SANDRIANA DOS RAMOS SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA REGIÃO Fc DE ANTICORPOS MURINOS IgG1
ANAFILÁTICOS E NÃO-ANAFILÁTICOS**

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro

SÃO PAULO

2010

RESUMO

SILVA, S. R. **Estudo comparativo da região Fc de anticorpos IgG1 murinos anafiláticos e não-anafiláticos**. 137 f. Tese (Doutorado em Imunologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Está estabelecido que o processo de glicosilação é essencial para a conformação estrutural e função efetora dos anticorpos. Entretanto, não está completamente claro como diferenças nos carboidratos ligados aos anticorpos podem interferir na sua atividade biológica. Foi previamente descrito que anticorpos IgG1 murinos podem ser divididos em anafiláticos ou não-anafiláticos, de acordo com a sua capacidade de induzir *in vivo* reação de anafilaxia. Somado a isso, foi verificado que a cadeia de oligossacarídeos *N*-ligada à molécula de IgG1 é fundamental para a manutenção da sua função efetora. O objetivo do presente trabalho é estudar diferenças estruturais entre os subtipos de IgG murinos que poderiam determinar a sua atividade biológica. O seqüenciamento dos nucleotídeos que codificam os domínios C_{H2} e C_{H3} dos dois subtipos de IgG1 permitiu constatar homologia de 100% dessas regiões nas duas moléculas estudadas. Entretanto, ao analisar o padrão de carboidratos *N*-ligados aos anticorpos IgG1 foi observado maior conteúdo de ácido siálico e fucose na cadeia *N*-ligada ao anticorpo anafilático em relação à do não-anafilático. Contudo, a remoção de resíduos de ácido siálico por tratamento enzimático do anticorpo IgG1 anafilático resultou na perda da capacidade desta molécula de induzir desgranulação celular *in vitro* e reação anafilática *in vivo*, semelhante ao anticorpo IgG1 deglicosilado. Em contraste, a remoção de fucose não afetou a sua função anafilática. A análise por PCR em tempo real da expressão dos genes das enzimas envolvidas no processo de glicosilação das proteínas revelou menor expressão gênica de algumas glicosidases, principalmente as sialiltransferases, no hibridoma e linfócitos B secretores do subtipo IgG1 não-anafilático em relação ao obtido no hibridoma e linfócitos B que secretam a IgG1 anafilática. Além disto, foi observada menor atividade enzimática das sialiltransferases obtidas do hibridoma produtor da IgG1 não-anafilática em relação à do hibridoma que produz a IgG1 anafilática. Em conjunto, estes resultados comprovam que a capacidade de anticorpos IgG1 murinos de induzir anafilaxia é diretamente dependente do conteúdo de ácido siálico presente na cadeia de oligossacarídeos ligada à região Fc do anticorpo, além disso sugerem fortemente que essa maior sialilação observada no tipo anafilático seja resultante da maior expressão gênica destas enzimas e assim da sua atividade enzimática no momento da síntese dos anticorpos.

Palavras-chave: Anafilaxia. Anticorpo. Glicosilação. Mastócitos. Cromatografia de Afinidade. Expressão gênica.

ABSTRACT

SILVA, S.R. **Comparative study of the Fc region from murine IgG1 anaphylactic and non anaphylactic antibodies.** 2010. 137 p. Ph.D. Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

It is well established that the glycosylation process is essential for the structural conformation and effector function of the antibodies. However, it is quite clear how differences in the carbohydrates attached to the antibodies may interfere with their biological activities. It was previously reported that murine IgG1 antibodies can be divided into anaphylactic or non-anaphylactic according to their ability to induce anaphylaxis. Furthermore, it was demonstrated that the oligosaccharide chain *N*-linked to the IgG1 is essential for its conformation and biological activity. The objective of this work is to study structural differences between these subtypes of murine IgG1 that could determine their biological activity. The sequencing of the nucleotides encoding the C_{H2} and C_{H3} domains of these two subtypes of IgG1 showed 100% of homology in the Fc regions of these molecules. In contrast, the analysis of the carbohydrates *N*-linked to the IgG1 antibodies demonstrated higher sialic acid and fucose contents in the chain attached to the anaphylactic antibody than in the non-anaphylactic IgG1. However, the removal of sialic acid residues by enzymatic treatment of anaphylactic IgG1 antibody resulted in the abrogation of its ability to induce mast cells degranulation *in vitro* and anaphylactic reaction *in vivo* as observed to deglycosylated IgG1 antibody. On the other hand, the removal of fucose did not change the anaphylactic activity. The analysis by real time PCR of the gene expression of enzymes that are involved in the protein glycosylation showed lower gene expression of some glycosyltransferases, mainly sialyltransferases, in the hybridoma and B lymphocytes that produce the non-anaphylactic IgG1 compared to those verified in the hybridoma and B cells producer of the anaphylactic IgG1. Furthermore, it was verified lower enzymatic activity of sialyltransferases purified from the hybridoma producer of the non-anaphylactic IgG1 in relation to the hybridoma producer of the anaphylactic antibody. Together, these results prove that the ability of murine IgG1 to induce anaphylaxis is directly dependent of the sialic acid content in the carbohydrate core attached to the antibody Fc region. It is also strongly suggested that this higher sialylation observed in the anaphylactic IgG1 may be resultant of the higher gene expression and enzymatic activity of some sialyltransferases during the antibody synthesis.

Keywords: Anaphylaxis. Antibody. Glycosylation. Mast cells. Affinity Chromatography. Gene expression.

1 INTRODUÇÃO

A primeira evidência experimental do uso de anticorpos foi proposta pelo médico alemão Emil Adolf von Behring, que demonstrou, juntamente com Shibasaburo Kitasato, que a transferência de componentes do soro, posteriormente denominados de anticorpos, podia neutralizar a toxina diftérica, fato que gerou grande revolução no pensamento científico da época (HAAS, 2001; JARYAL, 2001). Em contrapartida, alguns pesquisadores renomados, como o Dr Ivan Mota, evidenciaram a participação dos anticorpos nas reações anafiláticas (TOKUDA e WEISER, 1958; TREADWELL et al., 1960; MOTA, 1963,1964). Atualmente, sabe-se que os anticorpos são moléculas funcionais que participam do processo de eliminação de antígenos/patógenos por meio da ativação de mecanismos efetores dependentes da imunidade inata e adaptativa e, ainda, podem estar envolvidos na patogênese de algumas doenças auto-imunes e nas hipersensibilidades (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Estruturalmente, os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas formadas pela associação de pares idênticos de cadeias polipeptídicas leves e pesadas (*Light e Heavy*), sendo a cadeia leve codificada por uma seqüência variável (V_L) e uma constante de aminoácidos (C_L) e a pesada por uma seqüência variável seguida de 3-4 domínios constantes (domínios variável- V_H e constantes- C_H), dependendo da classe de anticorpo. Por pontes dissulfídicas, cada cadeia leve se associa covalentemente a uma cadeia pesada, assim como as cadeias pesadas ligam-se entre si, formando uma estrutura em forma de Y. Os braços desta estrutura são constituídos pelo pareamento entre os domínios variáveis de ambas as cadeias e o 1º domínio constante da pesada com o único domínio constante da leve (V_H-V_L e $C_{H1}-C_L$). A região de associação dos domínios variáveis das cadeias (V_H e V_L) compreende o sítio de ligação ao antígeno e os domínios constantes das cadeias pesadas (C_{H2} , C_{H3} e alguns casos C_{H4}) se pareiam e formam a região de interação com moléculas, células do sistema imune ou de inserção na membrana do linfócito B (MIX et al., 2006).

