desencadear uma resposta de hipersensibilidade imediata (MIKITA; PADLAN, 2007).

A reatividade cruzada IgE humana para alérgenos homólogos é uma questão relevante (AALBERSE; AKKERDAAS; VAN REE, 2001; ARRUDA et al., 2014). Um estudo avaliou a resposta IgE a tropomiosina de camarão, ácaro e barata entre judeus ortodoxos, os quais obedecem estritamente às leis da dieta Kosher, que proíbe a ingestão de crustáceos. Nove pacientes selecionados apresentaram testes cutâneos positivos para camarão e, dentre eles, 3 demonstraram reatividade IgE para tropomiosina de camarão por RAST e *immunoblotting*. Uma significativa inibição da ligação de IgE à tropomiosina de camarão foi verificada quando os soros dos indivíduos envolvidos no estudo foram pré-incubados com extratos de *D. pteronyssinus*, *B. germanica* e *P. americana*. Estes resultados indicam que a reatividade de IgE para camarão neste grupo de judeus, não expostos a camarão, ocorreu como resultado de sensibilização indireta, por reatividade cruzada de IgE para tropomiosinas de camarão, ácaro e barata (FERNANDES et al., 2003).

1.4 Imunoterapia alérgeno-específica como tratamento para doenças alérgicas

A imunoterapia alérgeno-específica (designada na presente Dissertação como imunoterapia IT) tem sido utilizada como tratamento adjuvante de asma, rinite e conjuntivite alérgicas por mais de 100 anos. Pode ser administrada tanto por via subcutânea (ITSC) quanto por via sublingual (ITSL). Estudos controlados e análises sistemáticas revelam que ambas as formas de imunoterapia são eficazes em diminuir os sintomas, melhorar a função pulmonar e diminuir a necessidade de medicamentos de controle na asma alérgica, em adultos e crianças (KIM et al., 2013; NELSON, 2014; YUKSELEN; KENDIRLI, 2014; HANCI et al., 2016). A IT consiste em exposições a doses crescentes do alérgeno com o objetivo de induzir tolerância imunológica e clínica no indivíduo, sendo o único tratamento que atua na causa básica da alergia, e seus benefícios incluem melhora dos sintomas e da qualidade de vida mesmo após a cessação do tratamento. Embora inicialmente a IT seja um tratamento caro, quando analisada a longo prazo ela se mostra vantajosa devido aos benefícios clínicos e a economia que proporciona (ARSHAD, 2016; FALK; HUGHES; RODGERS, 2016; KAPPEN et al., 2016; SHIMA et al., 2017).

Estudo feito por Damm et al. (2016) na Alemanha buscou identificar as características mais importantes e a preferência dos pacientes na escolha de uma opção de IT (ITSC *versus* ITSL). No estudo, foram avaliados indivíduos acima de 18 anos com sintomas de rinite alérgica moderados a grave e com indicação de IT, porém que ainda não tivessem utilizado o tratamento. O estudo foi um experimento de escolha discreta que continha 5 atributos importantes da IT cada um com 2 níveis. Os resultados mostraram que o fator de maior importância para os pacientes foi o número total e a duração das visitas ao médico seguido pelo risco de reação anafilática e que a

forma de administração teve a menor importância. De acordo com os autores, a ITSL seria a melhor opção para esses pacientes com base na importância dada por eles às características analisadas no experimento (DAMM et al., 2016).

Os resultados benéficos da imunoterapia (ITSC e ITSL) resultam da indução de resposta T reguladora (Treg) na qual tanto células T reguladoras originadas no timo quanto células Treg induzidas na periferia atuam durante a IT produzindo TGF- β , moléculas de supressão e IL-10, que atuam na troca de isotipo de anticorpo produzido de IgE para IgG e IgA e supressão de células T. A produção de novos isotipos de anticorpos alérgeno-específicos, em especial do anticorpo IgG4, é importante pois eles competem com os anticorpos IgE na ligação ao antígeno e a células. A IgG4 interfere na apresentação do antígeno a células T, tanto via células B quanto via células dendríticas, que é auxiliada por IgE e pode ser relacionada com a eficácia da IT. Embora no início da IT ocorra aumento tanto de IgG4 quanto de IgE, a continuidade do tratamento causa diminuição de IgE. A IT também tem efeito sobre a atividade de mastócitos, eosinófilos e basófilos e causa direcionamento para resposta Th1 (KAPPEN et al., 2016; OZDEMIR et al., 2016; PASSALACQUA; CANONICA; BAGNASCO, 2016; CARDONA; LUENGO; LABRADOR-HORRILLO, 2017). Células natural killer e células B reguladoras induzidas também contribuem para tolerância ao alérgeno por meio da produção de IL-10. A vantagem da ITSL em relação à ITSC é o fato da cavidade oral ser um local de indução de tolerância, devido a presença de células dendríticas tolerogênicas, induzindo resposta do tipo 1 e reguladora (OZDEMIR et al., 2016).

Modelos experimentais de asma são muito importantes tanto para o estudo da fisiopatologia da doença quanto para testar novos tratamentos. Para indução da doença em camundongos, classicamente se utilizava a ovalbumina, porém para produzir um quadro asmático mais próximo do humano é preciso utilizar alérgenos importantes para a doença. Esses alérgenos podem ser administrados na forma de proteína recombinante ou como extrato bruto. O uso da proteína recombinante é preferido por permitir o uso somente da molécula alergênica (MARTINS, 2015; HIROTA et al., 2011; BAZETT et al., 2016).

Interessados principalmente no papel preventivo da ITSL, Hagner et al. (2016) mostraram que esta terapia é eficaz tanto no combate à inflamação das vias aéreas quanto na prevenção usando modelo experimental de sensibilização e desafio intranasais com extrato de *Dermatophagoides farinae*. Neste trabalho, os autores mostraram que camundongos que receberam ITSL profilática tinham menos células T $\gamma\delta$ duplo negativas no homogenato pulmonar em comparação aos animais cuja IT, mas não a sensibilização e desafio, foi feita com PBS. Estas células parecem bastante envolvidas com a presença de neutrófilos e eosinófilos nos locais

inflamados. Outro dado interessante é o aumento de células T CD8+CD25+INF- γ + no pulmão de animais que receberam ITSL profilática em comparação ao mesmo grupo controle. Esse subgrupo de células T CD8, denominado Tc1, está envolvido no combate à reposta alérgica em grande parte devido à produção de IFN- γ . Tanto neste trabalho quanto em Tourdot et al. (2011) é citada a provável importância do anticorpo IgA na eficácia da ITSL e ambos relatam aumento de IgA alérgeno específico, respectivamente, no lavado broncoalveolar e na saliva dos camundongos tratados, embora o aumento no lavado broncoalveolar não foi estatisticamente significativo tanto na profilaxia quanto no tratamento quando comparado com o grupo cuja ITSL foi feita com PBS (TOURDOT et al., 2011; HAGNER et al., 2016).

Avaliando as cavidades broncoalveolar e nasal, Kaminuma et al. (2010) mostraram utilizando ovalbumina e dois grupos experimentais (desafio intranasal e intratraqueal) que a resposta inflamatória ao alérgeno pode ter características diferentes em diferentes partes do sistema respiratório e que o efeito da ITSL profilática também é diferente nesses locais (KAMINUMA; SUZUKI; MORI, 2010).

Igarashi et al. (2016) relatam que o resultado da ITSL profilática com ovalbumina ou Cry j 1 contra rinite alérgica em camundongos pode ser influenciado pelo período do dia em que o tratamento é feito, devido a ação do ciclo circadiano, e também por características do alérgeno. Em relação ao período do dia, o melhor momento para a administração do tratamento seria no período desativo, ou seja, naquele em que normalmente o animal diminui suas atividades e tende a repousar (IGARASHI et al., 2016).

Segundo Liu et al. (2015), a ITSL teve o mesmo mecanismo de ação tanto na dermatite atópica induzida por extrato de ácaro em camundongos quanto em indivíduos no tratamento de alergia nas vias aéreas e foi benéfica no combate a doença, um dado interessante que pode indicar constância no modo de ação da ITSL contra alergia (LIU et al., 2015).

Estudo preliminar realizado por nosso grupo mostrou que em modelo de asma experimental utilizando tropomiosina de barata, foram observadas as principais características presentes na asma humana associada à resposta tipo 2, incluindo eosinofilia pulmonar, aumento de IgE específica, aumento de IL-4, IL-5 e IL-13 e a hiper-responsividade brônquica. A ITSL com tropomiosina de barata causou redução da eosinofilia pulmonar, bem como da IL-5 e IL-13, entretanto não induziu a diminuição da IgE específica, IL-4 e hiper-responsividade brônquica no modelo de asma experimental (MARTINS, 2015). Diante disto, um dos objetivos do presente trabalho foi dar continuidade ao trabalho realizado por Martins et al. (2015) testando protocolo alternativo de imunoterapia a longo prazo (MARTINS, 2015).

Avanços estão ocorrendo na IT para doenças alérgicas, incluindo novas rotas de aplicação dos alérgenos (via epicutânea, intralinfática e oral); uso de alérgenos purificados, recombinantes ou naturais; desenvolvimento e utilização de hipoalérgenos que preservem a eficácia da terapia aumentando a segurança; uso de novos adjuvantes. Embora a IT tenha sido introduzida na prática clínica há mais de 100 anos, os mecanismos de ação envolvidos nesta forma de tratamento ainda não são completamente conhecidos, e estudos se fazem necessários para investigar melhores regimes e vias de aplicação, avaliar o uso da IT na prevenção à sensibilização a alérgenos e desenvolvimento de doenças alérgicas, bem como a possibilidade do uso de IT para um alérgeno induzir tolerância a alérgenos relacionados (AKDIS; AKDIS, 2015; ARSHAD, 2016; BUSH, 2016). Um avanço significativo no campo da IT foi o estabelecimento e legalização em vários países do comprimido SQ de extrato de ácaros *D. farinae* e *D. pteronyssinus* para ITSL como opção de tratamento tanto para rinite alérgica quanto para asma alérgica que tornou o uso da IT na asma alérgica mais seguro. O efeito do tratamento com o comprimido na asma alérgica foi avaliado em ensaios clínicos que mostraram sua tolerabilidade, eficácia e segurança (CANONICA et al., 2016).

