

SANDRIANA DOS RAMOS SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DA REGIÃO Fc DE
ANTICORPOS IgG1 MURINOS 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 Doutor em Ciências.

SÃO PAULO
2010

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

dos Ramos Silva, Sandriana.

Estudo comparativo da região Fc de anticorpos IgG1 murinos anafiláticos e não-anafiláticos / Sandriana dos Ramos Silva. -- São Paulo, 2010.

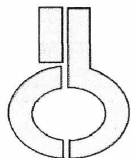
Orientador: Eliana Faquim de Lima Mauro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Anafilaxia e glicosilação de anticorpos.

Versão do título para o inglês: Comparative study of the Fc region of murine anaphylactic and non-anaphylactic IgG1.

Descritores: 1. Anafilaxia 2. Anticorpo 3. Glicosilação 4. Mastócitos 5. Cromatografia 6. Expressão gênica I. Faquim-Mauro, Eliana de Lima II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB038/2010



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **050** nas fls. **30** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Eliana Faquim de Lima Mauro, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Estudo comparativo da região Fc de anticorpos IgG1 murinos anafiláticos e não anafiláticos**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Sandriana dos Ramos Silva e a pesquisadora Mahasti Sahihi de Macedo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **20.04.2006**.

São Paulo, 08 de maio de 2006.

Prof. Dra. Marília C.L. Seelaender
Coordenadora -CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sandriana dos Ramos Silva.

Título da Tese: Estudo comparativo da região Fc de anticorpos IgG1 murinos anafiláticos e não-anafiláticos.

Orientador(a): Eliana Faquim de Lima Mauro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

DEDICATÓRIA

**Aos meus queridos pais pelo amor, esforço,
dedicação e compreensão, em todos os
momentos desta e de outras caminhadas.**

AGRADECIMENTOS

A confecção do presente trabalho não seria possível sem os estudos prévios realizados por inúmeros profissionais de diferentes Centros de Pesquisa, profissionais estes, muitas das vezes incógnitos, mas interligados no propósito da produção de conhecimento – a toda essa Comunidade Científica, sem distinção de hierarquia, meu reconhecimento e sinceros agradecimentos.

Agradeço de maneira destacada a Prof^a. Dr^a. Eliana Faquim de Lima Mauro, tradução de competência, disciplina e profissionalismo pela orientação, amizade e atenção dispensados durante todo o curso e pela confiança depositada desde do curso de mestrado até o doutorado.

À Dra. Alicia Couto, do Departamento de Química Orgânica da Universidade de Buenos Aires, pela colaboração e oportunidade de estágio, fundamental para produção de conhecimentos para o desenvolvimento deste projeto; à Dra. Ana Moura, diretora do Laboratório de Imunopatologia, do Instituto Butantan, assim como, a todos os pesquisadores desta unidade; ao Laboratório de Imunogenética, pela ajuda na realização das reações em PCR em Tempo Real e análise dos resultados, e aos doutores componentes da banca de qualificação: Maria Notoni Sato, Fábio Henrique e Ises Abrahamsohn, pela disponibilidade e pelas sugestões de aprimoramento.

Aos funcionários e responsáveis pelos biotérios de criação e experimentação do ICB-USP e do Instituto Butantan; aos funcionários da biblioteca ICB-USP, por todo auxílio na catalogação e revisão bibliográfica; aos docentes do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV-USP, pelos ensinamentos; aos secretários Amarildo Utiana (*in memoriam*). Lucas Soares, Jotelma Ribeiro, Maria Eni e Cleusa Aparecida, pela amizade e atenção dispensadas; e a todos os funcionários do Laboratório de Imunopatologia que contribuíram durante todo o trabalho na preparação dos materiais utilizados e apoio científico.

As minhas irmãs científicas: Bruna Favoretto, Renata Ricardi e Priscila Ranéia, no compartilhamento de trabalhos, sonhos e dificuldades, aos meus amigos Caio Farina, Tamires Oliveira, Daiana da Silva, pela atenção e ajuda, e a todas os demais que, mesmo sem a citação dos nomes, contribuíram com a realização deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

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.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos principais de oligossacarídeos <i>N</i> -ligados à asparagina.....	31
Figura 2 - Estratégia utilizada para o seqüenciamento dos nucleotídeos que codificam os domínios C _{H2} e C _{H3} da região constante das moléculas de IgG1.....	50
Figura 3 - Seqüências de <i>primers</i> utilizados na amplificação em PCR.....	64
Figura 4 -Produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PI ou PIII em soros de camundongos IL-4KO imunizados com PI ou IFN- γ KO imunizados com PIII.....	70
Figura 5 - Títulos de anticorpos IgG1 anafiláticos em soros de camundongos IL-4KO imunizados com PI ou IFN- γ KO imunizados com PIII.....	70
Figura 6 - Produto de amplificação da molécula constitutiva β -actina em PCR.	71
Figura 7 - Produto de amplificação dos domínios C _{H2} e C _{H3} da cadeia pesada das moléculas de IgG1 anafilática e não-anafilática.....	72
Figura 8 - Seqüência de nucleotídeos que codificam os domínios C _{H2} e parte do C _{H3} da região constante da cadeia pesada da molécula de IgG1 anafilática produzida pelo hibridoma U7.6.....	74
Figura 9 - Seqüência de nucleotídeos que codificam os domínios C _{H2} e parte do C _{H3} da região constante da cadeia pesada da molécula de IgG1 não-anafilática produzida pelo hibridoma B8401-H5.....	74
Figura 10 - Seqüência de nucleotídeos que codificam os domínios C _{H2} e parte do C _{H3} da região constante da cadeia pesada da molécula de IgG1 obtida a partir de células de camundongos IL-4KO e imunizados com PI.....	75
Figura 11 - Seqüência de nucleotídeos que codificam os domínios C _{H2} e parte do C _{H3} da região constante da cadeia pesada dos anticorpos IgG1 anafiláticos obtida de células de camundongos IFN- γ KO e imunizados com PIII em hidróxido de alumínio.....	75
Figura 12 - Análise da homologia entre a seqüência de nucleotídeos que codificam a metade final do domínio C _{H1} , C _{H2} e início do C _{H3} da cadeia pesada das moléculas de IgG1 anafiláticas e não-anafiláticas.....	77
Figura 13 - Perfil de eluição da tiroglobulina submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Con A.....	79

Figura 14- Perfil de eluição dos anticorpos IgG1 anafilático (U7.6) e não-anafilático (H5) submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de Con A.....	80
Figura 15- Afinidade de ligação dos anticorpos IgG1 anafiláticos ou não-anafiláticos com diferentes lectinas.....	82
Figura 16- Afinidade de ligação dos fragmentos Fc e Fab dos IgG1 anafiláticos ou não-anafiláticos com diferentes lectinas.....	83
Figura 17- Perfil de eluição dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos obtido após cromatografia de afinidade em coluna de <i>Triticum vulgare</i> -Agarose.	84
Figura 18- Perfil de eluição dos anticorpos IgG1 anafilático e não-anafilático obtido após cromatografia de afinidade em coluna de <i>Triticum vulgare</i> -Agarose.....	86
Figura 19- Perfil de eluição dos anticorpos IgG1 anafilático, não-anafilático e IgG1 dessialilado submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de lectina <i>Sambucus nigra</i> -Sepharose.....	87
Figura 20- Perfil de eluição dos anticorpos IgG1 anafilático, não-anafilático e IgG1 defucosilado submetido à cromatografia de afinidade à lectina <i>Ulex europeus</i>	88
Figura 21- Perfil de eluição das cadeias de oligossacarídeos obtidas dos anticorpos IgG1 anafilático e não-anafilático em coluna Carboxyl Sepharose 6B por HPAEC-PAD.....	90
Figura 22- Análise das cadeias de oligossacarídeos dos anticorpos IgG1 anafiláticos, não-anafiláticos e dessialilados por HPAEC-PAD.....	92
Figura 23- Perfil eletroforético de anticorpos IgG1 anafilático tratado ou não com sialidase e anticorpo não-anafilático em gel de poliacrilamida 9%.....	95
Figura 24- Reconhecimento antigênico dos anticorpos IgG1 anafiláticos ou não-anafiláticos.....	96
Figura 25- Análise da ligação dos anticorpos IgG1 anafilático, não-anafilático ou IgG1 dessialilado aos mastócitos <i>in vitro</i>	98
Figura 26- Secreção da enzima β -glucuronidase por mastócitos (PT18) incubados com anticorpos IgG1 anafilático, não-anafilático ou IgG1 dessialilado anti-DNP e posteriormente desafiados com DNP-BSA.....	99
Figura 27- Purificação de anticorpos IgG1 de soros de camundongos IFN- γ KO imunizados com PIII.....	102
Figura 28- Purificação de anticorpos IgG1 de soros de camundongos IL-4KO imunizados com PI.....	103

Figura 29- Títulos de anticorpos anti-Asc nas amostras obtidas após purificação por cromatografia de afinidade.....	104
Figura 30 - Afinidade de ligação dos anticorpos IgG1 policlonais anafiláticos ou não-anafiláticos a diferentes lectinas.....	105
Figura 31- Afinidade dos anticorpos IgG1 anti-Asc purificados do soro de camundongos IFN- γ KO ou IL-4KO.....	106
Figura 32- Análise das cadeias de oligossacarídeos dos anticorpos IgG1 purificados de soros de camundongos IFN- γ KO, anticorpos IgG1 purificados de soros de camundongos IL-4KO e anticorpo IgG1 dessialilado por HPAEC-PAD.....	107
Figura 33- Expressão relativa dos genes <i>glicosiltransferases</i> em hidridomas U7.6 (produtor de anticorpos IgG1 anafiláticos) e H5 (produtor de anticorpos IgG1 não-anafiláticos).....	109
Figura 34- Expressão gênica de <i>ST3Gal (I-V)</i> em hidridomas U7.6 (produtor de anticorpos IgG1 anafiláticos) e H5 (produtor de anticorpos IgG1 não-anafiláticos).....	110
Figura 35- Expressão gênica de <i>ST6Gal I</i> e <i>ST6GalNac (I-IV)</i> em hidridomas U7.6 (produtor de anticorpos IgG1 anafiláticos) e H5 (produtor de anticorpos IgG1 não-anafiláticos).....	111
Figura 36- Expressão gênica de <i>ST8Sial (I-V)</i> em hidridomas U7.6 (produtor de anticorpos IgG1 anafiláticos) e H5 (produtor de anticorpos IgG1 não-anafiláticos).....	111
Figura 37- Expressão gênica de <i>ST3Gal (I-V)</i> em hidridomas U7.6 (produtor de anticorpos IgG1 anafiláticos) e H5 (produtor de anticorpos IgG1 não-anafiláticos).....	112
Figura 38- Expressão gênica de <i>ST6GalNac (I-IV)</i> em hidridomas U7.6 (produtor de anticorpos IgG1 anafiláticos) e H5 (produtor de anticorpos IgG1 não-anafiláticos).....	113
Figura 39- Expressão gênica de <i>ST8Sial (I-V)</i> em hidridomas U7.6 (produtor de anticorpos IgG1 anafiláticos) e H5 (produtor de anticorpos IgG1 não-anafiláticos).....	113
Figura 40- Expressão gênica de <i>ST3Gal (I-V)</i> em linfócitos B de camundongo IFN- γ KO e IL-4KO.....	114
Figura 41- Expressão gênica de <i>ST6GalNac (I-IV)</i> em linfócitos B de camundongo IFN- γ KO e IL-4KO.....	114
Figura 42- Expressão gênica de <i>ST8Sial (I-V)</i> em linfócitos B de camundongo IFN- γ KO e IL-4KO.....	115

Figura 43- Afinidade dos anticorpos IgG1 a lectina <i>Sambucus nigra</i>	117
Figura 44- Atividade enzimática das sialiltransferases obtidas dos hibridomas U7.6 e H5 sob o anticorpo IgG1 dessialilado.....	117
Figura 45 - Afinidade dos anticorpos IgG1 a lectina <i>Sambucus nigra</i>	118
Figura 46- Atividade das sialiltransferases obtidas dos hibridomas U7.6 e H5 sob o anticorpo IgG1 não-anafilático	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Afinidade das lectinas por monossacarídeos.....	52
Tabela 2- Resumo do protocolo de PCR-RT para amplificação de cDNA.....	62
Tabela 3- Sequências de <i>primers</i> utilizados em reação de PCR.....	65
Tabela 4 - Reações de PCA mediadas por anticorpos IgG1 monoclonais.....	68
Tabela5- Reações de anafilaxia cutânea passiva desencadeada por anticorpos monoclonais IgG1 após cromatografia de afinidade em coluna de <i>Triticum vulgare</i> -Agarose.....	85
Tabela 6- Reações de anafilaxia cutânea passiva desencadeadas por anticorpo IgG1 deglicosilado.....	63
Tabela 7- Reação de anafilaxia cutânea passiva mediada por IgG1 dessialilado ou defucosilado.....	94
Tabela 8- Indução de anafilaxia cutânea passiva <i>in vivo</i> por anticorpos IgG1 purificados de camundongos IL-4KO ou IFN- Γ ko	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Asc** – Extrato de *Ascaris suum*
- BCR** – *Receptor B cell* (Receptor de linfócito B)
- BSA** – *Bovine albumin serum* (Soro albumina bovino)
- cDNA** – ácido desoxiribonucléico complementar
- CFA** – *Complete Freund adjuvant* (Adjuvante completo de Freund)
- DMSO** - *Dimethylsulfoxid* (Sufóxido de metilo)
- dNTP**- *Deoxynucleotidetriphosphates* (Desorribonucleotídeo trifosfato)
- DTT** – *Dithiothreitol* (Ditiotreitól)
- dT** – Oligonucleotídeo
- EDTA** – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (
- FITC** – *Fluorescein isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)
- HCl** – Hipoclorito de sódio
- OPD** – *Ortho-phenylene- di-amino-di-hydrochloride* (*o*-fenilenodiamina)
- OVA** – *Ovalbumin* (Ovalbumina)
- PBS** – Phosphate buffered saline (Solução salina tamponada com fosfato)
- PBST**- Phosphate buffered saline tween (Solução salina tamponada com fosfato contendo Tween-20)
- PCA** – *Anaphylaxis cutanea passive* (Reação de anafilaxia cutânea passiva)
- PCR** - *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
- PI** – Pico I (Componentens de alta massa molecular do extrato de Asc)
- PIII** – Pico III (Componentes de baixa massa molecular do extrato de Asc)
- RNA**- Ácido ribonucléico
- RNA_m** - Ácido ribonucléico mensageiro
- RPMI** – *Roswelt Park Memorial Institute*
- SDS** - *Sodium duodecil sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)
- TBS** – Tampão borato com salina
- TCR** – *Receptor T cell* (Receptor de linfócito T)
- TRIS** - *Tris-hydroxymethyl-aminomethane* (Tri-hidroxi-metil-aminometano)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVO	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Animais	38
3.2 Antígenos e Adjuvantes	38
3.3 Obtenção dos anticorpos monoclonais IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos	39
3.3.1 Produção dos anticorpos IgG1 monoclonais <i>in vitro</i>	39
3.3.2 Purificação dos anticorpos IgG1 em coluna de proteína G-Sepharose	39
3.3.3 Dosagem protéica das amostras	40
3.4 Produção dos dois subtipos de anticorpos policlonais IgG1 anafiláticos e não anafiláticos em camundongos imunizados com PI ou PIII do extrato de <i>Ascaris suum</i>	41
3.4.1 Protocolo de imunização.....	41
3.4.2 Protocolo de purificação de anticorpos IgG1 do soro de camundongos previamente imunizados	41
3.4.2.1 Acoplamento do extrato de <i>Ascaris suum</i> em Sepharose 4B.....	41
3.4.2.2 Cromatografia de afinidade em coluna de Asc-Sepharose.....	42
3.4.2.3 Separação dos anticorpos IgG1 em coluna de proteína A-Sepharose.....	43
3.5 Ensaio imunoenzimático para dosagem de anticorpos anti-PI, PIII do extrato bruto de <i>Ascaris suum</i>	43
3.6 Purificação de Linfócitos B provenientes de camundongos	44
3.7 Obtenção de RNA e seqüenciamento dos domínios CH₂ e CH₃ dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos	45
3.7.1 Obtenção de RNA	45
3.7.2 Extração e quantificação de RNA.....	46

3.7.3 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	47
3.7.4 Reação de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação da proteína constitutiva β -actina	47
3.7.5 Seqüenciamento dos domínios CH ₂ e CH ₃ de anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos	48
3.7.5.1 Preparo das amostras de cDNA para o seqüenciamento	48
3.7.5.2 Purificação dos produtos amplificados por PCR para posterior seqüenciamento...	49
3.7.5.3 Seqüenciamento da região constante da cadeia pesada dos anticorpos IgG1	49
3.8 Obtenção dos fragmentos Fab e Fc de anticorpos IgG1 por digestão por papaína	51
3.9 Ensaio de afinidade de ligação dos anticorpos as diferentes lectinas	51
3.9.1 Ensaio <i>in vitro</i> de afinidade dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos a diversas lectinas (ELISA).....	51
3.10 Análise dos oligossacarídeos N-ligados aos anticorpos IgG1	53
3.10.1 Preparo das amostras e tratamento enzimático.....	53
3.10.2 Análise das cadeias de carboidratos por HPAEC-PAD.....	53
3.11 Modificação dos resíduos da cadeia de carboidratos dos anticorpos IgG1 anafiláticos por tratamento enzimático	54
3.11.1 Obtenção de anticorpos IgG1 deglicosilados.....	54
3.11.2 Obtenção de anticorpos IgG1 dessialilados.....	54
3.11.3 Obtenção de anticorpos IgG1 defucosilados.....	55
3.12 Análise da atividade anafilática dos anticorpos IgG1	55
3.12.1 Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva.....	55
3.12.2 Análise da ligação dos anticorpos IgG1 à mastócitos <i>in vitro</i> por citômetria de fluxo.....	56
3.12.3 Ensaio de desgranulação de mastócitos <i>in vitro</i> e detecção da atividade da enzima β -glucuronidase.....	57
3.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida	58

3.14 Cromatografia de afinidade às lectinas	58
3.14.1 Coluna de lectina <i>Canavalia ensiformis</i> - sepharose.....	59
3.14.2 Coluna de lectina <i>Triticum vulgare</i> -agarose.....	59
3.14.3 Coluna de <i>Sambucus nigra</i> -Sepharose	60
3.14.4 Coluna de <i>Ulex europeus</i> – Sepharose	60
3.15 Reações de PCR em Tempo-Real	61
3.15.1 Padronização das reações de PCR em Tempo Real.....	61
3.15.2 Expressão das enzimas envolvidas no processo de glicosilação dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafilático.....	62
3.16 Avaliação da Atividade de sialiltransferases	66
3.16.1 Preparação do Extrato celular	66
3.16.2 Determinação da atividade enzimática por ensaio de ELISA	66
3.17 Análise Estatística	67
4 RESULTADOS.....	68
4.1 Avaliação anafilática dos anticorpos	68
4.1.1 Anticorpos IgG1 monoclonais.....	68
4.1.2 Anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos induzidos em camundongos imunizados com PI ou PIII.....	69
4.2 Seqüenciamento dos domínios CH₂ e CH₃ da cadeia pesada dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos	71
4.3 Análise da composição das cadeias de oligossacarídeos N-ligadas aos anticorpos monoclonais IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos	78
4.3.1 Cromatografia de Afinidade a lectina <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA).....	78
4.3.2 Afinidade de ligação dos anticorpos monoclonais IgG1 anafiláticos e não- anafiláticos a diferentes lectinas	80
4.3.3 Cromatografia de afinidade dos anticorpos monoclonais IgG1 em coluna de lectina extraída de <i>Triticum vulgare</i> acoplada a Agarose.....	83
4.3.4 Análise do conteúdo de ácido siálico e fucose nas cadeias de oligossacarídeos N- ligadas aos anticorpos IgG1 monoclonais por cromatografia de afinidade	86

4.3.5	Análise das cadeias de oligossacarídeos <i>N</i> -ligadas aos anticorpos IgG1 monoclonais por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperimétrico (HPAEC-PAD).....	88
4.4	Avaliação <i>in vivo</i> da atividade anafilática dos anticorpos IgG1 monoclonais após tratamento enzimático	93
4.4.1	Reação de PCA induzida por anticorpo monoclonal IgG1 deglicosilado.....	93
4.4.2	Reação de PCA induzida por anticorpo monoclonal IgG1 defucosilado ou dessialilado	94
4.5	Análise da afinidade de ligação dos anticorpos IgG1 monoclonais aos receptores FcγIII nos mastócitos	96
4.6	Avaliação da capacidade dos anticorpos monoclonais IgG1 de induzir desgranulação de mastócitos <i>in vitro</i>	98
4.7	Análise das cadeias de oligossacarídeos dos anticorpos IgG1 produzidos em resposta a imunização com antígenos de extrato de <i>Ascaris suum</i> (Asc)	100
4.7.1	Purificação dos anticorpos IgG1 de camundongos IFN-γKO ou IL-4KO e análise de suas cadeias de oligossacarídeos <i>N</i> -ligadas por cromatografia de afinidade.....	100
4.8	Análise da expressão gênica das enzimas envolvidas no processo de glicosilação anticorpos	108
4.9	Avaliação da atividade enzimática das sialiltransferases.....	115
5	DISCUSSÃO.....	119
6	CONCLUSÕES.....	133
	REFERÊNCIAS	135
	ANEXO	150

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 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 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 α e Ig β), 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, observa-se a presença das cinco classes de anticorpos, além das subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (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 α e Ig β , 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 e 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; 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/FcεRI 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 Fc γ R2 em comparação à observada em camundongos selvagens. Além destas observações, este estudo mostra ainda, que este efeito supressor do Fc γ R2 não ocorre na desgranulação celular induzida pela interação do alérgeno com a IgE ligada ao Fc ϵ R1 (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 (YAZDANBAKHSI 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 subsequentes 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 efetoras 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 ($\text{Man}_3\text{GlcNac}_2$ - 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 tetraanténrias (GEYER e GEYER, 2006).

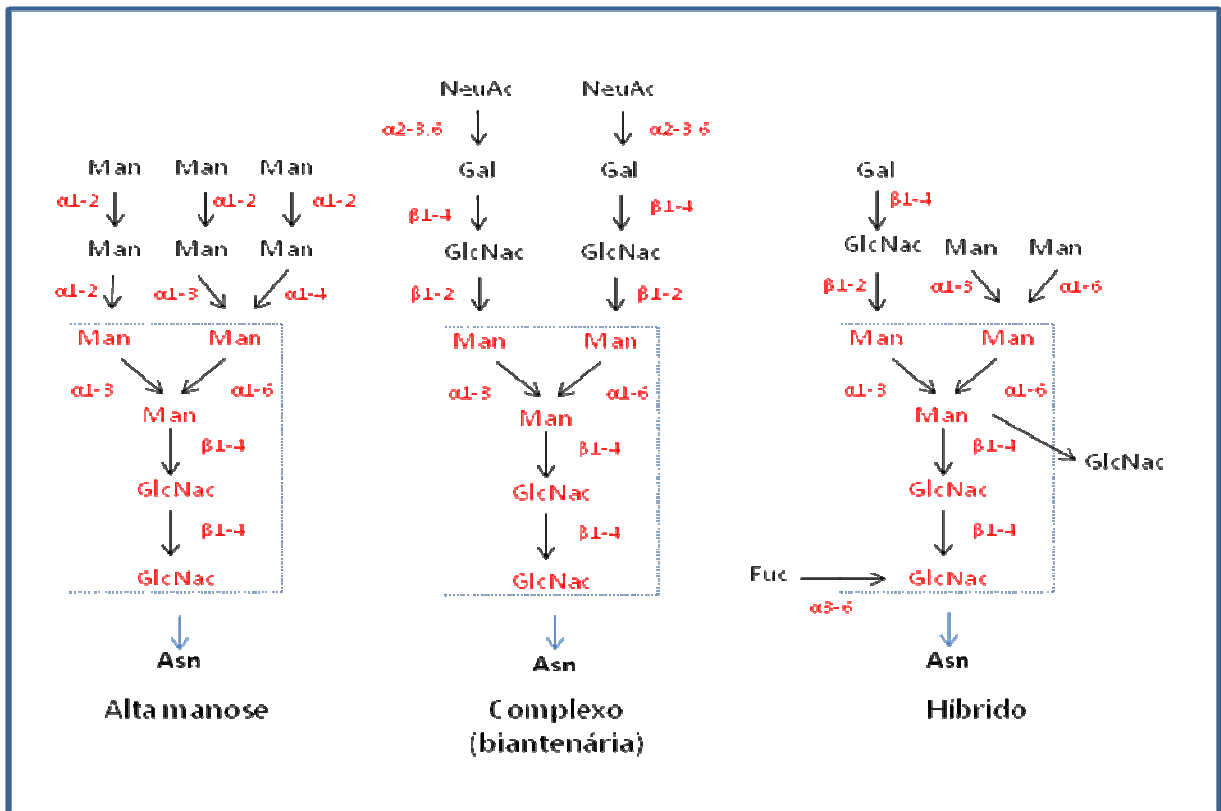


Figura 1 - Tipos principais de oligossacarídeos *N*-ligados à asparagina. A linha pontilhada ressalta o núcleo da cadeia que é composto por Man₃GlcNac₂. A este núcleo podem ser adicionados outros monossacarídeos como: Man (manose), GlcNac (N-acetilglucosamina), Gal (galactose), Fuc (fucose) e NeuAc (ácido 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; 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 glicofomas (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 glicofomas 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 $Fc\gamma R$ 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 glicofomas distintas de IgG humanas, geradas por mudanças na composição dos monossacarídeos da cadeia *N*-ligada, à seus receptores $Fc\gamma IIb$ 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.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar possíveis diferenças estruturais na região Fc dos anticorpos IgG1 murinos anafiláticos e não-anafiláticos.

2.3 Objetivos específicos

- Sequenciar os nucleotídeos que codificam a região constante dos anticorpos IgG1 a partir de RNA mensageiros extraídos dos hibridomas produtores destes anticorpos como também das células de camundongos deficientes em IL-4 ou IFN- γ imunizados com antígenos de alta e baixa massa molecular do extrato de *Ascaris suum* (PI e PIII).
- Avaliar a afinidade de ligação dos anticorpos IgG1 monoclonais à coluna de *Canavalia ensiformis*, classicamente empregada na classificação das cadeias de oligossacarídeos.
- Analisar a composição das cadeias de oligossacarídeos N-ligadas aos anticorpos IgG1 monoclonais, utilizando como ferramenta o teste de afinidade dos monossacarídeos a diferentes lectinas.
- Caracterizar as cadeias de açúcares associadas aos anticorpos em sistema de cromatografia de troca aniônica de alta resolução acoplada a um detector de pulso amperimétrico (HPAEC-PAD).
- Estudar a participação de resíduos específicos de carboidratos na capacidade dos anticorpos IgG1 anafiláticos de mediar reação de PCA *in vivo* bem como de induzir a desgranulação de mastócitos *in vitro*.
- Purificar anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos provenientes de soros dos camundongos deficientes em IFN- γ ou IL-4 previamente imunizados com PIII ou PI, utilizando cromatografia de afinidade.

- Analisar a expressão gênica de enzimas envolvidas no processo de glicosilação de proteínas em hibridomas produtores de IgG1 e linfócitos B purificados.
- Avaliar a atividade enzimática de sialiltransferases extraídas de hibridomas produtores de anticorpos IgG1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos da linhagem C57BL/6 geneticamente deficientes em IFN- γ (IFN γ KO) ou IL-4 (IL-4KO) machos, com 6-7 semanas de idade, provenientes do Biotério de Instituto de Ciências Biomédicas II-USP, foram utilizados nos protocolos de imunização para obtenção de anticorpos IgG1 anafiláticos ou não-anafiláticos, purificação de linfócitos B e para obtenção de células utilizadas na extração de RNA (ácido ribonucléico).

Camundongos BALB/c de ambos os sexos, com 5 semanas de idade, provenientes do biotério do Instituto Butantan, foram utilizados nos ensaios de PCA. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais do Instituto Butantan (Nº 308/06), assim como do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Nº 050/06).

3.2 Antígenos e Adjuvantes

Extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* foi preparado como descrito por Strejan e Campbell (1967) e utilizado por gel filtração, de acordo o protocolo descrito por Faquim-Mauro e Macedo (1998), para a obtenção dos componentes de alta e baixa massa molecular, denominado de PI (530 KDa) e PIII (29KDa), respectivamente.

Como adjuvantes foram utilizados o Completo de Freund (CFA), Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) e Hidróxido de alumínio, Pepsamar (Sanofi-Synthelabo de Colombia S.A, Santiago de Calli, Valle del Cauca, Colômbia) na proporção 1:1 (vol/vol) com os componentes do PI ou PIII, respectivamente, segundo o protocolo de imunização.

3.3 Obtenção dos anticorpos monoclonais IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos

3.3.1 Produção dos anticorpos IgG1 monoclonais *in vitro*

Anticorpos monoclonais foram obtidos pelo cultivo dos hibridomas produtores de IgG1 anafiláticos (clone U7.6) e IgG1 não-anafiláticos (clone B8401-H5) em meio de cultura RPMI 1640, Gibco (Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., Estados Unidos) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (Sigma), à 37 °C em estufa umidificada com 5% de CO₂. Os sobrenadantes foram concentrados por centrifugação em Centriprep 100, Amicon (Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos).