As imunoglobulinas podem ser expressas na superfície do linfócito B em associação com outras proteínas transmembranares ($Ig\alpha$ e $Ig\beta$), formando o receptor de antígeno (BCR), ou são secretadas pelos linfócitos B ativados nos espaços extracelulares. Classes distintas de anticorpos com funções efetoras diversificadas são encontradas na maioria dos vertebrados. No homem, foram identificadas cinco classes de imunoglobulinas (IgA , IgG , IgE , IgM e IgD) de acordo com o tipo de região constante, ou seja, tamanho, seqüência de aminoácido e

conteúdo de carboidratos. A classe IgG é, ainda subdividida em IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e a IgA em IgA1 e IgA2 (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Em camundongos, assim como no homem, observa-se a presença das cinco classes de anticorpos, além das subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA1 e IgA2 (STAVNEZER, 1996).

Como consequência do reconhecimento antígeno-específico pelo BCR na superfície dos linfócitos B, ocorre ativação de uma cascata de sinalização intracelular que tem como etapa inicial a fosforilação dos domínios intracelulares das moléculas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, as quais contêm motivos ricos em tirosina (ITAMs) necessários para a transdução de sinais. A agregação das imunoglobulinas de membrana aproxima vários ITAMs e isso aciona os sinais intracelulares e conseqüentemente, as vias da MAP quinase, Ca^{++} e proteína quinase C são induzidas resultando na ativação dos fatores de transcrição AP1, NFAT e NF κ B, respectivamente. Deste modo, genes são transcritos que promovem a diferenciação final de linfócitos B em células produtoras de anticorpos (plasmócitos) ou linfócitos B de memória (ABBAS e LICHTMAN, 2005; HARWOOD e BATISTA, 2010).

A ativação de linfócitos B por antígenos timo-dependentes requer, além do reconhecimento do antígeno pelo BCR, a interação com o linfócito TCD4⁺ previamente ativado, via moléculas CD40 expressas no linfócito B e o seu co-receptor CD40L presente na superfície do linfócito T. Juntamente com essa ligação entre CD40-CD40L, os linfócitos TCD4⁺, mais especificamente subpopulações caracterizadas como Th1, Th2 ou Th3, secretam citocinas que induzem a mudança de classe do anticorpo que o linfócito B irá produzir (DEFrance et al., 1992; AVERSA et al., 1994). Sendo assim, duas citocinas que classicamente apresentam efeitos antagônicos, a IL-4 e o IFN- γ , exercem papel central na indução e regulação da resposta humoral. Primeiramente, a IL-4 secretada por células Th2 induz a produção de IgG1 e IgE pelas células B. Outras citocinas também secretadas por linfócitos Th2 como a IL-9 e IL-5 potencializam a produção de IgE e IgG1 induzida por IL-4 (PETIT-FRERE et al., 1993; PURKERSON e ISAKSON, 1992).

É fato, que existem caminhos alternativos para regulação da expressão de anticorpos IgG1 em camundongos, o que foi verificado por Faquim-Mauro et al. (1999), os quais demonstraram a indução de anticorpos IgG1, na ausência de IL-4 e dependente de IL-12.

Além dessas citocinas, está claro que a IL-13 também exerce importante papel na indução da síntese de anticorpos humanos da classe IgE e da subclasse IgG4, já em camundongo, estudos iniciais sugerem pouco ou nenhum efeito dessa citocina na regulação da mudança de classe de anticorpos. No entanto, vale ressaltar que, a IL-13 parece regular a produção de anticorpos IgE em camundongos transgênicos para esta citocina, onde se observa

alta secreção desta proteína e ausência de competição com a IL-4 pelo mesmo receptor celular (CALLARD et al., 1996; EMSON et al., 1998).

Outros trabalhos mostram que a IL-21, quando na presença de IL-4, induz nos linfócitos B humanos a mudança de classe para IgG1 e IgG3 (PÈNE et al., 2004; ETTINGER et al., 2005; AVERY et al., 2008).

Em relação ao IFN- γ , foi demonstrado que esta citocina promove a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ em Th1 ao mesmo tempo em que inibe sua diferenciação em Th2, promovendo desta forma, a troca da classe IgM para IgG2a e inibição da produção de IgG1 pelas células B murinas. (MAGGI et al., 1992, FINKELMAN et al., 1998)

Outra citocina relevante na produção de anticorpos IgG2a é a IL-12, cujo efeito parece ser indireto devido ao aumento da síntese de IFN- γ pelas células matadoras naturais (*Natural Killer-NK*) e/ou linfócitos T (GERMANN et al., 1995). Entretanto, JanKovic et al (1997) avaliando o efeito adjuvante da IL-12 na resposta humoral (IgG2a e IgG3) contra a proteína gp120 recombinante do vírus HIV (vírus da Imunodeficiência humana) demonstraram aumento nos níveis de anticorpos IgG2a independente de IFN- γ .

Estudos posteriores têm demonstrado que, na ausência de IL-12, a IL-18 estimula a produção de IL-4 e IL-13 por linfócitos T, células NK, mastócitos e basófilos. Além disso, foi mostrado que em resposta a IL-18 e IL-2, os linfócitos TCD4⁺ virgens produzem IL-4 e IL-13 quando estimulados via receptor de antígeno (TCR), promovendo assim a diferenciação dos linfócitos TCD4⁺ em Th2 e conseqüentemente a produção de anticorpos anafiláticos (HOSHINO et al., 1999; YOSHIMOTO et al., 2000).

Está bem estabelecido que, além do contato célula-célula e a presença das citocinas no microambiente de ativação dos linfócitos B, outros fatores como o tipo de antígeno, substâncias adjuvantes e o sítio anatômico podem influenciar o padrão e a magnitude da resposta de anticorpos antígeno-específica que será gerada (MOSMANN e COFFMAN, 1989; FINKELMAN et al., 1990; ABBAS e LICHTMAN, 2005).

A proteção ao patógeno/antígeno gerada pela imunidade humoral é resultante da ação de classes distintas de anticorpos, as quais interagem com uma grande variedade de células via ligação a receptores específicos para a região Fc da molécula ou com o sistema complemento. Desta interação com outros componentes do sistema imune são desencadeados mecanismos efetores, incluindo opsonização e ativação de fagócitos, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e ativação da via clássica do sistema complemento por meio da interação com o componente C1.

Dentre os receptores para a região Fc dos anticorpos, os específicos para IgG e IgE são os mais bem caracterizados. Os receptores Fc γ são glicoproteínas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas e podem ser subdivididos em três classes Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16). Com relação à afinidade destes receptores às moléculas de IgG monoméricas e aos imunocomplexos, o Fc γ RI representa o de maior afinidade, em seguida o Fc γ RIII, e o Fc γ RII é descrito como o de menor afinidade (GESSNER et al., 1998).

Receptor tipo I (Fc γ RI) e tipo III (Fc γ RIII) são expressos principalmente nas células da linhagem hematopoiética e como também nas células NK e medeiam funções efetoras como fagocitose, ADCC e liberação de mediadores inflamatórios. O do tipo II (Fc γ RII) é expresso tanto nas células de origem mielóide como linfóide e está envolvido no processo de inibição da ativação celular (RAVETCH e KINET, 1991; DAËRON et al., 1995).