Estudos clínicos tem sugerido que as indicações de imunoterapia podem ser expandidas, com dados promissores em alergia alimentar, alergia ao látex e dermatite atópica (GINSBERG; EICHENFIELD, 2016; SLAVYANAKAYA; DERKACH; SEPIASHVILI, 2016; TAM et al., 2016). Diversos estudos sugerem que a imunoterapia pode ser eficaz para a DA, quando esta condição está associada à sensibilização a aeroalérgenos, sendo capaz de promover mudanças sorológicas e imunológicas consistentes com a tolerância. Tanto a ITSC quanto a ITSL têm sido estudadas na DA, com demonstração de eficácia parcial em pacientes com sensibilização a ácaros (COX; CALDERON, 2016; GINSBERG; EICHENFIELD, 2016; NELSON; MAKATSORI; CALDERON, 2016; SLAVYANAKAYA; DERKACH; SEPIASHVILI, 2016; TAM et al., 2016).

Quando consideramos a IT para dermatite atópica dentro dos conceitos atuais de Medicina de Precisão, é importante que se determine o perfil de sensibilização a alérgenos purificados. Em nosso meio, identificamos a tropomiosina como alérgeno principal em pacientes com asma e/ou rinite (SANTOS et al., 1999), com alto grau de reatividade cruzada entre invertebrados particularmente ácaros e camarão. Entretanto, a sensibilização a tropomiosina não foi investigada em pacientes com dermatite atópica em nosso meio. Desta forma, no presente estudo pretendemos utilizar a tropomiosina recombinante de barata, produzida com elevado grau de pureza, como modelo para avaliar a resposta IgE em pacientes com DA em nosso meio.

2. OBJETIVOS

Geral

Utilizar tropomiosina recombinante de barata *Periplaneta americana* (alérgeno Per a 7) para avaliar efeitos imunológicos da imunoterapia sublingual em modelo experimental de hiper-responsividade brônquica em camundongos, e para investigar resposta IgE a este alérgeno em pacientes com dermatite atópica em nosso meio.

Específicos

1. Desenvolver protocolo de imunoterapia sublingual utilizando rPer a 7 na indução de tolerância ao alérgeno.
2. Avaliar o efeito da imunoterapia sublingual em diminuir a eosinofilia pulmonar e em melhorar a função pulmonar nos camundongos tratados.
3. Quantificar IgE específica para rPer a 7 no soro de pacientes com dermatite atópica por meio de ELISA quimérico.
4. Comparar os resultados de IgE específica para rPer a 7 com dados clínicos e imunológicos em pacientes com dermatite atópica
5. Verificar se a presença de sensibilização ao alérgeno Per a 7 poderia ser um biomarcador para gravidade e/ou persistência da doença.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Produção e purificação de tropomiosina recombinante de barata *Periplaneta americana* (alérgeno Per a 7)

Métodos para produção de tropomiosina recombinante de *P. americana* foram previamente estabelecidos em nosso laboratório (SANTOS et al., 1999), entretanto foram adicionadas modificações para minimizar a contaminação por endotoxina da preparação recombinante, incluindo substituição das etapas de diálise e concentração em centrífuga a vácuo (*concentrator* 5301 Eppendorf) por filtração do sobrenadante da expressão em membrana de nitrocelulose 0,45 µm e uso dos concentradores *Pierce Protein Concentrator* PES 10K MWCO lote nº RH237504 código 88527. Também substituímos a solução de azida sódica 0,2 g/L para limpeza e armazenamento da coluna de cromatografia de afinidade pelo tampão TST, (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris Base, 0.05% Tween 20, pH 7.6) contendo 20% de etanol. Resumidamente, para a expressão de rPer a 7 foram utilizados os meios BMGY e BMMY contendo extrato de levedura e peptona. Colônias individuais correspondentes a transformantes positivos foram inoculadas em 25 mL de BMGY, e incubadas em agitador a 30°C e 250 rpm até que a cultura alcançasse uma densidade óptica de 2,0 a 6,0 à 600 nm. As células foram centrifugadas a 3600 rpm à temperatura ambiente durante 5 minutos. O precipitado celular foi ressuscitado em meio BMMY (meio contendo metanol) para densidade óptica igual a 1.0 a 600 nm. A cada 24 horas foi adicionado à cultura metanol 100% para uma concentração final de 0.5%. Alíquotas do sobrenadante da cultura foram coletadas após 24, 48 e 72 horas de incubação para posterior análise usando o sistema Phast system (Pharmacia LKB Biotechnology S-751 82, Uppsala, Suécia) e coloração por nitrato de prata. Após 72 horas no agitador, o meio de cultura foi centrifugado a 3600 rpm, 25°C por 5 minutos e o sobrenadante foi armazenado em freezer -20°C.

Tropomiosina recombinante de *P. americana* foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando o anticorpo monoclonal 1A6 anti-tropomiosina de ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Indoor Biotechnologies, Inc. Charlottesville, Virginia, USA). Coluna de afinidade para purificação de tropomiosina foi preparada com 17 mg do anticorpo monoclonal 1A6, em tampão de ligação (NaHCO₃ 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 8,3), utilizando 1g de Sepharose (GE HealthCare, Brasil). Após lavagens seriadas, as esferas conjugadas ao anticorpo monoclonal 1A6 foram ressuscitadas em PBS (phosphate buffered saline) pH 7,4. O sobrenadante da cultura de expressão foi filtrado em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Protran® BA85 lote: 5319015 No: 10401116 Whatman) e passou pelo procedimento de concentração seguido de troca de tampão para PBS 1X por meio dos concentradores *Pierce Protein Concentrator* PES 10K MWCO lote nº

RH237504 código 88527. Posteriormente o sobrenadante em PBS 1X foi aplicado à coluna previamente preparada. Após lavagem com PBS, eluição da proteína foi feita com tampão glicina 0,005 M pH 2,6. As frações eluídas foram coletadas em frasco queimado contendo tampão fosfato de sódio pH 7.

Em seguida, o volume eluído na purificação passou pelo processo de troca de tampão para tampão bicarbonato de amônia 5 mM seguido de concentração com o uso dos concentradores *Pierce Protein Concentrator* PES 10K MWCO lote nº RH237504 código 88527. A concentração final da proteína foi determinada por ensaio de Micro-Bradford. A pureza das preparações de tropomiosina recombinante foi avaliada por SDS-PAGE (gradiente de 8-25%) usando o sistema Phast system (Pharmacia LKB Biotechnology S-751 82, Uppsala, Suécia) e coloração por nitrato de prata.

3.2 Dosagem de endotoxina bacteriana

A quantificação de endotoxina em preparações purificadas de rPer a 7 foi realizada utilizando o kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL- 1000™ (Lonza-Walkersville, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.3 Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c, com idade de 5 semanas, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto, foram utilizados no projeto. Os animais foram ambientados por aproximadamente uma semana no Biotério da Clínica Médica da FMRP antes do início dos experimentos em caixas coletivas (máximo de 4 camundongos por caixa), com livre acesso a água e ração (Labmix, Agromix, Jaboticabal, São Paulo), à temperatura de aproximadamente $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ e em fotoperíodo de 12/12 horas.

3.4 Avaliação da eficácia da imunoterapia sublingual (ITSL) com tropomiosina recombinante de *P. americana* no tratamento de asma experimental induzida por rPer a 7

Camundongos BALB/c (10 animais/grupo) foram sensibilizados duas vezes com injeções intraperitoneais (i.p.) de 50 µg de rPer a 7 e 1 mg de hidróxido de alumínio diluídos em 0,2 mL de solução salina isotônica estéril, com 1 semana de intervalo. Uma semana após a última injeção intraperitoneal, os camundongos foram submetidos a três desafios com aplicação intranasal de 50 µg de rPer a 7 diluídos em 50 µL de solução salina isotônica estéril, sob anestesia, uma vez por dia, por 3 dias consecutivos. Um dia após a terceira aplicação intranasal foi iniciada a ITSL com 50 µg de rPer a 7 em 15 µL de salina estéril durante 6 semanas, 5 dias por semana e 24 horas

após o fim da ITSL foram feitas novas aplicações intranasais com rPer a 7 da mesma forma que as primeiras (3 dias consecutivos com 50 µg de rPer a 7). Os grupos controle foram submetidos aos mesmos procedimentos, nos mesmos dias, porém a injeção intraperitoneal, as aplicações intranasais e/ou sublinguais foram realizadas com solução salina isotônica estéril conforme ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos experimentais

Grupos	Injeção intraperitoneal	Aplicação intranasal	Aplicação sublingual	Aplicação intranasal
1	salina	salina	salina	salina
2	salina	salina	rPer a 7	salina
3	rPer a 7	rPer a 7	salina	rPer a 7
4	rPer a 7	rPer a 7	rPer a 7	rPer a 7

A avaliação do desenvolvimento de fenótipo asmático e do efeito da imunoterapia neste fenótipo foi feita, inicialmente, avaliando-se a contagem de células totais e diferenciais (eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos) no lavado broncoalveolar obtido 24 horas após o último desafio (Figura 1).

Figura 1. Esquema do protocolo de imunoterapia sublingual utilizado no trabalho. i.p. = intraperitoneal, i.n. = intranasal, ITSL = imunoterapia sublingual, LBA = lavado broncoalveolar, Al(OH)₃ = hidróxido de alumínio, rPer a 7 = tropomiosina recombinante de *P. americana*.

3.5 Lavado broncoalveolar (LBA)

Por meio de cânula traqueal foi obtido o lavado broncoalveolar, pela infusão e aspiração de 1 mL de salina estéril no pulmão dos animais duas vezes, para contagem total e diferencial de células (eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos). O LBA foi centrifugado para separação do *pellet* celular, que foi ressuspenso em 500 µL de PBS 1X gelado para contagem de células

totais e diferenciais. A contagem de células totais foi feita em Câmara de Neubauer com aumento de 400X usando coloração com tripan.

