

## Análise do Conteúdo Protéico de Medicamentos Utilizados na Terapia de Dessensibilização Alérgica

### Protein Content Analysis of Medicine Used on Allergic Desensitization Therapy

#### RESUMO

As alergias são um problema de saúde pública que consome quantias significativas dos recursos do SUS (Sistema Único de Saúde). As crianças são as maiores vítimas e os casos clínicos se manifestam especialmente nos meses de inverno. Uma terapia auxiliar contra os episódios de alergia consiste na dessensibilização do paciente frente ao antígeno causador dos sintomas alérgicos. Vários produtos destinados a este fim são comercializados no mercado de fármacos, porém não há uma metodologia oficial adequada ao controle de qualidade destes medicamentos. Estes produtos são constituídos de lisados de bactérias, fungos, ácaros, proteínas alimentares etc., constituindo uma matriz bastante complexa e variável. O conteúdo protéico existente em seis formulações comerciais foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), a fim de estabelecer um controle de qualidade e uma padronização entre produtos. Verificou-se que não há uma uniformidade entre produtores, tanto quantitativamente como qualitativamente, e as quantidades de proteínas observadas foram extremamente baixas.

**Palavras-chave:** alergias; dessensibilização alérgica; imunoterapia; vigilância sanitária; proteínas; eletroforese

#### ABSTRACT

*Allergies are a problem of public health that consumes significant amounts of governmental Health-System resources. Children are the main victims and the clinical cases increase especially in winter. An auxiliary therapy against the allergy episodes consists of the desensitization of the patient to antigen that causes allergic symptoms. Some products destined to this are commercialized in drugstores, but there is no official adjusted methodology to the quality control of these medicine. These products are constituted of lysed from bacteria, fungus, mites, alimentary proteins etc., constituting a sufficiently complex and variable matrix. The existing protein content in six commercial formulas was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in order to establish a quality control and products standard. The tests show that there is no uniformity between producers, neither quantitatively nor qualitatively and the amounts of observed proteins were extremely low.*

**Key words:** allergy, allergic desensitization, immunotherapy, health surveillance, proteins, electrophoresis

Ezequias Pessoa de Siqueira  
Filipe Soares Quirino da Silva

Instituto Nacional de Controle de Qualidade  
em Saúde – INCQS Departamento de  
Química – Setor de Soros e Vacinas

## Introdução

Muitas substâncias como poeira domiciliar, fungos, ácaros, medicamentos, alimentos, venenos de insetos e outros desencadeiam processos alérgicos em pacientes sensíveis. Os sintomas mais comuns são rinite, produção de grande quantidade de secreções nasais, constrição dos brônquios, eczema, febre, vermelhidão na pele ou região de contato com a substância alérgica e, em casos mais graves, choque anafilático e morte<sup>1</sup>. Os efeitos de reações alérgicas são considerados como um problema de saúde pública com grande repercussão econômica e social. De acordo com o Instituto Nacional de Saúde dos EUA, 18 milhões de americanos têm asma e cinco milhões desses são crianças. Isso representa um aumento de mais de 150% dos casos desde 1980. A asma consome cerca de US\$ 12,7 bilhões por ano em despesas médicas. De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde, os custos associados com asma excedem àqueles devidos a tuberculose e aids combinados<sup>2</sup>.

Estes problemas são agravados pelas condições atmosféricas adversas, tais como poluição, inversão térmica, mudanças bruscas de temperaturas, entre outros. Os agentes causadores de tais sintomas são na maioria das vezes proteínas, mas é também possível encontrar pacientes sensíveis a carboidratos, produtos químicos como fármacos, aerossóis, produtos de limpeza e cosméticos.