Quanto aos receptores para IgE, o Fc ϵ RI é descrito como o de alta afinidade e é expresso em mastócitos, basófilos e eosinófilos. Este receptor é formado por uma cadeia α responsável pela ligação à porção Fc do anticorpo, uma cadeia β que promove a montagem e expressão do receptor na superfície celular e duas cadeias γ envolvidas na transdução do sinal gerado pela ligação da IgE ao alérgeno (RAVETCH e KINET 1991; DOMBROWICZ et al., 1993; SCHARENBERG e KINET, 1994).

Dentre as diferentes classes de anticorpos, o da classe IgE é o principal mediador envolvido nas reações anafiláticas (BOCHNER e LICHTENSTEIN, 1991 e KEMP e LOCKEY, 2002; GALLI, 2005). Neste sentido, diferentes trabalhos mostram que indivíduos sensibilizados com determinado alérgeno desenvolvem resposta predominantemente do tipo Th2 com alta produção de anticorpos IgE alérgeno-específicos, os quais ligam-se aos receptores Fc ϵ RI nos mastócitos presentes nos tecidos ou basófilos na circulação sanguínea (KINET, 1999; KRAFT e KINET, 2007). Em decorrência da ligação cruzada entre o alérgeno e o complexo IgE/Fc ϵ RI nos mastócitos/basófilos ocorre a ativação dessas células, com conseqüente desgranulação e liberação de mediadores pré-formados, como a histamina, proteases, citocinas pré-formadas e proteoglicanos. Além disso, a ativação de mastócitos leva à rápida síntese e liberação de prostaglandinas, leucotrienos, e tromboxanos, que são formados pelo metabolismo do ácido araquidônico. Finalmente, os mastócitos ativados sintetizam e secretam várias citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-13 dentre outros. Em conjunto, estes mediadores geram diversos efeitos biológicos que incluem o aumento da permeabilidade vascular, contração dos músculos lisos,

recrutamento e ativação de células inflamatórias, as quais são responsáveis pelas manifestações anafiláticas (GALLI et al., 1991; TRIGGIANI et al., 1995; SIMONS, 2008).

Experimentos realizados em camundongos deficientes em IgE ou na cadeia alfa do receptor FcεRI permitiram evidenciar outro mecanismo de desencadeamento de reação anafilática além deste classicamente mediado por mastócitos sensibilizados por anticorpos IgE (OETTGEN et al., 1994; DOMBROWICZ et al., 1997; STRAIT et al., 2002). Neste contexto, Miyajima et al. (1997) mostraram que os anticorpos da subclasse IgG1 alérgeno-específicos são também capazes de induzir reação anafilática sistêmica após a re-exposição ao antígeno. Somado a isto, foi verificado que o pré-tratamento de camundongos com anticorpo anti-FcγRIII resulta na inibição da reação anafilática sistêmica desencadeada pela presença do alérgeno mostrando, portanto, a participação dos anticorpos IgG1 neste tipo de reação (STRAIT et al., 2002).

Estudo *in vivo*, utilizando mastócitos derivados da medula óssea de camundongos deficientes no FcγRII (FcγRII^{-/-}) ou selvagens, demonstra o papel essencialmente supressor, desse receptor no controle da desgranulação de mastócitos induzida por IgG1/FcγRIII. Sendo assim, foi observado que uma concentração 5-10 vezes menor de anticorpo IgG1 foi suficiente para desencadear reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) em camundongos deficientes em FcγRII em comparação à observada em camundongos selvagens. Além destas observações, este estudo mostra ainda, que este efeito supressor do FcγRII não ocorre na desgranulação celular induzida pela interação do alérgeno com a IgE ligada ao FcεRI (TAKAI et al., 1996).

Inúmeros trabalhos ressaltam que os anticorpos IgE também estão envolvidos na imunidade protetora contra infecções por helmintos, os quais induzem no hospedeiro alta produção desta classe de anticorpos, eosinofilia e mastocitose que são características de resposta predominantemente Th2 (JARRETT e MILLER, 1982; KING et al., 1997; NEGRAO-CORREA, 2001). No entanto, ainda há dúvidas se o aumento da produção de IgE é resultado do papel da imunidade humoral na defesa contra helmintos ou se é apenas um mecanismo de escape dos parasitas, oriundo da hiperprodução de IL-4 que resulta na produção policlonal e, portanto, não-funcional da IgE (YAZDANBAKHSH et al., 2002; COOPER, 2004). Destacando a ação dos helmintos como moduladores da resposta imune celular e humoral, foi demonstrado que o extrato de *Ascaris suum* obtido a partir de vermes adultos (Asc) é capaz de suprimir a resposta imune humoral e celular induzida por antígenos heterólogos, como ovalbumina (OVA) ou micobactéria (SOARES et al., 1987; MACEDO e BARBUTO, 1988).

Estudos posteriores realizados por Soares et al. (1988 e 1990) constataram que o efeito supressor do Asc na resposta imune heteróloga é mediado por proteínas termoestáveis, resistentes a pH ácido e independente de cadeias de lipídios. Posteriormente, esses pesquisadores fracionaram o extrato de Asc por gel filtração e obtiveram três picos distintos (PI, PII e PIII com pesos moleculares de 530, 80 e 29 KDa, respectivamente), os quais foram testados quanto à imunogenicidade e atividade supressora na produção de anticorpos IgE anti-Asc e anti-OVA. Os resultados mostraram que o efeito supressor na resposta à OVA é exercido pelos componentes de maior peso molecular (PI) e que os altos níveis de anticorpos IgE anti-Asc são induzidos pelos componentes de menor peso molecular (PIII) (SOARES et al., 1992).

Estudando a resposta imune humoral induzida por antígenos distintos do extrato de *Ascaris suum* obtidos por gel de filtração, Faquim-Mauro e Macedo (1998) demonstraram que os componentes de alta massa molecular contidos no 1º pico de eluição (PI) promovem a produção de altos títulos de IgG1 e baixos de IgE, enquanto que os componentes de baixa massa molecular presente no 3º pico e chamados (PIII), induzem alta produção de ambos os anticorpos IgG1 e IgE detectados pelo método enzimático (ELISA). Por outro lado, utilizando o ensaio biológico *in vivo* de PCA para a determinação dos títulos de IgE e IgG1, esses autores mostraram que os componentes do PI induzem a síntese de anticorpos IgG1 incapazes de induzir reações positivas de PCA, enquanto que os anticorpos IgG1 gerados em resposta ao PIII apresentam atividade anafilática como a IgE, o que permitiu a identificação de dois subtipos funcionalmente distintos de IgG1: anafilático e não-anafilático.

Quanto à regulação da síntese dos dois subtipos de IgG1, descritos acima, em estudos subseqüentes foi demonstrado que os anticorpos IgG1 anafiláticos são regulados positivamente por IL-4, enquanto que a produção de IgG1 não-anafilática é dependente de IL-12/IFN- γ . Além disto, foi mostrado que a imunização de camundongos com OVA associada tanto ao CFA como ao hidróxido de alumínio induzem a produção dos dois subtipos de IgG1, sendo que o CFA promove níveis maiores do tipo não-anafilático e o hidróxido de alumínio induz a produção de IgG1 anafilática anti-OVA (FAQUIM-MAURO et al., 1999; FAQUIM-MAURO e MACEDO, 2000).

Posteriormente, testando diferentes anticorpos monoclonais IgG1 murinos, quanto à sua capacidade de induzir anafilaxia, foi possível identificar dois deles com a mesma especificidade antigênica (anti-DNP), porém um com atividade anafilática e outro não-anafilático. Estes anticorpos foram utilizados para avaliar as possíveis diferenças funcionais

entre estas duas moléculas de IgG1, essencialmente com respeito à sua afinidade de ligação aos mastócitos e conseqüente capacidade de induzir desgranulação celular.