As lâminas para contagem diferencial das células foram preparadas no dia do sacrifício de cada grupo (Cytospin 4, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) e coradas com Panótico rápido (Laborclin). A contagem diferencial de células foi feita às cegas em objetiva de imersão, com aumento de 1000X, e seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de macrófagos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos. Foram contadas 300 células por lâmina.

3.6 Avaliação da função pulmonar

Vinte e quatro horas após o último desafio, a função pulmonar basal e após provocação com metacolina inalatória seria avaliada em equipamento FlexVent (Scireq, Montreal, QC, Canadá). Infelizmente não foi possível utilizar o FlexVent para medida da função pulmonar nos dias previstos de acordo com o protocolo (27, 28/08/18 e 03, 04/09/18), porque o equipamento apresentou problemas técnicos e não calibrou. Destaco que este equipamento é o único existente na FMRP-USP. Localizamos equipamento semelhante no laboratório do Prof. Milton Arruda, na FMUSP, entretanto avaliamos que o transporte dos camundongos para São Paulo traria variáveis adicionais particularmente o stress dos animais que poderia alterar os resultados da função pulmonar e de todo o experimento. Desta forma, optamos por seguir com o protocolo e coletamos lavado broncoalveolar dos animais.

3.7 Pacientes

Cento e doze pacientes com diagnóstico clínico de DA foram selecionados a partir daqueles atendidos nos Ambulatórios de Alergia e Dermatologia do HCFMRP-USP. Os pacientes foram selecionados durante o expediente ordinário, sendo registrados em prontuários todos os dados referentes à anamnese e ao exame clínico e dermatológico, como rotina destes serviços. Foi coletado sangue dos pacientes para obtenção do soro para dosagem de IgE total e específica para Per a 7 recombinante (rPer a 7).

Critérios de inclusão para o estudo foram:

- Diagnóstico de DA de acordo com os critérios de Hanifin e Rajka (HANIFIN, 1980);
- Idade maior ou igual a 3 anos;
- Concordância do paciente ou do seu responsável legal em participar do estudo.

Critérios de exclusão do presente estudo foram:

- Gravidez ou lactação;
- Uso de imunossupressor por doenças inflamatórias que não asma e dermatite atópica.

A gravidade da dermatite atópica foi determinada pelo *Scoring Atopic Dermatitis* (SCORAD), índice baseado em sinais e sintomas clínicos de acordo com: extensão de comprometimento cutâneo (pontuação de 0 a 100%), intensidade do eritema, edema, exsudação/crostras, escoriações, liquenificação e xerose (pontuação de 0-3), além de sintomas subjetivos como qualidade do sono e intensidade do prurido (pontuação de 0-10). A classificação da gravidade foi definida como leve (SCORAD < 25), moderada (SCORAD entre 25 e 50) e grave (SCORAD > 50).

3.8 Determinação da IgE total

Níveis séricos de IgE total foram determinados usando o sistema ImmunoCAP (Thermo Fisher, Brasil) e os resultados expressos em UI/mL.

3.9 Quantificação de IgE específica para tropomiosina recombinante de barata *Periplaneta americana* (rPer a 7)

A quantificação de anticorpos IgE específicos para rPer a 7 no soro dos pacientes com dermatite atópica foi feita através de ELISA quimérico (ICHIKAWA et al., 1999; TROMBONE et al., 2002).

Placa de poliestireno Costar® (Corning Incorporated, Nova Iorque, EUA) foi incubada *overnight* entre 2 – 4°C com 100 µL/poço de uma solução de anticorpo monoclonal 1A6 diluído em tampão carbonato/bicarbonato pH= 9,6 para uma concentração final de 10 µg/mL. Após 3 lavagens com PBS – Tween 0,05%, foi feito o bloqueio da placa com 200 µL/poço de uma solução de BSA 1% - PBS – Tween durante 30 minutos a temperatura ambiente. A placa foi lavada 3 vezes com PBS – Tween 0,05% e em seguida foram adicionados 100 µL/poço de rPer a 7 diluída em BSA 1% - PBS – Tween para a concentração de 0,5 µg/mL. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, a placa foi lavada com PBS – Tween 0,05% por 5 vezes. Foram adicionados 100 µL/poço de soro dos pacientes com DA e controles negativos diluídos 1:10 em BSA 1% - PBS – Tween. A placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente e em seguida lavada 5 vezes com PBS – Tween 0,05%. Em seguida foram adicionados 100 µL/poço de anticorpo de cabra anti IgE humana biotinilado (Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland, EUA) diluído 1:4000 em BSA 1% - PBS – Tween e a placa foi incubada por 1 hora na bancada. A placa foi lavada da mesma forma por 5 vezes e foram adicionados 100 µL/poço de estreptavidina peroxidase (Sigma, Steinheim, Alemanha) diluída 1:1000 em BSA 1% - PBS – Tween. Após 30 minutos a temperatura ambiente, a placa foi lavada como anteriormente e a reação desenvolvida pela adição de 100 µL/poço de ABTS/H₂O₂ (2,2'-azino-bis(3-

ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) contendo H_2O_2 0,02%) (Sigma, Steinheim, Alemanha). A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro (PowerWave X, Bio-tek Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 405 nm. Algumas amostras de soro precisaram ser repetidas utilizando diluições maiores.

Uma curva padrão foi construída utilizando um anticorpo quimérico cujas regiões variáveis da cadeia pesada e as cadeias leves são provenientes de um anticorpo monoclonal murino, clone 2B12, que reconhece o alérgeno do grupo 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p 2, e as regiões constantes das cadeias pesadas são de IgE humana (SCHUURMAN et al., 1995, 1997; ELDERFIELD et al., 1996).

Para construção da curva uma placa de poliestireno Costar® (Corning Incorporated, Nova Iorque, EUA) foi incubada *overnight* entre 2 – 4°C com 100 µL/poço de uma solução de anticorpo monoclonal anti Der p 2, αDpX, (Indoor Biotechnologies, Inc. Charlottesville, Virginia, EUA) diluído em tampão carbonato/bicarbonato pH= 9,6 para uma concentração final de 10 µg/mL. Após 3 lavagens com PBS – Tween 0,05%, foi feito o bloqueio da placa com 200 µL/poço de uma solução de BSA 1% - PBS – Tween durante 30 minutos a temperatura ambiente. A placa foi lavada 3 vezes com PBS – Tween 0,05% e em seguida foram adicionados 100 µL/poço de extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* como fonte de Der p 2 diluído 1:400 em PBS – Tween 0,05%. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, a placa foi lavada com PBS – Tween 0,05% por 5 vezes. Foram adicionados 100 µL/poço de diluições do anticorpo chimérico (Indoor Biotechnologies, Inc. Charlottesville, Virginia, EUA) em BSA 1% - PBS – Tween na placa desde a concentração de 38,190 UI IgE/ml a 0,037 UI IgE/mL. A curva foi feita em duplicata. A placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente e em seguida lavada 5 vezes com PBS – Tween 0,05%. Os passos seguintes foram os mesmos feitos para as amostras de soro.

3.10. Análise dos dados

Diferenças entre a contagem de células totais e diferenciais em LBA do grupo tratado com imunoterapia com rPer a 7e dos grupos controles foram avaliadas por Análise de Variância one-way e pós-teste de Bonferroni. Os pacientes com DA foram separados entre aqueles sensibilizados a rPer a 7 e não sensibilizados ao alérgeno. Estes dois grupos foram comparados em relação ao SCORAD, IgE total, idade de início dos sintomas e tempo de doença utilizando o teste Mann-Whitney, e em relação à presença das comorbidades incluindo asma e rinite utilizando o teste qui quadrado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo realizado com o modelo experimental utilizando tropomiosina recombinante de barata para investigar hiper-responsividade brônquica e eficácia de imunoterapia sublingual em camundongos foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número de protocolo 053/2018, Anexo 7.

Os experimentos para investigar o papel da tropomiosina recombinante de barata na resposta IgE em pacientes com dermatite atópica em nosso meio foram realizados utilizando soros já coletados, que estavam armazenados em nosso laboratório em freezer a -80°C , e dados clínicos previamente disponíveis, de pacientes com DA que participaram ou participam dos estudos da Dra. Renata Nahas Cardili e da Dra. Sarah Sella Langer, previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP sob os números de processo HCRP 17807/2013 e 3927/2017, respectivamente. Estes pacientes ou seus responsáveis legais assinaram previamente o TCLE quando da inclusão nos estudos citados acima, que preveem coleta de sangue e avaliação da resposta imune alérgica em seus soros.

5. RESULTADOS

5.1 Produção da proteína recombinante alérgeno rPer a 7

A produção da proteína recombinante foi concluída com uma média de 7,8 mg de proteína produzida por expressão, com total de 80,0 mg. A Figura 2 mostra tropomiosina recombinante de *P. americana* (alérgeno rPer a 7) com elevado grau de pureza em gel SDS-PAGE com coloração por nitrato de prata.

Figura 2. Análise por SDS-PAGE em gel com gradiente 8-25%, corado com nitrato de prata, de preparação representativa de tropomiosina recombinante de *P. americana*, alérgeno rPer a 7. A figura mostra bandas correspondentes à proteína purificada e concentrada na forma reduzida (R, 33kDa) e não reduzida (NR, 70kDa). Marcador High Molecular Weight Standard Mixture SDS-6H Sigma.

A dosagem de endotoxina na preparação de proteína recombinante foi de 0,015 UE/ μ g de proteína. Esta quantidade de endotoxina foi adequada, considerando parâmetro de quantidade de endotoxina considerado aceitável de $<0,03$ UE/ μ g (LoToxTM, Indoor Biotechnologies, Inc. Charlottesville, Virginia, USA).

5.2 Modelo experimental de imunoterapia sublingual com rPer a 7

No gráfico apresentado na Figura 3 foi possível observar que houve aumento na contagem de células totais no lavado broncoalveolar dos animais cuja injeção intraperitoneal e aplicação intranasal foram realizadas com rPer a 7, quando comparados aos animais cujos procedimentos foram feitos com salina. Entretanto não houve diminuição na contagem de células totais no LBA dos animais cuja injeção intraperitoneal, aplicação intranasal e sublingual foram feitos com rPer a

7, em comparação aos animais que também receberam injeção intraperitoneal e aplicação intranasal com rPer a 7, mas na aplicação sublingual foi utilizada salina. Seria esperado que a aplicação sublingual tivesse reduzido a contagem de células totais no LBA dos animais tratados com rPer a 7 em comparação aos animais tratados com salina.