Os anticorpos IgG1 presentes nos sobrenadantes foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de proteína G-Sepharose, Amersham (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) e a concentração dos anticorpos foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.3.2 Purificação dos anticorpos IgG1 em coluna de proteína G-Sepharose

Os anticorpos IgG1 foram purificados por cromatografia de afinidade, em coluna de proteína G-Sepharose (Amersham). Para tanto, a coluna foi lavada e equilibrada com 30,0 mL de tampão fosfato de sódio Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) 0,01M pH 7,0 (tampão de ligação) e os sobrenadantes das culturas foram aplicados na coluna. Posteriormente, a lavagem da coluna foi realizada com o tampão de ligação para a retirada de todo o material não-ligado à resina. Os anticorpos foram eluídos da coluna com a aplicação de 20,0 mL de solução glicina (Merck) 0,1M pH 2,7. As frações foram coletadas em volume de 1,0 mL/tubo e o pH neutralizado com solução Tris (Merck) 2,0 M pH 9,0. O conteúdo protéico das frações foi monitorado pela leitura da absorbância a 280 nm em

espectrofotômetro. As amostras contendo os anticorpos foram dialisadas em salina tamponada com fosfato (PBS), concentradas e armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

3.3.3 Dosagem protéica das amostras

O método de Bradford (1976) foi utilizado para a determinação da concentração protéica das amostras. Para isto, as amostras foram diluídas em PBS e distribuídas em placas de 96 poços (Corning Costar, MA, Estados Unidos) em volume de 50 µL. Como curva padrão foi utilizada solução de soro albumina bovina (BSA, Sigma) na concentração de 500 µg/mL diluída na razão 1:2 (50 µL/poço). Após a distribuição das amostras e da curva padrão foi acrescentado 150 µL/poço do reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Estados Unidos) previamente diluído em água destilada (1:5). A placa foi lida em espectrofotômetro em filtro de 595 nm. O cálculo da concentração protéica foi feito utilizando o programa estatístico *Graphpad Instat* tendo como referência as densidades ópticas obtidas das amostras em relação à curva-padrão de BSA.

3.4 Produção dos dois subtipos de anticorpos IgG1 em camundongos imunizados com antígenos de alta ou baixa massa molecular (PI e PIII) do extrato de *Ascaris suum*

3.4.1 Protocolo de imunização

Para a obtenção de soros contendo predomínio de anticorpos IgG1 anafiláticos, grupos de 5-6 camundongos IFN- γ KO foram imunizados com PIII (150 μ g/animal) em hidróxido de alumínio (7,5 mg/animal), via intraperitoneal. No 10º dia pós-imunização os camundongos foram sacrificados e sangrados por punção cardíaca.

Na obtenção de anticorpos IgG1 não-anafiláticos, grupos de 5-6 camundongos IL-4KO foram imunizados com PI (150 μ g/animal) em CFA, na base da cauda. Após 8 dias da imunização os camundongos foram sacrificados e sangrados por punção cardíaca e os soros foram estocados para posterior utilização.

3.4.2 Protocolo de purificação de anticorpos IgG1 do soro de camundongos previamente imunizados

3.4.2.1 Acoplamento do extrato de *Ascaris suum* em Sepharose 4B

O extrato de *Ascaris suum* (Asc) foi acoplado a resina de SepharoseTM 4B ativada previamente por brometo de cianogênio (Amersham) da seguinte maneira: 3 mg da resina foi hidratada com solução de ácido clorídrico (HCl, Merck) a 1mM (200mL/g de resina) por 15 minutos em repouso. Após este período, a solução foi removida e adicionado novamente 200 mL de HCl 1mM e repetido este procedimento por mais 3 vezes. Paralelamente, o extrato de Asc foi dissolvido em solução de carbonato de sódio (Merck) 0,1M, pH 8,3 contendo cloreto de sódio (Merck) a 0,5M na proporção de 5,0 mL da solução para cada 1,0 g de proteína. Após lavagem e remoção do excesso do tampão, o extrato de Asc foi adicionado à resina, em seguida a mistura foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente (TA). Após essa incubação, a resina contendo o extrato de Asc foi lavada 5 vezes com 5,0 mL de tampão

carbonato de sódio (NaCO_3 , Merck) a 0,1M, pH 8,3; contendo NaCl a 0,5 M e adicionada solução de hidroximetil-aminometano mais ácido clorídrico (Tris-HCl) 0,1M, pH 8,0. A resina foi incubada por mais 2 horas TA e em seguida lavada 6 vezes, alternando os tampões: acetato de sódio (CH_3COONa , Merck) 0,1M, pH 4,0, contendo NaCl 0,5M (15,0 mL) e Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo NaCl 0,5M (15 mL). Ao final, a resina Asc-Sepharose foi estocada a 4° C para posterior utilização.

3.4.2.2 Cromatografia de afinidade em coluna de Asc-Sepharose

Para a purificação dos anticorpos anti-Ascaris presentes nos soros dos camundongos previamente imunizados como descrito no ítem 3.4.1 foi feita uma mistura dos soros de 5-6 animais/grupo seguida de diluição de 1/50 em tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4 , Merck) 0,01M, pH 7,0. Essas amostras de soros diluídas (1,0 mL) foram aplicadas na coluna Asc-Sepharose 4B previamente equilibrada em tampão de ligação (NaH_2PO_4) 0,01M, pH 7,0 e em seguida, foi aplicado 5,0 mL do mesmo tampão de ligação. Os anticorpos anti-Asc ligados à resina foram eluídos com solução Glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, Merck) 0,1 M, pH 2,7 e as frações coletadas em volume 1,0 mL/tubo. As frações contendo os anticorpos anti-Asc foram concentradas em sistema de centriprep membrana YM-100 (Amicon), dialisadas contra PBS 0,01 M, pH 7,2 e determinada a concentração protéica pelo método de Bradford.

3.4.2.3 Separação dos anticorpos IgG1 em coluna de proteína A-Sepharose

Para a obtenção dos anticorpos da subclasse IgG1, amostras dos anticorpos purificados Asc-específicos (0,87 mg/mL) foram aplicadas na coluna de proteína A-Sepharose em tampão de ligação, composta por solução de 0,02M de fosfato de sódio (NaH_2PO_4) contendo 0,15M de cloreto de sódio (NaCl) pH 8,0. Os anticorpos não-ligados à coluna foram coletados e concentrados, enquanto que os anticorpos com afinidade à proteína A (IgG2a, IgG2b e IgG3)

foram eluídos da coluna com duas soluções de fosfato de sódio (Na_2HPO_4) a 0,2M, pH 5,0 ou pH 2,5, contendo 0,1M de ácido cítrico (Merck).

Os anticorpos que não se ligaram à coluna, correspondentes aos da subclasse IgG1, foram concentrados e reaplicados na coluna, previamente equilibrada em tampão 1M de Glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) em 2M de cloreto de sódio (NaCl) pH 9,0. Após essa etapa, a coluna foi lavada com este mesmo tampão e feita a eluição dos anticorpos ligados à coluna com solução 0,15M de NaCl pH 3,0. As frações eluídas foram coletadas (1mL/tubo) e concentradas em sistema de centriplus YM-100 (Amicon), dialisadas contra PBS 0,01 M pH 7,2 para posterior determinação do conteúdo protéico.

3.5 Ensaio imunoenzimático para dosagem de anticorpos anti-PI, PIII do extrato bruto de *Ascaris suum*

Placas de 96 poços de poliestireno (Costar) foram sensibilizadas (100 μL /poço) com componentes de alta (PI) ou baixa massa molecular (PIII) do extrato de Asc (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluída em tampão PBS pH 7,5 e incubadas por 18 horas a 4 °C, em câmara úmida. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS+0,05% Tween 20 (PBST) (Synth). Após esse procedimento, foi feito o bloqueio das placas com PBS + 3% de gelatina com incubação de 3 horas a 37 °C. Em seguida, foi realizado novo ciclo de lavagens (3 vezes) com PBST e adicionadas as amostras contendo os anticorpos diluídos na razão 1:2 em solução PBS + 0,5 % de gelatina, com incubação por 1 hora a 37 °C. Após esta etapa, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e acrescentados os anticorpos anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG3 ou anti-IgM, Southern (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Estados Unidos) de camundongo marcados com biotina diluídos 1/1000 em PBST + 0,5% de gelatina Synth (Labsynth Ltda, São Paulo, SP, Brasil), seguida de nova incubação por 1 hora a 37 °C. Após o procedimento de lavagem, foi acrescentado à placa o conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase

(Sigma) diluído 1/6000 em PBST+0,5% de gelatina, com incubação de 1 hora a 37 °C. Após esse período, as placas foram lavadas e a reação revelada pela adição de 1 mg/mL de *orto*-fenildiamina (OPD, Sigma) e peróxido de hidrogênio (30%) diluídos em tampão citrato de sódio 0,5 M pH 5,0. Após 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico a 30% (Merck). A absorbância foi determinada a 492 nm em leitor de ELISA (Electron Corporation, Shanghai, China).

3.6 Purificação de Linfócitos B provenientes de camundongos

Camundongos da linhagem C57BL/6 IFN- γ KO ou IL-4KO, previamente imunizados ou não, foram sacrificados e os baços retirados e macerados em homogeneizadores estéreis contendo meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 2 mM de L-glutamina, 50 μ M de 2-mercaptoetanol e 5% de soro fetal bovino (Meio de cultura suplementado). As suspensões celulares obtidas foram centrifugadas e ressuspensas em água destilada e deionizada estéril (1,0 mL/baço) para promover a lise das hemácias e em seguida adicionados mais 20,0 mL de meio de cultura suplementado. Nova centrifugação foi realizada a 4 °C por 8 minutos a 500 x g e as células ressuspensas em 10,0 mL de meio de cultura suplementado. Em seguida foi avaliada viabilidade celular e determinada a concentração de células/ suspensão pela técnica de exclusão utilizando o corante *trypan blue* 0,1% (Sigma) em câmara de Neubauer.

A partir da suspensão celular, os linfócitos B (células CD19 positivas) foram purificados pelo sistema MidiMACS (Miltenyi Biotec Inc. Auburn, CA, Estados Unidos) segundo Sudowe et al. (2000). Para isto, a suspensão celular foi ajustada para concentração de 1×10^7 células /mL em tampão PBS contendo 0,5% de BSA-EDTA 2mM pH 7,2 e incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD19 biotilado (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) na concentração de 1 μ L / 10^6 células por 30 minutos a 4 °C. Após este período, as células foram lavadas com 5 mL do tampão, centrifugadas nos mesmos

parâmetros descritos anteriormente e ressuspensas em 500 μ L do tampão. Posteriormente, foi acrescentado 20 μ l/10⁷ células do conjugado anti-biotina acoplado às microesferas magnéticas (Milteny Biotec), seguida de incubação por 20 minutos a 4 °C. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 800 μ l do tampão e aplicadas na coluna MidiMACS acoplada ao campo magnético. As células não marcadas foram eluídas da coluna com a aplicação de 10,0 mL de tampão. Após este procedimento, a coluna foi retirada do campo magnético e as células CD19 positivas foram eluídas com a aplicação do tampão à coluna. A suspensão celular obtida foi centrifugada e realizada a contagem das células purificadas, como descrito acima.

3.7 Obtenção de RNA e seqüenciamento dos domínios C_{H2} e C_{H3} dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos

3.7.1 Obtenção de RNA

Os hibridomas produtores de IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos foram cultivados para obtenção de RNA de acordo como descrito no item 3.3. Para a coleta das células e posterior extração de RNA, a concentração celular *in vitro* foi monitorada nos diferentes dias de cultivo com o auxílio da câmara de Neubauer.

Camundongos IL-4KO e IFN γ -KO imunizados respectivamente, com os componentes do PI ou PIII como descrito no item 3.4.1, foram também utilizados como fonte de RNAs dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos.

Após 6 dias da imunização, todos os camundongos foram sacrificados e, dos animais IL-4KO foram retirados os linfonodos periaórticos e inguinais e, dos IFN- γ KO os baços para a preparação das suspensões celulares. Amostras de 2x10⁷ células foram centrifugadas por 8 minutos 500 x g. Os sedimentos celulares ressuspensos em 1,0 mL de solução de fenol

(Merck) e isotiocianato de guanidina (Trizol[®], Invitrogen) e posteriormente foi realizada a extração dos RNAs mensageiros.

3.7.2 Extração e quantificação de RNA

O isolamento do RNA dos hibridomas ou das células obtidas dos camundongos foi feito acrescentando-se 200 µL de clorofórmio e 1,0 mL de glicogênio (20 mg/mL) com subsequente agitação por 15 segundos e incubação por 2 horas a -20 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (12.000xg/15min/ 4 °C), o que permitiu a separação da solução em uma fase aquosa e outra orgânica. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e o RNA foi precipitado pela adição de 0,5 mL álcool isopropílico seguida de agitação mecânica (Sieger – Equipamentos Médicos Laboratoriais, São Paulo, SP, Brasil) por 10 segundos e incubação 45min/1h a TA.

O precipitado (RNA) foi lavado com 1,0 mL de etanol (Merck) a 75%, seguido de centrifugação (7.500xg/5min/4 °C). Após secagem do precipitado a vácuo (5-10 min), o mesmo foi ressuspensão em 30 µL de água livre de RNAses e DNAses (Invitrogen). Para a determinação da concentração de RNA, amostras diluídas 1/50-1/100 foram obtidas e analisadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 260 e 280nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias 260/280 nm foi superior a 1,8. Considerando que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA por mL de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula: A = absorbância e D = diluição da alíquota usada para a quantificação.

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

3.7.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada a partir das amostras obtidas utilizando oligonucleotídeos complementares à cauda de poli-A do RNAm. Para cada amostra contendo 3 µg de RNA total foi adicionado 1,0 µL de oligo dT (500 µg/mL) (Invitrogen) e água autoclavada completando volume final de 12 µL. Em seguida, os tubos foram aquecidos por 10 minutos a 70 °C e resfriado em gelo. Após a incubação, foi adicionado 4,0 µL de tampão “first strand buffer” (5 x concentrado), 1,0 µL contendo cada dNTP (10mM), 2,0 µL de DTT (0,1M) e as amostras incubadas por 2 minutos a 4 °C. Posteriormente, foi adicionado 1,0 µL da enzima transcriptase reversa Superscript (200 U- Invitrogen) em cada amostra com subsequente incubação a 42 °C por 50 minutos. Após este período, todas as amostras foram incubadas por 5 minutos a 90 °C, para inativação da enzima e adicionado 1µL de RNase H (GE-Amershan) com incubação por 20 minutos a 37 °C. No fim desta etapa, as amostras foram estocadas à -20 °C para posterior utilização nos ensaios de PCR (DIEFFENBACH et al., 1993).

3.7.4 Reação de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação da proteína constitutiva β-actina

Após a síntese do cDNA, foi realizada a amplificação da proteína β-actina utilizando-se um par de seqüências de nucleotídeos complementares ao gene *β-actina* (*primers*) e que amplificam um fragmento de 394 pb dessa proteína. Cada reação foi realizada acrescentando-se 1,0 µL de cDNA; 39,1 µL de água (Gibco); 5,0 µL de tampão (10x concentrado); 1,5 µL de cloreto de magnésio (50mM); 1,0 µL do *primer 1* (senso); 1,0 µL do *primer 2* (anti-senso); 1,0 µL de dNTP (10 mM) e 0,4 µL da enzima Taq polimerase (Invitrogen). As amostras foram colocadas no termociclador (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e incubadas a 95 °C por 2 minutos, seguida de 1 minuto a 94 °C; e 18 ciclos de temperatura 94 °C por 45 segundos, 68

°C por 45 segundos; e 72 °C por 45 segundos. Ao final dos ciclos, as amostras foram mantidas a 72 °C por 45 segundos e seguida a 4 °C.

Os produtos obtidos da amplificação do DNA complementar (cDNA) para *β-actina* foram observados por eletroforese em gel contendo 1,5 % de agarose (Bio-Rad) e 0,01% de brometo de etídio (Sigma).

3.7.5 Seqüenciamento dos domínios C_{H2} e C_{H3} de anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos

3.7.5.1 Preparo das amostras de cDNA para o seqüenciamento

Para realizar o seqüenciamento dos nucleotídeos que codificam os domínios C_{H2} e C_{H3} da cadeia pesada das moléculas de IgG1 anafiláticas e não-anafiláticas, amostras de cDNA foram submetidas a reação de PCR, utilizando um par de *primers* que promovem a amplificação da metade final do domínio C_{H1} até o final do domínio C_{H3}. Todos os *primers* utilizados foram delineados e sintetizados a partir da seqüência de genes que codificam a molécula de IgG1 murina, descrita por Honjo et al. (1979).

Seqüência do *primer* senso (5'-3'): ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA

Seqüência do *primer* anti-senso (5'-3'): GGT GGA GGT AGG TGT CAG AGT CCT

Reações de 50 µL foram realizadas utilizando-se 2,0 µL de cDNA de cada amostra acrescidos de 19,5 µL de água; 5,0 µL do tampão de PCR (10x concentrado); 1,0 µL de dNTP (10 mM); 1,5 µL de cloreto de magnésio (100 mM); 10,0 µL do *primer* senso (25 nM); 10,0 µL do *primer* anti-senso (25 nM) e 1,0 µL da enzima Taq polimerase. As amostras preparadas foram amplificadas em 30 ciclos, em uma reação de desnaturação de 1 minuto a 94 °C, ciclo de 1 minuto a 55 °C e 1 minuto a 72 °C. Ao término dos ciclos de amplificação os produtos gerados foram visualizados por eletroforese em gel contendo 1,5 % de agarose e 0,01% de brometo de etídio (Sigma).

3.7.5.2 Purificação dos produtos amplificados por PCR para posterior seqüenciamento

Para a purificação dos produtos da PCR gerados na reação acima descrita, foi utilizado o sistema SVGel e de limpeza de produtos de PCR- Wizard (Promega Corporation, Wisconsin, Estados Unidos). Com esta finalidade, foram acrescentados 50 µL de tampão de ligação fornecido no Kit de purificação em cada amostra, as quais foram aplicadas nas mini-colunas inseridas dentro de tubos coletores e incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto. Todos os tubos foram centrifugados 16.000 x g /1minuto e descartado o líquido presente no tubo. Em cada mini-coluna foi adicionado 700 µL de solução de lavagem e novamente os tubos foram centrifugados a 16000 x g por 1 minuto. As mini-colunas foram retiradas dos tubos, o líquido descartado e as colunas re-inseridas nos respectivos tubos. Este processo de lavagem da coluna com tampão de lavagem foi repetido acrescentando-se 500 µL de tampão, seguida de centrifugação e descarte do líquido.

Ao final deste procedimento, as colunas foram transferidas para novo tubo coletor, adicionados 50 µL de água livre de nuclease e incubados por 1 minuto (TA) para a eluição do material contido nas mini-colunas. Nova centrifugação foi realizada a 16000 x g por 1 minuto e o produto de PCR purificado foi estocado a 4 °C.

3.7.5.3 Seqüenciamento da região constante da cadeia pesada dos anticorpos IgG1

Para o seqüenciamento dos nucleotídeos da região constante das moléculas de IgG1, 1,0 µL dos produtos de PCR amplificados e purificados foram colocados em tubos de 0,5 mL e adicionados 5,5 µL de água e 1,0 µL do *primer* senso 1 ou do *primer* senso 2 (3,2 pM).

Todas as amostras foram preparadas com o *primer* senso 1 e senso 2.

Primer senso 1: ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA

Primer senso 2: AGGTGCACACAGCTCAGACGGCAAC

Todas as amostras foram enviadas para o Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan e os seqüenciamentos foram feitos pelo método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (SANGER et al., 1977), em um seqüenciador *ABI 3100* da *Applied Biosystems*, utilizando eletroforese capilar.

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisadas utilizando-se o programa *software* DNASTAR. Os resultados foram comparados entre si para a análise da homologia e também em relação à seqüência depositada no *GenBank* utilizando-se o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

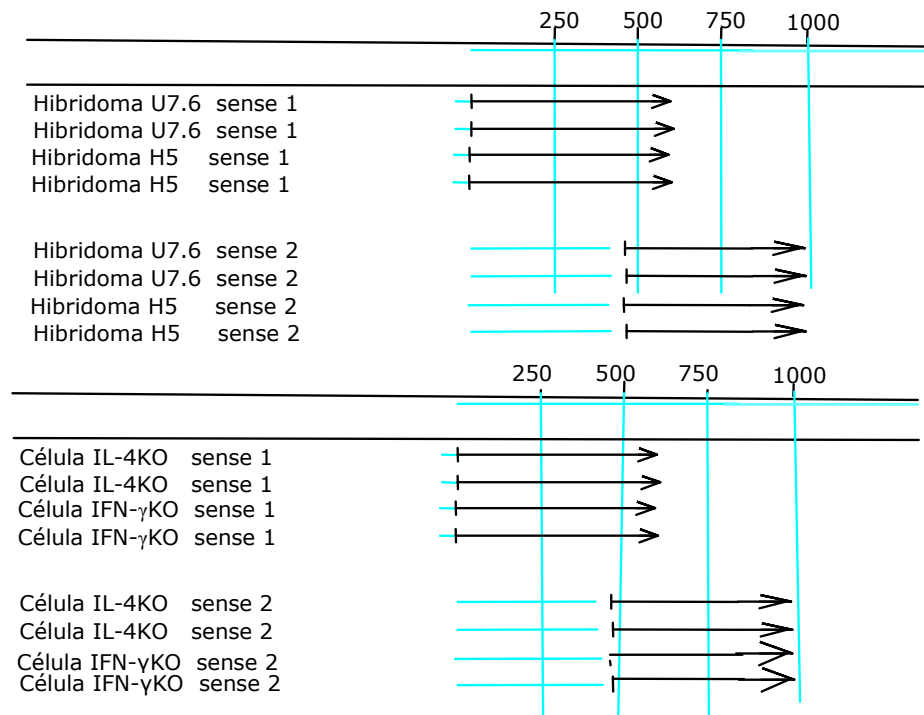


Figura 2 - Estratégia utilizada para o seqüenciamento dos nucleotídeos que codificam os domínios C_{H2} e C_{H3} da região constante das moléculas de IgG1. Duplicata das amostras de cDNA obtidas dos hibridomas produtores dos anticorpos IgG1 anafilático ou não-anafilático ou das células $CD19^+$ foram colocadas em tubos de 0,5 mL e adicionado o *primer* senso 1 ou senso 2 e submetidas ao seqüenciamento.

3.8 Obtenção dos fragmentos Fab e Fc de anticorpos IgG1 por digestão por papaína

Para obtenção dos fragmentos Fab e Fc dos anticorpos IgG1 monoclonais anafiláticos e não-anafiláticos, os mesmos foram submetidos à clivagem por papaína acoplada à agarose (Sigma), como descrito por Coulter e Harrys (1983). Assim, para cada 1 mg de anticorpo IgG1 diluído em PBS, foi adicionado 3,2 mg de hidrocloreto de cisteína; 1,6 mg de EDTA e 0,25 mg de papaína em fase sólida em volume final de 1,0 mL e as amostras foram incubadas a 37 °C por 4 horas em agitação. O material digerido foi separado da enzima por centrifugação (1200xg por 5 min). Os fragmentos Fab e Fc foram purificados por cromatografia de afinidade a proteína A-Agarose (Sigma) utilizando o protocolo descrito no item 3.4.2.3. As frações foram coletadas, dialisadas contra PBS, concentradas em sistema de ultra-centrifugação (Millipore) e a concentração protéica determinada pelo método de Bradford. A pureza dos fragmentos Fab e Fc foi analisada por eletroforese em gel de 12% de poliacrilamida corado com *Coomassie Blue* (Bio-Rad), segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970).

3.9 Ensaios de afinidade de ligação dos anticorpos as diferentes lectinas

3.9.1 Ensaio *in vitro* de afinidade dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos a diversas lectinas (ELISA)

A afinidade de ligação dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos as diferentes lectinas foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA), usando placas de 96 poços (Costar) sensibilizadas com 1 µg/mL das seguintes lectinas: *Canavalia ensiformis*, *Limulus polyphemus*, *Sambucus nigra*, *Datura stramonium*, *Ulex europaeus I*, *Bauhinia purpúrea* ou *Erythrina cristagali* (Sigma) (Tabela 1) previamente diluídas em PBS pH 7,2 e

incubadas por 18 horas a 4 °C. As placas foram lavadas com PBST e bloqueadas com 200 µL/poço de PBST acrescido de 3% de gelatina, por 3 hora a 37 °C.

As placas foram lavadas com solução PBST por 3 vezes e adicionados os anticorpos IgG1 anafiláticos, não-anafiláticos e o anafilático/tratado com PNGase F (deglicosilado) na concentração de 5 µg/mL (100 µL/poço). Nova incubação foi feita por 1 hora a 37 °C, seguida de 3 lavagens com PBST e adicionado 100 µL/poço do anticorpo anti-IgG1 de camundongo biotilado (1 µg/mL). As placas foram novamente incubadas por mais 1 hora a 37 °C e lavadas 3 vezes com PBST. O conjugado de estreptoavidina-peroxidase (diluído 1/6000, Sigma) foi distribuído nas placas e realizada outra incubação de 1 hora a 37 °C.

A reação foi revelada adicionando-se 100 µL/poço do substrato enzimático contendo 10 mg do cromógeno OPD (Sigma) e 10 µL de peróxido de hidrogênio 30% (Sigma) diluídos em 10 mL de tampão citrato de sódio 0,1 M. A reação foi parada após 15 minutos com solução de ácido sulfúrico (2 %) e a leitura das placas feita em leitor de ELISA (Electron Corporation).

Tabela 1 – Afinidade das lectinas por monossacarídeos

LECTINA	α man	α Glc	α Fuc	β Gl	α Gal	α GlcNac	β GlcNac	Neuac
<i>Canavalia ensiformis</i>	+	+				+		
<i>Limulus polyphemus</i>								+
<i>Sambucus nigra</i>				+				+
<i>Datura stramonium</i>							+	
<i>Ulex europeaus I</i>			+					
<i>Bauhina purpurea</i>						+	+	
<i>Erythrina cristagalli</i>				+	+	+	+	

Fonte: Ey Laboratories, Inc.

Man=manose; Glc=glucose; Fuc=fucose; Gal=galactose; GlcNac= acetilglucosamina; Neuac= ácido siálico

3.10 Análise dos oligossacarídeos *N*-ligados aos anticorpos IgG1

3.10.1 Preparo das amostras e tratamento enzimático

Anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos (1mg/mL) foram dialisados contra água ultrapura Milli-Q (Millipore) por 24 horas, posteriormente liofilizados Termo Savant SC110A Speed Vac Plus (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, Estados Unidos) e dissolvidos em solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,5% contendo 1% de 2-mercaptoetanol. As amostras foram, então aquecidas por 2 min a 100 °C e adicionados: o tampão de digestão (500 mM de fosfato de sódio, pH 7,5, NP-40 1%) e a enzima PNGase F (New England Biolabs Inc., Beverly, M, Estados Unidos) na proporção de 3 µL para cada 600 µg de glicoproteína, seguida de incubação por 18 horas a 37 °C. Os oligossacarídeos foram isolados dos anticorpos por centrifugação em filtros Millipore (MW 5KDa) e analisados por cromatografia de troca aniônica de alta resolução acoplada a um detector de pulso amperimétrico (HPAEC-PAD).

3.10.2 Análise das cadeias de carboidratos por HPAEC-PAD

As cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas aos anticorpos IgG1 e obtidas como acima descrito, foram purificadas em coluna de sílica sepPack-5000 (Millipore) e submetidas à cromatografia em coluna Carbopac PA-100 acoplada a um sistema DX-300 Dionex BioLC (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com detector de pulso amperimétrico.

Para a detecção dos oligossacarídeos neutros, após a aplicação das amostras foi

passada no sistema a solução de hidróxido de sódio 100 mM por 5 minutos a 1,0 mL/minuto, seguida de gradiente de eluição composta por solução de hidróxido de sódio 100 mM contendo acetato de sódio de 0-50 mM por 60 minutos.

Para a eluição dos oligossacarídeos acídicos, após a aplicação das amostras no sistema, foi passada solução de hidróxido de sódio 50 mM contendo 100 mM de acetato de sódio por 5 minutos e em seguida de gradiente de eluição com solução de 100 mM de hidróxido de sódio e 50-170 mM de acetato de sódio durante 60 minutos com fluxo de 1,0 mL/min.

O perfil obtido com as amostras de oligossacarídeos foi comparado ao previamente estabelecido como cadeias de oligossacarídeos padrões.

3.11 Modificação dos resíduos da cadeia de carboidratos dos anticorpos IgG1 anafiláticos por tratamento enzimático

3.11.1 Obtenção de anticorpos IgG1 deglicosilados

Alíquotas de 240 µg de anticorpo IgG1 anafilático foram diluídas em 40 µL de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,5 e tratadas com 120 mU da enzima PNGase F por 18 horas a 37 °C. A enzima foi inativada pela adição de 0,2% de solução de SDS de acordo o protocolo descrito por Verbet (1995). As amostras após o tratamento foram novamente dialisadas em PBS e estocadas para posterior utilização.

3.11.2 Obtenção de anticorpos IgG1 dessialilados

Amostras do anticorpo IgG1 anafilático (1,0 mg) diluídas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 foram incubadas por 18 horas a 37 °C com a enzima neuraminidase específica aos resíduos de α 2-3, α 2-6 e α 2-8 ácido siálico ligados (*Clostridium perfringens*-New England

Biolabs), na proporção de 1 µL da enzima para 12 µg de anticorpo IgG1. A eficiência do tratamento foi avaliada por cromatografia de afinidade usando a coluna de *Sambucus nigra*-Sephrose (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, Estados Unidos) e por análise eletroforética em gel de 9% de poliacrilamida corado com *Coomassie Blue* (Bio-Rad Laboratories, In., Hercules, CA, Estados Unidos), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). Após a confirmação da eficácia do tratamento, as amostras foram testadas quanto à sua atividade anafilática em reações de PCA *in vivo* ou em ensaio de ligação aos mastócitos *in vitro*, por meio da análise por citometria de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) da enzima β-glucuronidase.