Em ensaios *in vitro* foi mostrado que o anticorpo IgG1 não-anafilático é capaz de ligar aos mastócitos, porém esta ligação é de menor afinidade que a observada com a IgG1 anafilática, comprometendo a ativação e desgranulação dos mastócitos desencadeada pela presença do antígeno (FAQUIM-MAURO et al., 2003).

Posteriormente, utilizando modelo de asma experimental desenvolvido em camundongos, foi observado que somente o grupo depletado de seus próprios anticorpos e reconstituído com a IgG1 anafilática desenvolveu hiperreatividade brônquica de forma semelhante à observada no grupo reconstituído com anticorpos IgE, enquanto que o reconstituído com a IgG1 não-anafilática não apresentou qualquer reação (MACEDO-SOARES et al., 2004).

Tem sido descrito que a capacidade dos anticorpos IgG de se ligarem a diferentes tipos de células e conseqüentemente induzirem ativação celular via receptores para Fc, ou ao componente C1q do sistema complemento, está diretamente relacionada com a integridade da região constante das moléculas IgG (JEFFERIS et al., 1998). Além disso, foi observado que oligossacarídeos associados à região Fc de anticorpos IgG são essenciais para a manutenção da estrutura conformacional e das funções efectoras da molécula (JEFFERIS, 2005; ARNOLD et al., 2007).

Em relação aos anticorpos IgE, poucos trabalhos descrevem o papel da *N*-glicosilação desta classe de anticorpo para a sua atividade biológica. Na anafilaxia foi demonstrado que a cadeia de carboidrato associada à molécula IgE murina é essencial para a sua ligação aos mastócitos e conseqüente desgranulação celular (GANATO e NEESER, 1987; MASUDA et al., 2001).

A glicosilação de proteínas representa uma grande modificação pós-translacional que ocorre principalmente no complexo de Golgi e envolve a atuação de diversas enzimas como as glicosiltransferases e glicosidases (RAJU et al., 1996). Sabe-se que de maneira geral, estas enzimas competem entre si por um simples substrato e/ou por uma molécula aceptora. Como resultado deste processo, inúmeras cadeias de oligossacarídeos podem ser geradas e ligadas às diversas proteínas e podendo interferir tanto na atividade biológica, como na estabilidade, antigenicidade e farmacocinética da glicoproteína resultante (KOBATA, 1992; JENKINS e CURLING, 1994).

Os oligossacarídeos são, em sua maioria, covalentemente ligados à proteína pelo átomo de nitrogênio (*N*-ligados) presente no grupo amida da asparagina (Asn) ou aos de

oxigênio (*O*-ligados) presentes no grupamento amino-hidroxil da serina (Ser) e/ou treonina (Thr). O motivo estrutural específico para inserção de carboidratos *N*-ligados é Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido com exceção da prolina (VANCE et al., 1997; SATOMI et al., 2004; HEBERT et al., 2005). Devido ao fato da via de biossíntese ser comum, todas as cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas compartilham uma estrutura conservada chamada de núcleo formado por um pentassacarídeo de manose e *N*-acetilglucosamina (Man₃GlcNac₂ - Figura 1). Esta estrutura comum pode sofrer variação na composição dos oligossacarídeos principalmente na região terminal, o que permite a divisão das cadeias de carboidratos em três classes segundo os monossacarídeos ligados: alta manose (contém número variável de manose e raramente glicose); tipo complexa (número variável de acetilglucosamina, galactose, fucose e ácido siálico) e do tipo híbrida que combina características de ambos os tipos de cadeias já descritas. Com respeito à cadeia do tipo complexa, sabe-se ainda que, esta pode apresentar ramificações formando estruturas mono-, bi-, tri- ou tetrantenárias (GEYER e GEYER, 2006).

Figura 1 - Tipos principais de oligossacarídeos *N*-ligados à asparagina. A linha pontilhada ressalta o núcleo da cadeia que é composto por Man₃GlcNac₂. A este núcleo podem ser adicionados outros monossacarídeos como: Man (manose), GlcNac (N-acetilglucosamina), Gal (galactose), Fuc (fucose) e NeuAc (ácido siálico).

Em relação aos anticorpos, dependendo da sua classe ou subclasse eles apresentam-se *N*- e/ou *O*-glicosilados. Os anticorpos IgG humanos são *N*-glicosilados no domínio C_{H2} da região Fc e, somente por volta de 30% destas moléculas, observa-se também cadeias de oligossacarídeos *O*-ligadas na sua região Fab (BEALE e FREINSTEIN, 1976; revisado por WRIGHT e MORRISON, 1997). Sabe-se que a glicosilação da região Fab é menos freqüente, visto que, a adição deste tipo de cadeia é dependente da presença de motivos específicos na seqüência de aminoácidos da região hipervariável (DWEK et al., 1995). No entanto, trabalhos mostram que a presença de carboidratos na região Fab pode influenciar a afinidade de ligação do anticorpo ao antígeno como também na associação de auto-anticorpos IgG (WRIGHT e MORRISON, 1993; ENDO et al., 1995; LEIBIGER et al., 1999).

No homem, como também em outros vertebrados, a cadeia de oligossacarídeos ligada aos anticorpos IgG é do tipo complexa biantenária, apresentando uma estrutura básica de carboidratos formada por 6-7 monossacarídeos, à qual podem estar acrescidos vários outros resíduos de açúcares gerando múltiplas glicoformas (HAMAKO et al., 1993; WRIGHT e MORRISON, 1997; RAJU et al., 2000).

Além do ancoramento da cadeia de oligossacarídeos na asparagina 297 da cadeia constante do anticorpo, são observadas outras interações não-covalentes entre os monossacarídeos com aminoácidos hidrofóbicos dos domínios C_{H2} e C_{H3} da cadeia polipeptídica, o que em conjunto determina a conformação tridimensional da molécula (JEFFERIS e LUND, 2002; KRAPP et al., 2003).

O processo de glicosilação do anticorpo é heterogêneo, decorrente da inserção de diferentes carboidratos à molécula, varia entre espécies e também é dependente da idade, do sexo, além da condição de saúde do indivíduo (ITOH et al., 1993; YAMADA et al., 1997; AXFORD et al., 2003).

Neste contexto, estudos enfocando o padrão de glicosilação de diferentes classes de anticorpos demonstraram que determinadas glicoformas estão associadas com a patogênese de algumas doenças auto-imunes (PAREKH et al., 1985; WATSON et al., 1999). Anticorpos IgG de pacientes com artrite reumatóide apresentam alta proporção de resíduos terminais do tipo *N*-acetilglucosamina, com decréscimo de galactose e ácido siálico em comparação aos anticorpos de indivíduos saudáveis. Estes dados sugerem que clones específicos de linfócitos B secretam anticorpos da classe IgG com determinado tipo de glicosilação que favorece o desenvolvimento da doença (PAREKH et al., 1985; HOLLAND et al., 2006).

Em modelo experimental, foi verificado que camundongos MLR/lpr, linhagem que apresentam mutação pontual no gene fas, desenvolvem doença auto-imune espontânea com

características similares à artrite reumatóide observada no homem, incluindo o aumento dos níveis de anticorpos IgG não-galactosilados além do aumento da secreção de IL-6 que parece estar envolvida no processo de glicosilação das proteínas (DIXON et al., 1978; MACKIEWICZ e KUSHNER, 1989; FIELD et al, 1991; TANG et al., 1991).