Figura 3. Contagem de células totais. Sal/sal = injeção intraperitoneal e aplicação intranasal feitos com salina, rPer a 7/rPer a 7 = injeção intraperitoneal e aplicação intranasal feitos com tropomiosina recombinante de *P. americana*, Imunoterapia - = aplicação sublingual de salina, Imunoterapia + = aplicação sublingual de tropomiosina recombinante de *P. americana*. *** $p < 0,0001$.

Os resultados da contagem diferencial de células estão mostrados na Figura 4.

Figura 4. Contagem diferencial de células. A – Macrófagos, B – Eosinófilos, C – Linfócitos, D – Neutrófilos. Sal/sal = injeção intraperitoneal e aplicação intranasal feitos com salina, rPer a 7/rPer a 7 = injeção intraperitoneal e aplicação intranasal feitos com tropomiosina recombinante de *P. americana*, Imunoterapia - = aplicação sublingual de salina, Imunoterapia + = aplicação sublingual de tropomiosina recombinante de *P. americana*. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,009$ e * $p < 0,05$.

Nos gráficos da Figura 4 foi possível observar que o modelo experimental de asma funcionou, pois houve aumento de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos no LBA dos animais cuja injeção intraperitoneal e aplicação intranasal foram feitas com rPer a 7 em comparação aos controles, cujos procedimentos foram feitos com salina. Entretanto a imunoterapia com rPer a 7 no grupo de injeção intraperitoneal e aplicação intranasal com rPer a 7 não levou a diminuição na quantidade destas células, particularmente eosinófilos, em comparação ao grupo cuja injeção intraperitoneal e aplicação intranasal foram feitas com rPer a 7, mas a aplicação sublingual com salina.

Em 2015, a Dra. Thalita Freitas Martins verificou em sua Tese de Doutorado realizada em nosso laboratório que, em modelo experimental semelhante ao modelo do presente estudo, a

aplicação sublingual de rPer a 7 feita 5 dias/semana durante 3 semanas diminuiu significativamente o número de eosinófilos, linfócitos e macrófagos no grupo de injeção intraperitoneal e aplicação intranasal com rPer a 7 em comparação ao grupo cuja injeção intraperitoneal e aplicação intranasal foram feitos com rPer a 7, mas a aplicação sublingual não. Entretanto, não observou mudanças significantes na função pulmonar nos grupos experimentais (MARTINS, 2015). Na ocasião fizemos a hipótese de que estes resultados poderiam ser devido à duração curta da imunoterapia, de 3 semanas, e optamos por utilizar modelo semelhante com algumas modificações na produção da proteína descritas em Métodos, mas com maior duração da imunoterapia, por 6 semanas. Desta forma, seria esperado que a resposta celular em LBA fosse semelhante à observada pela Dra. Thalita Martins, com efeito da imunoterapia em diminuir células totais e eosinófilos no LBA.

Um fator que pode ter contribuído para estes resultados inesperados foi a utilização de ração inapropriada, deficiente em nutrientes essenciais, durante o período de realização dos experimentos. Em 2018 a Universidade de São Paulo campus Ribeirão Preto, mediante licitação, comprou uma ração diferente da usada há anos pela FMRP. A ração Labmix (Agromix Indústria e Comércio de Alimentos LTDA, Jaboticabal, São Paulo) começou a ser usada no biotério central no final de abril de 2018. Os funcionários dos biotérios da universidade bem como os alunos perceberam que a ração poderia não ser da mesma qualidade que a ração anterior por análise visual da ração, odor e por relato de queda de pelo dos animais e perda de peso. Análises nutricionais confirmaram que a ração era realmente pobre em nutrientes e que a Universidade foi vítima de desonestidade e engano pela empresa durante o processo de licitação para compra de ração. Recebemos essas informações oficialmente em reunião realizada no dia 27/09/2018 com a Diretora da FMRP Prof. Dra. Margaret de Castro que teve como objetivo esclarecer essa situação para os alunos, docentes e funcionários que trabalham com modelos experimentais Anexos 1-5.

Os experimentos com modelo animal foram iniciados no dia 26/06/2018 com a primeira sensibilização do grupo 1. Acreditamos que a desnutrição dos animais causada pelo uso dessa nova ração pode ter influenciado negativamente nos resultados e, por isso, não podemos considerar os dados deste modelo experimental válidos. Dessa forma, não progredimos com uma série de experimentos que incluíam dosagem de citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17 e TGF- β no LBA e homogenato pulmonar; dosagem por ELISA de IgE sérica para rPer a 7 e análise do tecido pulmonar para presença de infiltrado celular, produção de muco e presença de colágeno por análises histológicas usando coloração com Hematoxilina e Eosina, Periodic-Acid Schiff e picrossirius, respectivamente, como planejados no projeto original.

5.3 Resposta IgE ao alérgeno Per a 7 em pacientes com dermatite atópica

A idade dos pacientes variou de 3 a 67 anos com média de 24,9 ($\pm 15,4$) anos, com 75 indivíduos do sexo feminino (67%). Nos 112 pacientes, o SCORAD apresentou média de 43,1 ($\pm 18,1$) e foram relatadas asma e rinite em 42 e 85 indivíduos, respectivamente. Níveis de IgE total apresentaram ampla variação, de 14,2 a 63.000 UI/mL, com média geométrica de 2.193 UI/mL. A idade de início dos sintomas e o tempo de doença apresentaram médias, respectivamente, de 9,5 ($\pm 12,9$) e 15,4 ($\pm 12,3$) anos, Anexo 6.

No total, 30 indivíduos (26,8%) apresentaram níveis detectáveis de IgE para Per a 7 recombinante, com variação de 2,3 a 3.191 UI/mL. A razão de IgE específica para Per a 7/IgE total nestes pacientes variou de 0,03% a 33,8%. Dividindo os pacientes em sensibilizados e não sensibilizados ao alérgeno de barata, observamos que não houve diferença significativa entre os grupos com relação à idade de início dos sintomas, tempo de doença, SCORAD, presença de rinite ou asma e níveis de IgE total, conforme apresentado na Tabela 2. A comparação dos dois grupos em relação à presença de asma ou rinite foi feita pelo teste qui quadrado e para as outras características utilizamos o teste de Mann-Whitney.

Tabela 2 – Comparação entre grupos de pacientes sensibilizados e não sensibilizados a Per a 7

	Grupo sensibilizado n = 30	Grupo não sensibilizado n = 82	Valor p
Idade de início dos sintomas (anos), mediana	6	4	0,20
Tempo de doença (anos), mediana	10	12,5	0,35
Presença de asma	12	30	0,74
Presença de rinite	24	61	0,53
SCORAD, mediana	47,5	38,5	0,2
IgE total (UI/mL), mediana	3505	1750	0,07

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho iniciou com a proposta de produzir a tropomiosina de barata *P. americana* em condições estéreis e com baixa dosagem de endotoxina utilizando a levedura *Pichia pastoris* como sistema de expressão, e utilizar a proteína purificada e concentrada em um modelo experimental de indução de fenótipo asmático em camundongos e tratamento com o alérgeno desencadeante por meio de imunoterapia sublingual, caracterizando-se como um ensaio pré-clínico.

Os primeiros resultados do modelo experimental demonstraram que a aplicação sublingual do alérgeno de barata não teve o efeito esperado sobre a contagem diferencial e total de células em LBA e que, provavelmente, a análise de outros fatores envolvidos na asma alérgica também levaria a resultados negativos. Acreditamos que a provável desnutrição dos animais, que vem desde as matrizes do Biotério Central, causada pelo uso da nova ração pode ter influenciado negativamente os resultados do presente trabalho, visto que o estado nutricional afeta o sistema imune de várias maneiras, aumentando por exemplo, a suscetibilidade do indivíduo a infecções bem como a morbidade e mortalidade devido a essas doenças. A desnutrição está associada a alterações intestinais como, por exemplo, atrofia das vilosidades, infiltrado inflamatório na mucosa e problemas na barreira intestinal e cutânea; a nutrição do indivíduo também afeta o metabolismo de células do sistema imunológico, sendo que a desnutrição prejudica funções efetoras que necessitam de metabolismo de glicose, e interfere na resposta do organismo a vacinas, embora indivíduos desnutridos sejam capazes de responder (PRENDERGAST, 2015; ALWARAWRAH; KIERNAN; MACLVER, 2018). Turfkruyer et al. (2016) mostraram em um modelo murino que a baixa quantidade de vitamina A, natural em neonatos, interfere na indução de tolerância oral a ovalbumina e que esse micronutriente também está envolvido no desenvolvimento do epitélio intestinal (TURFKRUYER et al., 2016).

Outra hipótese para explicar os resultados inesperados observados na contagem total e diferencial de células no LBA é a baixa quantidade de endotoxina presente na preparação de proteína recombinante administrada nos animais. É possível que a endotoxina seja necessária para ativar o sistema imune durante a imunoterapia, visto que ela é encontrada em extratos alergênicos que são utilizados nesta forma de tratamento na prática clínica, e mostra-se um componente importante desses extratos em ensaios de ativação de fibroblastos humanos da derme cultivados na presença do extrato normal, fervido ou tratado com polimixina B (ROCKWOOD; MORGAN; ARLIAN, 2013). Fato que talvez reforce esta hipótese é que a preparação de rPer a 7 utilizada pela doutora Thalita Martins em seu modelo experimental tinha uma quantidade maior de endotoxina, 0,34 UE/ μ g de proteína, do que a preparação utilizada no presente estudo. Durante

o presente estudo, aprimoramos algumas etapas posteriores à produção da proteína para melhorar o rendimento e reduzir de forma marcante a quantidade de endotoxina nas preparações de tropomiosina recombinante.