3.11.3 Obtenção de anticorpos IgG1 defucosilados

Anticorpos IgG1 anafiláticos diluídos em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5 foram tratados com a enzima α-fucosidase (*Xanthomonas manihotis*, New England Biolabs), na proporção de 1,0 µl da enzima para cada 12µg de anticorpo, por 18 horas à 37 °C. Para avaliar a eficiência do tratamento enzimático, as amostras tratadas foram analisadas por afinidade a coluna de *Ulex europeaus* I-Agarose (específica para resíduos de α-L-fucose em glicoproteínas).

3.12 Análise da atividade anafilática dos anticorpos IgG1

3.12.1 Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva

A atividade anafilática dos anticorpos IgG1 produzidos *in vitro* ou purificados a partir dos soros dos camundongos foi avaliada em reação de anafilaxia cutânea passiva, como descrito por Ovary (1958). Camundongos BALB/c previamente tricotomizados no dorso

foram injetados com diferentes concentrações dos anticorpos IgG1. Após período de sensibilização de 2 horas, os animais foram desafiados intravenosamente com uma mistura de azul de Evans (Sigma) a 0,25% e DNP-BSA (2mg/mL) ou extrato de Asc (2 mg/mL). Passados 30 minutos do desafio, os camundongos foram sacrificados e a leitura da reação analisada na pele invertida dos animais.

Anticorpos IgG1 foram considerados anafiláticos quando induziram no dorso do animal reações positivas com no mínimo 5 mm de diâmetro. Todos os testes foram feitos em triplicata e a variação dos títulos de PCA igual ou menor do que 2 vezes, sendo que somente diferenças acima destes valores foram consideradas significantes (ISHIZAKA et al., 1966).

3.12.2 Análise da ligação dos anticorpos IgG1 à mastócitos *in vitro* por citômetria de fluxo

Amostras de anticorpos IgG1 anafiláticos, não-anafiláticos ou tratados enzimaticamente foram testados quanto à sua afinidade de ligação *in vitro* à uma linhagem de mastócitos de camundongo (PT18), as quais expressam FcεRI e FcγRII/III e apresentam as mesmas características funcionais que mastócitos/basófilos *in vivo* (VANDERHOEK et al., 1982; FAQUIM-MAURO et al., 2003) . Para isto, utilizamos o ensaio de incubação por 30 minutos a 4 °C de diferentes concentrações dos anticorpos IgG1 anafiláticos, não-anafiláticos e IgG1 dessialilados com os mastócitos. Após o período de incubação, as células foram lavadas com solução de PBS contendo 0,1% BSA e incubadas com anticorpo biotilado anti-IgG1 de camundongo, por mais 30 minutos a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com estreptoavidina-FITC para posterior análise em citômetro de fluxo, segundo descrito por Faquim-Mauro et al. (2003).

3.12.3 Ensaio de desgranulação de mastócitos *in vitro* e detecção da atividade da enzima β -glucuronidase

A capacidade dos anticorpos IgG1 anafiláticos, não-anafiláticos ou dessialilados de induzir a desgranulação de mastócitos (linhagem PT18) foi investigada *in vitro* usando a metodologia de determinação da atividade da enzima β -glucuronidase liberada por essas células após a sua desgranulação, de acordo com Ortega et al. (1991).

Para isto, 8×10^5 mastócitos foram incubados por 30 minutos a 37°C / 5% CO_2 com 20 ng de IgG1 anafilático, não-anafilático ou dessialilado em tampão de sódio PIPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}$, Sigma) contendo 10% de albumina bovina (Sigma) e cloreto de cálcio (CaCl_2 , Merck) 1M. As células foram lavadas com Na-PIPES e desafiadas com 5 ng de DNP-BSA. Em seguida, as células foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados. As células incubadas apenas com tampão Na-PIPES foram lisadas com 200 μL de tampão acetato de sódio (CH_3COONa , Merck) 0,1M, pH 4,5 para avaliar o conteúdo total da enzima nos grânulos dos mastócitos. Para cada amostra experimental, 20 μL da solução do substrato (ácido glucurônico fenolftaleína a 0,01M, Sigma) em 70 μL de tampão acetato de sódio a 0,1M, pH 4,5; foi adicionada e as placas foram incubadas por 12 horas a 37°C . A reação foi parada pela adição de 100 μL de solução de glicina (Merck) a 0,2M, pH 10,7 e a densidade óptica determinada a 570 nm no leitor de ELISA (Electron Corporation). O índice de secreção foi expresso como a porcentagem da atividade da enzima β -glucuronidase nos sobrenadantes das células não-estimuladas. Os resultados representam a média das amostras em triplicata de três ensaios independentes \pm desvio padrão.

3.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese com agente desnaturante (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). Para tanto, foi utilizado um gel de empilhamento contendo 3% de bisacrilamida/acrilamida em Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e 1 % SDS e um gel de separação contendo 9% de bisacrilamida/acrilamida em Tris-HCl 2,0M pH 8,8 e 1% SDS. As amostras foram dissolvidas em tampão (Tris-HCl 0,625 mM pH 6,8; 10% glicerol (v/v); 5% β -mercaptoetanol (v/v); 2 % de SDS e 0,001 % de azul de bromofenol) e aquecidas a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, foram aplicadas nos poços do gel assim como o padrão de peso molecular *Color Plus*, (New England BioLabs). O tampão de corrida foi constituído por Tris-HCl 0,25 mM, glicina 0,19 M e SDS a 0,1 %, pH 8,3 e realizada com uma corrente de 20 mA por 2 horas. Ao final da corrida, o gel foi imerso em solução de 0,2 % (m/v) de *Coomassie Blue R-250* (Bio-Rad) em água e metanol na proporção de 1:1 (v/v) para a visualização do padrão de bandejamento das proteínas presentes nas amostras. Após esse período, o excesso de corante foi retirado mergulhando o gel em solução de 30% de metanol (Merck), 10% de ácido acético (Merck) em água destilada.

3.14 Cromatografia de afinidade às lectinas

As cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas aos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos foram avaliadas quanto à sua composição utilizando a estratégia de afinidade de ligação a diversas lectinas imobilizadas em colunas de Sepharose ou Agarose (cromatografia de afinidade).

3.14.1 Coluna de lectina *Canavalia ensiformis* - sepharose

Anticorpos monoclonais IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos foram testados quanto à sua afinidade de ligação à lectina ConA acoplada a Sepharose 4B (Sigma). Na coluna de ConA, amostras contendo 500 µg de IgG1 anafilático ou IgG1 não-anafilático foram aplicadas em tampão Tris 20 mM pH 7,4 contendo 0,5 M de cloreto de sódio (tampão Tris/NaCl) e em seguida passados mais 25 mL de tampão Tris/NaCl. Após esse procedimento, os anticorpos ligados à ConA foram eluídos com a aplicação de soluções de Tris/NaCl contendo 5, 50 ou 500 mM do açúcar competidor α -metil-D-manopiranosídeo (Sigma). O perfil cromatográfico foi definido com a leitura de todas as frações coletadas em espectrofotômetro modelo Bakman DU 640 (Beckman Inc., Palo Alto, CA, Estados Unidos) à 280 nm.

3.14.2 Coluna de lectina *Triticum vulgaris* -agarose

Para o ensaio de afinidade dos anticorpos IgG1 à lectina *Triticum vulgaris*-Agarose (Sigma), a coluna contendo a resina foi equilibrada com tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4) 50 mM contendo 0,2 M de cloreto de sódio (NaCl) pH 7,0. Em seguida, foram aplicados na coluna, 500 µg de cada anticorpo ou ainda uma mistura de ambos os subtipos de IgG1 (250 µg/cada) em um volume de 1,0 mL. Após a aplicação das amostras foram passados 10,0 mL do tampão fosfato de sódio/NaCl seguida de 30,0 mL de tampão contendo 100 mg/mL de *N*-acetilglucosamina para a eluição do material adsorvido à coluna. Frações de 1,0 mL foram coletadas e lidas a 280 nm em espectrofotômetro.

3.14.3 Coluna de *Sambucus nigra*-Sephrose

Os anticorpos IgG1 anafiláticos, não anafiláticos ou IgG1 dessialilados foram aplicados na concentração de 1 mg/mL na coluna de *Sambucus nigra*, específica ao ácido siálico ligado na posição α 2-6Gal/GalNac da cadeia de carboidrato, utilizando como tampão de ligação TBS (solução salina tamponada com borato). Após 10 minutos da aplicação, foi procedida a eluição do material ligado à lectina utilizando-se soluções de TBS contendo 0,5 M de lactose seguida de solução contendo 0,5 M de lactose e 0,2 M de ácido acético (CH₃COOH), segundo protocolo fornecido pelo fabricante (Vector Laboratories). Frações de 1,0 mL foram coletadas e o perfil cromatográfico determinado pela leitura das amostras a 280 nm em espectrofotômetro.

3.14.4 Coluna de *Ulex europeus* – Sepharose

Como descrito acima, amostras de anticorpos IgG1 anafiláticos, não-anafiláticos ou IgG1 defucosilados (1 mg/mL) foram aplicados na coluna de *Ulex europeus I* em tampão de ligação TBS. Após 10 minutos de incubação dos anticorpos na resina, foi feita a lavagem da mesma com tampão TBS (10 mL) e a eluição do anticorpo ligado com a aplicação de solução PBS pH 7,4 contendo 0,1 M de L-fucose. As frações obtidas foram coletadas e lidas a 280 nm em espectrofotômetro.

3.15 Reações de PCR em Tempo-Real

3.15.1 Padronização das reações de PCR em Tempo Real

A expressão dos genes que codificam algumas das enzimas envolvidas no processo de glicosilação de anticorpos foi analisada por PCR em Tempo Real, técnica fundamentada na detecção e quantificação de um repórter fluorescente (LIVAK et al., 1995). O aumento de sinal fluorescente é diretamente proporcional à quantidade do produto amplificado em PCR. Inicialmente, realizamos reações de PCR para padronizar de cDNA das amostras, analisando a expressão do gene constitutivo *β -actina*.

Para cada reação, 1 μ l do cDNA das diferentes amostras foi adicionada a uma solução contendo um par de *primers* complementares à seqüência-alvo juntamente com a enzima *Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG* (Invitrogen) de acordo com a tabela 2. As reações foram colocadas no aparelho Chromo 4 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, Estados Unidos), e submetidas a uma fase inicial de incubação à 50 °C por 2 minutos, seguido da fase de ativação da enzima (hot start) 95 °C por 5 minutos. As seqüências-alvo foram, amplificadas durante 50 ciclos de etapas sucessivas de desnaturação (95 °C por 20 segundos) e anelamento (60 °C/35 segundos). Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase de dissociação (Melting), onde a temperatura variou de 55 °C a 90 °C e a fluorescência foi adquirida a cada 1 °C, registrando-se a temperatura de dissociação ou desnaturação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e, portanto, a especificidade do produto amplificado em cada reação. Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa *Opticon Monitor Analysis Software 2.03*.

Tabela 2 - Resumo do Protocolo de PCR-RT para amplificação de cDNA

<i>MIX</i>	QUANTIDADE
Água	4,5 µl
Primer (senso) 5µM	0,5 µl
Primer (anti-senso) 5µM	0,5 µl
Splatinum SYBR Green qPCR	6,25 µl
cDNA	1,0 µl
Volume final	12,50 µl /tubo

FONTE: Elaborado pelo autor.

3.15.2 Expressão das enzimas envolvidas no processo de glicosilação dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafilático

Foi empregado a padronização do método de PCR- RT como descrito acima para analisar a expressão dos genes que codificam as diferentes enzimas envolvidas no processo de glicosilação das moléculas de anticorpos. Para isto, foi utilizado cDNA sintetizado a partir RNA isolado dos hibridomas ou células de camundongos imunizados que foram incubados com pares de *primers* específicos para cada uma das enzimas, *α-sialiltransferases*, *β-galactosiltransferase*, *α-manosidases*, *α-N-acetilglucosaminiltransferases* e *α-D-glucosidases* (Invitrogen). A síntese dos *primers* utilizados nas reações de PCR foi feita a partir das seqüências descritas por Takashima et al. (1999) e Dennis et al. (1999). Na figura 2 estão descritas os *primers* que foram utilizados para amplificar as enzimas da família das sialiltransferases a partir dos cDNA específicos, e na tabela 3, encontram-se as seqüências sintéticas empregadas para amplificação das outras enzimas analisadas.

A quantidade de expressão dos genes analisados em cada amostra foi estimada pelo método comparativo do *Cycle Threshold* (C_T). Todas as amostras foram feitas em duplicata e os resultados obtidos foram normalizados em relação ao obtido na amplificação de um gene

constitutivo, a *β-actina*, cuja expressão deve ser constante nos diferentes tecidos do organismo, em todos os estágios do desenvolvimento e não deve ser afetada pelo tratamento experimental (GIULIETTI et al., 2001; LIVAK e SCHMITTGEN, 2005). Mediante o valor de C_T , ponto correspondente ao ciclo onde a fluorescência excede o limiar de detecção, calcula-se o ΔC_T para cada amostra de RNAm, que consiste na diferença entre os C_T do gene de interesse e o C_T do gene constitutivo. Exemplificado pela fórmula: $\Delta C_T = C_T$ (amostra interesse) - C_T (constitutivo *β-actina*).

A expressão dos genes entre as amostras foi determinada pela comparação entre o ΔC_T das amostras e o ΔC_T do calibrador, segundo a fórmula: $\Delta \Delta C_T = \Delta C_T$ (calibrador) - ΔC_T (amostra interesse). Sendo assim, a expressão relativa é igual a $2^{-\Delta \Delta C_T}$.

Para empregar o método $2^{-\Delta \Delta C_T}$ para quantificação do nível da expressão gênica relativa é necessário que os *primers* tenham eficiência individual próxima a 100%, a qual foi obtida pela plotagem dos valores de C_T contra as várias diluições das amostras (diluição na razão de 10), o resultado é uma reta cujo coeficiente de correlação (R^2) deve ser maior que 0,95. Todos os primers empregados nas reações tiveram porcentagem de eficiência entre 98,9-99,9%.

Gene	Strand	Primer	Position	Amplified fragment (bp)	
				Target	Competitor
ST3Gal I	sense	5'-ATGAGGAGGAAGACCCTCAAG-3'	1 to 21	403	248
	antisense	5'-CCACCAGCCTCTTGTTCAAC-3'	384 to 403		
ST3Gal II	sense	5'-GATGAAGTGTCTCTTCGGG-3'	-1 to 19	410	240
	antisense	5'-CAGGCACGATCTGGAACAGT-3'	390 to 409		
ST3Gal III	sense	5'-GTGAAGATGGGACTTTGGT-3'	-6 to 14	661	478
	antisense	5'-ATTGCTCAGGTCGCTGCATG-3'	646 to 655		
ST3Gal IV	sense	5'-AGCCATGCTTCCAGGGTGAAG-3'	131 to 150	450	272
	antisense	5'-CCTTGAAAGCTACCAGGACC-3'	561 to 580		
ST3Gal V	sense	5'-TCAGAGCTATGCTCAGGAAGTCTTGCAGAAG-3'	240 to 270	349	250
	antisense	5'-ACTGTTCAACCTTATTACCACATCGAACTG-3'	559 to 588		
ST6Gal I	sense	5'-ATGATTCATACCAACTGAAG-3'	1 to 21	635	530
	antisense	5'-GGTGCCCATTAACCTCAG-3'	616 to 635		
ST6GalNAc I	sense	5'-CATGACGAGATATTGCAGAGG-3'	-1 to 20	356	269
	antisense	5'-CTGCCTTGCTCTGAGGATTC-3'	326 to 355		
ST6GalNAc II	sense	5'-AGACCCAGGTTCCCGCCAGG-3'	104 to 123	481	287
	antisense	5'-AAGGAGGCTTAGTGCCAC-3'	565 to 584		
ST6GalNAc III	sense	5'-ATGGATACATAAATGTGAGGACC-3'	185 to 207	515	315
	antisense	5'-GTGGATACTGTAGCAGGCATCCA-3'	677 to 699		
ST6GalNAc IV	sense	5'-GTGGTCTACGGGATGGTCAG-3'	684 to 703	678	542
	antisense	5'-GAGAGGCTGAGGCTCAAAGG-3'	1343 to 1362		
ST8Sia I	sense	5'-GACAAATGGAAGACTGCTGTG-3'	236 to 256	845	667
	antisense	5'-CTTCTGCAGTCCCTAGGAAG-3'	1061 to 1080		
ST8Sia II	sense	5'-TGAAGAATAAGCATTTCAGACTTGTGCC-3'	446 to 474	502	346
	antisense	5'-CAGAAGCCATAAAGGTAGATCTGAT-3'	923 to 947		
ST8Sia III	sense	5'-AGCCCGGATGAGAAATTGC-3'	-8 to 12	474	262
	antisense	5'-TCATAATGGGCGACATCT-3'	447 to 466		
ST8Sia IV	sense	5'-CACCCAAGATGCGCTCAATT-3'	-8 to 12	408	354
	antisense	5'-TTGGTGAAACTTCAGGCAGG-3'	381 to 400		
ST8Sia V	sense	5'-CAGGATGCGCTACGCAGACC-3'	-4 to 16	834	625
	antisense	5'-TTCTCGTACCTCTGCAGCAC-3'	811 to 830		

Figura 3- Sequências de *primers* utilizados na amplificação em PCR.

FONTE: Takashima e et al., 1999.

Tabela 3 - Sequências de *primers* utilizados em reação PCR

Gene	Primer
<i>Oligossacariltransferase</i>	Sense: TCCTGAAGAGGAAAGGTGGCAAGT Antisense: TCATGGAGAAGGCACTGGCATAGT
β -galactosiltransferase	Sense: AGGACACCCCATGTGTCT Antisense: GGGTCTGCCTTTGGTTTTG
<i>α-manosidase I</i>	Sense: TGGATCTTCAACACCGAGGCTCAT Antisense: TATGCAGTGAGGGAACGAAGCAGA
<i>α-manosidase II</i>	Sense: AGGGCCAGCCATATGTTTCCCTAA Antisense: TTCCCTGAATGTTGTACAGGCGGA
<i>N-acetilglucosamiltransferase II</i>	Sense: TGCATAACAGGCCGGAATACCTCA Antisense: ACTGTTGATCTCTGCGGACCAGAA
<i>α-D-glicosidase I</i>	Sense: AGGTGCACACAGCTCAGA Antisense: GGTGGAGGTAGGTGTCAG
<i>α-D-glicosidase II</i>	Sense: ACCGTCTGTGTTCAATGGTCCTGA Antisense: TATTAGCCCATCAGCAGTCGCCAT
<i>α-fucosidase IV</i>	Sense: AGTGCACATCACCTCTTCTGGGA Antisense: AGTCTGCCAAGTTGTGGATGCTCT
<i>α-fucosidase VII</i>	Sense: AGGCTGGGACTAGCTTTCCTGTTT Antisense: TGAACTGTAGGTTCAAGCCCAAGGT

FONTE: Adaptada de Dennis et al., 1999.

3.16 Avaliação da Atividade de sialiltransferases

Com o objetivo de avaliar a atividade das enzimas sialiltransferases nos hibridomas produtores dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos, foi realizado o ensaio imunoenzimático, de acordo com o método descrito por Basset et al. (2000). Este método é baseado no uso de anticorpo IgG1 dessialilado como substrato e na propriedade de ligação diferencial da lectina *Sambucus nigra* a resíduos de ácido siálico.

3.16.1 Preparação do Extrato celular

Hibridomas produtores de anticorpos IgG1 anafiláticos ou não-anafiláticos foram lavados 3 vezes com solução de cacodilato de sódio (Merck) 0,1M, pH 7 e posteriormente centrifugados a 1500 rpm/ 5 min. Para lisar as células foi adicionada a solução de cacodilato de sódio 0,1M, pH 7, 0, contendo 0,5M NaCl (Merck), 20mM MnCl₂ (Merck), 0,2% Triton X-100 (Sigma), 0,1% mercaptoetanol (Sigma), 100µg/ml de sulfóxido fenil-metil (Sigma) e 2µg/ml de leupetine (Sigma) seguida de incubação por 30 min a 4°C. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13.000 x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante coletado e estocado a -70 °C. Em seguida, a concentração protéica do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford.

3.16.2 Determinação da atividade enzimática por ensaio de ELISA

Placas de 96 poços (Costar) foram sensibilizadas com 50 µg/mL de IgG1 dessialilado por 2 h a 37 °C e *overnight* a 4 °C. Após lavagem da placa com PBS-Tween 0,05%, foi adicionado 120 µL da mistura contendo 40 µL do extrato celular com 80 µL do tampão de reação composto por 0,2M cacodilato de sódio, pH 6,5; 0,8 µL Triton X-100; 2,25 g/L BSA e

0,4M Galactose (Sigma, aplicado como inibidor de galactosidase), 2,25 mM de ácido 2,3-dehidro-2-deoxi-neuramínico (Sigma, empregado como inibidor de neuraminidase) e 0,12 mM de citidina 5-monofosfato ácido siálico (fonte de ácido siálico-Sigma) e incubada por 2 horas a 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada e adicionado 100 µl SNA biotilado diluído 1:250 (Lectina *Sambucus nigra* conjugada a biotina) aos poços. Após incubação de 1 hora a 37 °C e lavagem da placa, foram adicionados 100 µL de estreptoavidina-peroxidase diluído 1:6000 (Sigma) e realizada outra incubação por 1 hora a 37 °C. A reação foi revelada adicionando 100 µL/poço do substrato enzimático contendo 10 mg do cromógeno OPD (Sigma) e 10 µL de peróxido de hidrogênio 30% diluídos em 10 mL de tampão citrato de sódio 0,1 M. A reação foi parada após 15 minutos com solução de ácido sulfúrico (2 %) e a leitura das placas feita em leitor de ELISA (Electron Corporation) com 492 nm de comprimento de onda. A atividade enzimática foi determinada segundo a fórmula: $[(D.O \text{ Amostra} - D.O \text{ Branco}) / \text{Concentração da proteína} = O.D / \text{mg}]$.

3.17 Análise Estatística

Os resultados obtidos dos ensaios da atividade *β-glucuronidase* foram submetidos a análise pelo método estatístico não-paramétrico ANOVA, seguida de teste de comparação múltipla Tukey. Os resultados da expressão gênica e atividade enzimática das sialiltransferases foram analisados estatisticamente pelo método não-paramétrico T test.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação Anafilática dos Anticorpos

4.1.1 Anticorpos IgG1 monoclonais

Os hibridomas U7.6 e B8401-H5 produtores dos anticorpos monoclonais IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos, respectivamente, foram cultivados *in vitro* com a finalidade de utilizá-los tanto para a obtenção de RNAs mensageiros que codificam as moléculas de IgG1, como para obtenção dos anticorpos IgG1 usados nos diversos protocolos experimentais. Ao longo de todo o cultivo dos hibridomas, os sobrenadantes das células foram coletados e posteriormente os anticorpos IgG1 purificados em coluna de proteína G-Sepharose. Após a purificação das diferentes amostras de IgG1, a capacidade destes anticorpos de induzir anafilaxia foi monitorada em reações de PCA.

Como apresentado na tabela 4, anticorpos IgG1 produzidos pelo hibridoma U7.6 induziram reações positivas até uma concentração mínima de 20 ng/50 μ L, enquanto que os anticorpos IgG1 purificado do sobrenadante do hibridoma H5 não desencadearam reações de PCA, mesmo quando injetado na concentração de 2 μ g/50 μ L .

Tabela 4- Reações de PCA mediadas por anticorpos IgG1 monoclonais.

ANTICORPO	REAÇÃO ANTI-DNP
IgG1 anafilático (produzido pelo hibridoma U7.6)	Positiva (20ng/ sítio)
IgG1 não-anafilático (produzido pelo hibridoma H5)	Negativa (20-2000 ng/ sítio)

Estes resultados estão de acordo com os previamente publicados, mostrando que apesar de ambos os anticorpos IgG1 apresentarem a mesma especificidade antigênica possuem atividades funcionais distintas (FAQUIM-MAURO et al., 2003). Diante deste resultado demos prosseguimento aos experimentos propostos no projeto.

4.1.2 Anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos induzidos em camundongos imunizados com PI ou PIII

Os níveis de anticorpos IgG1 produzidos por camundongos IFN γ -KO ou IL-4KO foram avaliados por ELISA e a capacidade deles de induzir anafilaxia *in vivo* foi analisada em reações de PCA, como mostram as figuras 4 e 5.

Com relação aos ensaios de ELISA, podemos observar maior produção de anticorpos IgG1 por camundongos IFN- γ KO imunizados com PIII em relação aos camundongos IL-4KO imunizados com PI. Por outro lado, níveis maiores de IgG2a foram observados nos camundongos IL-4KO imunizados com PI (Figura 4). Quanto à atividade anafilática dos anticorpos IgG1, apenas camundongos IFN- γ KO imunizados com PIII produziram altos títulos deste anticorpo (Figura 5).

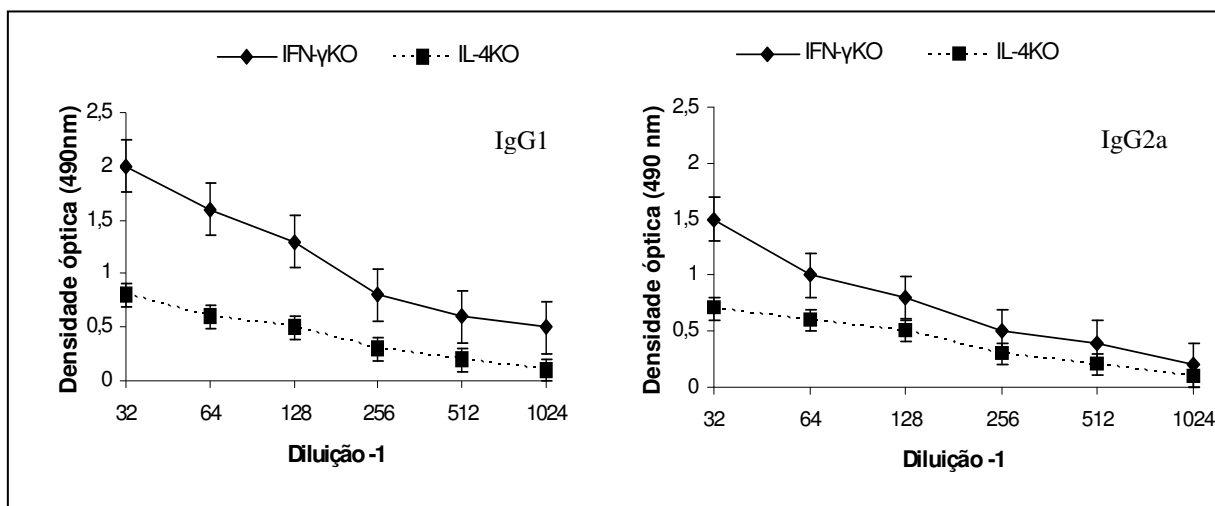


Figura 4- Produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PI ou PIII em soros de camundongos IL-4KO imunizados com PI ou IFN- γ KO imunizados com PIII. A produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PI ou PIII foi avaliada pelo método de ELISA. Os resultados representam a média aritmética das densidades ópticas obtidas dos soros de 7-8 animais/grupo nas diferentes diluições \pm erro padrão.

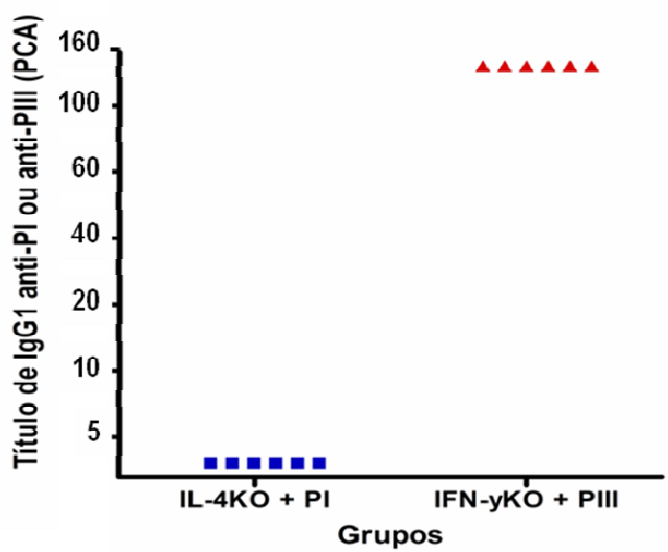


Figura 5- Títulos de anticorpos IgG1 anafiláticos em soros de camundongos IL-4KO imunizados com PI ou IFN- γ KO imunizados com PIII. Os títulos de IgG1 anafiláticos anti-PI ou PIII foram determinados pela técnica de anafilaxia cutânea passiva (PCA). Todas as reações foram feitas em triplicata e os resultados expressos como a recíproca da maior diluição dos soros individuais que resultou em uma reação maior que 5 mm de diâmetro.

4.2 Seqüenciamento dos domínios C_{H2} e C_{H3} da cadeia pesada dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos

Uma vez verificado que o hibridoma U7.6, assim com os camundongos IFN- γ KO produzem IgG1 com atividade anafilática, enquanto que o H5 e os camundongos IL4-KO produzem anticorpos IgG1 não-anafiláticos, tanto os hibridomas como as células dos camundongos foram coletados e utilizados para a extração de RNA. Com este material foi realizado o seqüenciamento dos domínios C_{H2} e C_{H3} da cadeia pesada desses anticorpos.