Outros estudos mostraram ainda, que a administração de IL-6 recombinante em camundongos CBA/Ig^b resulta no aumento da produção de anticorpos IgG agalactosilados nos soros dos animais, fenômeno também observado em camundongo transgênico para IL-6 (ROOK et al, 1991; HITSUMOTO et al., 1992).

Em relação à nefropatia induzida por IgA, foi observado padrão de glicosilação anormal, com decréscimo do conteúdo de galactose e ácido siálico nos anticorpos IgA1 dos soros de pacientes quando comparado com os soros de indivíduos normais (MESTECKY et al., 1995; HIKI et al., 2001).

Neste contexto, o impacto da glicosilação na estrutura e atividade biológica de glicoproteínas tem sido alvo de inúmeros estudos que visam compreender a complexidade e diversidade deste processo assim como esclarecer como diferenças nas cadeias dos oligossacarídeos *N*-ligados podem influenciar na função efetora dos anticorpos.

Com bases nestas observações, Faquim-Mauro et al (2003) estudaram a participação da cadeia de oligossacarídeos na atividade anafilática dos anticorpos monoclonais IgG1. Assim, o hibridoma produtor da IgG1 anafilática foi tratado com um inibidor de *N*-glicosilação (tunicamicina) para a obtenção de moléculas aglicosiladas, as quais foram testadas em reações de PCA. Os resultados permitiram evidenciar que o anticorpo IgG1 aglicosilado é incapaz de induzir reação de anafilaxia, mostrando que a cadeia de oligossacarídeos associada à IgG1 é fundamental para a sua atividade anafilática.

Estudo utilizando a técnica de engenharia de proteínas para gerar anticorpos com alterações nos resíduos de aminoácidos envolvidos no ancoramento e acomodação da cadeia de carboidratos *N*-ligada mostraram alteração da atividade funcional destas moléculas, como ligação do componente C1 do sistema complemento ou ligação a receptores FcγR solúveis. Além disto, foi verificado que, em geral, estas moléculas apresentam maior grau de galactosilação e sialilação que as glicoproteínas normais (LUND et al., 1996).

Em outro trabalho foi demonstrado progressiva diminuição na afinidade de ligação de glicoformas distintas de IgG humanas, geradas por mudanças na composição dos monossacarídeos da cadeia *N*-ligada, à seus receptores FcγIIb solúveis. Estes dados confirmam, portanto a influência da composição exata dos monossacarídeos na cadeia *N*-

ligada sobre a afinidade de ligação do anticorpo ao seu receptor específico (KRAPP et al, 2003).

O estudo da afinidade de ligação dos anticorpos com algumas lectinas, as quais possuem especificidade para determinados monossacarídeos, permitiu classificar os oligossacarídeos presentes nos anticorpos IgG1 anafiláticos como *N*-ligados e do tipo complexo (JEFFERIS e LUND, 1997). Entretanto, em relação aos anticorpos não-anafiláticos, foi observada fraca ligação destes anticorpos com poucas lectinas, o que impossibilitou a determinação do tipo de cadeia de glicanos associados a estas moléculas.

Em vista de todos os resultados obtidos anteriormente e os dados da literatura correlacionando a estrutura conformacional da molécula de anticorpo murino ou humano com a manutenção da sua função efetora, torna-se relevante realizar estudos mais aprofundados, englobando possíveis diferenças estruturais na região envolvida com a função efetora dos dois tipos de anticorpos IgG1 murinos.

Acreditamos que o controle do processo de glicosilação representa um grande obstáculo a ser superado que implica na possibilidade de obtenção de imunoglobulinas contendo estruturas específicas de oligossacarídeos e assim atividade funcional aprimorada. Sendo assim, o entendimento deste processo torna-se relevante para a grande finalidade de aperfeiçoar as funções efetoras dos anticorpos usados como estratégias terapêuticas.

6 CONCLUSÃO

- Anticorpos murinos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos apresentam nos domínios C_{H2} e C_{H3} seqüências de nucleotídeos com 100% de homologia.
- Os anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos são quantitativamente diferentes em suas cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas.
- Resíduos de ácido siálico e fucose estão presentes em maior proporção na cadeia glicosídica do anticorpo anafilático frente à do não-anafilático.
- A atividade anafilática do anticorpo IgG1 é determinada pelo grau de sialilação da sua cadeia de oligossacarídeos.
- Os resíduos de ácido siálico presentes na cadeia de glicanos da molécula de IgG1 modulam a afinidade de ligação do anticorpo ao receptor FcγIII nos mastócitos.
- O hibridoma e as células produtoras de anticorpos IgG1 anafiláticos apresentam maior expressão gênica de algumas glicosiltransferases que o hibridoma e as células secretoras de anticorpos IgG1 não-anafiláticos.
- A atividade enzimática das sialiltransferases está comprometida no hibridoma produtor do anticorpo IgG1 não-anafilático. Sialiltransferases obtidas do hibridoma produtor da IgG1 anafilática foram capazes de adicionar *in vitro* resíduos de ácido siálico à anticorpos IgG1 dessialilados ou não-anafiláticos.
- A sialilação *in vitro* do anticorpo IgG1 não-anafilático aumenta a afinidade deste à lectina *Sambucus nigra* na mesma intensidade observada com o anticorpo IgG1 anafilático.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*, Ed. Revinter, Rio de Janeiro, 5º ed., 2005.

ARNOLD, J. N. et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 21-50, 2007.

AXFORD, J. S.; CUNNANE, G.; FITZGERALD, O.; BLAND, J. M.; BRESNIHAN, B.; FREARS, E. R. Rheumatic disease differentiation using immunoglobulin G sugar printing by high density electrophoresis. **J. Rheumatol.**, v. 30, p.2540-2546, 2003.

AVERSA, G. et al. CD40 ligand-CD40 interaction in Ig isotype switching in mature and immature human B cells. **Semin. Immunol.**, v. 6, n. 5, p. 295-301, 1994.

AVERY, D. T. et al. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. **J. Immunol.**, v. 181, n. 3, p. 1767-1779, 2008.

BASSET, C. et al. Enhanced sialyltransferase activity in B lymphocytes from patients with primary Sjögren's syndrome. **Scand. J. Immunol.**, v. 51, n. 3, p. 307-311, 2000.

BEALE, D.; FEINSTEIN, A. Structure and function of the constant regions of immunoglobulins. **Q. Rev. Biophys.**, v. 9, n.2, p.135-180, 1976.

BOCHNER, B.S.; LICHTENSTEIN, L. M. Anaphylaxis. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, n.1, p. 1785-1790, 1991.

BOLT, S., et al. The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 403-411, 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUSSE, W. et al. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 108, p.184-190,2001.

De acordo com :

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação:referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CALLARD, R.E.; MATTHEWS, D.J.; HIBBERT, L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? **Immunol. Today.**, v. 17, n.3, p. 108-110, 1996.

CHINTALACHARUVU, S. R.; EMANCIPATOR, S. N. Differential glycosylation of two glycoproteins synthesized by murine B cells in response to IL-4 plus IL-5. **Cytokine**, v. 12, p. 1182-1188, 2000.

CHINTALACHARUVU, S. R. et al. T cell cytokine polarity as a determinant of immunoglobulin A (IgA) glycosylation and the severity of experimental IgA nephropathy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 153, p. 456-462, 2008.

CLARK, J.;CHIANG, D.;CASALE, T. B. Omalizumab in the treatment of allergic respiratory disease. **J. Asthma**, v. 43, p.87-93, 2006.