O protocolo utilizado no presente trabalho pode ser questionado quanto a sua eficácia pelo fato da ITSL ter sido realizada com os animais acordados, somente segurando-os firmemente pela nuca durante 30 segundos após a aplicação sublingual da solução de rPer a 7 ou salina estéril. Entretanto, Hesse et al. (2018) relataram resultados de protocolo de ITSL de 8 semanas com aplicação sublingual de 5 dias/semana de um volume de 5 µL em um modelo experimental de asma com extrato de pólen de grama, mantendo os camundongos acordados durante a ITSL, da mesma forma que no presente estudo, diferindo no tempo de retenção do animal para ação da ITSL, para 20 segundos. Este trabalho mostrou que o tratamento sublingual com a maior dose diminuiu IgE específica e aumentou IgG2a após desafio intranasal e melhorou a função pulmonar dos animais em comparação ao controle positivo, porém a imunoterapia não diminuiu a contagem de eosinófilos no LBA nem a produção de citocinas do tipo 2 por células do pulmão dos animais estimuladas *in vitro*, em nenhuma dose utilizada, em relação ao controle positivo (HESSE et al., 2018).

Shima et al. (2017) realizaram ITSL de 2 semanas 5 dias/semana com camundongos acordados, segurando-os por 20 a 30 segundos após a aplicação sublingual de 10 µL de extrato de ácaro. Este trabalho de indução de fenótipo asmático por extrato de ácaro por tempos diferentes e tratamento por ITSL em dose variável mostrou de forma geral resultados positivos em relação à hiper-responsividade brônquica, contagem de eosinófilos no LBA, parâmetros da histologia pulmonar, produção de citocinas por estimulação de células mononucleares do linfonodo submandibular e níveis séricos de anticorpos IgG1 e IgG2a e IgA no LBA (SHIMA et al., 2017). Os resultados destes estudos sugerem que provavelmente o tempo de retenção do camundongo para ação da ITSL utilizado no presente trabalho foi adequado, e que provavelmente não se faz necessária a anestesia dos animais.

A quantificação de IgE específica para Per a 7 no soro de 112 pacientes com DA do nosso meio mostrou que 26,8% dos pacientes apresentaram níveis detectáveis de IgE específica para este alérgeno, com limite de detecção do ensaio de 0,15 UI/mL. Barbosa et al. (2013) observaram que em pacientes do nosso país com rinite e/ou asma, com alergia a barata, a sensibilização a Per a 7 foi importante. Entre 57 pacientes, 54,4% e 42,1% deles apresentaram IgE específica por ELISA quimérico e teste cutâneo positivo para o alérgeno Per a 7, respectivamente (BARBOSA et al., 2013). Verificamos que não houve relação entre sensibilização a Per a 7 e aspectos clínicos e demográficos, como idade de início dos sintomas, tempo de doença, SCORAD, IgE total e

presença de asma ou rinite. Portanto, a sensibilização a alérgeno de barata Per a 7 não pode ser associada com maior gravidade da DA. Além disso, a frequência de sensibilização a Per a 7 entre pacientes com DA foi mais baixa que em pacientes com asma e/ou rinite (ARRUDA et al., 2001; BARBOSA et al., 2013). Vimos que diferentemente do que Santos et al. (1999) observaram em seu trabalho com pacientes portadores de rinite e/ou asma do nosso meio previamente testados para alergia a barata, a tropomiosina não foi um alérgeno importante de barata entre pacientes com DA também do nosso meio (SANTOS et al., 1999).

7. CONCLUSÕES

Tropomiosina recombinante de barata *Periplaneta americana* (alérgeno Per a 7) foi produzida com alto grau de pureza e quantidades muito baixas de endotoxina.

Per a 7 recombinante induziu resposta inflamatória em modelo experimental de asma, caracterizada por aumento na contagem de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos no lavado broncoalveolar.

Em pacientes com dermatite atópica, a sensibilização IgE ao alérgeno Per a 7 ocorreu em 26,8% dos pacientes (30/112).

A presença de sensibilização ao alérgeno Per a 7 em pacientes com dermatite atópica não foi associada à idade de início dos sintomas, tempo de doença, gravidade da doença (dada pelo SCORAD), presença de rinite ou asma e níveis de IgE total.

Sensibilização ao alérgeno Per a 7 pode ser útil para a determinação do perfil de reatividade IgE, particularmente quando se considerar o tratamento com imunoterapia alérgeno-específica para pacientes com dermatite atópica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERSE, R. C.; AKKERDAAS, J. H.; VAN REE, R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. **Allergy**, v. 56, n. 6, p. 478–490, 2001.

AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. **The World Allergy Organization journal**, v. 8, n. 1, p. 17, 2015.

ALBRECHT, M. et al. High level expression, purification and physico- and immunochemical characterisation of recombinant Pen a 1: A major allergen of shrimp. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. Suppl. 2, p. S186-195, 2008.

ALWARAWRAH, Y.; KIERNAN, K.; MACLIVER, N. J. Changes in nutritional status impact immune cell metabolism and function. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1055, 2018.

AMORIM, A. J.; DANELUZZI, J. C. [Prevalence of asthma in schoolchildren]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 77, n. 3, p. 197–202, 2001.

ANTUNES, A. A. et al. Guia prático de atualização em dermatite atópica - parte I: etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 2, p. 131–156, 2017.

ARRUDA, L. K. et al. Cockroach allergens and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, n. 3, p. 419–428, 2001.

ARRUDA, L. K. et al. Recombinant Allergens for Diagnosis of Cockroach Allergy. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 14, n. 4, p. 428, 2014.

ARSHAD, S. H. An update on allergen immunotherapy. **Clin Med (Lond)**, v. 16, n. 6, p. 584–587, 2016.

BARBOSA, M. C. R. et al. Efficacy of recombinant allergens for diagnosis of cockroach allergy in patients with asthma and/or rhinitis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 161, n. 3, p. 213–219, 2013.

BARRETO, M. L. et al. Prevalence of asthma symptoms among adolescents in Brazil: National Adolescent School-based Health Survey (PeNSE 2012). **Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology**, v. 17 Suppl 1, n. PeNSE 2012, p. 106–15, 2014.

BAZETT, M. et al. A novel microbe-based treatment that attenuates the inflammatory profile in a mouse model of allergic airway disease. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 35338, 2016.

BECKER, S. et al. Tropomyosin sensitization in house dust mite allergic patients. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 269, n. 4, p. 1291–1296, 2012.

BUSH, R. K. Advances in allergen immunotherapy in 2015. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 5, p. 1284–1291, 2016.

CANONICA, G. W. et al. Efficacy and safety of SQ house dust mite (HDM) SLIT-tablet treatment of HDM allergic asthma. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 12, n. 8, p. 805–

815, 2016.

CARDONA, V.; LUENGO, O.; LABRADOR-HORRILLO, M. Immunotherapy in allergic rhinitis and lower airway outcomes. **Allergy**, v. 72, n. 11, p. 35–42, 2017.

COX, L.; CALDERON, M. A. Allergen immunotherapy for atopic dermatitis: is there room for debate? **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 3, p. 435–444, 2016.

DAMM, K. et al. Patient preferences in allergy immunotherapy (AIT) in Germany – a discrete-choice-experiment. **Health Economics Review**, v. 6, n. 1, p. 32, 2016.

ELDERFIELD, A. et al. Absolute quantitation of mite allergen-specific IgE antibody levels by ELISA using a chimeric mouse Fab/Human Fc epsilon antibody to Der p 2 [abstract]. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, n. 1, p. 301, 1996.

FALK, N. P.; HUGHES, S. W.; RODGERS, B. C. Medications for chronic asthma. **American Family Physician**, v. 94, n. 6, p. 454–462, 2016.

FARAHANI, R. et al. Cytokines (interleukin-9, IL-17, IL-22, IL-25 and IL-33) and asthma. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 1, p. 127, 2014.

FERNANDES, J. et al. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 33, n. 7, p. 956–961, 2003.

GINSBERG, D. N.; EICHENFIELD, L. F. Debates in allergy medicine: specific immunotherapy in children with atopic dermatitis, the “con” view. **World Allergy Organization Journal**, v. 9, p. 16, 2016.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2018.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION ONLINE APPENDIX. 2018.

GUENICHE, A. et al. Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium *Vitreoscilla filiformis* lysate on atopic dermatitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. **British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 6, p. 1357–1363, 2008.

HAGNER, S. et al. House Dust Mite-Specific Sublingual Immunotherapy Prevents the Development of Allergic Inflammation in a Mouse Model of Experimental Asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 170, n. 1, p. 22–34, 2016.

HANCI, D. et al. Immunotherapy in all aspects. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 6, p. 1347–1355, 2016.

HANIFIN, J. Diagnostic features of atopic dermatitis. **Acta Dermato-Venereologica (Stockh)**, v. 92, p. 44–47, 1980.

HESSE, L. et al. Subcutaneous immunotherapy suppresses Th2 inflammation and induces neutralizing antibodies, but sublingual immunotherapy suppresses airway hyperresponsiveness in

grass pollen mouse models for allergic asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 48, n. 8, p. 1035–1049, 2018.

HIROTA, J. A. et al. Modeling asthma in mice: What have we learned about the airway epithelium? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 44, n. 4, p. 431–438, 2011.

ICHIKAWA, K. et al. High prevalence of sensitization to cat allergen among Japanese children with asthma, living without cats. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, n. 6, p. 754–761, 1999.

IGARASHI, S. et al. The Efficacy of Sublingual Immunotherapy for Allergic Rhinitis May Vary with the Time of Day. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 171, n. 2, p. 111–118, 2016.

JEONG, K. Y.; HONG, C.-S.; YONG, T.-S. Allergenic Tropomyosins and Their Cross-Reactivities. **Protein & Peptide Letters**, v. 13, n. 8, p. 835–845, 2006.

KAMINUMA, O.; SUZUKI, K.; MORI, A. Effect of sublingual immunotherapy on antigen-induced bronchial and nasal inflammation in mice. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 152, n. Suppl. 1, p. 75–78, 2010.

KAPPEN, J. H. et al. Applications and mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis and asthma. **Therapeutic advances in respiratory disease**, p. pii: 1753465816669662, 2016.