A partir do RNAs extraídos foi realizada a transcrição reversa para cDNA e posteriormente a amplificação da molécula constitutiva β -actina, para confirmar a qualidade do cDNA sintetizado nas diferentes amostras.

Como mostra a figura 6, somente em uma amostra obtida das células de camundongos IL-4KO (número 2) não foi possível observar produto de amplificação da β -actina, a qual foi descartada.

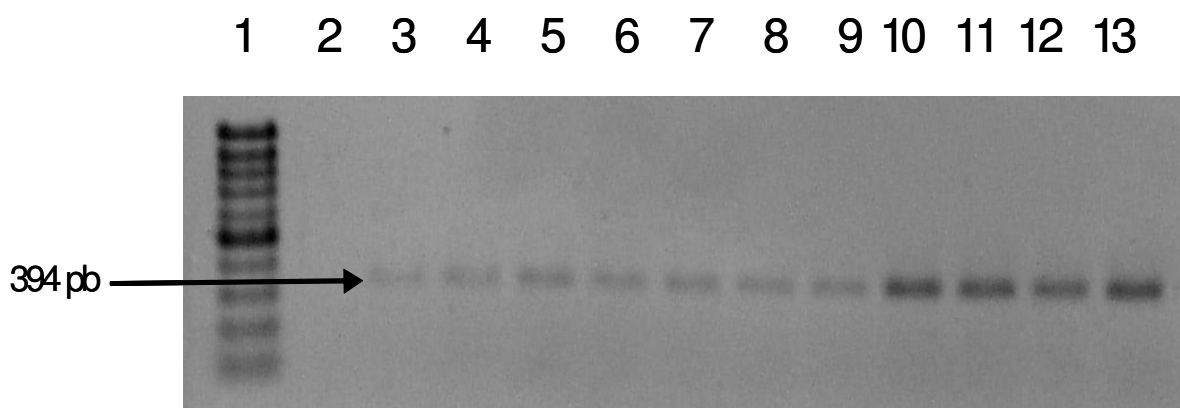


Figura 6 - Produto de amplificação da molécula constitutiva β -actina em PCR.

Amostras de cDNA obtidas por transcrição reversa a partir de RNAm extraídos de células de camundongos IL-4KO imunizados com PI (2-5), de células de camundongos IFN- γ KO imunizados com PIII (6-9), do hibridoma produtor da IgG1 anafilática (10-11), ou da não-anafilática (12-13) foram usadas para amplificar parte da proteína β -actina, utilizando um par de *primers* complementar a esta região. A posição 1 corresponde ao padrão de tamanho de fragmentos. Os resultados foram analisados em gel de 1,5% de agarose corado com brometo de etídio.

camundongos IL-4-KO ou IFN γ -KO previamente imunizados para serem amplificadas com um par de *primers* complementares a uma região do domínio C_{H1} (*primer* senso no sentido 5'-3') e ao domínio C_{H3} (*primer* anti-senso 3'-5'), com o objetivo de aumentar o número de cópias de DNA da região C_{H2}-C_{H3} para posterior seqüenciamento dos nucleotídeos.

Como pode ser visto na figura 7, em todas as amostras observamos produtos de amplificação do mesmo tamanho e na mesma intensidade. Todos os produtos amplificados foram, então purificados em sistema *Wizard* e submetidos ao seqüenciamento utilizando a estratégia esquematizada na figura 2 do material e métodos.

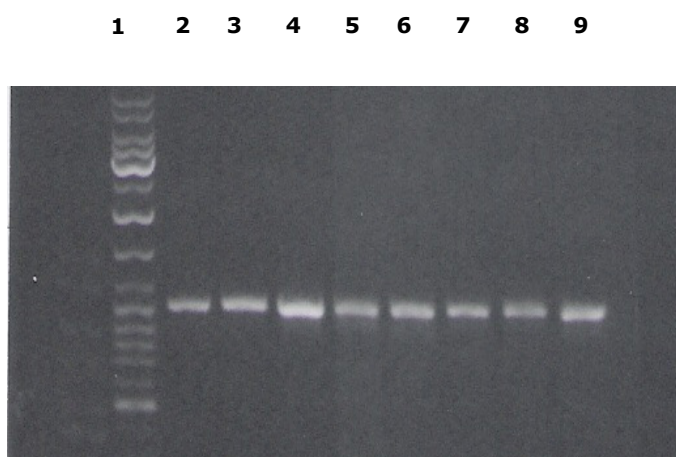


Figura 7- Produto de amplificação dos domínios C_{H2} e C_{H3} da cadeia pesada das moléculas de IgG1 anafilática e não-anafilática.

Amostras de cDNA dos hibridomas produtores da IgG1 anafilática (2-3), da não-anafilática (4-5) ou de células de camundongos IL-4KO imunizados com PI (6-7) ou de células de camundongos IFN- γ KO e imunizados com PIII (8-9) foram usadas para a amplificação dos domínios C_{H1} ao C_{H3} por PCR, utilizando um par de *primers* complementares a esta região. A posição 1 corresponde o padrão de tamanho de fragmento. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de 1,5% de agarose e

Para isto, às amostras foram acrescentados o *primer* senso 1 que hibridiza a seqüência complementar na região C_{H1}, ou com o *primer* senso 2 complementar a uma região no domínio C_{H2} em associação juntamente com o reagente *Big Dye 2*.

A partir das seqüências obtidas e utilizando o programa *Expert Sequence Analysis* software SeqMan, estas foram alinhadas entre si e feita uma seqüência consenso para cada grupo de amostras de IgG1 anafilática ou não-anafilática vindas dos hibridomas ou ainda, das células dos camundongos IL-4KO ou IFN- γ KO (Figuras 8 a 11).

TGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCC
CTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAG 130
CTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCA
GCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGT 260
ACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCT
GACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCA 390
GCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGC
ACTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTT 520
CAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCA
GACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAA 650
GTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGG
GCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTTCG 780
TCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTA
CATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCTGGTAAATGAT 909

Figura 8 - Sequência de nucleotídeos que codificam os domínios C_{H2} e parte do C_{H3} da região constante da cadeia pesada da molécula de IgG1 anafilática produzida pelo hibridoma U7.6. Amostras de cDNA foram utilizadas como molde para a amplificação dos domínios C_{H2} e C_{H3} da região constante da IgG1 utilizando-se dois *primers* que hibridizam com seqüências presentes nos exons dos domínios C_{H1} e C_{H2}, resultando na seqüência completa do domínio C_{H2} e parte do C_{H3}. Os produtos da amplificação foram submetidos ao seqüenciamento pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos.

CCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCT
CTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCT
 130
GAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCA
CCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGC
 260
ATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACC
ATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCC
 390
AGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGT
TCAACAGCACTTTCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAA
 520
GGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC
CAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAG
 650
GATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAG
TGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTT
 780

Figura 9- Sequência de nucleotídeos que codificam os domínios C_{H2} e parte do C_{H3} da região constante da cadeia pesada da molécula de IgG1 não-anafilática produzida pelo hibridoma B8401-H5. Amostras de cDNA foram utilizadas como molde para a amplificação dos domínios C_{H2} e C_{H3} pertencentes à região constante da IgG1 utilizando-se um par de *primers* que hibridizam com seqüências presentes nos exons que codificam parte do domínio C_{H1} e C_{H2}, resultando na seqüência completa do domínio C_{H2} e parte do C_{H3}. Os produtos da amplificação foram submetidos ao seqüenciamento pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos.

CCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGA
ACTCTGGATCCC
TGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAG
TG 130
ACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGC
ACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCC
260
CAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTC
CTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTT
390
TGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGAAACCCGGGAGGAGCAGATCAACAGCACTTT
CCGTTTCAGTCAGTGA
ACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGC
520
AGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCG
AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGAGGGCCAAGGATAAAGTCAGTC
650
TGACCTGCATGATAACAAACTTCTTCCCTGAARACATTACTGTGGAGTGGCAKTGGAATGGGCAGC
CAGCGGAGA
ACTACAAGA
CACTCAGCCCATCRTGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAG
780
CAAGCTCAATGTGCAAAAGAGCAACTGGGAGGCRGGAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGA
GGCCTGCACAACCACATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGATCCAGTGT

Figura 10 -Seqüência de nucleotídeos que codificam os domínios C_{H2} e parte do C_{H3} da região constante da cadeia pesada da molécula de IgG1 obtida a partir de células de camundongos IL-4KO e imunizados com PI.

Amostras de cDNA foram utilizadas como molde para a amplificação dos domínios C_{H2} e C_{H3} pertencentes à região constante da IgG1 utilizando-se um par de *primers* que hibridizam com seqüências presentes nos exons que codificam parte do domínio C_{H1} e C_{H2}. Os produtos da amplificação foram submetidos ao seqüenciamento pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos.

GGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGA
ACTCTGGATCCC
TGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTG
130
ACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCCAGACCGTACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGC
ACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCC
260
CAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTC
CTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTT
390
TGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGAAACCCGGGAGGAGCAGATCAACAGCACTTT
CCGTTTCAGTCAGTGA
ACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGC
520
AGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCG
AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTC
650
TGACCTGCATGATAACAAACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGC
CAGCGGAGA
ACTACAAGA
CACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAG
780

Figura 11 -Seqüência de nucleotídeos que codificam os domínios C_{H2} e parte do C_{H3} da região constante da cadeia pesada dos anticorpos IgG1 anafiláticos obtida de células de camundongos IFN- γ KO e imunizados com PIII em hidróxido de alumínio.

Amostras de cDNA foram utilizadas como molde para a amplificação dos domínios C_{H2} e C_{H3} pertencentes à região constante da IgG1 utilizando-se um par de *primers* que hibridizam com seqüências presentes nos éxons que codificam parte do domínio C_{H1} e C_{H2}. Os produtos da amplificação foram submetidos ao seqüenciamento pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos.

Utilizando esse mesmo programa de *software*, todas as seqüências consensos foram alinhadas e comparadas entre si na busca de qualquer diferença entre os nucleotídeos. A análise comparativa entre os produtos dos seqüenciamentos mostrou 100% de identidade entre os nucleotídeos que codificam os domínios C_{H2} e C_{H3} das cadeias pesadas de ambas as moléculas de IgG1.

Além da comparação entre as seqüências obtidas, utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), foi feita outra análise de homologia entre a seqüência consenso obtida e a de nucleotídeos que codifica a cadeia pesada de uma molécula de IgG1 murina já descrita na literatura e depositada no banco de dados de nucleotídeos da NCBI (clone MUSIGHCKF).

A figura 12 mostra o alinhamento dos nucleotídeos, onde verifica-se homologia de 100% entre as seqüências, validando a especificidade dos *primers* usados no nosso seqüenciamento e da seqüência consenso obtida nas nossas células.

Esses resultados em conjunto, permitem descartar a possibilidade de que trocas de nucleotídeos e conseqüentes mudanças de aminoácidos poderiam ser responsáveis pela atividade funcional distinta entre os anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos.

```

Região constante da cadeia pesada de IgG1 de camundongo
Length=1070 Score = 1172 bits (591), Expect = 0.0 Identities = 591/591
(100%),
Query 1 GGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATC 60
|||||
Sbjct 75 GGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATC 134

Query 61 CCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAG 120
|||||
Sbjct135 CCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAG 194

Query 121 CAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGC 180
|||||
Sbjct 195 CAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGC 254

Query 181 CCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAA 240
|||||
Sbjct 255 CCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAA 314

Query 241 GCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAA 300
|||||
Sbjct 315 GCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAA 374

Query 301 GGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAA 360
|||||
Sbjct 375 GGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAA 434

Query 361 GGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCA 420
|||||
Sbjct 435 GGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCA 494

Query 421 GACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCAT 480
|||||
Sbjct 495 GACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCAT 554

Query 481 CATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTT 540
|||||
Sbjct 555 CATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTT 614

Query 541 CCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGGAAGGC 591
|||||
Sbjct 615 CCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGGAAGGC 665
Score = 646 bits (326), Expect = 0.0 Identities = 326/326 (100%),
Query 577 AGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAA 636
|||||
Sbjct 674 AGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAA 733

Query 637 GGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGA 696
|||||
Sbjct 734 GGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGA 793

Query 697 GTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACAC 756
|||||
Sbjct 794 GTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACAC 853

Query 757 AGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGG 816
|||||
Sbjct 854 AGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGG 913

Query 817 AAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAG 876
|||||
Sbjct 914 AAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAG 973

Query 877 CCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGAT 902
|||||
Sbjct 974 CCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGAT 999

```

Figura 12 -Análise da homologia entre a seqüência de nucleotídeos que codificam a metade final do domínio C_{H1}, C_{H2} e início do C_{H3} da cadeia pesada das moléculas de IgG1 anafiláticas e não-anafiláticas e a seqüência de nucleotídeos que codificam a região constante da cadeia pesada de uma molécula de IgG1 murina, depositada no banco de dados da NCBI. A comparação foi feita utilizando-se o programa BLAST.

4.3 Análise da composição das cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas aos anticorpos monoclonais IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos.

4.3.1 Cromatografia de Afinidade a lectina *Canavalia ensiformis* (ConA)

Em vista dos resultados anteriores, os estudos foram direcionados para análise da composição dos monossacarídeos *N*-ligados às duas moléculas de IgG1. Lectinas são proteínas que possuem no mínimo dois sítios de ligação a carboidratos e assim apresentam a capacidade de ligar-se a glicoconjugados, sendo então, utilizadas para a detecção, caracterização e fracionamento de glicoproteínas (DEBRAY, 1995). Dentre as diferentes lectinas, a extraída de *Canavalia ensiformis*, é amplamente empregada na identificação e classificação das diferentes cadeias de oligossacarídeos devido a sua seletiva afinidade aos monossacarídeos, principalmente manose. A primeira estratégia utilizada foi investigar a afinidade de ligação dos anticorpos à coluna de *Canavalia ensiformis* (ConA)-Sephrose. Com o objetivo de avaliar a capacidade da lectina em ligar uma glicoproteína, amostra de tiroglobulina foi aplicada na coluna como sugerido pelo fabricante. A figura 13 representa o perfil de eluição da tiroglobulina onde se observa que toda a glicoproteína foi eluída da coluna somente após a aplicação da maior concentração do açúcar α -metil-*D*-glucosídeo.

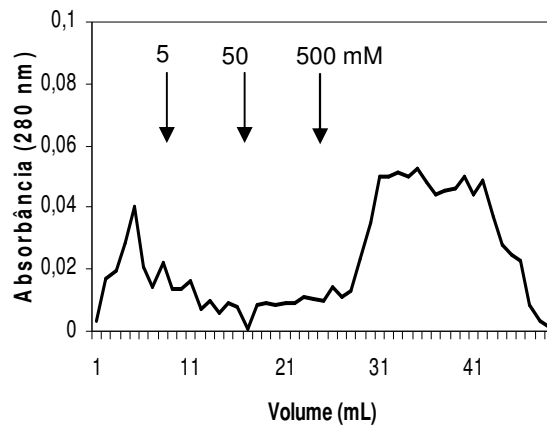


Figura 13 - Perfil de eluição da tiroglobulina submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Con A.

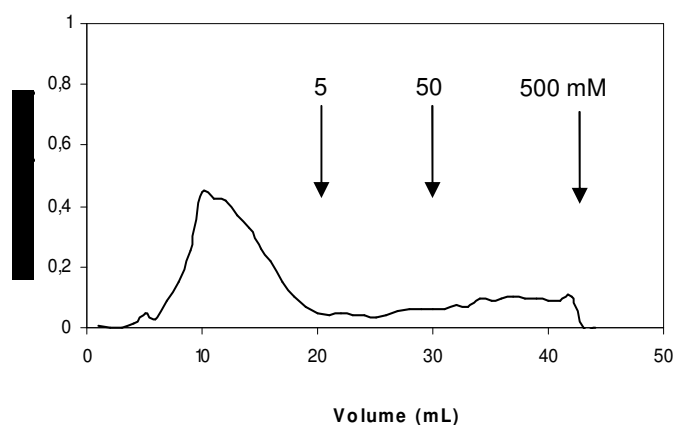
Tiroglobulina (5mg/1,0 mL) foi aplicada à coluna de Sepharose 4B ativada acoplada à ConA, e em seguida aplicado tampão acetato de sódio com gradiente de acetato de sódio contendo 5 , 50 e 500 mM de α -metil-D-glucosídeo. As frações coletadas foram monitoradas em espectrofotômetro a 280 nm.

Após ter verificado a eficiência da coluna em reter a amostra de glicoproteína, os dois subtipos de anticorpos IgG1 foram submetidos à cromatografia de afinidade à ConA.

Pode-se observar na figura 14 que ambos os anticorpos foram eluídos no tampão de equilíbrio, revelando que os dois apresentam cadeias complexas de oligossacarídeos.

Além disto, verificamos perfis diferentes de eluição dos anticorpos IgG1, onde o anafilático parece ter reagido fracamente a lectina, enquanto que o não-anafilático mostrou-se não-reativo à lectina.

U7.6



H5

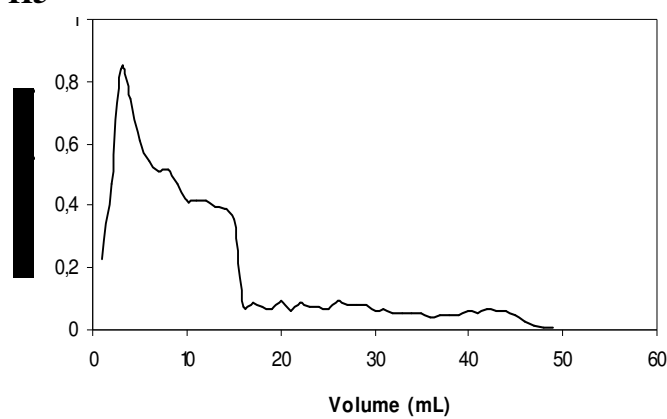


Figura 14 - Perfil de eluição dos anticorpos IgG1 anafilático (U7.6) e não-anafilático (H5) submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de Con A.

Amostras de 500 μ g de IgG1 anafilático ou não-anafilático (1,0 mL) foram aplicadas à coluna de Sepharose 4B ativada acoplada à ConA, em tampão acetato de sódio, seguida de gradiente de acetato de sódio contendo 5-500 mM de α -metil-D-glucosídeo. As frações coletadas foram monitoradas em espectrofotômetro a 280 nm.

4.3.2 Afinidade de ligação dos anticorpos monoclonais IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos a diferentes lectinas

Baseado no resultado anterior que demonstra aparente diferença na composição dos monossacarídeos *N*-ligados aos anticorpos IgG1 anafilático e não-anafilático, resolvemos avaliar a afinidade de ligação destes anticorpos a várias lectinas, as quais apresentam a capacidade de ligar monossacarídeos distintos. Para tanto, placas de alta afinidade de ligação foram sensibilizadas com as lectinas e em seguida foram incubadas com os anticorpos IgG1. Neste ensaio pôde ser analisada a interação dos anticorpos IgG1 com lectinas específicas aos

resíduos de α -D-manose (*Canavalia ensiformis*); β -N-acetilgalactosamina (*Bauhinia purpurea*), aos resíduos de β -D-galactose e β -D-acetilglucosamina (*Erythrina cristagali*); β -N-acetilglucosamina (*Datura stramonium*); L-fucose (*Ulex europaeus I*) e ao ácido siálico (*Sambucus nigra e Limulus polyphemus*).

A figura 15 representa os resultados obtidos, onde podemos observar ausência de interação do anticorpo deglicosilado a todas as lectinas utilizadas no ensaio comprovando, portanto a especificidade do ensaio.

Com relação à afinidade dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos às lectinas, verificamos que ambos ligaram-se a todas que foram testadas indicando que cadeias de oligossacarídeos do tipo complexa estão presentes em ambos os subtipos de IgG1. No entanto, foi observada variação no grau de interação destes anticorpos IgG1 com as diversas lectinas, especialmente com *Sambucus nigra*, *Limulus polyphemus* e *Ulex europeaus I*. Estes resultados apontam possível diferença na quantidade de resíduos de ácido siálico e fucose entre os dois subtipos de anticorpos IgG1.

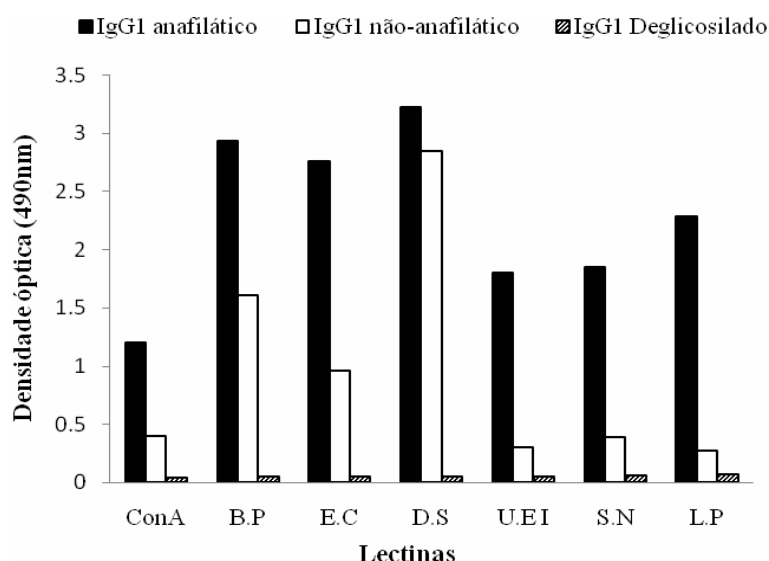


Figura 15 - Afinidade de ligação dos anticorpos IgG1 anafiláticos ou não-anafiláticos com diferentes lectinas.

Amostras de 5 µg/mL de cada subtipo de IgG1 e de IgG1 deglicosilado foram incubadas em placas previamente sensibilizadas com 1 µg/mL das diferentes lectinas, seguida de incubação com anticorpo anti-IgG1 biotilado e estreptoavidina-peroxidase. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro a 490nm. Lectinas utilizadas no ensaio, em ordem de apresentação: *Canavalia ensiformis* (Con A), *Bauhinia purpurea* (B.P), *Erythrina cristagalli* (E.C), *Datura stramonium* (D.S), *Ulex Europeaus I* (U.EI), *Sambucus nigra* (S.N) e *Limulus polyphemus* (L.P). Os resultados representam a média das densidades ópticas obtidas das amostras em triplicata.

Além disso, com o intuito de investigar se os anticorpos IgG1 apresentam cadeias de carboidratos somente na região Fc e que os resultados obtidos se referem somente à interação entre a cadeia de oligossacarídeo *N*-ligada e as lectinas, os dois subtipos de IgG1 foram clivados com papaína para a obtenção dos fragmentos Fab e Fc e estes foram testados no mesmo ensaio de afinidade às diversas lectinas.

Como mostra a figura 16, somente os fragmentos Fc dos dois subtipos de IgG1 ligaram-se às lectinas, indicando que as moléculas de IgG1 apresentam somente cadeia de oligossacarídeos *N*-ligada. Vale ressaltar, que a diferença no grau de afinidade dos fragmentos Fc dos dois anticorpos IgG1 às lectinas foi semelhante à observada com as moléculas íntegras.

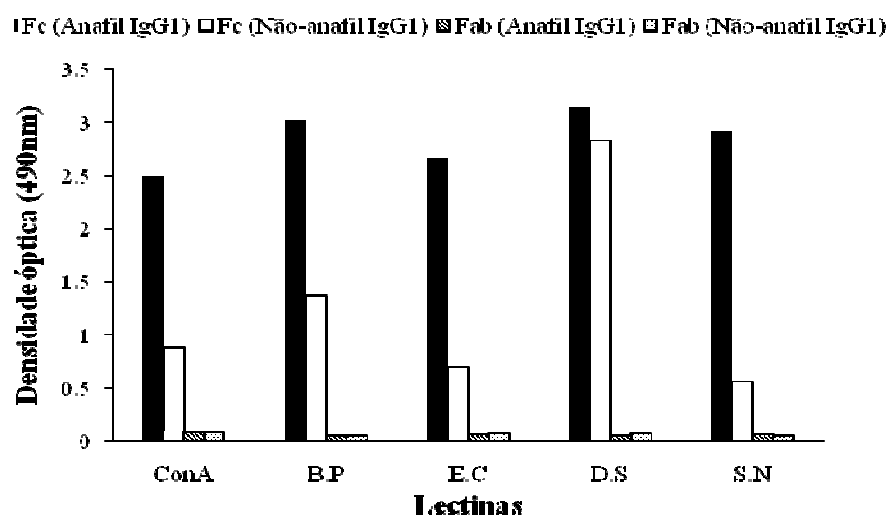


Figura 16 - Afinidade de ligação dos fragmentos Fc e Fab dos IgG1 anafiláticos ou não-anafiláticos com diferentes lectinas.

Amostras de 5 µg/mL dos fragmentos Fab ou Fc de anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos foram incubadas em placas previamente sensibilizadas com 1 µg/mL das diferentes lectinas, seguida de incubação com anticorpo anti-IgG1 biotilado e estreptoavidina-peroxidase. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro a 490nm. Lectinas utilizadas no ensaio, em ordem de apresentação: *Canavalia ensiformis* (Con A), *Bauhinia purpurea* (B.P), *Erythrina cristagalli* (E.C), *Datura stramonium* (D.S), *Sambucus nigra* (S.N) e *Limulus polyphemus* (L.P). Os resultados representam a média das densidades ópticas obtidas das amostras em triplicata.

4.3.3 Cromatografia de afinidade dos anticorpos monoclonais IgG1 em coluna de lectina extraída de *Triticum vulgare* acoplada a Agarose

Considerando os resultados que sugerem diferença na quantidade de resíduos de ácido siálico presentes nas cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas às moléculas de IgG1, ambos os anticorpos foram testados em cromatografia de afinidade em coluna de lectina *Triticum vulgare* (KOBATA e ENDO, 1992). Assim, os anticorpos IgG1 foram aplicados separadamente na coluna e eluídos de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

Observa-se na figura 17 que o anticorpo anafilático apenas foi eluído da coluna após a aplicação de *N*-acetilglucosamina na coluna, enquanto que o anticorpo não-anafilático foi recuperado ainda na etapa de aplicação do tampão de equilíbrio.

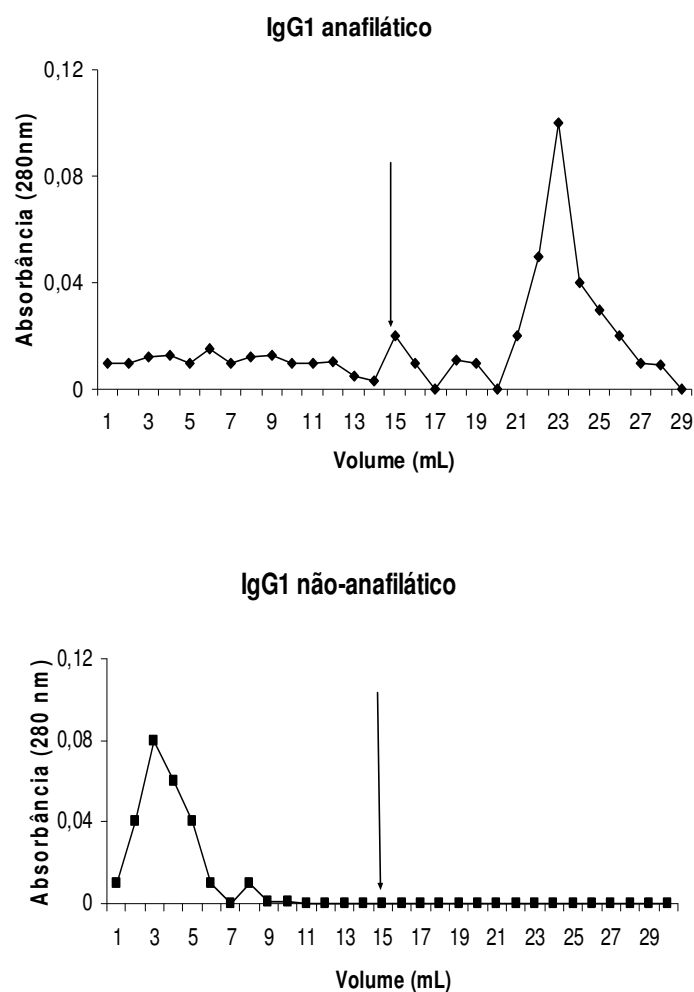


Figura 17- Perfil de eluição dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos obtido após cromatografia de afinidade em coluna de *Triticum vulgaris*-Agarose. Amostras de 500 µg de IgG1 anafilático ou do não-anafilático (1 mL) foram aplicadas à coluna de Sepharose 4B acoplada à lectina *Triticum vulgaris*, em tampão fosfato de sódio pH 7,0 seguida de eluição com o mesmo tampão contendo 100 mg/mL de *N*-acetilglucosamina. As frações coletadas foram lidas em espectrofotômetro a 280 nm. A seta indica a aplicação do açúcar competidor.

O pico de anticorpo IgG1 anafilático obtido após a cromatografia foi coletado, a concentração protéica determinada e posteriormente foi avaliada a sua capacidade de induzir reação de PCA. Como resultado, obtivemos recuperação de 90% do anticorpo após cromatografia e ainda, verificamos que este foi capaz de desencadear reações positivas de anafilaxia *in vivo* (tabela 5).

Tabela 5- Reações de anafilaxia cutânea passiva desencadeada por anticorpos monoclonais IgG1 após cromatografia de afinidade em coluna de *Triticum vulgare*-Agarose.