COHEN, A.M. et al. Sialyltransferase activity and sialic acid levels in multiple myeloma and monoclonal gammopathy. **Eur. J. Haematol.**, v. 42, p. 289-292, 1989.

COOPER, P. J. Intestinal worms and human allergy. **Parasite Immunol.**, v. 26, p. 11-12, 2004.

COULTER, A.; HARRIS, R. Simplified preparation of rabbit Fab fragments. **J. Immunol. Methods**, v. 59, p. 199-203, 1983.

DAËRON, M. et al. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n. 2, p.577-585, 1995.

DEBRAY, H.; MONTREUIL, J.; FRANZ, H. Fine sugar specificity of the mistletoe (*Viscum album*) lectin I. **J. Glycoconj.**, v. 11, p.550-557, 1994.

DEFRANCE, T. et al. Proliferation and differentiation of human CD5+ and CD5- B cell subsets activated through their antigen receptors or CD40 antigens. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, n.11, p. 2831-2839, 1992.

De GRACIA, J. et al. IgG subclass deficiencies associated with bronchiectasis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 153, p.650-655, 1996.

DENNIS, J. W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C. E. Protein glycosylation in development and disease. **Bioessays.**, v.21, n.5, p. 412-421, 1999.

DIEFFENBACH, C.W.; LOWE, T. M.; DVEKSLER, G. S. General concepts for PCR primer design. **PCR Methods Appl.**, v. 3, n.3, p.30-37, 1993.

DIXON, F. J. et al. Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus-like syndrome in mice. **Arthritis Rheum**, v. 21, n.5, p. 64-67, 1978.

DOMBROWICZ, D, et al. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. **Cell.**, v. 75, n. 5, p. 969-976, 1993.

DOMBROWICZ, D. et al. Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 5, p. 915-925, 1997.

DWEK, R. A.; LELLOUCH, A. C.; WORMALD, M. R. Glycobiology: 'the function of sugar in the IgG molecule. **J. Anat.**, v. 187, n.2., p. 279-292, 1995.

ENDO, T. et al. Glycosylation of the variable region of immunoglobulin G-site specific maturation of the sugar chains. **Mol. Immunol.**, v. 32, n.13, p. 931-940, 1995.

EMSON, C. L. et al. Interleukin (IL)-4-independent induction of immunoglobulin (Ig)E, and perturbation of T cell development in transgenic mice expressing IL-13. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 2, p. 399-404, 1998.

ETTINGER, R. et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. **J. Immunol.** v.175, n. 12, p.7867-7879, 2005.

FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. **Clin. Esp. Immunol.**, v. 114, n. 2, p. 245-251, 1998.

FAQUIM-MAURO, E. L. et al. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. **J. Immunol.**, v. 163, n.7, p. 3572-3576, 1999.

FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. **Int. Immunol.**, v. 12, p. 1733-1740, 2000.

FAQUIM-MAURO, E. L.; JACYSYN, J.F.; MACEDO, M.S. Anaphylactic and non-anaphylactic murine IgG1 differ in their ability to bind to mast cells: relevance of proper glycosylation of the molecule. **Immunobiology**, v. 207, n.3, p. 169-177, 2003.

FAROOQ, M. et al. Glycosylation of polyclonal and paraprotein IgG in multiple myeloma. **J. Glycoconj.**, v. 14, p. 489-492, 1997.

FERRARA, C. et al. Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. **Biotechnol Bioeng.**, v. 93, p. 851-861, 2006.

FIELD, M. et al. Interleukin-6 localization in the synovial membrane in rheumatoid arthritis. **Rheumatol. Int.**, v. 11, n. 2, p. 45-50, 1991.

FINKELMAN, F. D. et al. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. **J. Immunol.**, v. 140, n. 4, p. 1022-1027, 1988.

FINKELMAN, F. D. et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 303-333, 1990.

FINKELMAN, F. D. et al. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 115, p. 449-457, 2005.

FLEMING, S.C. et al. Increased sialylation of oligosaccharides on IgG paraproteins--a potential new tumour marker in multiple myeloma. **J. Clin. Pathol.**, v. 51, p. 825-830, 1998.

FRIEND, P.J. et al. Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection. **Transplantation**, v. 68, n. 11, p. 1632-1637, 1999.

FRITZ, G.; RONQUIST, G.; ERICSSON, P. Serum sialyltransferase and fucosyltransferase activities in patients with multiple myeloma. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 21, p. 913-917, 1985.

GALLI, S.J.; GORDON, J.R.; WERSHIL, B.K. Cytokine production by mast cells and basophils. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 3, n.6, p. 865-872, 1991.

GALLI, S.J. Pathogenesis and management of anaphylaxis: current status and future challenges. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 115, n. 3, p. 571-574, 2005.

GERMANN, T. et al. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 3, p. 823-829, 1995.

GEYER, H.; GEYER, R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, n. 12, p. 1853-1869, 2006.

GRANATO, D.A.; NEESER, J.R. Effect of trimming inhibitors on the secretion and biological activity of a murine IgE monoclonal antibody. **Mol. Immunol.**, v. 24, n. 8, p. 849-855, 1987.

GESSNER, J.E. et al. IgG Fc receptor family. **Ann. Hematol.**, v. 76, n. 6, p. 231-248, 1998.

GIULIETTI, A. et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n.4, p. 386-401, 2001.

HAAS, L.F. Emil Adolph von Behring (1854-1917) and Shibasaburo Kitasato (1852-1931). **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v.71, n. 1. p. 62, 2001.

HAMAKO, J. et al. Comparative studies of asparagine-linked sugar chains of immunoglobulin G from eleven mammalian species. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 106, n.4, p. 949-954, 1993.

HARWOOD, N. E.; BATISTA, F. D. Early Events in B Cell Activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 28, p. 185-210, 2010.

HAZENBOS, W.L. et al. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. **Immunity**, v. 5, p.181-188, 1996.

HEBERT, D. N.; GARMAN, S. C.; MOLINARI, M. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. **Trends Cell Biol.**, v. 15, n.7, p. 364-370, 2005.

HENNET, T. et al. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, n. 8, p. 4504-4509, 1998.

HIKI, Y. et al. Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. **Kidney Int.**, v. 59, n.3, p.1077-1085, 2001.

HITSUMOTO, Y. et al. Relationship between interleukin 6, agalactosyl IgG and pristane-induced arthritis. **Autoimmunity**, v. 11, n. 4, p.247-254, 1992.

HOLGATE, S.T., et al. Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 117, p. 496-506, 2006.

HOLLAND, M. et al. Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculi. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, n. 4, p. 669-677, 2006.

HONJO, T. et al. Cloning and complete nucleotide sequence of mouse immunoglobulin gamma 1 chain gene. **Cell**, v. 18, p. 559-568, 1979.

HOSHINO, T.; WILTROUT, R. H.; YOUNG, H. A. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. **J. Immunol.**, v. 162, n. 9, p. 5070-5077, 1999.

ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T.; HORNBROOK, M. M. Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. **J. Immunol.**, v. 97, n.1, p. 75-85, 1966.

ITOH, H. et al. The influence of age and health status on the serum alpha 1-acid glycoprotein level of conventional and specific pathogen-free pigs. **Can. J. Vet. Res.**, v. 57, n.2, p. 74-78, 1993.

JANKOVIC, D. et al. Adsorption to aluminum hydroxide promotes the activity of IL-12 as an adjuvant for antibody as well as type 1 cytokine responses to HIV-1 gp120. **J. Immunol.**, v. 159, n. 5, p. 2409-2417, 1997.