O ambiente domiciliar apresenta uma grande quantidade desses elementos alérgicos de forma que o contato permanente com essas substâncias desencadeia o aparecimento dos sintomas alérgicos. Segundo Chapman<sup>3</sup>, existe um número de razões pelas quais alergologistas devem considerar a exposição de pacientes a esses materiais, porque existe uma estreita correlação entre os processos asmáticos e o nível de aparecimento desses materiais nas poeiras domiciliares. Barnes et al.<sup>4</sup> descrevem o isolamento de uma proteína alérgica de 70 kD encontrada na poeira das residências de pacientes com histórico de asma. Os estudos elaborados por estes autores suportam a hipótese que esse material alérgico, proveniente de fungos e ácaros, é o principal causador de asma.

As medidas terapêuticas adotadas para atenuar os sintomas alérgicos incluem evitar o contato com os produtos desencadeadores das manifestações clínicas, medicações antialérgicas e imunoterapia para alérgicos específicos (também conhecida como terapia de dessensibilização). As drogas frequentemente usadas são os agentes antagonistas de histamina e anti-colinérgicos, além de corticosteróides para suprimir a inflamação alérgica. A imunoterapia ou terapia de dessensibilização

consiste na administração de pequenas quantidades de alérgicos em concentrações crescentes por um longo período de tempo. Essa metodologia tem sido usada para o tratamento de rinite alérgica<sup>5</sup>, asma alérgica e veneno de insetos<sup>6</sup>, induzindo um efeito prolongado.

Estão disponíveis no mercado de fármacos brasileiro alguns produtos cuja finalidade é a terapia de dessensibilização. Estes produtos são compostos por lisados de ácaros, bactérias, fungos, proteínas de origem alimentar, veneno de insetos e outros. São administrados de forma rotineira e por longos períodos, tendo como principais pacientes as crianças com histórico de alergias. Devido à complexidade desses produtos, e não existindo uma metodologia de análise própria para se estabelecer um controle de qualidade satisfatório – tanto do ponto de vista da ação terapêutica como da segurança do uso –, este trabalho buscou analisar o perfil protéico de seis produtos disponíveis no mercado brasileiro para comparar qualitativamente o perfil de proteínas entre eles.

## Metodologia

### Amostragem

Os dessensibilizantes alérgicos de 4 fabricantes foram obtidos nas farmácias da cidade do Rio de Janeiro nos meses de janeiro-julho de 2004. Os produtos foram classificados como A e B (fabricante 1); C e D (fabricante 2); X (fabricante 3) e Y (fabricante 4). Poeira domiciliar colhida dos aspiradores de pó das residências de pessoas com histórico de alergia foi usada como referência de material alérgico.

Com exceção do produto Y, que se apresentou na forma de micro-esferas, e da poeira domiciliar, todos os produtos foram líquidos.

### Extração do material protéico

A extração do material protéico do produto Y e da poeira domiciliar foi realizada de acordo com o protocolo seguido por Yamada<sup>7</sup>. Um grama de material sólido foi solubilizado em 2,5 mL de uma solução de bicarbonato de amônio 0,01 M, pH = 7,5 e agitado a 180 R.P.M. por 3 horas a 45°C. Uma metodologia alternativa foi extrair o material alérgico com uma solução tampão de fosfato salino 0,15 M, pH = 7,2 (contendo 8,5 mM fosfato de potássio dibásico, 1,5 mM fosfato de potássio monobásico e 0,15 M NaCl) por 18 horas a 4°C. Após esse período, o material foi centrifugado a 15.000 g por 30 minutos e filtrado através de filtro de papel Whatman nº 1. O filtrado foi dialisado

contra água deionizada durante 24 horas a 4°C e então liofilizado e estocado a -70°C. A extração do material alergênico das amostras líquidas A, B, C, D e X foi obtida por diálise de 50 mL do material líquido a 4°C durante 24 horas, liofilização e estocagem a -70°C.

#### Teor de Proteínas do material alergênico

O teor de proteínas foi determinado pelo método colorimétrico de Lowry<sup>8</sup>, usando BSA como padrão. Os ensaios colorimétricos foram realizados em um espectrofotômetro UV-visível modelo 1601 (Shimadzu, Japão).