ANTICORPO	REAÇÃO ANTI-DNP
IgG1 monoclonal anafilático	20 ng/ sítio (Positiva)
IgG1 obtido após cromatografia	20 ng/ sítio (Positiva)
IgG1 monoclonal não-anafilático	20-2000 ng/ sítio (Negativa)

Reações de PCA realizadas em camundongos BALB/c injetados com 50 µL dos anticorpos IgG1 (20 ng-2µg/sítio) no dorso, via intradérmica. Após 2 horas de sensibilização, os camundongos foram desafiados com 0,5 mL de solução PBS contendo 0,5% de azul de Evans e 2 mg/mL DNP-BSA. Todas as reações foram realizadas em triplicatas e os resultados considerados positivos quando resultaram em reação de no mínimo 5 mm de diâmetro.

Estes resultados reforçam os obtidos nos ensaios de afinidade às lectinas, mostrando diferença no conteúdo de ácido siálico nas cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas aos anticorpos monoclonais IgG1 testados.

Com o objetivo de avaliar a capacidade da coluna de *Triticum vulgare* de separar os subtipos de anticorpos IgG1 anafilático e não-anafilático, uma amostra contendo ambos os monoclonais foi submetida à cromatografia nas mesmas condições descritas anteriormente.

Os resultados mostram que a coluna de *Triticum vulgare* foi eficiente em separar os dois subtipos de IgG1 de uma amostra contendo ambos, ou seja, o não-anafilático não se ligou a lectina e portanto foi recuperado durante a aplicação do tampão de equilíbrio, enquanto que o anafilático foi recuperado apenas após a eluição com o açúcar competidor. O pico correspondente à IgG1 anafilática foi testado em reações de PCA e observou-se resultado positivo (Figura 18).

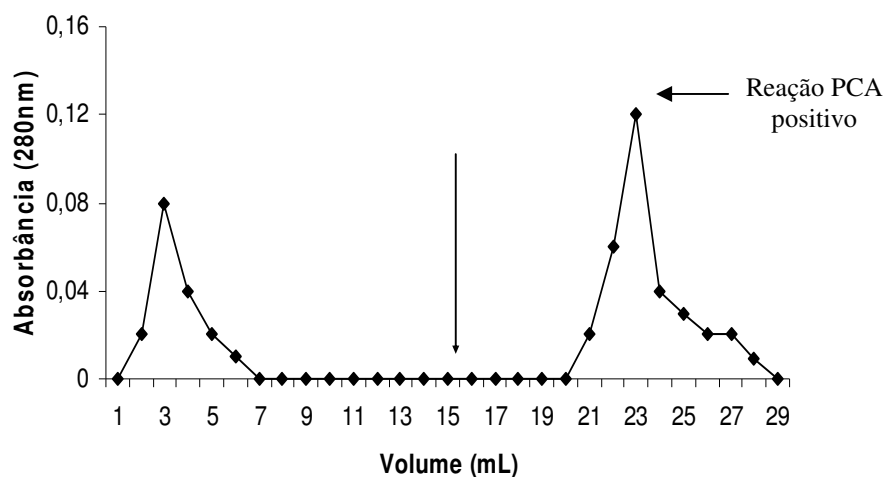


Figura 18- Perfil de eluição dos anticorpos IgG1 anafilático e não-anafilático obtido após cromatografia de afinidade em coluna de *Triticum vulgaris*-Agarose. Amostra contendo 250 µg do anticorpo IgG1 anafilático e 250 µg do não-anafilático (1,0 mL) foi aplicada na coluna em tampão fosfato de sódio pH 7,0 seguida de eluição com tampão fosfato de sódio contendo 100 mg/mL de *N*-acetil-glucosamina. As frações coletadas foram monitoradas em espectrofotômetro a 280 nm. A seta indica aplicação do açúcar competidor.

4.3.4 Análise do conteúdo de ácido siálico e fucose nas cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas aos anticorpos IgG1 monoclonais por cromatografia de afinidade

Para confirmar a diferença na quantidade de resíduos de ácido siálico e fucose presente nas cadeias de carboidratos dos anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos, amostras de ambos os anticorpos foram submetidas à análise por cromatografia de afinidade às lectinas *Sambucus nigra* e *Ulex europeus I*, respectivamente.

Analisando o perfil cromatográfico obtido, observamos que anticorpos IgG1 anafiláticos apresentaram alta afinidade à lectina *Sambucus nigra*, cuja especificidade se refere à resíduos de ácido siálico ligados à posição α 2-6 Gal/GalNac da cadeia glicosídica, sendo apenas eluídos da coluna pela adição do açúcar competidor (Figura 18). Em contraste, anticorpos IgG1 não-anafiláticos não se ligaram à lectina *Sambucus nigra* e assim foram recuperados da coluna ainda no tampão de ligação. Além disso, como esperado, anticorpos IgG1 anafiláticos e dessialilados perderam a capacidade de se ligar à coluna de lectina (Figura

19). Estes resultados confirmam que anticorpos IgG1 anafiláticos possuem maior conteúdo de ácido siálico em sua cadeia oligossacarídica que os anticorpos IgG1 não-anafiláticos

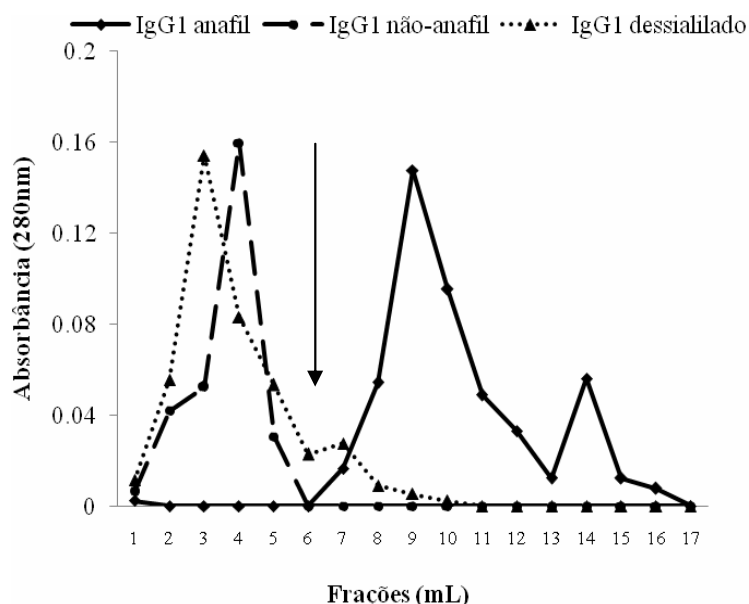


Figura 19 - Perfil de eluição dos anticorpos IgG1 anafilático, não-anafilático e IgG1 dessialilado submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de lectina *Sambucus nigra*-Sepharose. Amostra de cada tipo de anticorpo IgG1 (1 mg) e de anticorpo anafilático/dessialilado foram aplicadas na coluna de agarose ligada a lectina *Sambucus nigra*. A seta indica a aplicação do açúcar competidor.

Análise similar foi realizada utilizando a lectina *Ulex europeaus I* que é específica a resíduos de L-fucose. Como resultado verificou-se que o anticorpo IgG1 anafilático ficou retido na coluna e foi eluído somente com a aplicação do tampão contendo alta molaridade do monossacarídeo competidor (Figura 20). Em contrapartida, anticorpos IgG1 não-anafiláticos bem como os anticorpos anafiláticos/defucosilados foram completamente recuperados ainda na etapa de lavagem da coluna com o tampão de ligação (figura 20). Estes resultados confirmam que anticorpo IgG1 anafilático possui maior conteúdo de fucose em sua cadeia oligossacarídica que o anticorpo IgG1 não-anafilático.

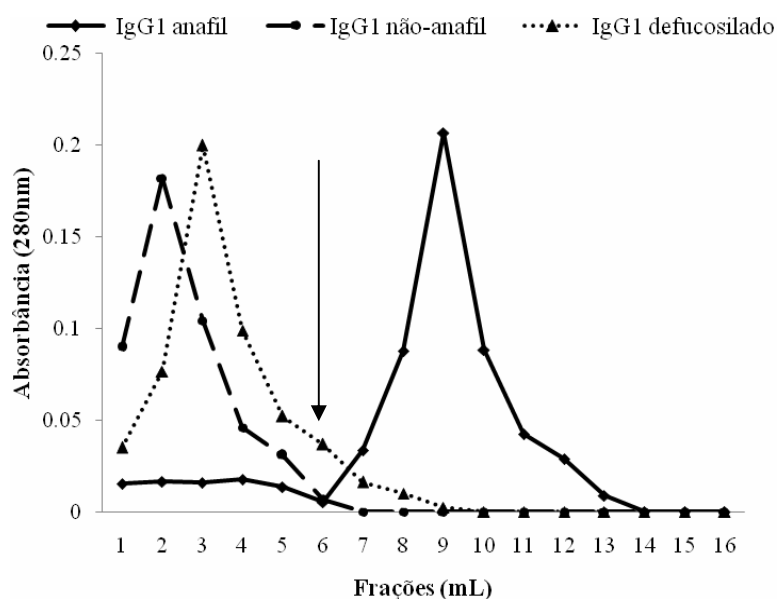


Figura 20- Perfil de eluição dos anticorpos IgG1 anafilático, não-anafilático e IgG1 defucosilado submetido à cromatografia de afinidade à lectina *Ulex europeus I*. Amostras de cada tipo de anticorpo IgG1 (1 mg) foram aplicadas na coluna de agarose ligada a lectina *Ulex europeus I*. A seta indica a aplicação do açúcar competidor.

4.3.5 Análise das cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas aos anticorpos IgG1 monoclonais por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperimétrico (HPAEC-PAD)

Dando continuidade ao estudo de caracterização das cadeias de carboidratos ligadas aos anticorpos monoclonais IgG1, amostras de ambos os subtipos foram primeiramente tratadas com a enzima PNGase F e as cadeias de oligossacarídeos purificadas e analisadas quanto à composição dos monossacarídeos neutros ou ácidos (contendo ácido siálico) em coluna de Carbowac PA-100. Como padrões de cadeias de oligossacarídeos foram aplicadas amostras com composições glicosídicas previamente definidas.

A figura 21 mostra o conteúdo de monossacarídeos neutros presentes nas cadeias *N*-ligadas às moléculas de IgG1 anafiláticas e não-anafiláticas, onde se observa em ambos os anticorpos IgG1 a presença de três picos proeminentes e correspondentes aos três tipos de

estruturas de oligossacarídeos utilizados como padrões: o primeiro formado pela estrutura básica de acetilglucosamina-manose, o segundo corresponde a duas cadeias de acetilglucosamina-manose ligadas entre si, e o terceiro contendo uma estrutura de acetilglucosamina-manose associada a duas outras contendo manose-acetilglucosamina-galactose.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos na cromatografia de afinidade à ConA, revelando que ambos os anticorpos possuem cadeias do tipo complexa, contendo manose, *N*-acetil-glucosamina e galactose.

Vale ressaltar, que apesar desta metodologia não ser quantitativa, verificamos picos maiores na análise do anticorpo anafilático em relação ao não-anafilático, indicativo que anticorpo anafilático contém cadeia de oligossacarídeos formada por estruturas mais glicosiladas que o não-anafilático.

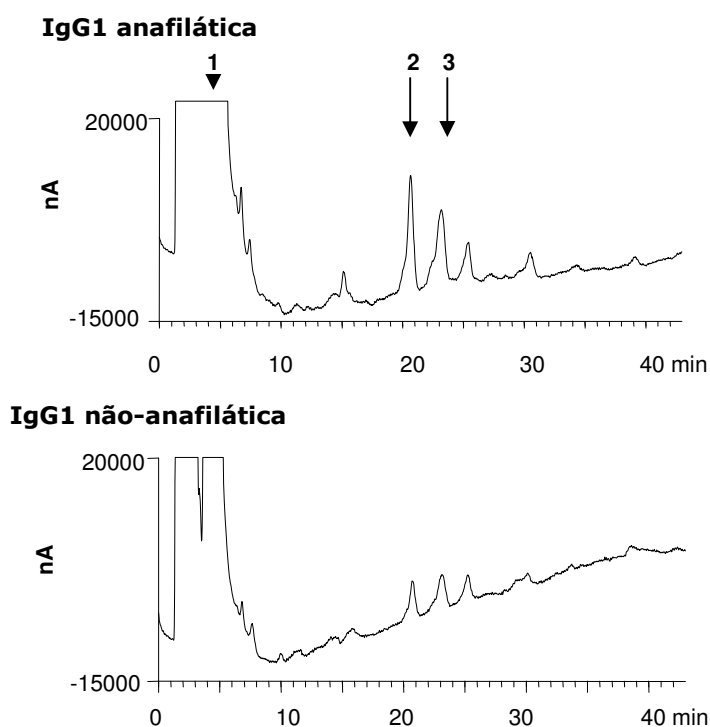


Figura 21 - Perfil de eluição das cadeias de oligossacarídeos obtidas dos anticorpos IgG1 anafilático e não-anafilático em coluna Carbopac PA-100 por HPAEC-PAD.

Cadeias de oligossacarídeos obtidas dos anticorpos IgG1 foram submetidas ao sistema DX-300 Dionex BioLC (Dionex Corporation) com detector de pulso amperimétrico acoplado a uma coluna Carbopac PA-100. A eluição dos oligossacarídeos neutros foi feita usando solução de hidróxido de sódio 100 mM por 5 min, seguida de solução de cloreto de sódio 100 mM em gradiente de 0-50 mM de acetato de sódio durante 60 minutos.

Pico 1: estrutura básica de acetilglucosamina-manose;

Pico 2: duas cadeia de acetilglucosamina-manose ligadas entre si

Pico3: acetilglucosamina-manose- associada a duas outras estruturas de manose-acetilglucosamina-galactose.

Com enfoque na diferença observada quanto ao conteúdo de resíduos de ácido siálico associados às cadeias dos dois subtipos de anticorpos, resolvemos utilizar a metodologia de HPAEC-PAD que permite a avaliação de glicanos mono- e di-sialilados. Para isto, as cadeias de oligossacarídeos foram obtidas a partir do tratamento enzimático dos anticorpos IgG1 e foram analisadas em condições acídicas.

O perfil obtido claramente mostra que o anticorpo IgG1 anafilático apresenta picos de oligossacarídeos mono- e di-sialilados, enquanto que o anticorpo não-anafilático mostrou

menor pico correspondente a cadeia di-sialilada (Figura 22). Além disso, a digestão dos oligossacarídeos, por ação da enzima neuraminidase, das amostras de IgG1 anafilática seguida da análise por HPAEC-PAD resultou no desaparecimento do oligossacarídeos sialilados, o que comprova a eficiência da metodologia utilizada (figura 22 C).

Os resultados de análise das cadeias *N*-ligadas permitem inferir que a composição dos oligossacarídeos é diferente, sendo a do não-anafilático composta por menor conteúdo de ácido siálico.

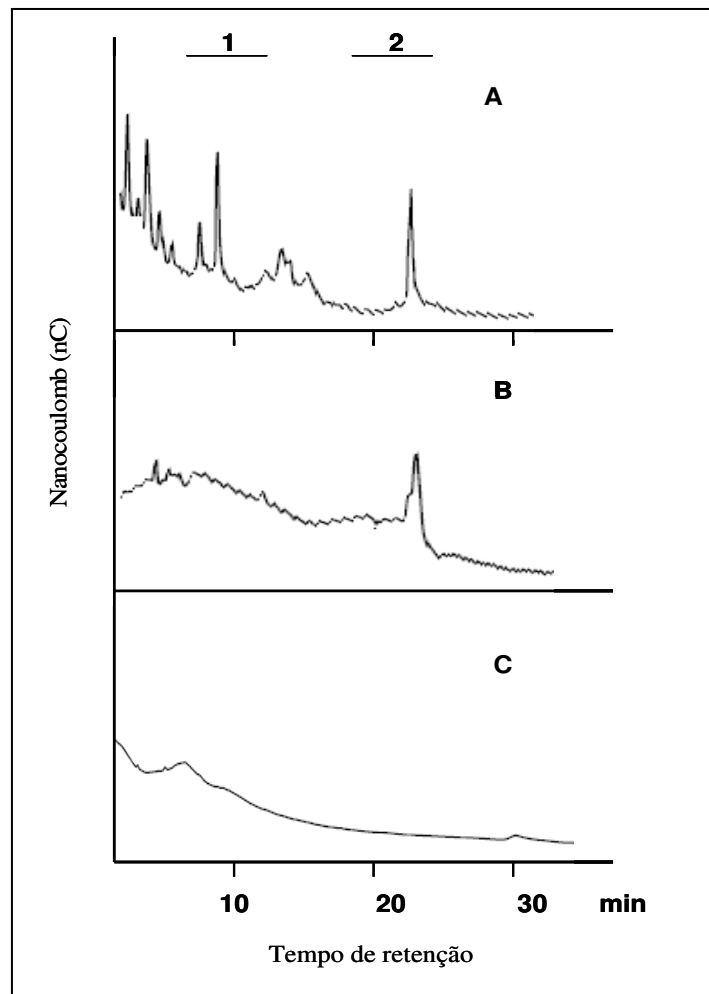


Figura 22- Análise das cadeias de oligossacarídeos dos anticorpos IgG1 anafiláticos, não-anafiláticos e dessialilados por HPAEC-PAD. Amostras de anticorpo IgG1 anafilático (A), não-anafilático (B) ou IgG1 dessialilado foram tratadas com PNGase para a obtenção das cadeias de carboidratos, as quais foram analisadas em condições ácidas. As indicações 1 e 2 representam cadeias mono e di-sialiladas, respectivamente, em relação aos padrões de oligossacarídeos.

4.4 Avaliação *in vivo* da atividade anafilática dos anticorpos IgG1 monoclonais após tratamento enzimático

4.4.1 Reação de PCA induzida por anticorpo monoclonal IgG1 deglicosilado

Realizadas as análises das cadeias de oligossacarídeos presentes nos anticorpos IgG1 monoclonais, o próximo objetivo foi avaliar a relevância destes monossacarídeos para atividade anafilática do anticorpo IgG1. Para tanto, amostras de IgG1 foram submetidas ao tratamento com enzimas que removem toda a cadeia glicosídica ou com enzimas que seletivamente removem resíduos específicos de açúcar. Após esta etapa, os anticorpos foram testados em PCA.

Assim, amostras de anticorpos IgG1 que foram deglicosilados pela ação da PNGaseF foram testados *in vivo* em reações de PCA com o objetivo de avaliar a dependência da cadeia de carboidratos para a atividade funcional do anticorpo. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos onde podemos verificar que a retirada da cadeia de oligossacarídeos aboliu 100% a capacidade do anticorpo de desencadear reação anafilática após desafio antigênico. Este anticorpo deglicosilado foi, então utilizado como controle em vários outros experimentos.

Tabela 6- Reações de anafilaxia cutânea passiva desencadeada por anticorpo IgG1 deglicosilado

ANTICORPOS	REAÇÃO ANTI-DNP
IgG1 anafilático	Positiva (20 ng/sítio)
IgG1 anafilático deglicosilado	Negativa (20-2000 ng/sítio)

Reações de PCA realizadas em camundongos BALB/c injetados com 50 μ L dos anticorpos IgG1 (20 ng-2 μ g/sítio) no dorso, via intradérmica. Após 2 horas de sensibilização, os camundongos foram desafiados com 0,5 mL de solução PBS contendo 0,5% de azul de Evans e 2 mg/mL DNP-BSA. Todas as reações foram realizadas em triplicata e os resultados somente considerados positivos quando resultaram em reação de no mínimo 5 mm de diâmetro.

4.4.2 Reação de PCA induzida por anticorpo monoclonal IgG1 defucosilado ou dessialilado

Considerando a diferença na quantidade de ácido siálico e fucose entre as cadeias de oligossacarídeos de ambos os tipos de IgG1, investigamos a participação desses monossacarídeos na atividade anafilática dos anticorpos IgG1. Assim, anticorpos IgG1 anafiláticos defucosilados ou dessialilados foram testados em reações de PCA. Como controle positivo e negativo, amostras de IgG1 anafilático e não-anafilático foram utilizadas, respectivamente.

A tabela 7 mostra que o anticorpo IgG1 dessialilado foi incapaz de mediar reação anafilática, mesmo quando injetado em altas concentrações (500 µg/50µL). Em contraste, a remoção de fucose do anticorpo IgG1 não alterou a sua atividade anafilática, induzindo, portanto reação semelhante à observada com o anticorpo anafilático não-tratado (controle positivo). Estes resultados indicam a participação do resíduo de ácido siálico na capacidade do anticorpo IgG1 de mediar reação anafilática

Tabela 7- Reação de anafilaxia cutânea passiva mediada por IgG1 dessialilado ou defucosilado.

ANTICORPO	REAÇÃO ANTI-DNP
IgG1 anafilático	Positiva (50 ng/sítio)
IgG1dessialilado	Negativa (50 to 5.000 ng/sítio)
IgG1 defucosilado	Positiva (50 ng/sítio)
IgG1 não-anafilático	Negativa (50-5.000 ng/sítio)

Camundongos previamente tricotomizados foram injetados no dorso com 50 µL de anticorpo anafilático (50 ng/sítio-U7.6); não-anafilático (H5) ou com anticorpo IgG1 anafilático (U7.6) tratado com as enzimas fucosidase, sialidase ou PNGase F (50 a 5000 ng/sítio). Após 2 horas de sensibilização, os camundongos foram desafiados i.v com solução de DNP-BSA em azul de Evans (0,5%). Todas as reações foram realizadas em triplicata e os resultados considerados positivos quando resultaram em uma reação de 5 mm de diâmetro.

É importante ressaltar que a eficiência do tratamento enzimático empregado para remoção dos resíduos de ácido siálico e/ou fucose das amostras de IgG1 foi confirmada por cromatografia de afinidade às lectinas *Sambucus nigra* e *Ulex europeaus I*. (Figura 2)

Além disso, foi verificada a integridade do anticorpo IgG1 dessialilado por eletroforese em gel de poliacrilamida 9 % , onde podemos observar ausência de degradação protéica pela ação das enzimas (Figura 23).

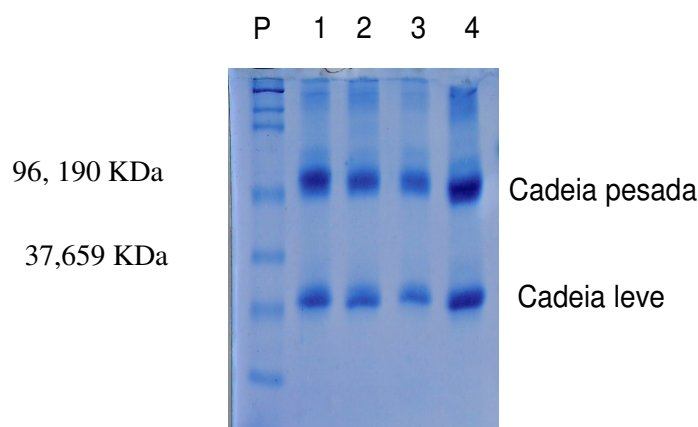


Figura 23- Perfil eletroforético de anticorpos IgG1 anafilático tratado ou não com sialidase e anticorpo não-anafilático em gel de poliacrilamida 9%.
Amostras dos anticorpos IgG1 anafilático , não-anafilático ou anafilático tratado *in vitro* com a enzima sialidase .
1= Anticorpo IgG1 anafilático; 2= Ac anafilático submetido a incubação a 37° C *overnight*; 3= Acanafilático incubado com sialidase *overnight* a 37 °C; 4= Ac IgG1 não-anafilático. P= padrão de peso molecular.

A afinidade antigênica, testada em ELISA, demonstra que os tratamentos enzimáticos utilizados na remoção da cadeia completa de carboidratos ou dos resíduos de ácido siálico das amostras IgG1 não interferiram na capacidade destes anticorpos de reconhecer o antígeno, uma vez que, foi obtido densidade ótica semelhante entre os anticorpos IgG1 submetidos ao tratamento e os IgG1 anafilático e não-anafilático (Figura 24).

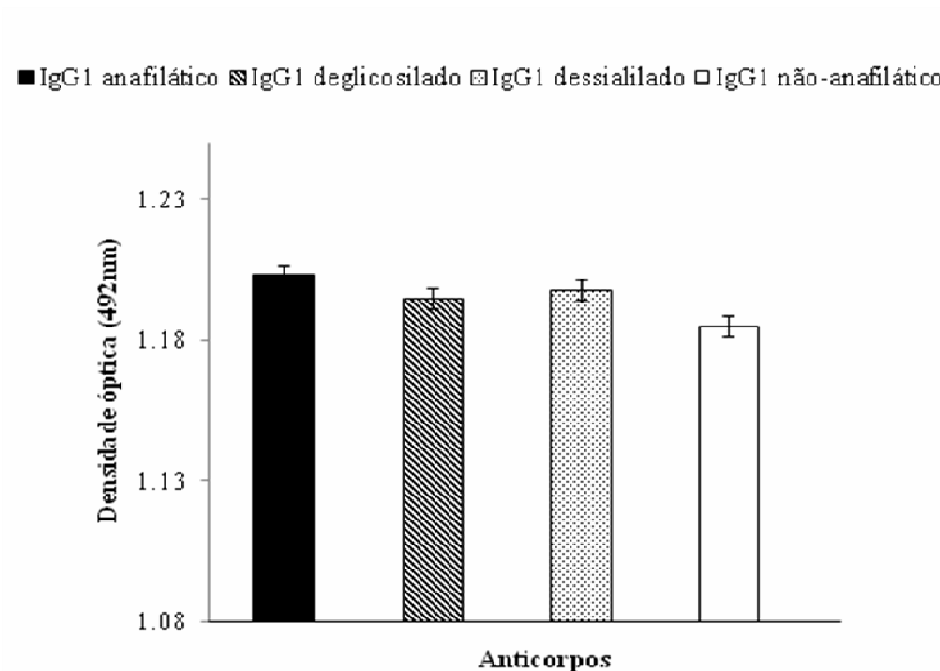


Figura 24 - Reconhecimento antigênico dos anticorpos IgG1 anafiláticos ou não-anafiláticos. Amostras de anticorpos IgG1 anafilático, anafilático dessialilado, anafilático deglicosilado ou não-anafilático (5µg/mL) foram adicionadas à placa de ELISA previamente sensibilizada com DNP-BSAA. Ligação dos anticorpos ao DNP foi revelada pela adição de anticorpo anti-IgG1biotinilado seguida de incubação com estreptoavidina-peroxidase. Os resultados representam a média das densidades ópticas obtidas das amostras de anticorpos IgG1 em triplicata \pm desvio padrão.

4.5 Análise da afinidade de ligação dos anticorpos IgG1 monoclonais aos receptores Fc γ III nos mastócitos

Sabe-se que a anafilaxia mediada por anticorpos IgE e IgG1 murinos ocorre via sua ligação aos receptores para Fc ϵ e Fc γ , respectivamente, expressos em mastócitos e basófilos. O reconhecimento do antígeno por estes anticorpos ligados aos receptores destas células promove a ativação que culmina com a desgranulação de mediadores pré-formados, síntese de outros mediadores farmacológicos e de citocinas que resultam na reação anafilática (MIYAJIMA et al., 1997; STRAIT et al., 2002; FINKELMAN et al., 2005).

Baseado nestas observações e nos resultados mostrando que o anticorpo IgG1 dessialilado é incapaz de mediar reação anafilática *in vivo*, estudamos se a incapacidade do

anticorpo IgG1 dessialilado de desencadear anafilaxia seria devido à deficiência na ligação desta molécula aos mastócitos ou ainda, ao comprometimento da transmissão do sinal de ativação celular.

Neste sentido, mastócitos da linhagem celular PT18, que expressam FcεRI e FcγRII/III (VANDERHOEK et al., 1982; FAQUIM-MAURO et al., 2003), foram incubados com duas concentrações do anticorpo IgG1 dessialilado e analisados por citometria de fluxo. Como controle positivo e negativo, mastócitos foram incubados com anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos, respectivamente. A figura 25 mostra alta porcentagem de mastócitos positivos (fluorescentes) quando incubados com as duas concentrações do anticorpo anafilático (74-40%) e diminuição na porcentagem de células marcadas após incubação com o anticorpo dessialilado (4,6-5,3%). Similarmente, foi observada baixa porcentagem de mastócitos positivamente marcados (9,8-6,4%) após a incubação com as duas concentrações da IgG1 não-anafilática (Figura 25 F, G).