JARRETT, E.E.; MILLER, H.R. Production and activities of IgE in helminth infection. **Prog. Allergy**, v. 31, p. 178-233, 1982.

JARYAL, A.K. Emil von Behring and the last hundred years of immunology. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v.45, n. 4, p. 389-394, 2001.

JEDDI, P. et al. The effect on immunoglobulin glycosylation of altering in vivo production of immunoglobulin G. **Immunology.**, v. 98, p. 475-480, 1999.

JEFFERIS, R. et al. Glycosylation of antibody molecules. A small step for structure, a leap for function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, p. 376:153, 1995.

JEFFERIS, R.; LUND, J. Glycosylation of antibody molecules: structural and functional significance. **Chem Immunol.**, v. 65, n. 2, p. 111-128, 1997.

JEFFERIS, R.; WALKER, M.R. The biological significance of specific antibody IgG subclass profiles. **Monogr. Allergy**, v. 23, p. 73-77, 1998.

JEFFERIS, R.; LUND, J.; POUND, J.D. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. **Immunol. Rev.**, v.163, p. 59-76, 1998.

JEFFERIS, R.; LUND, J. Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. **Immunol. Lett.**, v. 82, n.1-2, p. 57-65, 2002.

JEFFERIS, R. Glycosylation of natural and recombinant antibody molecules. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 564, p. 143-148, 2005.

JENKINS, N.; CURLING E. M. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, n. 5, p. 354-364, 1994.

KANEKO, Y.; NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J.V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. **Science.**, v.313, p. 670-673, 2006.

KEMP, S. F.; LOCKEY, R. F. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.110, n. 3, p. 341-348, 2002.

KINET, J.P. The high-affinity IgE receptor (Fc εRI): from physiology to pathology. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 931-972, 1999.

KING, C. L. et al. Mice with targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Shistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, v. 158, p. 294-300, 1997.

KOBATA, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, p.483-501, 1992.

KOBATA, A.; ENDO, T. Immobilized lectin columns: useful tools for the fractionation and structural analysis of oligosaccharides. **J. Chromatogr.**, v. 597, p. 111-122, 1992.

KONO, M. et al. Mouse β -galactoside α 2,3-sialyltransferases: comparison of in vitro substrate specificities and tissue specific expression. **Glycobiology**, v.7, n.4, p. 469-479, 1997.

KRAFT, S.; KINET, J. P. New developments in Fc ϵ RI regulation, function and inhibition. **Nat Rev Immunol.**, v. 7, n.5, p. 365-378, 2007.

KRAPP, S. et al. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. **J. Mol. Biol.**, v.325, n.5, p. 979-989, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, Y.C. et al. Molecular cloning and functional expression of two members of mouse Neu-Ac₂,3Gal₁,3GalNAc GalNAc₂,6-sialyltransferase family, ST6GalNAc III and IV. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p.11958–11967, 1999.

LEIBIGER, H. et al. Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. **Biochem. J.**, v. 338, n.2, p. 529-538, 1999.

LIBLAU, R.S.; BACH, J.F. Selective IgA deficiency and autoimmunity. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.99, p. 16-27, 1992.

LIS, H.; SHARON, N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. **Eur. J. Biochem.**, v. 218, p. 1-27, 1993.

LIVAK, K. J. et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Appl.**, v.4, n. 6, p.357-362, 1995.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))}. **Method**, v. 25, p. 402-408, 2005.

LUND, J. et al. Multiple interactions of IgG with its core oligosaccharide can modulate recognition by complement and human Fc gamma receptor I and influence the synthesis of its oligosaccharide chains. **J. Immunol.**, v.157, n.11, p. 4963-4969, 1996.

MACEDO, M. S.; BARBUTO, J. A. Murine delayed type hypersensitivity is suppressed by *Ascaris suum* extract. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, n. 3, p. 523-525, 1988.

MACEDO-SOARES, M. F. et al. Lung eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity are enhanced by murine anaphylactic, but not nonanaphylactic, IgG1 antibodies. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 114, n.1, p. 97-104, 2004.

MACKIEWICZ, A.; KUSHNER, I. Affinity electrophoresis for studies of mechanisms regulating glycosylation of plasma proteins. **Electrophoresis**, v. 10, n.12, p. 830-835, 1989.

MAGGI, E. et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. **J. Immunol.**, v. 148, n. 7, p. 2142-2147, 1992.

MALHOTRA, R. et al. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. **Nat. Med.** v., 1, p. 237-243, 1995.

MASUDA, Y.; AKAGAWA, Y.; HISHIKAWA, Y. Another anti-allergic mechanism: antibody IgE deglycosylation induced by a substance extracted from human urine. **Yale J. Biol. Med.**, v. 74, N. 3, p. 145-149, 2001.

MATSUMIYA, S. et al. Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G1. **J. Mol. Biol.**, v. 368, p 767-779, 2007.

MESTECKY, J.; HASHIM, O. H.; TOMANA, M. Alterations in the IgA carbohydrate chains influence the cellular distribution of IgA1. **Contrib. Nephrol.**, v. 111, p. 66-71, 1995.

MIMURA, Y. et al. The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. **Mol. Immunol.**, v. 37, p. 697-706, 2000.

MIYAJIMA, I. et al. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. **J. Clin. Invest.** v. 99, n. 5, p. 901-914, 1997.

MIX, E.; GOERTSCHES, R.; ZETT, U.K. Immunoglobulins-basic considerations. **J. Neurol.**, v. 253, p. 9-17, 2006.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 143-173, 1989.

MOTA, I. Passive cutaneous anaphylaxis induced with mast cell-sensitizing antibody. The role of histamine and 5-hydroxytryptamine. **Life Sci.**, v. 12, p. 917-927, 1963.

MOTA, I. The mechanism of anaphylaxis -II. The role of mast cell sensitizing antibody and delayed hypersensitivity in rat anaphylaxis. **Immunology**, v.7, n. 6, p. 700-706, 1964.

NEGRAO-CORREA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, p. 291-299, 2001.

NISHIURA, T. et al. Carbohydrate analysis of immunoglobulin G myeloma proteins by lectin and high performance liquid chromatography: role of glycosyltransferases in the structures. **Cancer Res.**, v. 50, p. 5345-5350, 1990.

OETTGEN, H. C. et al. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. **Nature**, v. 370, n.6488, p. 367-370, 1994.

ORTEGA, E.; SCHNEIDER, H.; PECHT, I. Possible interactions between the Fc epsilon receptor and a novel mast cell function-associated antigen. **Int. Immunol.**, v. 3, n. 4, p. 333-342, 1991.

OVARY, Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. **J. Immunol.**, v. 81, n. 4, p.355-357, 1958.

PAREKH, R. B. et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. **Nature**, v. 316, n. 6027, p. 452-457, 1985.

PÈNE, J. et al. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. **J. Immunol.**, v. 172, n.9, p. 5154-5157, 2004.

PETIT-FRERE, C.; DUGAS, B.; BRAQUET, P.; MENCIA-HUERTA, J.M. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes. **Immunology**, v. 79, n. 1, p.146-151, 1993.

PURKERSON, J.M.; ISAKSON, P.C. Interleukin 5 (IL-5) provides a signal that is required in addition to IL-4 for isotype switching to immunoglobulin (Ig) G1 and IgE. **J. Exp. Med.**, v. 175, n. 4, p. 973-982, 1992.