KAPUR, S.; WATSON, W.; CARR, S. Atopic dermatitis. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14, n. Suppl 2, p. 52, 2018.

KIM, J. M. et al. Allergen-Specific Immunotherapy for Pediatric Asthma and Rhinoconjunctivitis : A Systematic Review. **Pediatrics**, v. 131, n. 6, p. 1155–1167, 2013.

LIU, L. et al. The efficacy of sublingual immunotherapy with *Dermatophagoides farinae* vaccine in a murine atopic dermatitis model. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 4, p. 815–822, 2015.

MALLOL, J. et al. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase three : a global synthesis. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 41, n. 2, p. 73–85, 2013.

MARTINS, T. F. **Tropomiosinas de barata e camarão desencadeiam reatividade cruzada IgE em pacientes com asma e induzem aspectos da asma humana em modelo experimental [tese], [2015].**

MELO, J. et al. University and Public Health System partnership: a real life intervention to improve asthma management. **Journal of Asthma**, v. 54, n. 4, p. 411–418, 2017.

MIKITA, C. P.; PADLAN, E. A. Why is there a greater incidence of allergy to the tropomyosin of certain animals than to that of others? **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 5, p. 1070–1073, 2007.

NELSON, H. S. Subcutaneous Immunotherapy Versus Sublingual Immunotherapy : Which Is More Effective ? **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: in Practice**, v. 2, n. 2, p. 144–149, 2014.

NELSON, H. S.; MAKATSORI, M.; CALDERON, M. A. Subcutaneous immunotherapy and sublingual immunotherapy: comparative efficacy, current and potential indications, and warnings-United States versus Europe. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 13–24, 2016.

OZDEMIR, C. et al. Mechanisms of Aeroallergen Immunotherapy: Subcutaneous Immunotherapy and Sublingual Immunotherapy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 71–86, 2016.

PALLER, A. S. et al. The microbiome in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 1, p. 26–35, 2019.

PASSALACQUA, G.; CANONICA, G. W.; BAGNASCO, D. Benefit of SLIT and SCIT for Allergic Rhinitis and Asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 16, n. 12, p. 88, 2016.

PAWANKAR, R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. **World Allergy Organization Journal**, v. 7, n. 1, p. 12, 2014.

PERZANOWSKI, M. S.; PLATTS-MILLS, T. A. E. Editorial: Further confirmation of the relevance of cockroach and dust mite sensitization to inner-city asthma morbidity. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 39, n. 9, p. 1291–1293, 2009.

POMÉS, A.; ARRUDA, L. K. Investigating cockroach allergens: Aiming to improve diagnosis and treatment of cockroach allergic patients. **Methods**, v. 66, n. 1, p. 75–85, 2014.

PRENDERGAST, A. J. Malnutrition and vaccination in developing countries. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1671, 2015.

REESE, G.; AYUSO, R.; LEHRER, S. B. Tropomyosin: An Invertebrate Pan-Allergen. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 119, n. 4, p. 247–258, 1999.

ROCKWOOD, J.; MORGAN, M. S.; ARLIAN, L. G. Proteins and endotoxin in house dust mite extracts modulate cytokine secretion and gene expression by dermal fibroblasts. **Experimental and Applied Acarology**, v. 61, n. 3, p. 311–325, 2013.

RONCADA, C. et al. Burden of asthma among inner-city children from Southern Brazil. **Journal of Asthma**, v. 53, n. 5, p. 498–504, 2016.

SALIMI, M. et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 13, p. 2939–2950, 2013.

SANTOS, A. B. R. et al. Cockroach allergens and asthma in Brazil: Identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, n. 2 Pt I, p. 329–337, 1999.

SANTOS, A. B. R. et al. Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 4, p. 1040–1046.e1., 2008.

SCHUURMAN, J. et al. Mouse/human chimeric IgE antibodies directed to the house dust mite allergen Der p 2. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 107, n. 1–3, p. 465–

466, 1995.

SCHUURMAN, J. et al. Production of a mouse/human chimeric IgE monoclonal antibody to the house dust mite allergen Der p 2 and its use for the absolute quantification of allergen-specific IgE. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 99, n. 4, p. 545–550, 1997.

SEREDA, M. J.; HARTMANN, S.; LUCIUS, R. Helminths and allergy: the example of tropomyosin. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 6, p. 272–278, 2008.

SHIMA, K. et al. Effects of sublingual immunotherapy in a murine asthma model sensitized by intranasal administration of house dust mite extracts. **Allergology International**, v. 66, n. 1, p. 89–96, 2017.

SLAVYANAKAYA, T. A.; DERKACH, V. V.; SEPIASHVILI, R. I. Debates in allergy medicine: specific immunotherapy efficiency in children with atopic dermatitis. **World Allergy Organization Journal**, v. 9, p. 15, 2016.

SOLÉ, D. et al. Asthma in children and adolescents in Brazil : contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Revista Paulista de Pediatria**, v. 32, n. 1, p. 114–125, 2014.

SOLÉ, D. et al. Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: Nine-year follow-up study (2003-2012). **Jornal de Pediatria (Rio J)**, v. 91, n. 1, p. 30–35, 2015.

TAM, H. et al. Specific allergen immunotherapy for the treatment of atopic eczema. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, p. CD008774, 2016.

THOMSEN, S. F. Epidemiology and natural history of atopic diseases. **European Clinical Respiratory Journal**, v. 2, p. 24642, 2015.

TOURDOT, S. et al. Evaluation of therapeutic sublingual vaccines in a murine model of chronic house dust mite allergic airway inflammation. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 41, n. 12, p. 1784–92, 2011.

TROMBONE, A. P. F. et al. Use of a chimeric ELISA to investigate immunoglobulin E antibody responses to Der p 1 and Der p 2 in mite-allergic patients with asthma , wheezing and/or rhinitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 32, n. 9, p. 1323–1328, 2002.

TURFKRUYER, M. et al. Oral tolerance is inefficient in neonatal mice due to a physiological vitamin A deficiency. **Mucosal Immunology**, v. 9, n. 2, p. 479–491, 2016.

WEIDINGER, S.; NOVAK, N. Atopic dermatitis. **Lancet**, v. 387, p. 1109–1122, 2016.

WERFEL, T. et al. Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 2, p. 336–349, 2016.

YANG, E. J. et al. Recent developments in atopic dermatitis. **Pediatrics**, v. 142, n. 4, p. pii: e20181102, 2018.

YUKSELEN, A.; KENDIRLI, S. G. Role of immunotherapy in the treatment of allergic asthma. **World Journal of Clinical Cases**, v. 2, n. 12, p. 859–865, 2014.

9. ANEXOS

10/10/2018

E-mail de Universidade de São Paulo - [Docentes-FMRP] Comunicação sobre suspensão de ração e animais

Luísa Karla de Paula Arruda <karla@fmrp.usp.br>

[Docentes-FMRP] Comunicação sobre suspensão de ração e animais

1 mensagem

Diretoria Comunica <diretoria.comunica@fmrp.usp.br>

10 de outubro de 2018 17:19

Para: docentes-fmrp@listas.fmrp.usp.br

À COMUNIDADE DA FMRP-USP

Em reunião pública realizada em 28/09/2018 no Anfiteatro Prof. Dr. Renato Migliorini, docentes de diferentes departamentos discutiram a crise decorrente do uso de ração nutricionalmente desbalanceada nos biotérios de produção e de experimentação do campus de Ribeirão Preto. Após ampla discussão ficou acertado que, após manifestação oficial da CEUA da FMRP, em desejável consonância com a CEUA das outras unidades, a Diretoria da FMRP-USP prestaria esclarecimentos à comunidade da FMRP-USP, o que fazemos agora.

No início de 2018 a Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto (PUSP-RP) abriu pregão para adquirir ração para animais de experimentação usados nos biotérios do campus (pregão de número 19/2018), tendo vencido a empresa Agromix. A partir de 9 de maio de 2018, a Prefeitura passou a fornecer da nova ração para os biotérios e, após períodos variáveis de tempo, alguns pesquisadores perceberam que havia alguns problemas, tais como presença de fragmentos estranhos e excesso de farelo na ração, e animais (ratos e camundongos) com alterações de pelagem, ausência de ganho de peso e redução de prole. Esses e outros dados disponíveis sobre os problemas resultantes do uso da ração da Agromix estão detalhados no processo 2018.1.640.53.0. Estamos convictos de que a Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto (PUSP-RP) foi vítima de um crime empresarial, contra o qual as medidas de cunho administrativo e jurídico serão tomadas pelos setores competentes da USP.

Como conhecimento da situação, a primeira providência tomada pela FMRP foi a compra imediata e emergencial de ração nutricionalmente adequada, que era anteriormente usada, o que ocorreu após autorização dada pelo Magnífico Reitor, e está disponibilizada a todos os animais a partir do dia de hoje, 10/10/2018.

Em 4 de outubro de 2018, em atendimento à deliberação da CEUA da PUSP-RP, o prefeito do campus comunicou à Diretoria da FMRP-USP a suspensão do fornecimento de animais de laboratório do Biotério Geral (**Anexo 1**). A CEUA da FMRP-USP, alinhada com posicionamento da CEUA da PUSP-RP, comunicou à comunidade da FMRP-USP a suspensão do fornecimento de camundongos e ratos para a FMRP-USP avaliado em, no mínimo 90 dias. Ainda, no documento emitido pela CEUA-FMRP, a mesma decide pela suspensão temporária da aprovação dos protocolos de pesquisa que utilizem animais provenientes do Campus de Ribeirão, embora continue analisando normalmente os protocolos (**Anexo 2**). Oportunamente, quando de posse de todos os dados necessários, inclusive de reanálises da ração Agromix por laboratório independente (contraprovas), as CEUAs do campus de Ribeirão se reportarão ao CONCEA.