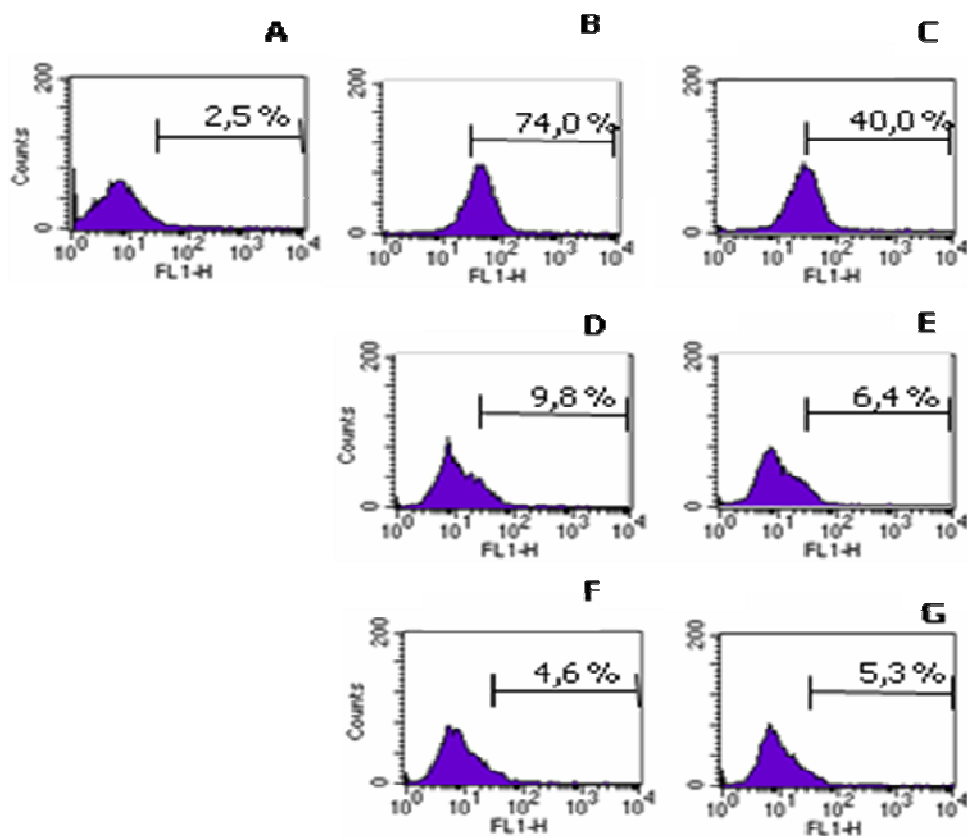


Figura 25 -Análise da ligação dos anticorpos IgG1 anafilático, não-anafilático ou IgG1 dessialilado aos mastócitos *in vitro* .

Células PT18 foram incubadas com cada tipo de IgG1, seguida de incubação com anticorpo anti-IgG1 de camundongo biotilado e estreptoavidina-FITC: (A) Mastócitos incubados apenas com anticorpo secundário e com estreptoavidina-FITC; (B, C) Mastócitos incubados com 40 ou 20 ng de anticorpo IgG1 anafilático; (D, E) Mastócitos incubados com anticorpo IgG1 não-anafilático (40 ou 20 ng); (F, G) Mastócitos incubados com 40 ou 20 ng de anticorpo IgG1 dessialilado. Os histogramas representam os resultados obtidos e mostram a porcentagem de células positivamente marcadas. Todas as condições experimentais foram realizadas em duplicata e os gráficos são representativos de três experimentos independentes.

4.6 Avaliação da capacidade dos anticorpos monoclonais IgG1 de induzir desgranulação de mastócitos *in vitro*

A capacidade dos anticorpos IgG1 de induzir desgranulação foi também avaliada pela determinação da enzima β -glucuronidase armazenada nos grânulos citoplasmáticos e liberada após a ativação e desgranulação celular. Os resultados demonstram que a porcentagem de secreção da enzima β -glucuronidase foi significativamente menor quando os mastócitos

(PT18) foram incubados com anticorpo IgG1 dessialilado em comparação ao obtido em células incubadas com anticorpo IgG1 anafilático/não-tratado. Além disso, baixa porcentagem de liberação desta enzima também foi observada em mastócitos incubados com o anticorpo não-anafilático (Figura 26).

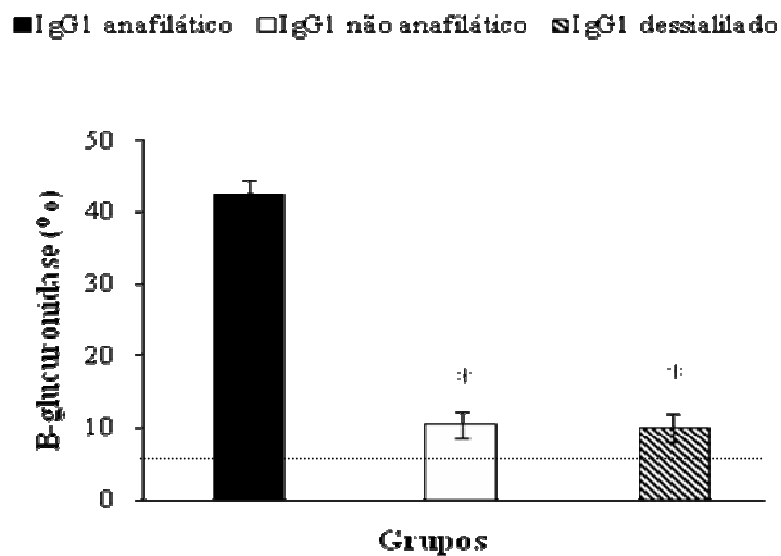


Figura 26- Secreção da enzima β -glucuronidase por mastócitos (PT18) incubados com anticorpos IgG1 anafilático, não-anafilático ou IgG1 dessialilado anti-DNP e posteriormente desafiados com DNP-BSA.

8×10^5 células foram incubadas com 40 ng de anticorpo IgG1 anafilático, não-anafilático ou IgG1 dessialilado e em seguida desafiados com DNP-BSA. A liberação da enzima β -glucuronidase foi avaliada nos sobrenadantes das células e os resultados expressos como a porcentagem total da atividade da enzima presente nas células, após subtração da atividade enzimática do sobrenadante de células não-estimuladas (média das quadruplicatas \pm SD) * $p < 0,05$ comparado com anticorpo IgG1 anafilático.

4.7 Análise das cadeias de oligossacarídeos dos anticorpos IgG1 produzidos em resposta a imunização com antígenos de extrato do *Ascaris suum* (Asc)

4.7.1 Purificação dos anticorpos IgG1 de camundongos IFN- γ KO ou IL-4KO e análise de suas cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas por cromatografia de afinidade

Foi demonstrado anteriormente, que componentes distintos de alta ou baixa massa molecular (PI e PIII) do extrato de Asc são capazes de induzir *in vivo* a síntese preferencialmente de anticorpos IgG1 não-anafiláticos ou anafiláticos, respectivamente. Além disso, foi mostrado 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 (FAQUIM-MAURO e MACEDO, 1998). Tendo em vista estas observações e os resultados de caracterização das cadeias *N*-ligadas aos anticorpos IgG1 monoclonais, tivemos o objetivo de estudar as cadeias de açúcares ligadas aos anticorpos IgG1 policlonais induzidos em resposta à imunização com PI ou PIII e comparar esses resultados com os obtidos com os monoclonais.

Para obter soros de camundongos com o predomínio de um subtipo ou outro de IgG1, realizamos experimentos de imunização de camundongos IL-4KO com os componentes do PI que induz a síntese preferencial do subtipo não-anafilático e em paralelo imunizamos camundongos IFN- γ KO com os componentes do PIII, os quais promovem a resposta predominante de IgG1 do subtipo anafilático.

Após a obtenção dos soros e com o objetivo de isolar somente os anticorpos anti-Asc, utilizamos a estratégia de purificação por afinidade em coluna de Asc-sepharose 4B.

Pode ser observado nas figuras 27A e 27B os perfis de eluição dos soros obtidos dos camundongos IL-4KO ou IFN- γ KO previamente imunizados com PI ou PIII, respectivamente, quando submetidos à cromatografia de afinidade. Observam-se dois picos distintos cujo primeiro representa os anticorpos não específicos aos antígenos do Asc e que,

portanto, não se ligaram à coluna, e o segundo pico compreende a fração de anticorpos anti-Asc eluídos após a aplicação do tampão de eluição.

Com a finalidade de separar o isótipo IgG1 presente nas amostras de anticorpos anti-Asc acima descritas, estas foram novamente submetidas a outra cromatografia de afinidade à proteína A-Sepharose. Os anticorpos anti-Asc das diferentes subclasses foram eluídos da coluna com soluções-tampão de pHs distintos.

Como podemos verificar nas figuras 28A e 28B, dois picos foram observados ao longo da cromatografia, sendo o primeiro obtido após a aplicação da solução de cloreto de sódio 2M contendo Glicina 1M pH 9,0 e segundo pico contendo os anticorpos IgG1 anti-Asc e obtido após a passagem da solução de cloreto de sódio 0,15M pH 3,0. Todas as amostras foram testadas em ELISA quanto à eficiência da purificação após cromatografia. A fração contendo os anticorpos IgG1 foi também avaliada em PCA.

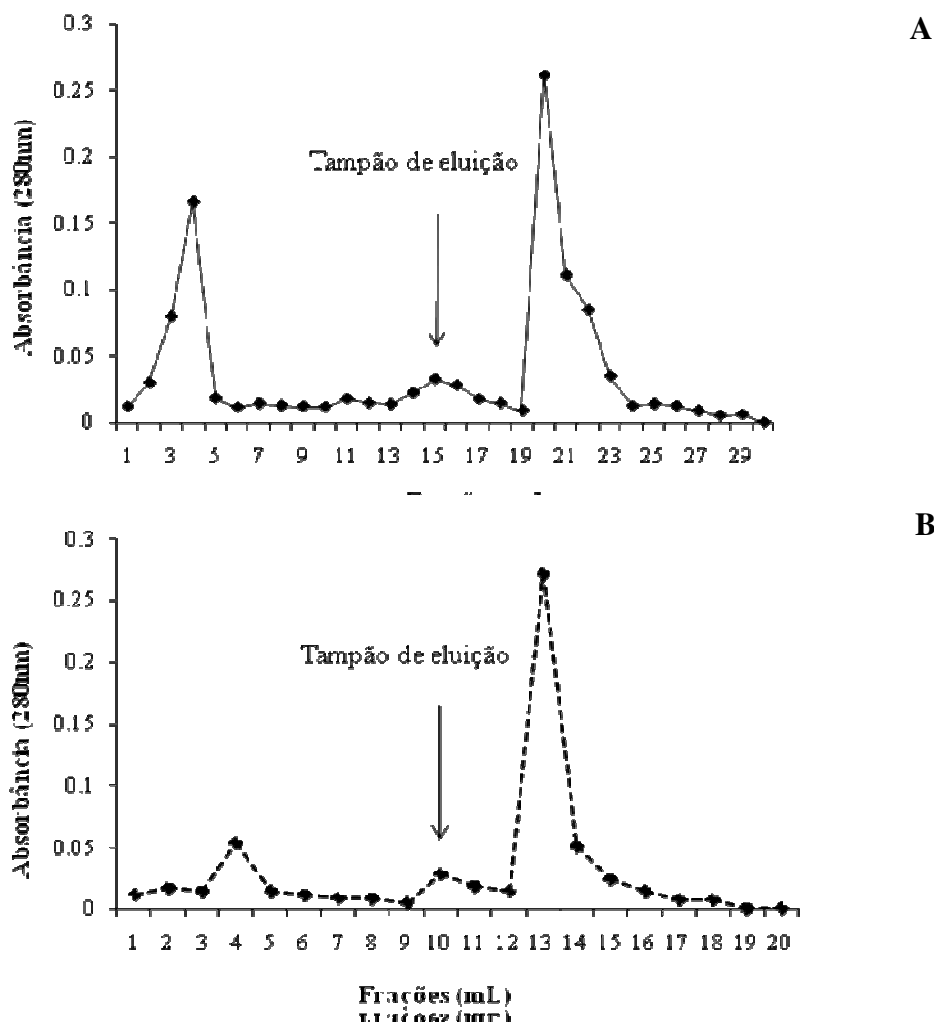


Figura 27 - Purificação de anticorpos IgG1 de soros de camundongos IFN- γ KO imunizados com PIII.

(A) Perfil cromatográfico de amostra de soros de camundongos IFN- γ KO imunizados com PI (150 μ g/animal) submetido à cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose acoplada ao extrato de *Ascaris suum*.

(B) Perfil cromatográfico da fração contendo os anticorpos anti-Asc submetida à cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose. Todas as frações obtidas foram monitoradas em espectrofotômetro a 280 nm.

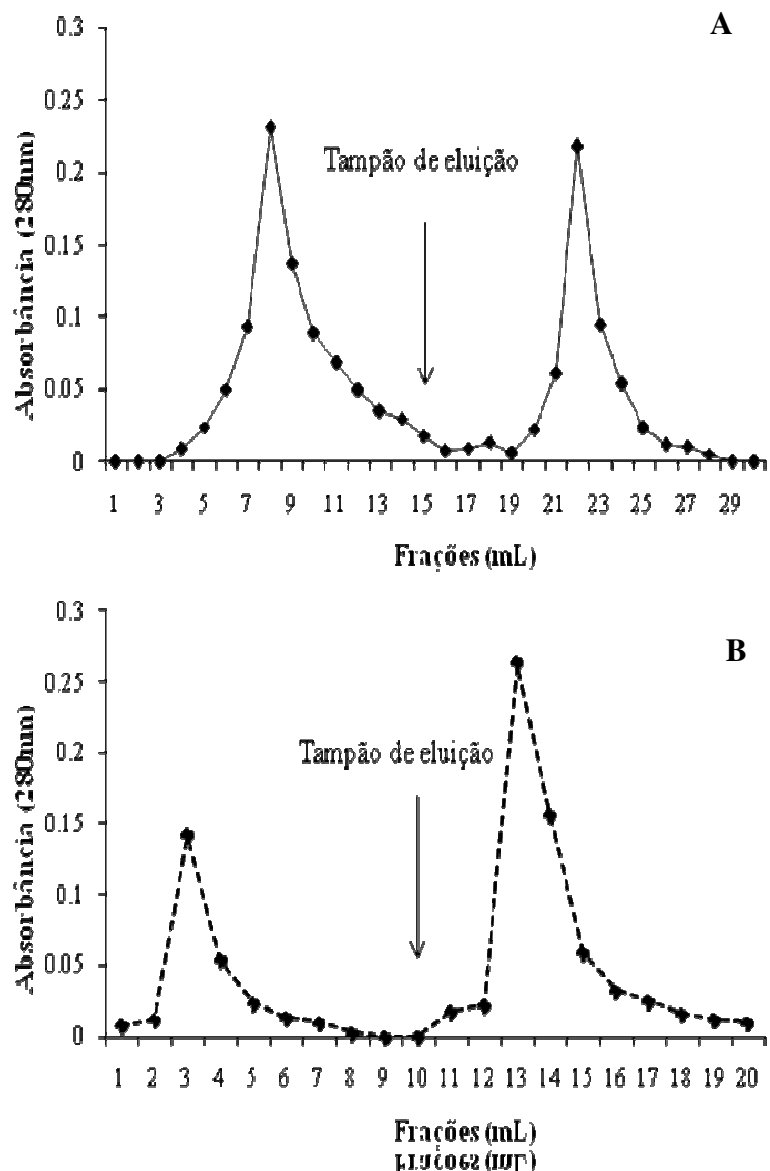


Figura 28- Purificação de anticorpos IgG1 de soros de camundongos IL-4KO imunizados com PI.

(A) Perfil cromatográfico de amostra de soros de camundongos IL-4KO imunizados com PI (150µg/animal) submetido à cromatografia de afinidade em coluna Sepharose acoplada ao extrato de *Ascaris suum*.

(B) Perfil cromatográfico da fração contendo os anticorpos anti-Asc submetida à cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose. Todas as frações obtidas foram monitoradas em espectrofotômetro a 280 nm.

Na figura 29 observa-se a presença somente de anticorpos da classe IgG1 específicos anti-Asc nas amostras purificadas dos soros de camundongos tanto IL-4KO como IFN-γKO,

o que demonstra eficiência do processo de purificação. Além disso, constatamos que os anticorpos IgG1 anti-Asc purificados do soro de camundongos IFN- γ KO foram capazes de induzir reação anafilática, ao contrário dos anticorpos IgG1 anti-Asc obtidos de soros de camundongos IL-4KO (Tabela 8).

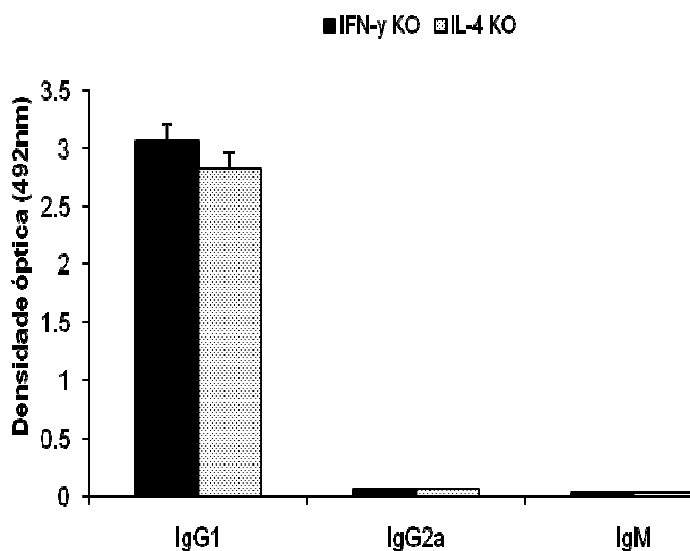


Figura 29- Títulos de anticorpos anti-Asc nas amostras obtidas após purificação por cromatografia de afinidade.

Amostras de soros de camundongos IL-4KO ou IFN- γ KO imunizados com PI ou PIII, respectivamente, foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna de Asc-Sepharose seguida de proteína A-sepharose e foram testadas em ELISA, na diluição de 1/50, segundo o protocolo descrito em material e métodos. Os resultados foram expressos como a média da densidade óptica obtida das amostras em duplicata \pm desvio padrão.

Tabela 8- Indução de anafilaxia cutânea passiva *in vivo* por anticorpos IgG1 purificados de camundongos IL-4KO ou IFN- γ KO

Amostras	Concentração	Reação anti-Asc
IgG1 /IFN- γ KO	250 ng	Positivo
IgG1 /IL-4 KO	250 ng	Negativo

Camundongos previamente tricotomizados foram injetados no dorso com 50 μ L dos anticorpos IgG1 purificados dos soros de camundongos IFN- γ KO imunizados com PIII (250 ng/sítio) ou de camundongos IL-4KO imunizados com PI (150 ng/sítio). Após 2 horas de sensibilização, os camundongos foram desafiados i.v. com solução de Asc (1 mg/mL) em azul de Evans (0,5%). Todas as reações foram realizadas em triplicatas e os resultados foram considerados positivos quando resultaram em uma reação > que 5 mm de diâmetro.

Utilizando a mesma estratégia experimental empregada para os anticorpos monoclonais, também foi avaliada a afinidade de ligação dos anticorpos IgG1 purificados de soros de camundongos IFN- γ KO ou IL-4KO imunizados com PIII ou PI. Como resultado pôde-se observar diferença na ligação dos anticorpos IgG1 purificados dos soros dos camundongos previamente imunizados, ou seja, anticorpos IgG1 anafiláticos purificados de camundongos IFN- γ KO apresentaram maior ligação às lectinas *Bauhinia purpúrea*, *Erythrina cristagalli*, *Ulex Europeaus I*, *Sambucus nigra* e *Limulus polyphemus* em relação ao obtido com os anticorpos IgG1 não-anafiláticos purificados de camundongos IL-4KO (Figura 30). Este resultado, assim como o obtido com os anticorpos monoclonais, sugere que os anticorpos IgG1 de camundongos IFN- γ KO e que apresentam atividade anafilática possuem cadeia de oligossacarídeo com maior conteúdo de acetilgalactosamina, galactose, fucose e ácido siálico em relação aos anticorpos IgG1 não-anafiláticos purificados de camundongos IL-4KO.

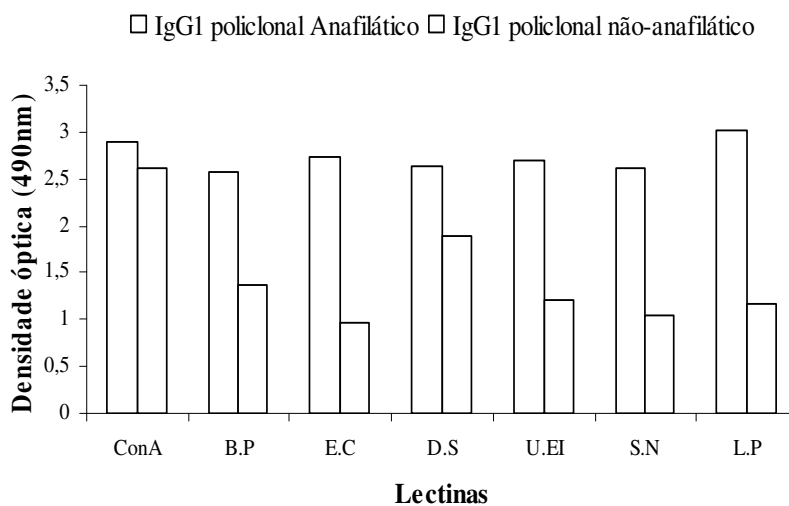


Figura 30 - Afinidade de ligação dos anticorpos IgG1 policlonais anafiláticos ou não-anafiláticos a diferentes lectinas.

Amostras de 5 μ g/mL dos anticorpos IgG1 purificados dos camundongos IFN- γ KO imunizados com PIII (anafiláticos) ou IL-4KO imunizados com PI (não-anafiláticos) foram incubadas em placas previamente sensibilizadas com 1 μ g/mL das diferentes lectinas, seguida de incubação com anticorpo anti-IgG1 biotilado e estreptoavidina-peroxidase. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm. Lectinas utilizadas no ensaio: *Canavalia ensiformis* (Con A), *Bauhinia purpurea* (B.P), *Erythrina cristagalli* (E.C), *Datura stramonium* (D.S), *Ulex Europeaus I* (U.EI), *Sambucus nigra* (S.N) e *Limulus polyphemus* (L.P). Os resultados representam a média das densidades ópticas obtidas nas amostras em triplicata.

Considerando que os anticorpos IgG1 monoclonais apresetam cadeias glicosídicas com conteúdos diferentes de ácido siálico e fucose, estudamos se nos anticorpos IgG1 policlonais anti-Asc esta diferença no padrão de glicosilação também seria evidente. Portanto, avaliamos o perfil de eluição dos anticorpos IgG1 purificados quando submetidos à coluna *Sambucus nigra*-Sepharose. Além disso, analisamos se esta metodologia seria capaz de separar das amostras de anticorpos IgG1 anti-Asc, os dois subtipos de IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos.

Na amostra de anticorpos IgG1 de camundongos IFN- γ KO imunizados com PIII, verificamos predomínio de anticorpos ligados à coluna e portanto somente eluídos com o monossacarídeo competidor, como mostra a figura 31A. Por outro lado, observamos que a maior parte dos anticorpos purificados de camundongos IL-4KO imunizados com PI foram recuperados da coluna durante a aplicação do tampão de ligação (figura 31B).

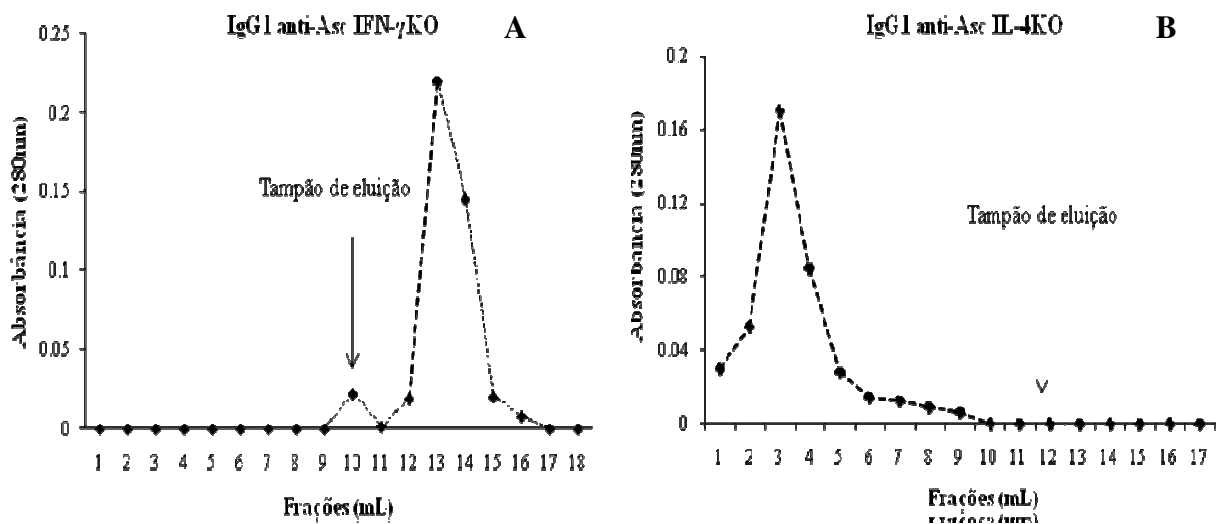


Figura 31- Afinidade dos anticorpos IgG1 anti-Asc purificados do soro de camundongos IFN- γ KO ou IL-4KO.

Amostra de anticorpos IgG1 anti-Asc de camundongos IFN- γ KO (A) ou de camundongo IL-4KO (B) foram submetidas a cromatografia de afinidade à lectina *Sambucus nigra*.

Avaliamos ainda, o conteúdo de oligossacarídeos mono e di-sialilados nesses anticorpos anti-Asc por HPAEC-PAD. Como resultado, pode-se observar que o anticorpo IgG1 de camundongos IFN- γ KO apresentou perfil semelhante ao observado com o anticorpo monoclonal anafilático, mostrando a presença de oligossacarídeos mono e di-sialilados. Em contraste, nos anticorpos IgG1 anti-Asc de camundongos IL-4KO, não observamos a presença simultaneamente, destes tipos de oligossacarídeos, como previamente verificado com o anticorpo monoclonal não-anafilático (Figura 32).

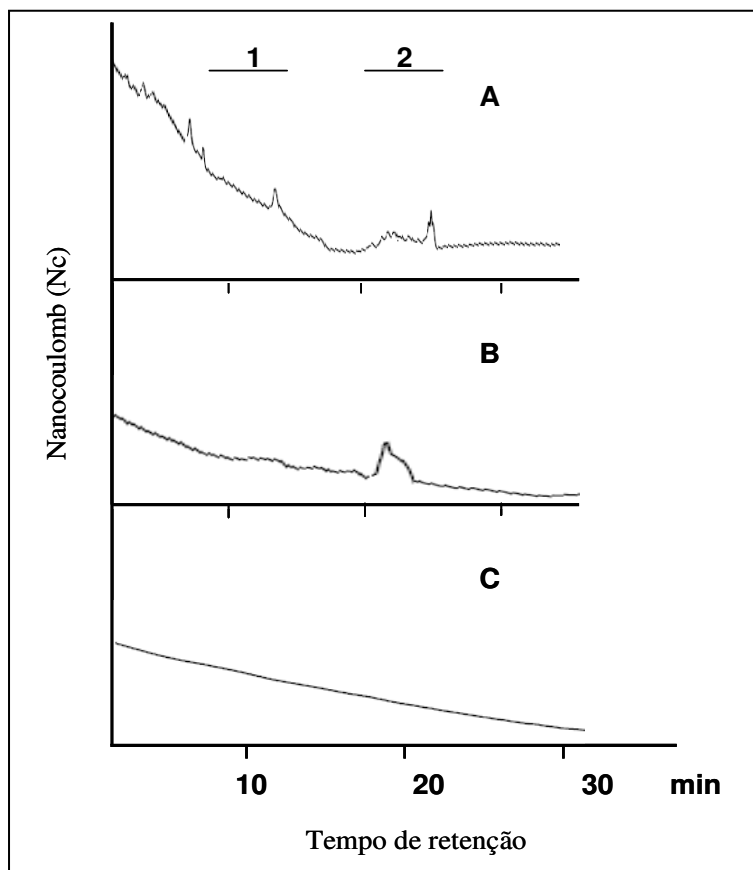


Figura 32-Análise das cadeias de oligossacarídeos dos anticorpos IgG1 purificados de soros de camundongos IFN- γ KO (A) , anticorpos IgG1 purificados de soros de camundongos IL-4KO (B) e anticorpo IgG1 dessialilado (C) por HPAEC-PAD. Amostras dos anticorpos IgG1 previamente purificados de soros de camundongos imunizados foram tratadas com PNGaseF para a remoção e isolamento das cadeias de carboidratos, as quais foram analisadas em condições ácidas. As indicações 1 e 2 representam as cadeias monossialiladas e dissialiladas, respectivamente, pela comparação com padrões de oligossacarídeos.

4.8 Análise da expressão gênica das enzimas envolvidas no processo de glicosilação anticorpos

É sabido que o processo de glicosilação de todas as proteínas ocorre no complexo de Golgi, o qual é controlado enzimaticamente pela ação de glicosiltransferases e glicosidases. Durante este processo, fatores como presença das diferentes enzimas, resíduos de monossacarídeos disponíveis e a composição da cadeia polipeptídica determinam o tipo de estrutura de carboidratos que será associada à molécula (DENNIS et al, 1999). Baseado nestes dados foi analisada por PCR em tempo real a expressão dos genes *α -sialiltransferase*, *β -galactosiltransferase*, *α -manosidase*, *α -N-acetilglucosaminiltransferase*, *α -D-glucosidase* e *oligossacariltransferase* que codificam enzimas que estão diretamente envolvidas no processo de glicosilação de anticorpos.

Inicialmente, foram realizados ensaios de padronização da técnica para determinar a concentração dos *primers* utilizados e da escolha do gene constitutivo.

Após a certificação das condições ideais para a realização das PCRs, partimos para análise da expressão gênica. Para isso, os hibridomas foram cultivados *in vitro* e o RNAmensageiros foram isolados e utilizados em PCRs em tempo real para a análise da expressão dos genes que codificam as diferentes enzimas. Em todos os ensaios foi realizada a amplificação do gene da molécula constitutiva β -actina nas amostras de cDNAs tanto dos hibridomas como dos linfócitos B purificados dos camundongos previamente imunizados com PI ou PIII, como já descrito. Os resultados foram expressos considerando a amostra do hibridoma produtor do anticorpo IgG1 anafilático como referência.