PRUSSIN, C.; METCALFE, D.D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 117, p. 450-456, 2006.

QU, S. et al. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-gene. **Glycobiology**, v. 15, p. 805-817, 1996.

RAJU, T. S.; LERNER, L.; O'CONNOR, J. V. Glycopinon: biological significance and methods for the analysis of complex carbohydrates of recombinant glycoproteins. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 24, p. 191-194, 1996.

RAJU, T. S. et al. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. **Glycobiology**, v., 10, n. 5, p. 477-486, 2000.

RAJU, T. S. et al. Glycoengineering of therapeutic glycoproteins: in vitro galactosylation and sialylation of glycoproteins with terminal N-acetylglucosamine and galactose residues. **Biochemistry**, v. 40, n. 30, p. 8868-8876, 2001.

RAJU, T. et al. Cost-effectiveness analysis of omalizumab in adults and adolescents with moderate-to-severe allergic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 114, p. 265–269, 2001.

RAVETCH, J. V.; KINET, J. P. Fc receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 9, n. p. 457-492, 1991.

ROOK, G. et al. The role of oil and agalactosyl IgG in the induction of arthritis in rodent models. **Eur. J. Immunol.**, v. 21, n.4, p.1027-1032, 1991.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1997.

SATOMI, Y. et al. Site-specific carbohydrate profiling of human transferrin by nano-flow liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 18, n. 24, p. 2983-2988, 2004.

SCALLON, B. et al. Quantitative in vivo comparisons of the Fc gamma receptor-dependent agonist activities of different fucosylation variants of an immunoglobulin G antibody. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, n. 6, p. 761-772, 2007

SCHARENBERG, A. M.; KINET, J. P. Initial events in Fc epsilon RI signal transduction. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 94, n.6, p. 1142-1146, 1994.

SIBER, G. R., et al. Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. **N. Engl. J. Med.**, v.303, p. 178-182, 1980.

SIMONS, F. E. Anaphylaxis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 121, p. 402-407, 2008.

SHIELDS, R.L. et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 26733-2640, 2002.

SJOBERG, E. et al. Analysis of sialyltransferase gene. **Glycobiology**, v. 65, p. 1258-1275, 1996.

SOARES, M. F.; MACEDO, M. S.; MOTA, I. Suppressive effect of an *Ascaris suum* extract on IgE and IgG antibody responses in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, n. 2, p. 203-211, 1987.

SOARES, M. F. et al. Suppression of IgE antibody production by *Ascaris suum* extract: characterization of suppressive component(s). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, n. 3, p. 527-529, 1988.

SOARES, M. F. et al. Further characterization of *Ascaris suum* component(s) with suppressive activity on the IgE antibody response. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 23, n.6, p. 589-592, 1990.

SOARES, M. F.; MOTA, I.; MACEDO, M. S. Isolation of *Ascaris suum* components which suppress IgE antibody responses. **Immunol.**, v. 97, n. 1, p. 37-43, 1992.

SUDOWE, S. et al. The role of interleukin-4 in the regulation of sequential isotype switch from immunoglobulin G1 to immunoglobulin E antibody production. **Scand. J. Immunol.**, v.51, n. 5, p. 461-471, 2000.

STAVNEZER, J. Immunoglobulin class switching. **Curr Opin Immunol.**, v.8, n.2, p. 199-205, 1996.

STRAIT, R. T. et al. Pathways of anaphylaxis in the mouse. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 109, n.4, p. 658-668, 2002.

STRAIT, R. T.; MORRIS, S. C.; FINKELMAN, F. D. IgG Blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and FcγRIIb crosslinking. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p.833-841, 2006.

STRUNK, R.C.; BLOOMBERG, G.R. Omalizumab for asthma. **N. Engl. J. Med.**, v.354, p. 2689-2695, 2006

TAKAI, T. et al. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. **Nature.**, v. 379, n.6563, p. 346-349, 1996.

TAKASHIMA, S et al. Quantitative analysis of expression of mouse sialyltransferase genes by competitive PCR. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 260, n. 1, p. 23-27, 1999.

TAKASHIMA, S.; TSUJI, S.; TSUJIMOTO, M. Comparison of the enzymatic properties of mouse beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferases, ST6Gal I and II. **J. Biochem.**, v. 134, n. 2, p. 287-296, 2003.

TANG, B. et al. Age-associated increase in interleukin 6 in MRL/lpr mice. **Int. Immunol.**, v.3, n. 3, p. 273-278, 1991.

TOKUDA, S.; WEISER, R. S. Anaphylaxis in the mouse produced with soluble complexes of antigen and antibody. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 98, n.3, p. 557-561, 1958.

TREADWELL, P. E.; WISTAR, R.; RASMUSSEN, A. F. Passive anaphylaxis in mice with homologous antiserum. I. Some quantitative aspects. **J. Immunol.**, v. 84, p. 539-544, 1960

TRIGGIANI, M.; ORIENTE, A.; DE CRESCENZO, G.; MARONE, G. Metabolism of lipid mediators in human basophils and mast cells. **Chem. Immunol.**, v. 61, n. 5, p. 135-147, 1995.

VANCE, B. A. et al. Multiple dimeric forms of human CD69 result from differential addition of N-glycans to typical (Asn-X-Ser/Thr) and atypical (Asn-X-cys) glycosylation motifs. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 37, p. 23117-23122, 1997.

VANDERHOEK, J. Y. et al. New role for 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. Activator of leukotriene biosynthesis in PT-18 mast/basophil cells. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n.20, p.12191-12195, 1982.

VARKI, A. Sialic acids. Essentials of Glycobiology. In: Cold Spring Harbor, 1nd ed. A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, and J. Marth, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 195–209, 1999.

VERBET, A. Methods on glycoconjugates, a laboratory manual. In: A. Verbet. Glycobiology. 2nd ed. Switzerland : Academic Publishers, 110-115, 1995.

WATT, G. et al. Synthesis of homogeneous neoglycoforms of IgG-Fc molecules and their functional properties. **Hum. Antibodies**, v. 11, p. 29–30, 2002.

WATSON, M. et al. Sugar printing rheumatic diseases: a potential method for disease differentiation using immunoglobulin G oligosaccharides. **Arthritis Rheum.**, v.42, n.8, p.1682-1690, 1999.

WRIGHT, A.; MORRISON, S. L. Antibody variable region glycosylation: biochemical and clinical effects. **Springer Semin. Immunopathol.**, v. 15, n. 2-3, p. 259-273, 1993.

WRIGHT, A.; MORRISON, S. L. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. **Trends Biotechnol.**, v. 15 , n.1, p. :26-32, 1997.

YAMADA, E. et al. Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. **J. Glycoconj.**, v. 14, n.3, p. 401-405, 1997.

YAMAMOTO, K.; TSUJI, T.; OSAWA, T. Analysis of asparagine-linked oligosaccharides by sequential lectin affinity chromatography. **Mol. Biotechnol.**, v. 3, n. 1, p. 25-36, 1995.

YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P. G.; VAN REE, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 490-494, 2002.

YOSHIDA, Y.; KOJIMA, N.; TSUJI, S. Molecular cloning and characterization of a third type of N-glycan 2,8-sialyltransferase from mouse lung. **J. Biochem.**, v.118,p. 658–664, 1995.

YOSHIMOTO, T. et al. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. **Nat. Immunol.**, v. 1, n.2, p. 132-137, 2000.

ZUBER , T. et al. Conserved amino acid sequence in the bacterial sialyltransferases belong glycosyltransferase family. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.365, p. 640-643, 1992.