Uma segunda providência, que convém assinalar, é que a Rede de Biotérios da USP fornecerá animais oriundos dos biotérios da FMSP (camundongos C57Bl-6 e Balb-c) e do ICB (ratos Hannover e Sprague Dawley), de acordo com suas disponibilidades. Para isso, os pesquisadores devem enviar às sextas feiras as requisições de animais para o biotério geral da PUSP-RP, que providenciará o transporte dos animais de São Paulo para Ribeirão Preto às terças feiras, com entrega às quartas feiras de cada semana, pela ordem de chegada das requisições à PUSP-RP. O pagamento será feito pelo pesquisador diretamente à FMSP ou ao ICB (ver novamente **Anexo 1**). Considerando a compra de animais de externas ao Biotério Geral, as atividades de avaliação de projetos pela CEUA-FMRP continuam normais.

Visando a redução de possíveis danos causados aos experimentos, a FMRP solicitou à PUSP-RP informações exatas de datas em que partidas da ração desbalanceada (**Anexo 3**), e lotes de animais (**Anexo 4**) que foram fornecidos pelo Biotério Geral aos diferentes biotérios da Unidade. De posse dessas informações, cada pesquisador poderá julgar a partir de que data os resultados de seus experimentos podem ter sido afetados pelo problema narrado.

Finalmente, a PUSP-RP emitirá, mediante solicitação de interessados, documento sumarizando o ocorrido, para eventuais necessidades de comprovação junto a programas de pós-graduação e agências de

fomento. A diretoria da FMRP se compromete, com base nessa experiência, que futuras alterações na fonte de ração usada no Biotério Geral venham merecer mais ampla discussão por parte PUSP-RP junto às Unidades.

Considerada a gravidade do ocorrido, estamos convictos de que fizemos o possível para minorar as consequências, tendo em mente a preservação da elevada qualidade da pesquisa e a formação de recursos humanos na FMRP-USP.

Comissão de Pesquisa da FMRP-USP
Diretoria FMRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Prefeitura do *Campus* USP de Ribeirão Preto

Gabinete

OF. CIRC/ 014 / PUSP-RP

04 de outubro de 2018.

À Senhora

Profª. Drª. Margaret de Castro

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Prezada Diretora,

A Prefeitura do *Campus* USP de Ribeirão Preto comunica a suspensão do fornecimento de animais do Biotério Geral, a partir desta data, em atendimento à deliberação dos membros da CEUA PUSP-RP, fundamentada no Artigo 10, Inciso VI, § 1, da Lei Nº 11.794/2008.

Os motivos que ensejaram a presente decisão estão expostos nos autos do processo 2018.1.640.53.0, que trata dos problemas relacionados à ração Agromix, amplamente divulgado às Unidades do *campus* USP de Ribeirão Preto que utilizam animais de laboratório.

Informamos, nesta oportunidade, que a PUSP-RP tomou todas as medidas cabíveis relacionadas à rescisão contratual, por ato unilateral da Administração e, ao mesmo tempo, obteve autorização da Reitoria para aquisição emergencial da ração utilizada anteriormente, visando normalizar a situação com a melhor brevidade, sendo certo que a elaboração do contrato emergencial pela FMRP foi fundamental para a celeridade do processo.

Colocamo-nos à disposição para mais esclarecimentos que se fizerem necessários, solicitando ampla divulgação em sua Unidade.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto

Prefeito de *Campus* USP de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto

Gabinete

OF.CIRC/015 / PUSP-RP

05 de outubro de 2018.

À Senhora
Profª. Drª. Margaret de Castro
FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Prezada Diretora,

A Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto comunica a Vossa Senhoria que a Rede de Biotérios da Universidade de São Paulo irá fornecer animais oriundos dos Biotérios da FMSP (camundongos das linhagens C57Bl-6 e Balb-c) e do ICB (ratos das linhagens Hannover e Sprague Dawley), de acordo com a disponibilidade de cada espécie a cada semana, enquanto perdurar a suspensão do fornecimento de animais do Biotério Geral.

Para tanto, serão adotados os seguintes procedimentos:

1. Unidades/pesquisadores enviam as requisições para o Biotério Geral da PUSP-RP até as 6ª feiras de cada semana;
2. O Biotério Geral providenciará o resgate dos animais em SP às 3ª feiras de cada semana;
3. O Biotério Geral distribuirá os animais às 4ª feiras de cada semana, de acordo com o critério de ordem de chegada das requisições e a quantidade de animais disponibilizados pela Rede;
4. O pagamento será efetuado pelo pesquisador diretamente ao ICB e FMSP, de acordo com a quantidade total de animais consumida por cada laboratório usuário;
5. Ao final de cada mês será encaminhado pelo Biotério Geral, relatório de consumo às Unidades, discriminando espécie, quantidades e usuários.
6. O pagamento dos animais deverá ser realizado por meio das modalidades de transferência orçamentária ou boleto bancário junto aos respectivos biotérios fornecedores.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Prefeitura do *Campus* USP de Ribeirão Preto

Gabinete

Informações adicionais poderão ser obtidas junto à equipe técnica do Serviço de Biotério Geral.

Colocamo-nos à disposição para mais esclarecimentos que se fizerem necessários, solicitando ampla divulgação em sua Unidade, com a melhor brevidade.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto
Prefeito de *Campus* USP de Ribeirão Preto

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

OF.CEUA/0382018/FMRP/09102018
FSR/fmcpcm

Ref: Notificação de Suspensão do Fornecimento de Animais

Prezados professores,

Tendo em vista o recente incidente relacionado ao fornecimento de dieta nutricionalmente desbalanceada aos animais de experimentação mantidos nos biotérios de produção do *Campus* USP – Ribeirão Preto, a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP), em cumprimento às disposições da Lei Federal N° 11.794 de 08 de outubro de 2008 (artigo 10, inciso VI, parágrafo 1), decide pela **suspensão temporária do fornecimento de animais** para fins de ensino e/ou pesquisa oriundos do CENTRO DE CRIAÇÃO DE CAMUNDONGOS ESPECIAIS da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

A referida suspensão se estenderá por período suficiente para que as atuais matrizes, ao serem alimentadas com ração nutricionalmente adequada, produzam a segunda ordem de parto e desmamem os respectivos filhotes. Estima-se um período de, no mínimo, 90 dias para o reinício do fornecimento de animais, o qual se dará de forma gradativa.

Em recente comunicado à comunidade acadêmica e como medida adicional, a CEUA-FMRP decidiu pela suspensão temporária da aprovação dos Protocolos de Pesquisa que utilizem animais procedentes dos biotérios de produção do *Campus* USP – Ribeirão Preto, embora continue atuando normalmente na análise dos Protocolos. Cabe, ainda, salientar que a CEUA-FMRP desaconselha fortemente a utilização dos animais de experimentação alimentados com a dieta nutricionalmente desbalanceada nos Protocolos de Pesquisa anteriormente aprovados.

Solicitamos ampla divulgação aos pesquisadores da FMRP-USP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA – FMRP-USP

C/C Prof. Dr. Américo Ceiki Sakamoto
DD. Prefeito do *Campus* USP - Ribeirão Preto

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Margaret de Castro
MD. Diretora da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo.

Data Solicitação	Requisição	Departamento	Requisitante	Quantidade (Kg)	Valor	Data Recebimento
MAIO 2018						
09/05/18	185659	CCCE	Julio Anselmo Siqueira	520	R\$ 2.639,93	10/05/18
09/05/18	181343	Fisiologia	Elisa Maria Aleixo	120	R\$ 609,21	10/05/18
09/05/18	180754	Fisiologia	Elisa Maria Aleixo	300	R\$ 1.523,04	10/05/18
16/05/18	197738	Bioquímica	Rosemeire Ferreira da Costa Gonçalves	40	R\$ 203,07	17/05/18
21/05/18	203231	CCCE	Julio Anselmo Siqueira	580	R\$ 2.944,55	24/05/18
22/05/18	206060	Patologia	Rosangela Mazzucato Castania de Paiva	60	R\$ 304,60	24/05/18
24/05/18	206435	Fisiologia	Elisa Maria Aleixo	300	R\$ 1.523,01	24/05/18
24/05/18	206249	Bioquímica	Sílvia Sant'Anna Consiglieri	20	R\$ 101,53	24/05/18
30/05/18	214616	Biocel	Lucia Helena Picinato Raphael	680	R\$ 3.452,23	07/06/18
30/05/18	213423	Clínica Médica	Simone Serra Pisani Cecilino	300	R\$ 1.523,04	28/05/18
TOTAL MAIO				2.920	R\$ 14.824,21	
JUNHO 2018						
07/06/18	226460	Bioquímica	Rosemeire Ferreira da Costa Gonçalves	80	R\$ 406,14	05/07/18
07/06/18	221310	Bioengenharia	Maria Teresinha de Moraes	40	R\$ 203,07	07/06/18
07/06/18	220179	Fisiologia	Elisa Maria Aleixo	120	R\$ 609,20	07/06/18
07/06/18	223089	Fisiologia	Elisa Maria Aleixo	300	R\$ 1.523,01	07/06/18
07/06/18	221639	Farmacologia	José Waldik Ramon	150	R\$ 761,53	07/06/18
29/06/18	246356	CCCE	Julio Anselmo Siqueira	520	R\$ 2.693,55	19/07/18
29/06/18	249860	Farmacologia	José Waldik Ramon	1.210	R\$ 6.267,68	12/07/18
29/06/18	258001	Fisiologia	Elisa Maria Aleixo	120	R\$ 621,59	19/07/18
29/06/18	257994	Fisiologia	Elisa Maria Aleixo	300	R\$ 1.553,97	19/07/18
TOTAL JUNHO				2.840	R\$ 14.639,74	
TOTAL GERAL				5.760	R\$ 29.463,95	