A primeira enzima estudada foi a oligossacariltransferase que é responsável pela adição do primeiro grupamento de açúcares à cadeia polipeptídica da molécula de anticorpo. Foi observado (Figura 33) que a expressão do gene dessa enzima foi semelhante nos dois

hibridomas estudados. A expressão dos genes *glicosidase I e II* também foi igual em ambos os hibridomas.

Por outro lado, a análise dos genes: *N-acetilglicosaminiltransferase, manosidases I e II, galactosiltransferase e fucosiltransferase IV e VII* permitiu verificar que todos estes estiveram menos expressos no hibridoma produtor da molécula de IgG1 não-anafilática (H5) em relação ao produtor da IgG1 anafilática (U7.6) (Figura 33).

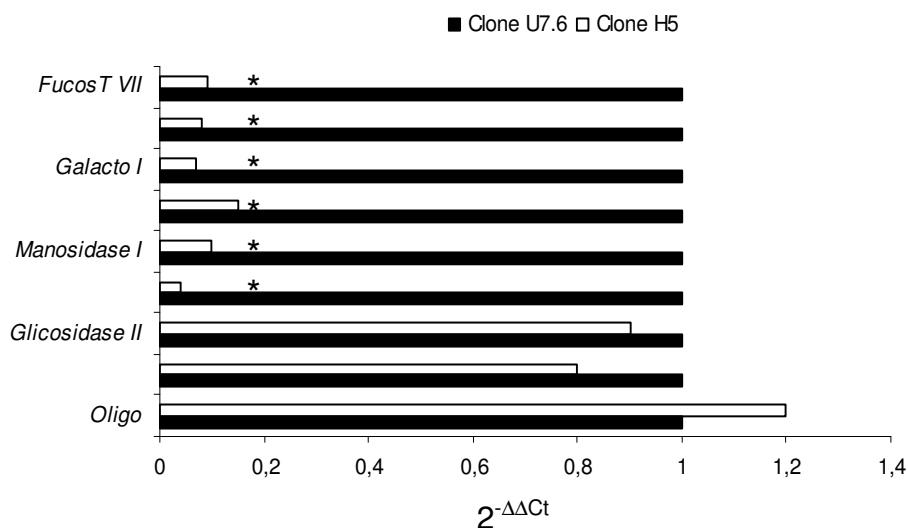


Figura 33- Expressão relativa dos genes *glicosiltransferases* em hidridomas U7.6 e H5. 1×10^7 células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNA, síntese de cDNA e a expressão gênica de *Oligossacariltransferase* (Oligo); *Glicosidase* (I e II); *N-acetilglicosaminiltransferase* (N-acetilglicosil I); *Manosidase I e II*; *Galactosiltransferase* (Galacto I); *Fucosiltransferase* (IV e VII) foi avaliada em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Avaliamos também os genes *sialiltransferases*: *ST3Gal I-V*; *ST6Gal I*; *ST6GalNac I-IV* e *ST8sial I-V*. Podemos verificar na figura 34, que a expressão de *ST3Gal I, II e V* foi semelhante nos dois hidridomas. No entanto, os genes *ST3Gal III e IV* estiveram menos expressos no hibridoma produtor do não-anafilático (H5), principalmente o *ST3Gal III*.

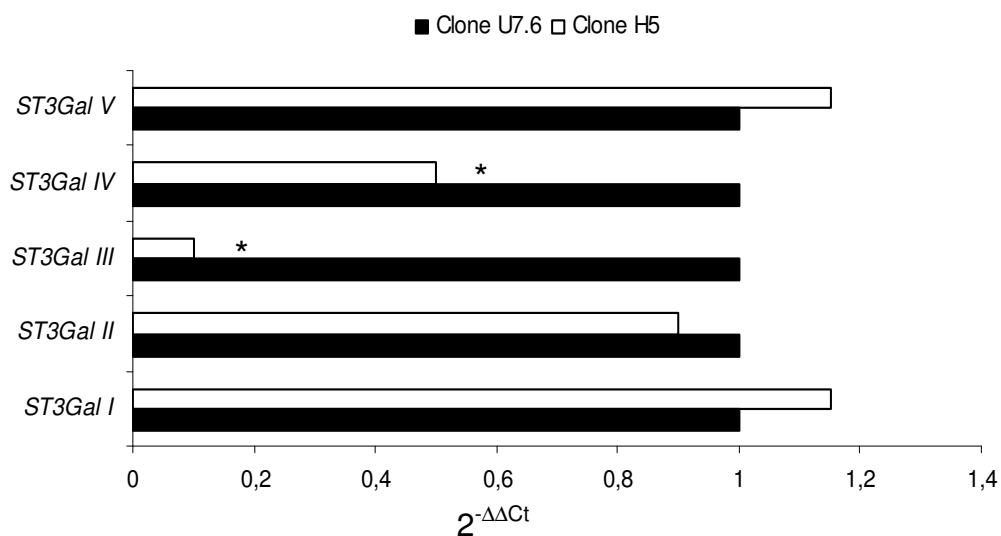


Figura 34- Expressão gênica de *ST3Gal (I-V)* nos hidridomas U7.6 e H5.

1×10^7 células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNAm e a expressão de *sialiltransferases (ST3Gal I – V)* foram avaliadas em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Analisando os genes que codificam as enzimas *ST6Gal I* e *ST6GalNac III* e *IV* constatamos que a expressão destes, esteve menor no hibridoma produtor do não-anafilático (H5), como mostra a figura 35.

Com relação à análise dos genes que codificam as enzimas *ST8sial I-V*, foi observado que apenas o *ST8Sial III* foi mais expresso no hibridoma U7.6 em relação do H5 (Figura 36).

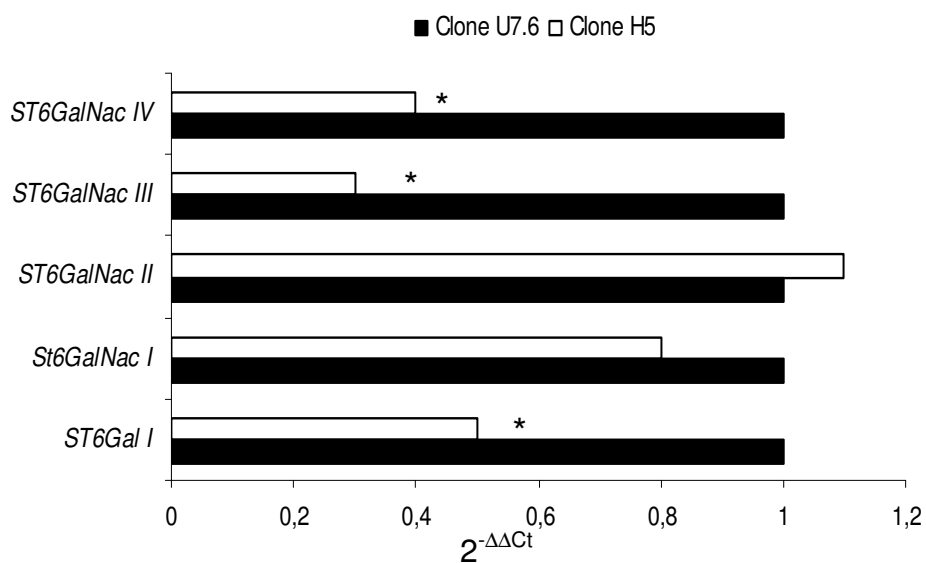


Figura 35- Expressão gênica de *ST6Gal I* e *ST6GalNac (I-IV)* nos hidridomas U7.6 e H5. 1×10^7 células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNAm e a expressão de sialiltransferases (*ST6Gal* e *ST6GalNac I-IV*) foram avaliadas em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

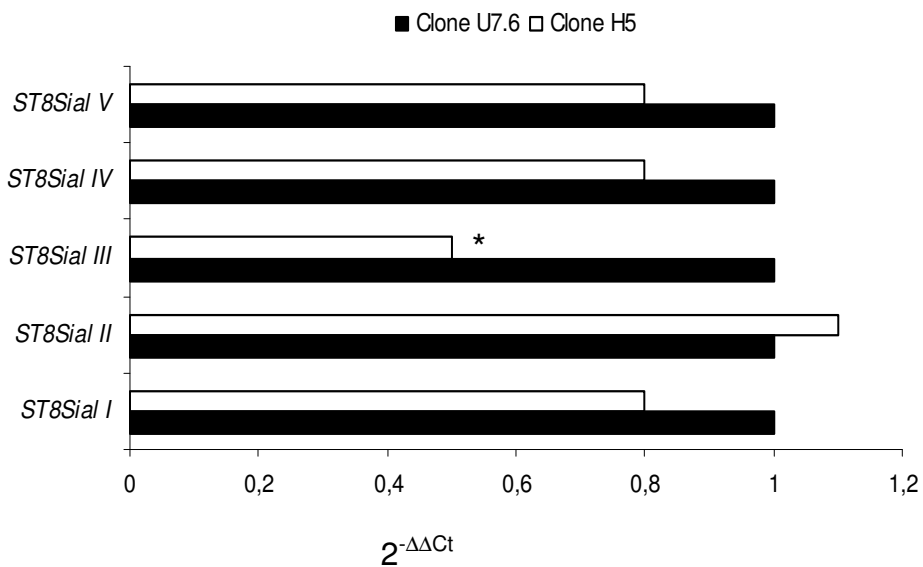


Figura 36- Expressão gênica de *ST8Sial (I-V)* nos hidridomas U7.6 e H5. 1×10^7 células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNAm e a expressão das enzimas sialiltransferases (*ST8Sial I-V*) foram avaliadas em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Dando continuidade a este estudo que enfoca a expressão de enzimas glicosidases, decidimos investigar algumas destas famílias de sialiltransferases nos linfócito B purificados de camundongos IFN- γ KO ou IL-4KO previamente imunizados, como descrito em material e métodos.

Como resultado foi observado menor expressão dos genes que codificam a maioria das enzimas nos linfócitos B de camundongos IL-4KO imunizados com PI em relação ao obtido nos linfócitos B purificados dos camundongos IFN- γ KO imunizados com PIII, com exceção de *ST3Gal V*, *ST8Sial II e IV* (Figuras 37, 38 e 39).

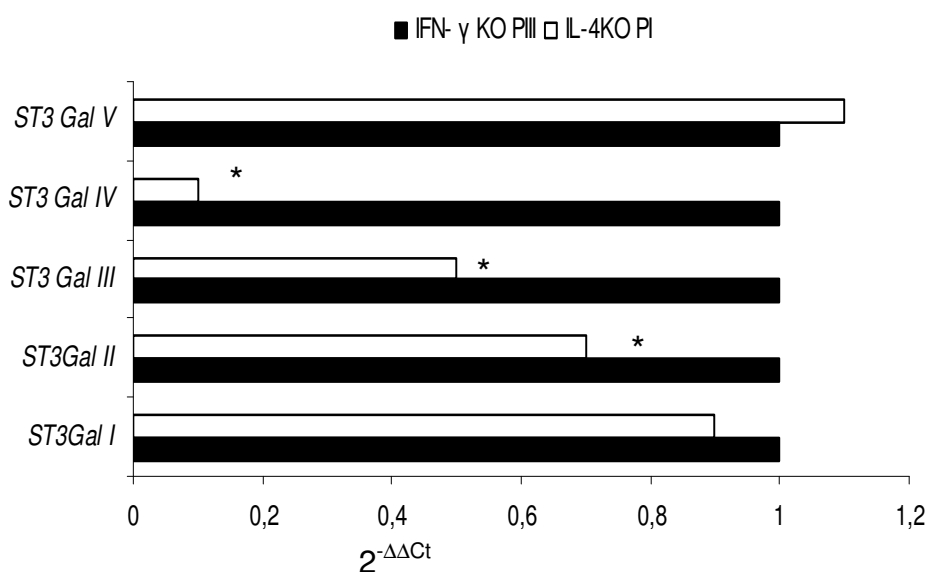


Figura 37- Expressão gênica de *ST3Gal (I-V)* nos linfócitos B purificados de camundongo IFN- γ KO imunizados com PIII ou IL-4KO imunizados com PI. 1×10^7 células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNAm e a expressão das enzimas sialiltransferases (*ST3Gal I-V*) foram avaliadas em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

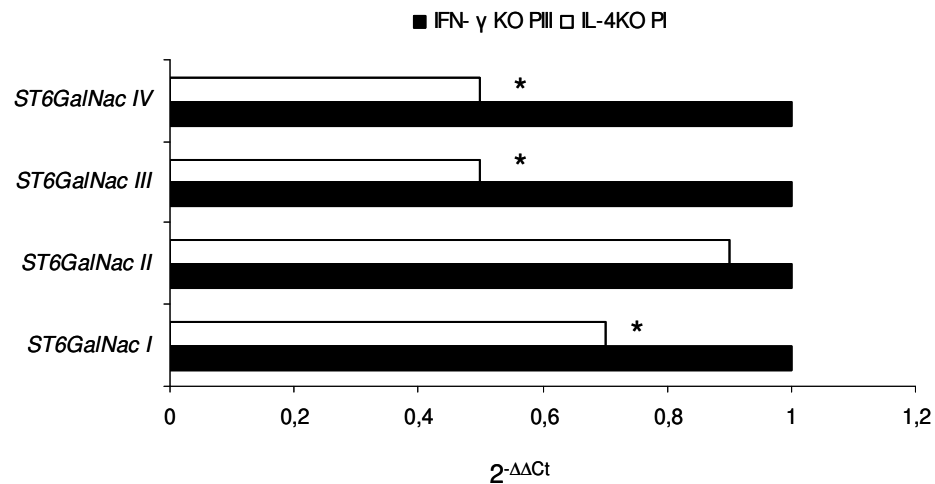


Figura 38- Expressão gênica de *ST6GalNac (I-IV)* nos linfócitos B purificados de camundongo IFN- γ KO imunizados com PIII ou IL-4KO imunizados com PI. 1×10^7 células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNAm e a expressão das enzimas sialiltransferases (*ST6GalNac I-IV*) foram avaliadas em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

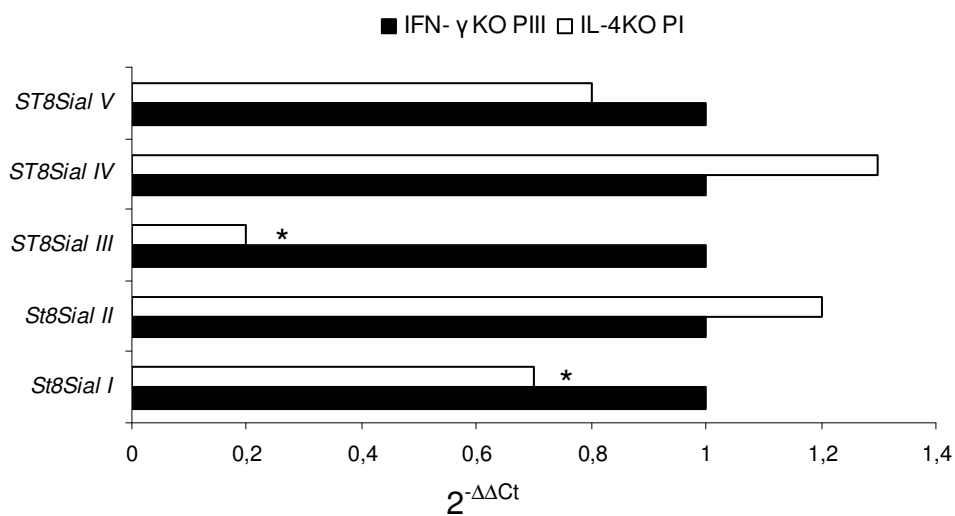


Figura 39- Expressão gênica de *ST8Sial (I-V)* nos linfócitos B purificados de camundongo IFN- γ KO imunizados com PIII ou IL-4KO imunizados com PI. 1×10^7 células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNAm e a expressão das enzimas sialiltransferases (*ST8Sial I-V*) foram avaliadas em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Também foi avaliada a expressão de *sialiltransferases* nos linfócitos B purificados de camundongos IL-4KO ou IFN- γ KO com intuito de verificar a modulação por citocinas do perfil de glicosilação dos anticorpos IgG1.

Como resultado, pôde-se observar que houve menor expressão de *ST3Gal III*, *ST6GalNacI* e *III* nos linfócitos B de camundongos IL-4KO em relação aos de camundongos IFN- γ KO (Figuras 40, 41 e 42).

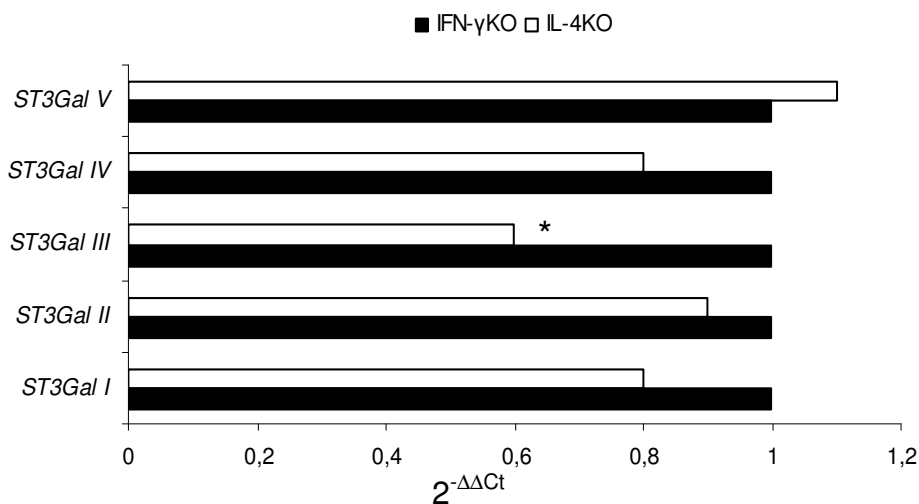


Figura 40- Expressão gênica de *ST3Gal (I-V)* em linfócitos B de camundongo IFN- γ KO e IL-4KO. 1×10^7 células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNAm e a expressão das enzimas sialiltransferases (*ST8Sial I-V*) foram avaliadas em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

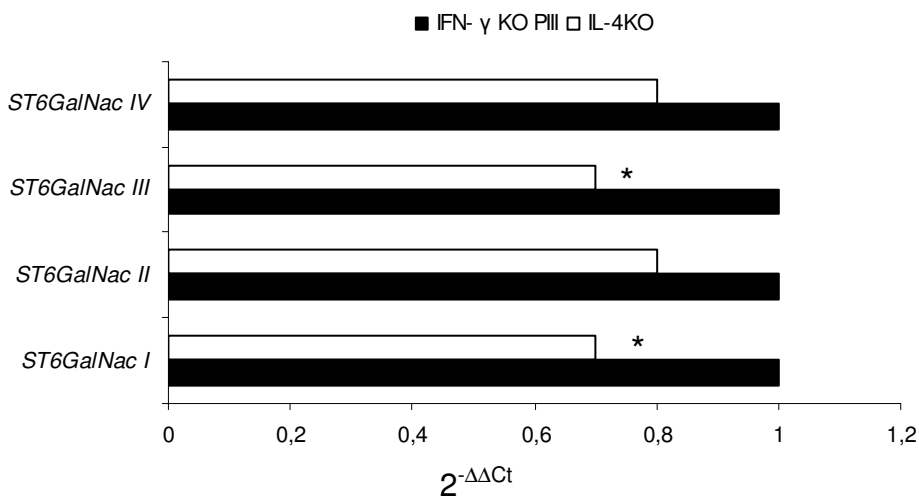


Figura 41- Expressão gênica de *ST6GalNac (I-IV)* em linfócitos B de camundongo IFN- γ KO e IL-4KO. 1×10^7 células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNAm e a expressão das enzimas sialiltransferases (*ST8Sial I-V*) foram avaliadas em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos com $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

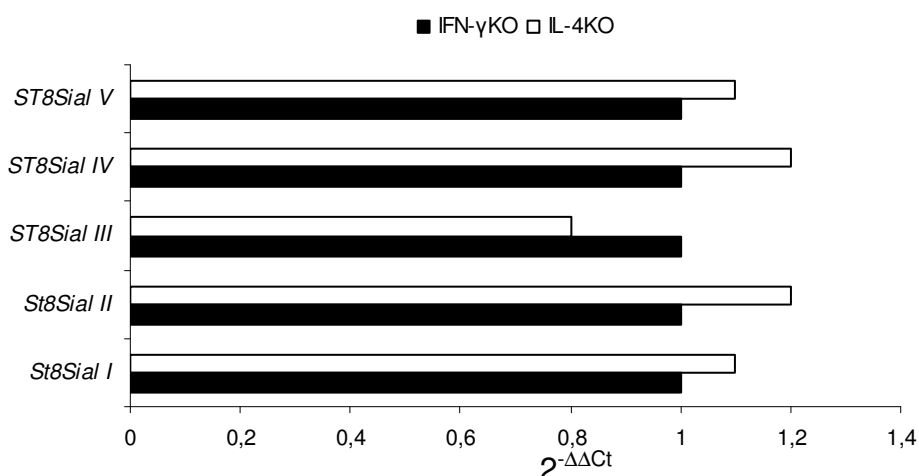


Figura 42- Expressão gênica de *ST8Sial (I-V)* em linfócitos B de camundongo IFN- γ KO e IL-4KO. 1×10^7 células foram coletadas e utilizadas para a extração de RNAm e a expressão das enzimas sialiltransferases (*ST8Sial I-V*) foram avaliadas em reações de PCR em Tempo Real. Os resultados foram expressos como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

4.9 Avaliação da atividade enzimática das sialiltransferases

Visto que houve diferença na expressão gênica das *sialiltransferases*, focamos o nosso estudo na avaliação da atividade das enzimas sialiltransferases, como possível explicação para o aumento de resíduos de ácido siálico encontrado na molécula de anticorpos IgG1 anafiláticos em relação ao não-anafiláticos.

Para tanto, empregamos o ensaio imunoenzimático que fundamenta-se na incubação de anticorpos IgG1 dessialilados com as enzimas sialiltransferases obtidas dos hibridomas U7.6 e H5 juntamente com resíduos de ácido siálico. A adição deste monossacarídeo à molécula de anticorpo foi avaliada pela sua afinidade a lectina *Sambucus nigra* e a reação revelada pela técnica de ELISA.

Na figura 43 pode ser observado que o anticorpo dessialilado que foi incubado com as enzimas obtidas do hibridoma U7.6 apresentou maior afinidade à *Sambucus nigra* que o anticorpo dessialilado e incubado com as enzimas do hibridoma H5. Além disso, a afinidade

de ligação do anticorpo incubado com as enzimas U7.6, foi semelhante à observada com o anticorpo anafilático.

A partir deste resultado, foi possível determinar a atividade enzimática das sialiltransferases obtidas de hibridomas U7.6 e H5, representada na figuras 44. É possível observar que a atividade de sialiltransferases provenientes do hibridoma U7.6 foi estatisticamente mais eficiente na adição de ácido siálico à molécula de IgG1, que as enzimas sialiltransferases do hibridoma H5.

Diante destas observações, testamos a capacidade das enzimas sialiltransferases do hibridoma U7.6 de promover a adição de ácido siálico nos anticorpos IgG1 monoclonais não-anafiláticos. Verificamos aumento da afinidade dos anticorpos IgG1 não-anafiláticos a *Sambucus nigra*, após incubação com enzimas sialiltransferases do hibridomas U7.6, quando comparado com os anticorpos IgG1 não-anafiláticos ou quando estes foram incubados com sialiltransferases do hibridoma H5. Além disso, foi possível verificar afinidade similares entre anticorpos IgG1 anafiláticos e anticorpos não-anafiláticos incubados com sialiltransferases do hibridoma U7.6 (Figura 45).

Pudemos observar ainda, que a atividade das sialiltransferases do hibridoma U7.6 foi estatisticamente mais eficiente na sialilação dos anticorpos IgG1 não-anafiláticos em relação as sialiltransferases de hibridoma H5 (Figura 46). Este resultado sugere aumento no conteúdo de ácido siálico presente nos anticorpos IgG1 não-anafiláticos após reação.

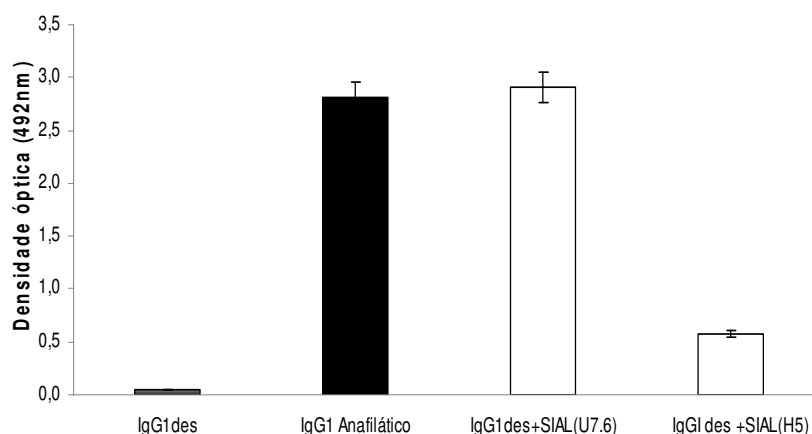


Figura 43- Afinidade dos anticorpos IgG1 a lectina *Sambucus nigra*.

Anticorpos IgG1 monoclonais não-anafiláticos, previamente dessialilados, foram incubados com enzimas sialiltransferases obtidas do hibridoma U7.6(IgG1des +SIAL U7.6) ou com sialiltransferases isoladas de hibridoma H5 (IgG1des +SIAL H5) e posteriormente, testados quanto a sua ligação a *Sambucus nigra* em ensaio de ELISA. Os resultados representam a media das densidades ópticas obtidas das amostras em triplicata \pm desvio padrão. IgG1 dessialilado foi empregado como controle negativo para determinação da atividade enzimática.

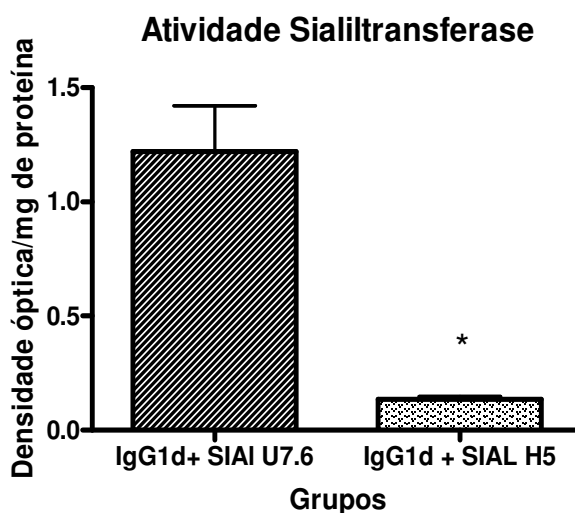


Figura 44 - Atividade enzimática das sialiltransferases obtidas dos hibridomas U7.6 e H5 sob o anticorpo IgG1 dessialilado .

Amostras de IgG1 dessialilado foram incubadas com enzimas sialiltransferases obtidas do hibridoma U7.6 ou com enzimas sialiltransferases do hibridoma H5. Atividade enzimática foi calculada pela fórmula: $[(D.O \text{ Amostra} - D.O \text{ branco}) / \text{concentração de proteína (mg/ml)}]$. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo método não-paramétrico t test. * = $p < 0,001$ comparado a IgG1d+SIAL U7.6.

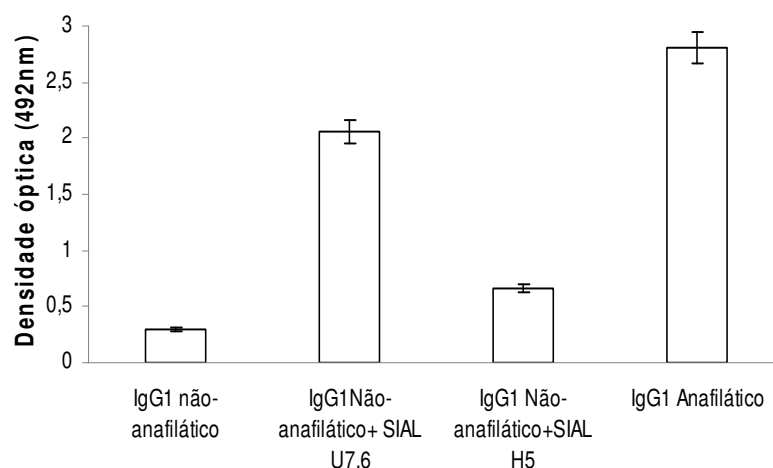


Figura 45- Afinidade dos anticorpos IgG1 à lectina *Sambucus nigra*.

Anticorpos IgG1 monoclonais não-anafiláticos, previamente dessialilados, foram incubados com enzimas sialiltransferases obtidas do hibridoma U7.6 (IgG1des +SIAL U7.6) ou com sialiltransferases isoladas de hibridoma H5 (IgG1des +SIAL H5) e posteriormente, testados quanto a sua ligação a *Sambucus nigra* em ensaio de ELISA. Os resultados representam a media das densidades ópticas obtidas das amostras em triplicata \pm desvio padrão. IgG1 não-anafilático foi utilizado como controle negativo para determinação da atividade enzimática.

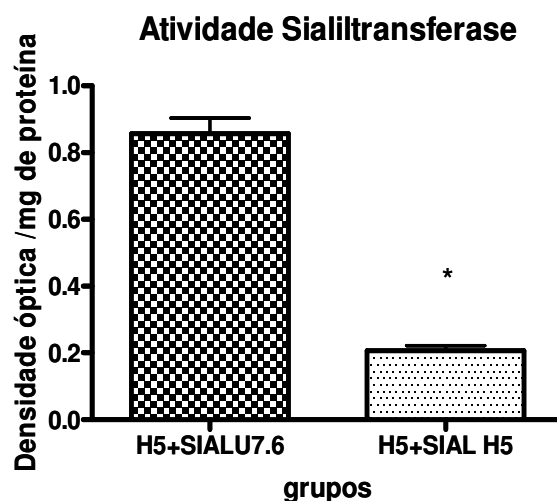


Figura 46- Atividade das sialiltransferases obtidas dos hibridomas U7.6 e H5 sob o anticorpo IgG1 não-anafilático.