#### Eletroforese do Material Alergênico

O material liofilizado foi solubilizado em 1 mL de água deionizada. A eletroforese foi desenvolvida segundo o método de Laemmli<sup>9</sup> em condições desnaturantes com SDS e 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) e colorida por meio de *coomassie blue* (Sigma-Aldrich, EUA). Foi usado padrão de peso molecular de 97KDa-14 KDa (Amersham, EUA) como referência. A aquisição eletrônica de imagens dos géis foi realizada por meio de um densitômetro modelo GS-800 (BioRad, EUA) e a análise das mesmas foi elaborada usando-se o programa Quantity-one 4.4.1 (BioRad, EUA).

#### Resultados

A concentração de proteína estimada pelo método de Lowry revelou que a amostra de poeira domiciliar teve uma concentração de 1,05 mg de proteína por mL e que as amostras de medicamentos continham menos que 1 mg de proteína por mL na formulação original. A Tabela 1 apresenta os dados referentes aos produtos analisados.

Os perfis de proteínas dos medicamentos A, B, C, D, X e Y foram obtidos por eletroforese após concentração do material protéico por meio de liofilização, uma vez que as concentrações de proteínas determinadas previamente foram baixas. As Figuras 1 e 2 apresentam os resultados da análise de eletroforese.

#### Discussão

Os produtos classificados como A e B são provenientes de um mesmo produtor, como mencionado anteriormente. De acordo com a Tabela 1, tratam-se de formulações diferentes, pois o composto A é uma mistura de antígenos de origem alimentar, poeira domiciliar e lisados bacterianos, e o produto B constitui-se de antígenos de inseto. O perfil de

Figura 1. Perfil eletroforético das amostras. Linha 1: padrão de peso molecular em kDa; linha 2: produto A; linha 3: produto B; linha 4: produto C; linha 5: produto D; linha 6: padrão de poeira domiciliar. Eletroforese com gel de poliácridamida a 12 % em condição desnaturante com duodecil sulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptotanol. 5 microlitros de amostra aplicado em cada linha.

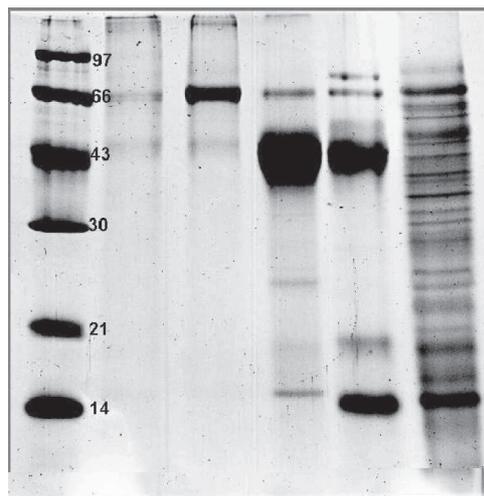
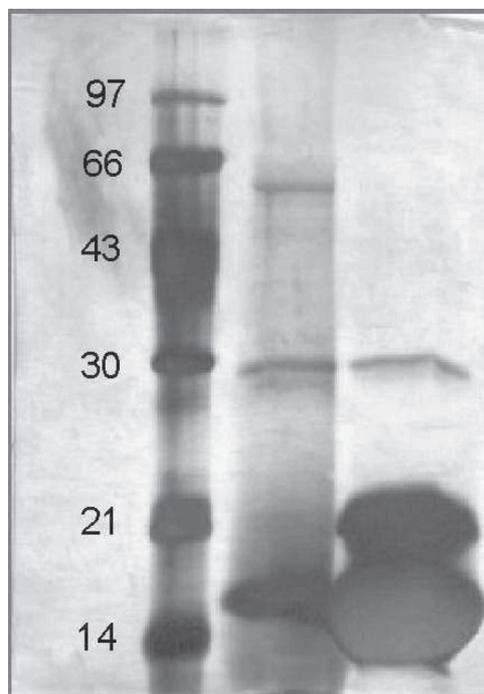


Figura 2. Perfil eletroforético das amostras. Linha 1: padrão de peso molecular em kDa; linha 2: produto X; linha 3: produto Y. Eletroforese com gel de poliácridamida a 12 % em condição desnaturante com duodecil sulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptotanol. 5 microlitros de amostra aplicado em cada linha.