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO				
PREFEITURA DO CAMPUS USP DE RIBEIRÃO PRETO				
SERVIÇO DE BIOTÉRIO				
CONSUMO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO - JUNHO/2018				
			TOTAL DE ANIMAIS	1981
UNIDADE	DEPARTAMENTO	DOCENTE	ESPÉCIE	JUNHO
FMRP	Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos	José Freire da Silva Neto	Cam Balb/c	40
FMRP	Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos	José Freire da Silva Neto	Cam C57BL/6	40
FMRP	Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos	Maria Cristina R A Barreira	Cam Balb/c	45
FMRP	Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos	Maria Cristina R A Barreira	Cam C57BL/6	8
FMRP	Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos	Mariana Kiomy Osako	Cam C57BL/6	20
FMRP	Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor	Antonio Carlos Shimano	Sprague Dawley	10
FMRP	Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor	José Batista Volpon	Wistar Hannover	60
FMRP	Bioquímica e Imunologia	Isis do Carmo Kettelhut	Wistar Hannover	4
FMRP	Bioquímica e Imunologia	João Santana da Silva	Cam C57BL/6	35
FMRP	Bioquímica e Imunologia	João Santana da Silva	Cam Swiss	15
FMRP	Bioquímica e Imunologia	Vanderlei Rodrigues	Cam Balb/c	90
FMRP	Bioquímica e Imunologia	Vanessa Carregaro Pereira	Cam C57BL/6	20
FMRP	Cirurgia e Anatomia	Luiza da Silva Lopes	Wistar Hannover + ninhada até 10 d	2
FMRP	Cirurgia e Anatomia	Orlando Castro e Silva Jr	Sprague Dawley	52
FMRP	Cirurgia e Anatomia	Paulo Roberto B. Évora	Sprague Dawley	6
FMRP	Clínica Médica	Luisa Karla de Paula Arruda	Cam Balb/c	40

Tabela 3 – Dados clínicos dos pacientes com dermatite atópica

Nº paciente	Sexo	Idade (anos)	Idade de início dos sintomas (anos)	Tempo de doença (anos)	Comorbidade: asma	Comorbidade: rinite	SCORAD	IgE total (UI/mL)	IgE específica Per a 7 (UI/mL)	IgE específica/IgE total
1	F	36	0	36	sim	sim	41	19720	< 0,15	
2	M	27	1	26	sim	sim	67	44160	261,6	0,59%
3	M	32	2	30	não	sim	70	18560	< 0,15	
4	F	34	28	6	sim	não	22.4	148	< 0,15	
5	F	54	47	7	não	sim	19.6	1382	< 0,15	
6	M	55	45	10	não	não	39.5	2500	530,1	21,20%
7	M	43	20	23	sim	sim	44.5	11600	3,1	0,03%
8	F	67	5	62	não	sim	22	3634	< 0,15	
9	F	34	0	34	não	não	24.3	1280	< 0,15	
10	M	26	8	18	não	não	16.4	2990	12,2	0,41%
11	F	23	0	23	não	sim	54	45020	< 0,15	
13	M	45	34	11	não	não	33	18620	< 0,15	
14	F	34	0	34	sim	sim	26	8180	< 0,15	
15	M	22	8	14	não	sim	61.7	6680	< 0,15	
16	M	42	15	27	sim	sim	36	807	< 0,15	
17	F	25	11	14	sim	sim	29	59440	1634	2,75%
18	F	25	19	6	não	não	13	24,3	7,6	31,28%
19	F	25	5	20	não	não	19	86	< 0,15	
20	M	59	29	30	sim	não	85	12720	< 0,15	
21	F	43	37	6	não	não	49	1576	< 0,15	
22	F	15	3	12	não	não	35	341	< 0,15	
23	F	24	0	24	não	sim	52	319	< 0,15	
24	M	52	43	9	não	não	46	1064	< 0,15	
25	F	38	6	32	não	sim	32.1	1419	9	0,63%
26	M	37	3	34	sim	não	51.6	63000	1725,2	2,74%
27	M	17	3	14	não	sim	77.5	484	<0,15	

Tabela 3 – Dados clínicos dos pacientes com dermatite atópica cont.

28	F	34	0	34	não	não	38	5840	4,3	0,07%
29	F	22	0	22	sim	sim	40	1695	< 0,15	
30	F	55	2	53	não	sim	15	4703	< 0,15	
31	F	46	0	46	sim	sim	51	2308	< 0,15	
32	F	42	38	4	não	não	47	39	< 0,15	
33	F	64	39	25	sim	sim	33	576	< 0,15	
34	F	51	7	44	não	não	58	5900	< 0,15	
35	F	25	0	25	não	sim	27	4728	< 0,15	
36	F	39	2	37	sim	sim	2	531	< 0,15	
37	F	25	0	25	sim	sim	7.1	1593	< 0,15	
38	M	18	0	18	sim	sim	37	1162	< 0,15	
39	F	53	23	30	não	sim	11	145	< 0,15	
40	M	24	0	24	não	sim	39.1	8040	< 0,15	
41	F	21	17	4	não	não	17.2	1459	< 0,15	
43	M	20	3	17	sim	sim	14	11600	176,8	1,52%
44	F	15	5	10	não	não	3.2	1562	< 0,15	
45	M	40	23	17	sim	sim	11	352	< 0,15	
46	F	34	5	29	sim	sim	25	1418	< 0,15	
47	F	23	3	20	não	sim	59	870	< 0,15	
48	F	22	5	17	não	não	33	916	< 0,15	
49	F	63	54	9	sim	sim	32	1321	11,6	0,88%
50	F	36	5	31	não	sim	3	180	< 0,15	
51	F	23	20	3	não	sim	26	97	< 0,15	
52	F	21	13	8	não	sim	73	47040	1519	3,23%
54	F	19	0	19	sim	sim	35	329	< 0,15	
56	F	19	11	8	não	sim	38	1387	< 0,15	
57	F	17	2	15	não	sim	37	4995	< 0,15	
58	F	26	4	22	sim	sim	39.6	12260	< 0,15	
59	M	18	0	18	não	sim	48.5	27040	< 0,15	
60	M	27	24	3	não	sim	29	14.2	<0,15	

Tabela 3 – Dados clínicos dos pacientes com dermatite atópica cont

61	F	6	1	5	sim	sim	67	34980	< 0,15	
62	F	14	0	14	não	sim	32	1457	3,7	0,25%
63	F	22	19	3	sim	sim	52	2826	< 0,15	
64	M	21	7	14	não	sim	50	37200	< 0,15	
65	F	10	0	10	sim	sim	33	24000	< 0,15	
66	F	40	5	35	não	sim	57	31400	< 0,15	
67	F	17	7	10	sim	sim	40	2851	< 0,15	
68	F	15	11	4	não	sim	47	18380	< 0,15	
69	F	12	2	10	sim	sim	51	31560	617,7	1,96%
70	M	20	14	6	não	sim	17	2720	< 0,15	
71	F	13	13	0	não	não	76	1888	< 0,15	
72	M	9	0	9	não	sim	56	4020	39,2	0,98%
73	F	11	8	3	não	sim	58	617	< 0,15	
74	M	14	1	13	sim	sim	37	6220	< 0,15	
76	M	19	14	5	sim	sim	59	2820	5,2	0,18%
77	M	13	7	6	sim	sim	52	2820	954,1	33,83%
78	F	38	35	3	não	sim	33	221	< 0,15	
79	F	18	6	12	sim	sim	46	1778	39,4	2,22%
80	F	12	1	11	não	sim	59	959	11,6	1,21%
81	F	13	2	11	não	sim	69	5480	705,4	12,87%
82	F	11	9	2	não	sim	42	929	36,4	3,92%
83	F	38	0	38	não	não	57	2340	< 0,15	
84	M	9	5	4	não	sim	58	32020	3191,1	9,97%
85	M	31	21	10	não	não	63	983	13,4	1,36%
86	F	36	30	6	não	sim	31	3900	< 0,15	
87	M	12	8	4	sim	sim	83	10680	683,8	6,40%
88	M	55	51	4	não	sim	53	346	2,3	0,66%
89	F	13	0	13	sim	sim	45	3300	< 0,15	
90	F	6	2	4	não	sim	51	17360	< 0,15	
91	M	11	2	9	não	sim	36	1804	<0,15	

Tabela 3 – Dados clínicos dos pacientes com dermatite atópica cont.

92	M	20	0	20	não	sim	61	18200	< 0,15	
93	M	10	0	10	não	sim	87	29300	< 0,15	
94	M	4	2	2	sim	sim	57	3900	< 0,15	
95	F	7	0	7	sim	sim	54	5140	< 0,15	
96	M	9	5	4	não	sim	78	2240	< 0,15	
97	F	7	3	4	não	sim	60	4680	993	21,22%
98	F	5	0	5	não	sim	43	147	< 0,15	
99	F	25	0	25	sim	sim	60	7920	< 0,15	
100	F	24	15	9	não	sim	26	1352	2,4	0,18%
101	F	8	1	7	sim	sim	38	2500	< 0,15	
102	F	11	4	7	não	não	69	517	< 0,15	
103	F	38	33	5	não	não	38	213	< 0,15	
104	F	8	2	6	sim	sim	49	4580	26,7	0,58%
105	F	4	0	4	sim	sim	46	1396	< 0,15	
106	F	17	10	7	sim	não	34	7160	< 0,15	
107	F	9	4	5	sim	não	34	84.5	< 0,15	
108	F	6	0	6	não	sim	21	713	< 0,15	
109	M	29	7	22	não	não	39	738	< 0,15	
110	F	7	0	7	sim	sim	31	1315	< 0,15	
111	F	7	0	7	sim	sim	28	1316	< 0,15	
112	F	13	6	7	não	não	53	106	< 0,15	
113	F	36	4	32	não	sim	20	22.6	< 0,15	
114	M	26	0	26	não	sim	22	6460	96,8	1,50%
115	M	4	1	3	não	sim	32	132	9,8	7,42%
116	F	13	7	6	não	sim	43	24580	< 0,15	
117	M	3	0	3	não	sim	49	3480	< 0,15

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Imunoterapia sublingual com tropomiosina em modelo experimental de hiper-responsividade brônquica*”, registrado com o número **053/2018**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 10 de dezembro de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 40 camundongos Balb/c machos pesando 20g oriundos do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 10/12/2018 a 30/04/2020.

We certify that the Protocol *n° 053/2018*, entitled “*Sublingual immunotherapy with tropomyosin in a experimental model of bronchial hyperresponsiveness*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 12/10/2018. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 40 male Balb/c mice weighing 20g from the Animal Facility of Faculty of Medicine of the University of São Paulo. This certificate is valid until 04/30/2020.

Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP – USP