Amostras de IgG1 não-anafiláticos foram incubadas com enzimas sialiltransferases obtidas do hibridoma U7.6 ou com enzimas sialiltransferases do hibridoma H5. Atividade enzimática foi calculada pela fórmula: $[(D.O \text{ Amostra} - D.O \text{ branco}) / \text{concentração de proteína (mg/ml)}]$. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo método não-paramétrico t test. * = $p < 0,001$ comparado ao grupo H5+SIAL U7.6.

5 DISCUSSÃO

A ação protetora das diferentes classes de anticorpos em resposta aos inúmeros agentes potencialmente patogênicos é incontestável (LIBLAU e BACH, 1992; De GRACIA et al., 1996; SIBER et al., 1980). Por outro lado, em algumas situações estas moléculas podem participar de reações exacerbadas e auto-dirigidas, como por exemplo, as alergias contra agentes que são potencialmente inertes (PRUSSIN e METCALF, 2006; STRAIT et al., 2006).

Neste sentido, estudando o papel dos anticorpos nas reações anafiláticas em modelo murino nosso grupo demonstrou que os anticorpos IgG1 são funcionalmente divididos em anafiláticos ou não-anafiláticos. Sobre a regulação da síntese destas moléculas, verificou-se que a IL-4 promove a produção da fração anafilática, enquanto que IFN- γ /IL-12 potencializam a síntese dos anticorpos não-anafiláticos. Somado a isso, foi evidenciado que o adjuvante utilizado na indução da resposta imunológica antígeno-específica também é capaz de modular a produção preferencial de cada subtipo de IgG1 (FAQUIM-MAURO et al., 1999; FAQUIM-MAURO et al., 2000).

Posteriormente, foi relatado que a cadeia de carboidratos presente na região Fc dos anticorpos IgG1 anafiláticos é essencial para a sua atividade biológica, uma vez que anticorpos deglicosilados perderam a capacidade de induzir anafilaxia *in vivo* (FAQUIM-MAURO et al., 2003). Neste contexto, o objetivo deste projeto foi buscar diferenças estruturais entre estes subtipos de IgG1 que determinasse a sua função efetora.

Alguns estudos de caracterização estrutural de anticorpos de diferentes classes e de identificação das cadeias de oligossacarídeos ligadas a eles ressaltam que a substituição de um único aminoácido no domínio C_{H2} destas moléculas pode interferir na inserção da cadeia glicosídica N-ligada e assim alterar a sua atividade funcional (LIS e SHARON, 1993; r JEFFERIS et al., 1995). Como exemplo foi demonstrado que para os anticorpos IgG humanos

a *N*-glicosilação destas moléculas é fundamental para sua função efetora, tais como ativação do sistema complemento e o mecanismo de citotoxicidade celular mediada por anticorpos (MALHOTRA et al., 1995; JEFFERIS e LUND, 2002; MATSUMIYA et al., 2007).

Diante destas informações, a primeira estratégia experimental abordada foi realizar o seqüenciamento da região Fc envolvida na função efetora dos dois subtipos de IgG1. Uma vez que, os resultados mostraram homologia de 100% nas seqüências obtidas dos dois subtipos de IgG1, pudemos descartar a possibilidade de que alguma mudança de nucleotídeos e conseqüente alteração de aminoácidos nesta região seria responsável pela capacidade ou incapacidade destas moléculas de mediar reações anafiláticas.

Fundamentados em trabalhos que descrevem o papel relevante do tipo de glicosilação de diversas glicoproteínas, incluindo os anticorpos, para a manutenção das suas atividades biológicas (MIMURA et al., 2000; ARNOLD et al., 2007), focamos o estudo na caracterização dos carboidratos que estão ligados à região Fc dos anticorpos IgG1.

Em relação ao anticorpo IgG, a principal imunoglobulina do soro, sabe-se que a cadeia de oligossacarídeos ligada ao aminoácido asparagina-297 é biantenária do tipo-complexa, contendo principalmente resíduos de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), manose, galactose e conteúdo variável de fucose e ácido siálico terminal. Está descrito ainda, que diversos fatores influenciam a formação da cadeia oligossacarídica que será ancorada na proteína. Dentre estes fatores está a inserção inicial da estrutura básica formada por resíduos de manose-*N*-acetilglucosamina na cadeia polipeptídica que permite a adição de galactose e posterior inserções de resíduos de ácido siálico, o qual é o último grupo glicosil adicionado à cadeia (VARKI, 1999; FERRARA et al., 2006). Estudos realizados com anticorpos IgG policlonais presentes nos soros humanos permitiram identificar mais de 30 estruturas distintas de oligossacarídeos *N*-ligadas (FAROOQ et al., 1997).

Alguns trabalhos ressaltam ainda, que a adição de monossacarídeos em diferentes

posições na estrutura básica da cadeia do tipo-complexa pode aumentar ou diminuir a afinidade de ligação dos resíduos de manose (pertencentes à cadeia básica) à lectina *Conavalia ensiforme* (Con A) (KOBATA e ENDO, 1992; YAMAMOTO et al., 1995).

Considerando estes relatos e os resultados obtidos quanto à afinidade dos dois subtipos de IgG1 às diversas lectinas, pudemos constatar que ambos os anticorpos IgG1 monoclonais apresentam cadeias *N*-ligadas às suas regiões Fc do tipo-complexa, as quais são compostas por resíduos de *N*-acetilglucosamina, manose, galactose, fucose e ácido siálico.

Ainda com relação a estes resultados, mais importante que a determinação do tipo de cadeia glicosídica ligada aos anticorpos IgG1 foi a detecção de maior conteúdo principalmente de fucose e ácido siálico na cadeia ligada ao anticorpo anafilático em relação à do não-anafilático. Além disso, esses dados permitiram padronizar uma metodologia que permite separar os anticorpos anafiláticos dos não-anafiláticos, segundo a sua afinidade à coluna de lectina específica para resíduos de ácido siálico.

Estas observações nos impulsionaram a estudar a relevância desses monossacarídeos para a atividade anafilática dos anticorpos IgG1. Para tanto, utilizamos a estratégia de remoção desses carboidratos por meio do tratamento enzimático de anticorpos monoclonais IgG1 anafiláticos com as enzimas fucosidase e neuraminidase e posterior avaliação da capacidade destes anticorpos de induzir reação de PCA *in vivo*.

Verificamos claramente, que os resíduos de ácido siálico são fundamentais para a atividade anafilática dos anticorpos IgG1, enquanto que a retirada de fucose não altera a função efetora destas moléculas.

Observamos ainda, que a perda da capacidade dos anticorpos IgG1 dessialilados de mediar anafilaxia não foi devido à degradação da proteína pelo tratamento com a neuraminidase confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida .

Estudando o efeito da galactosilação e fucosilação na afinidade dos anticorpos IgG humanos aos diferentes receptores Fc γ , Shield et al. (2002) demonstraram que os resíduos de fucose e galactose não são essenciais para a ligação do anticorpo ao Fc γ RI, mas a fucose é fundamental para a ligação ao receptor Fc γ IIA. Em contraste, a perda de fucose nos anticorpos IgG1 humanos resulta no aumento da afinidade desta molécula ao receptor Fc γ IIIA e assim, na capacidade deste anticorpo de mediar citotoxicidade por células NK. Estes dados revelaram, portanto, que a presença ou ausência de resíduos de fucose na cadeia de carboidratos de anticorpos IgG humanos seletivamente determina a perda ou aumento da afinidade deles aos diferentes receptores Fc γ . No entanto, os autores não demonstraram se a mudança de afinidade foi devido à interação direta do receptor com resíduos de fucose ou a alguma alteração conformacional do anticorpo.

No entanto, estudo realizado em modelo animal mostrou que a afinidade de anticorpos com baixo conteúdo de fucose aos receptores Fc γ II e Fc γ III não foi maior do que à observada com anticorpos altamente fucosilados. Este dado parece, portanto ser o motivo pelo pouco incentivo em estudar o efeito da defucosilação ou da remoção parcial de fucose na atividade biológica dos anticorpos murinos (SCALLON et al., 2007)

Diante dos nossos resultados demonstrando que a remoção de ácido siálico da cadeia glicosídica dos anticorpos IgG1 aboliu a capacidade dele de desencadear anafilaxia *in vivo*, estudamos como a remoção desses resíduos poderia modular a reação anafilática utilizando ensaios *in vitro*.

Quanto ao mecanismo de desgranulação dos mastócitos mediada pelos anticorpos IgG1 murinos, está claro na literatura que estas células expressam em sua superfície tanto os receptores de ativação Fc γ I e Fc γ III e de inibição Fc γ RII. Neste contexto, Takai et al. (1996) mostraram que mastócitos de camundongos deficientes no receptor Fc γ II são mais sensíveis

aos sinais de ativação e desgranulação via ligação de anticorpos IgG1 aos receptores Fc γ III que mastócitos de camundongos do tipo selvagem.

Foi evidenciado ainda, que a reação de PCA induzida por anticorpos IgG1 é dependente dos Fc γ RIII, uma vez que, em camundongos deficientes em Fc γ RIII ou que tiveram este receptor bloqueado pelo pré-tratamento com anticorpo 2.4G2, a reação anafilática foi totalmente abolida (HAZENBOS et al., 1996).

Observamos nos experimentos realizados *in vitro* com uma linhagem de mastócitos que os resíduos de ácido siálico são essenciais para afinidade de ligação da região Fc do anticorpo IgG1 aos receptores Fc γ RIII destas células, o que resulta na ativação e desgranulação em resposta ao desafio com anticorpo anti-IgG1 de camundongo ou com antígeno.

Estes resultados despertaram um questionamento se a incapacidade dos anticorpos IgG1 não-anafiláticos assim como os dessialilados em mediar anafilaxia poderia ser devido à ligação desses anticorpos aos receptores Fc γ II e conseqüente regulação negativa da reação anafilática. Esta hipótese foi descartada, pois os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram menor porcentagem de mastócitos positivos (fluorescentes) quando incubados com os anticorpos não-anafiláticos (baixo conteúdo de ácido siálico) ou com o dessialilado, eliminando assim a possível ligação desses anticorpos aos receptores Fc γ RII.

Outro ponto abordado foi a possibilidade de perda de afinidade do anticorpo ao antígeno após o tratamento enzimático para remoção dos resíduos de ácido siálico, essa dúvida também foi eliminada quando verificamos que o anticorpo IgG1 dessialilado e o deglicosilado foram capazes de reconhecer o antígeno da mesma forma que o anticorpo IgG1 anafilático e o não-anafilático, em ensaio imunoenzimático.

Para anafilaxia, apenas poucos trabalhos descreveram o papel essencial da N-glicosilação dos anticorpos IgE murinos na capacidade destas moléculas de induzir

desgranulação de mastócitos e conseqüentemente de mediar reação anafilática. Dentro desse contexto, vale ressaltar o trabalho realizado por Granato e Nesser (1987) que demonstra que anticorpos IgE monoclonais murinos contendo cadeias de oligossacarídeos com alterações no conteúdo de galactose ou glicose foram capazes de desencadear reação de PCA e apresentaram a mesma afinidade de ligação a uma linhagem basofílica de rato (RBL-1, *Rat Basophilic Leukemia*) em ensaio *in vitro*, da mesma forma que outros monoclonais IgE testados. No entanto, anticorpos IgE deglicosilados, resultantes do cultivo do hibridoma com tunicamina, não foram capazes de se ligar às células RBL-1 via receptor Fcε. Outro estudo revelou que, anticorpos IgE deglicosilados, os quais foram obtidos de soros de camundongos tratados com um polipeptídeo (1 KDa) extraído da urina humana, apresentam menor atividade anafilática que anticorpos IgE glicosilados (MASUDA et al., 2001).

Com os estudos realizados com os anticorpos IgG1 monoclonais pudemos mostrar, pela primeira vez, a direta correlação entre o grau de sialilação da cadeia de oligossacarídeos *N*-ligada ao anticorpo IgG1 com sua a atividade anafilática. Evidenciamos ainda, que esta perda da capacidade anafilática do anticorpo IgG1 dessialilado é decorrente da diminuição da afinidade de ligação deste anticorpo aos receptores FcγIII nos mastócitos comprometendo portanto, a ativação destas células no contato com o antígeno.

A relevância do ácido siálico associado à cadeia polissacarídica dos anticorpos em relação à sua função efetora foi também descrita por Kaneko et al. (2006). Neste trabalho os autores demonstraram que o grau de sialilação de anticorpos IgG humanos determina a capacidade destas moléculas de mediar atividade pró ou anti-inflamatória. Em modelo de artrite desenvolvido em camundongos foi visto que a administração de IgG humana por via endovenosa (IVIG) é eficiente no tratamento da doença e que essa proteção é mediada pela fração de anticorpos IgG altamente sialilados (IgG com ação anti-inflamatória). Além disso, os autores observaram que esta atividade protetora da IgG-sialilada é resultante da sua ligação

aos receptores Fc γ IIB nos macrófagos. Esta interação promove o aumento da expressão destes mesmos receptores na superfície destas células bem como a inibição da sua atividade efetora.

Portanto, os nossos resultados corroboram com o trabalho acima descrito no que se refere ao papel dos resíduos de ácido siálico como moduladores da atividade funcional dos anticorpos, ou seja, quanto maior o conteúdo de ácido siálico presente na cadeia glicosídica maior a afinidade de ligação desta molécula ao receptor expresso na célula efetora.

Uma vez que demonstramos a participação do ácido siálico na atividade anafilática dos anticorpos IgG1 monoclonais, decidimos investigar o perfil de glicosilação dos anticorpos IgG1 policlonais anafiláticos e não-anafiláticos purificados de soros de camundongos imunizados.

Para tanto, seguimos o mesmo protocolo descrito por Faquim-Mauro et al. (1999) de imunização de camundongos IL-4KO ou IFN- γ KO com os antígenos PI ou PIII do extrato de Asc, respectivamente. Os soros obtidos foram submetidos a uma série de purificações para a obtenção da subclasse IgG1 anti-Asc.

As análises das cadeias de oligossacarídeos dos anticorpos policlonais por HPAEC-PAD revelaram maior conteúdo de oligossacarídeos mono- e di-sialilado nos anticorpos IgG1 purificados de camundongos IFN- γ KO em comparação ao obtido nos anticorpos IgG1 purificados de camundongos IL-4KO.

Além disso, os resultados mostraram que a fração de anticorpos IgG1 de soros de camundongos IFN- γ KO possuem atividade anafilática, enquanto que os anticorpos IgG1 obtidos de camundongos IL-4KO foram incapazes de induzir reações de PCA *in vivo* (não-anafiláticos).

O conjunto dos resultados alcançados com os anticorpos IgG1 purificados sugerem predomínio de anticorpos anafiláticos nos soros dos camundongos IFN- γ KO que apresentam cadeia de oligossacarídeos com perfil semelhante ao do monoclonal anafilático, e que os

anticorpos IgG1 purificados dos camundongos IL-4KO são não-anafiláticos e menos glicosilados, assim como o anticorpo monoclonal não-anafilático.

Fundamentados nestes resultados podemos sugerir que a imunização/ativação do sistema imune por um antígeno, além de regular a troca de classe dos anticorpos pode modular o processo de glicosilação destas moléculas. Considerando esta hipótese, outro objetivo de estudo foi a analisar a expressão das enzimas que participam do processo de glicosilação dos anticorpos.

Os resultados permitiram evidenciar que não houve diferença significativa na expressão das *oligosacariltransferases*, *glicosidase I e II* que codificam enzimas envolvidas na etapa inicial de inserção da estrutura básica de oligossacarídeos à cadeia polipeptídica tanto nos hibridomas produtores de IgG1 como nos linfócitos B purificados.

As enzimas oligossacariltransferases são responsáveis pela transferência do precursor (Glc3Man9GlcNAc2) presente no doador lipídico, para asparagina na posição 297, durante o seu transporte pela membrana do retículo endoplasmático. O processamento é iniciado pela remoção do resíduo de glicose terminal pela α 1,2 glicosidase I e posteriormente, os dois resíduos de glicose internos são removidos pela ação específica da enzima α 1,2 glicosidase II.

Estes resultados descartam, portanto, possível defeito primário no transporte de glicoproteínas do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi, onde ocorre a fase final do processo de glicosilação das glicoproteínas.

No entanto, foi verificado que a expressão dos genes *N-acetilglicosaminiltransferase I e manosidases (I e II)* que codificam as enzimas responsáveis pela adição de resíduos de *N*-acetilglicosamina e remoção de resíduos de manose, respectivamente, estão menos expressos no clone H5 e nos linfócitos B produtores dos anticorpos não-anafiláticos. Sabe-se que alterações nessa fase do processo de glicosilação comprometem a exposição do sítio catalítico da fucosiltransferase, que somado com a baixa expressão desta

última enzima, pode resultar na formação de uma cadeia de oligossacarídeos com baixo conteúdo de fucose (DENNIS et al., 1999). Estes resultados podem, portanto, explicar o motivo pelo qual o anticorpo não-anafilático apresenta cadeia polissacarídica menos fucosilada que o anafilático.

A etapa final da síntese de cadeia de carboidratos do tipo complexa envolve a participação de outras enzimas como: galactosiltransferases e sialiltransferases. Em relação à expressão de *galactosiltransferase I*, enzima que adiciona galactose à cadeia de carboidratos, pudemos verificar menor expressão gênica desta enzima no hibridoma e nas células secretoras de anticorpos IgG1 não-anafiláticos, o que pode comprometer a adição subsequente dos resíduos de ácido siálico pelas sialiltransferases. Esses dados poderiam então, justificar o fato de que os anticorpos IgG1 não-anafiláticos possuem menor conteúdo de ácido siálico na sua cadeia de carboidratos que o anticorpo anafilático. Portanto, como etapa final e considerando o papel crucial dos resíduos de ácido siálico para a atividade dos anticorpos IgG1, analisamos a expressão das enzimas sialiltransferases que são especialistas na adição de resíduos de ácido siálico em diferentes posições da cadeia glicosídica.

Das famílias de sialiltransferases analisadas, destacamos os genes *ST3Gal III e IV*; *ST6Gal*, *ST6GalNac III e IV* e *ST8Sial I e III*, os quais estiveram menos expressos no hibridoma e células B produtores dos anticorpos não-anafiláticos em relação ao observado no hibridoma e linfócitos B secretores de anticorpos anafiláticos.

Esses resultados nos impulsionaram a buscar dados na literatura que pudessem acrescentar no entendimento da participação dessas enzimas no processo de glicosilação de anticorpos IgG. Em suma, as famílias *ST3Gal*, *ST6Gal*, *ST6GalNac* e *ST8Sial* são compostas por várias enzimas que entre si apresentam alta identidade entre suas seqüências de aminoácidos. As enzimas da família *ST3Gal* são responsáveis pela transferência de ácido siálico do substrato doador para resíduos de galactose na posição α 2,3 da cadeia e utilizam

como substrato acceptor as estruturas Gal β 1,3GlcNac e Gal β 1,4GlcNac das glicoproteínas, incluindo os anticorpos (KONO et al., 1997). A enzima ST6Gal I é a principal envolvida na adição de ácido siálico a resíduos de galactose na posição α 2,6 tendo como estrutura acceptora Gal β 1,4GlcNac (TAKASHIMA et al., 2003).

As enzimas ST6GalNac transferem ácido siálico do substrato doador para o resíduo *N*-acetilgalactosamina na posição α 2,6 na cadeia de oligossacarídeos da proteína. Especificamente, ST6GalNac III e IV utilizam a estrutura Sia α 2,3Gal β 1,3GalNac como substrato acceptor (LEE et al., 1999). Enquanto que, as ST8Sial estão envolvidas com a ligação de ácido siálico na posição α 2,8 da cadeia de carboidratos e ST8Sial III utiliza a estrutura Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNac como substrato acceptor (YOSHIDA et al., 1995).

Com relação ao papel destas enzimas na produção de anticorpos, foi verificado que camundongos deficientes em ST6Gal I apresentam forte quadro de imunossupressão, com redução dos níveis de IgM séricos, inibição da proliferação de linfócitos B em resposta à ligação cruzada de IgM e CD40 e diminuição da produção de anticorpos contra antígenos T-dependentes e independentes (HENNET et al., 1998).

De uma forma geral, as sialiltransferases são reguladas e expressas diferencialmente em vários tipos celulares o que, portanto mostra a especialização na geração de diferentes glicoproteínas com padrões próprios de cadeias glicosídicas (SJOBERG et al., 1996). Além disto, a maioria das glicoproteínas apresenta resíduos de ácido siálico na posição α 2-3 do que na posição α 2-8 da cadeia glicosídica (ZUBER et al., 1992; QU et al., 1996). Estas observações talvez expliquem o fato de não termos observado grande diferença na expressão das enzimas da família ST8Sial entre as células produtoras de anticorpos IgG1 anafiláticos e não-anafiláticos.

Considerando que alguns genes que codificam as sialiltransferases foram diferentemente expressos nas células produtoras dos dois subtipos de IgG1 e que a expressão

deles resulta em síntese protéica e posterior *N*-glicosilação dos anticorpos, decidimos avaliar a atividade das sialiltransferases obtidas dos dois hibridomas.

Como descrito nos resultados, estudamos a capacidade destas enzimas de adicionar ácido siálico aos anticorpos IgG1 dessialilados ou não-anafiláticos. Nesses ensaios verificamos maior sialilação do anticorpo IgG1 incubado com as enzimas do hibridoma secretor da IgG1 anafilático do que o incubado com as enzimas do hibridoma secretor de IgG1 não-anafilático. Além disto, observamos que as enzimas do hibridoma secretor do anticorpo anafilático foram também eficientes em adicionar ácido siálico na molécula de IgG1 não-anafilática o que resultou na sua maior afinidade à lectina *Sambucus nigra*.

É importante ressaltar, que esta metodologia não permite determinar em que posições os resíduos de ácido siálico foram inseridos, porém mostra claramente que as enzimas obtidas das células secretoras de IgG1 anafilático foram capazes de adicionar *in vitro* este monossacarídeo em uma molécula de IgG1 com eficiência semelhante à observada em anticorpos IgG1 produzidos pelo cultivo do mesmo hibridoma *in vitro*.

Em conjunto, estas observações permitem sugerir correlação direta entre a expressão das enzimas envolvidas na fase final da glicosilação com o grau de sialilação da cadeia glicosídica *N*-ligada aos anticorpos IgG1. Contudo, os fatores que afetam a atividade das sialiltransferases na glicosilação dos anticorpos necessitam ser melhor explorados.

Reforçando esta correlação, Nishiura et al.(1990) observaram a presença de paraproteínas IgG hipogalactosiladas e baixa atividade da enzima galactosiltransferase nas células da medula óssea de pacientes com mieloma múltiplo. Outros estudos demonstraram ainda, altos níveis de anticorpos IgG sialilados nos soros de pacientes com mieloma múltiplo e aumento da atividade das enzimas sialiltransferases nas células mononucleares periféricas (FRITZH et al., 1985; COHEN et al., 1989; FLEMING et al., 1998).

Como já mencionado, a glicosilação de todas as proteínas ocorre no complexo de Golgi. Durante este processo, a presença das diferentes enzimas, disponibilidade dos resíduos de monossacarídeos e a sequência da cadeia polipeptídica determinam a composição da cadeia de carboidratos que será associada à proteína (DENNIS et al, 1999). Complementar a isso, alguns trabalhos mostraram que fatores solúveis, como citocinas, exercem influência na formação da cadeia de oligossacarídeos associadas aos anticorpos (JEDDI et al., 1999; CHINTALACHARUVU e EMANCIPATOR, 2000).

Neste sentido, estudando a nefropatia associada à IgA, Chintalacharuvu et al.(2008) observaram que a imunização de camundongos com vírus Sendai inativado em Adjuvante Incompleto de Freund induz a produção de anticorpos IgA contendo cadeias glicosídicas com graus alterados de sialilação e galactosilação. Eles verificaram ainda, que estes anticorpos depositam-se na membrana mesenquimal, o que resulta no comprometimento da função glomerular. A partir destes resultados, os autores sugerem que citocinas secretadas por células Th2 estariam controlando tanto a síntese dos anticorpos IgA como o tipo de glicosilação dessas moléculas.

Com relação à utilização de anticorpos como estratégia terapêutica, atualmente, mais que 20 anticorpos IgG recombinantes estão licenciados para o tratamento de várias doenças. Portanto, grande incentivo aos estudos na área da glico-engenharia tem sido feito com o objetivo de desenvolver métodos capazes de regular negativa ou positivamente a atividade das células efetoras utilizando estratégias de modulação da afinidade de anticorpos aos receptores Fc γ .

Têm sido proposto a aplicação terapêutica do anticorpo monoclonal anti-CD3 aglicosilado, que diferentemente do anticorpo convencional, não provoca efeitos colaterais, provavelmente devido a sua incapacidade de se ligar e ativar receptores Fc γ (BOLT et al., 1993; FRIEND et al., 1999).

Em relação ao tratamento de doenças alérgicas, o omalizumabe, um anticorpo anti-IgE sintético não-anafilático, representa uma nova classe de medicamento: os imunomoduladores monoclonais. Aprovado para uso clínico, este anticorpo atua impedindo a fixação da IgE ao receptor de alta afinidade existente nos mastócitos e basófilos desde a fase inicial da resposta alérgica, além de bloquear a fixação dessa imunoglobulina ao receptor de baixa afinidade nos linfócitos B e em vários tipos celulares (BUSSE et al., 2001; STRUNK et al., 2006). No entanto, o uso clínico do omalizumabe tem levantado algumas questões que não estão completamente esclarecidas, como a eficiência do tratamento, ou seja, melhora rápida em alguns pacientes, em outros a melhora clínica demora a acontecer, ou pode nem ocorrer. A possível explicação para essa variação baseia-se na observação de heterogeneidade das glicofomas do anticorpo monoclonal (RAJU et al., 2001; CLARK et al., 2006; HOLGATE et al., 2006). Este fato abre, portanto, espaço para os estudos voltados ao processo de glicosilação destes anticorpos.

Na tentativa de resolver este desafio, existem várias estratégias para a fabricação de anticorpos que apresentem maior eficiência terapêutica. Dentre elas, pode-se destacar o método de glicosilação *in vitro* utilizando múltiplas glicosiltransferases recombinantes, o qual tem alcançado resultados promissores como a diminuição da heterogeneidade dos anticorpos produzidos (RAJU et al., 2001). Outro exemplo é a produção de fragmentos Fc de anticorpos IgG com glicofomas específicas, que podem funcionar como marcadores celulares em estudos que visam desvendar as respostas inflamatórias mediadas pelos anticorpos (WATT et al., 2002).

Os resultados obtidos nesta tese, permitiram mostrar que os subtipos de anticorpos IgG1 apresentam cadeias glicosídicas *N*-ligadas com composições distintas que são resultantes da expressão diferencial das enzimas glicosiltransferases e oligossacariltransferases nas células produtoras dos anticorpos. Pudemos demonstrar ainda, que os resíduos de ácido siálico presentes na cadeia glicosídica do anticorpo IgG1 murino determinam a sua capacidade de mediar ou não anafilaxia. Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* realizados com a linhagem de mastócitos mostram claramente que os resíduos de ácido siálico determinam a afinidade de ligação da molécula de IgG1 aos receptores Fc γ III e assim a ativação destas células.

Consideramos que este estudo acrescenta conhecimentos neste campo pouco desvendado, que é a glicobiologia de anticorpos. Estas observações poderão ainda, ser relevantes nos estudos voltados para a engenharia de produção de anticorpos monoclonais. Além disto, podem ser úteis nos estudos que visam a introdução ou deleção de determinados genes que codificam enzimas importantes para o processo de glicosilação de proteínas nas diferentes células. É claro que é apenas inclusão de novas perspectivas e sugestões de novos estudos, mas é inegável que, os avanços neste campo são aguardados.

6 CONCLUSÕES

- 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. et al. 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.

COFFMAN, R. L.; LEBMAN, D. A.; ROTHMAN, P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. **Adv Immunol.** v. 54, p. 229-270, 1993.

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.

DE VRIES, J. E.; ZURAWSKI, G. Immunoregulatory properties of IL-13: its potential role in atopic disease. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, p. 175-179, 1995.

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.

FRITZH, 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.**, v. 153, p. 376-367, 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.

KAPLAN, A.P. Chemokines, chemokine receptors and allergy. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 124, p. :423-431, 2001.

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 epsilon RI): 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 FcepsilonRI 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.

MILLER, H.R.; PEMBERTON, A.D. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. **Immunology**, v. 105, p. 375-390, 2002.

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.

PAULSON, J.C. Glycoproteins: what are the sugar chains for ? **Trends Biochem Sci.**, v. 14, p. 272-276, 1989.

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-FRÈRE, 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. Glycoprotein: 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. Bio. 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. Verbert. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 215p, 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.

ANEXO

Artigo 1- SILVA, S.R; CASABUONO, A.; JACYSYN, J. F.; FAVORETTO, B.C.; FERNANDES, I.; MACEDO, M.S; COUTO, A.S.; FAQUIM-MOURO, E.L. Sialic acid residues are essential for the anaphylactic activity of murine IgG1 antibodies. **J. Immunol.**, v. 181, n. 12, p. 8308-8314, 2008.