**Tabela 1.** Características dos produtos destinados à terapia de dessensibilização alérgica.

Característica	A	B	C	D	X	Y	Poeira Domiciliar
Apresentação	Gotas sublinguais	Gotas sublinguais	Gotas sublinguais	Gotas sublinguais	Gotas sublinguais	Cápsulas	Poeira
Composição	Proteínas alimentares, poeira domiciliar, lisados bacterianos	Antígenos de abelhas, vespas, formigas, mosquitos e pulgas	Poeira domiciliar, proteínas alimentares, antígenos de bactérias das vias respiratórias	Poeira domiciliar, proteínas alimentares, antígenos de bactérias das vias respiratórias	Lisados de bactérias, fungos, ácaros e leveduras	Lisados de bactérias, fungos, ácaros e leveduras	Não determinada
Concentração de proteínas pelo método de Lowry	< 1,0 mg/mL	< 1,0 mg/mL	< 1,0 mg/mL	< 1,0 mg/mL	< 1,0 mg/mL	< 1,0 mg/mL	1,05 mg/mL
Data de fabricação:	04/2003	04/2003	08/2003	08/2003	02/2003	11/2002	-
Data de validade:	04/2005	04/2005	08/2005	08/2005	02/2005	11/2004	-

proteínas apresentado na Figura 1 mostra que apesar de tratarem-se de proteínas de origem completamente diferentes, os perfis protéicos são iguais (linha 2 e 3, respectivamente). A diferença entre eles foi uma maior concentração de uma proteína de 66 KDa na amostra B. Comparando-se os produtos C e D, que são do mesmo produtor, nota-se que a sua composição é bastante similar (Tabela 1), porém o perfil eletroforético é diferente entre eles. Apenas duas proteínas são comuns entre eles, 66 e 43 KDa, respectivamente. Os produtos X e Y, apesar de serem de produtores diferentes, possuem a mesma composição (Tabela 1). De acordo com a Figura 2, verifica-se que existe uma proteína com peso de 60 KDa no produto X, inexistente no produto Y, e uma proteína de 20 KDa em Y, inexistente em X. Apesar de, segundo as suas bulas, todas as formulações serem constituídas de um número razoável de antígenos, verificou-se que a quantidade de proteína foi muito baixa – inicialmente verificada por meio da análise colorimétrica pelo método de Lowry e confirmada pelo número reduzido de bandas no perfil eletroforético. Em termos de comparação, o perfil eletroforético de poeira alérgica, Figura 1, linha 6, verifica-se uma quantidade muito grande de bandas de proteínas. Obviamente, nem todas as bandas são alérgicas ou promovem uma dessensibilização, porém o que fica demonstrado é que esses produtos carecem de uma análise mais rigorosa no sentido de validar sua eficácia e sua segurança, e se realmente estão de acordo com as normas preconizadas pela RDC nº 324 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 10 de novembro de 2003, publicada no Diário Oficial da União de 12 de novembro de 2003.

## Conclusões

Os produtos destinados à terapia de dessensibilização alérgica analisados neste estudo apresentaram um teor muito baixo de proteínas. Através do perfil eletroforético das amostras, foi possível verificar a distribuição das proteínas e constatou-se que existe uma incompatibilidade entre a formulação descrita pela bula dos produtos com a quantidade de material alérgico presente. Produtos com a mesma composição apresentam perfis eletroforéticos bem diferentes. Cabe-se verificar a eficácia destes produtos e se sua produção obedece integralmente à resolução da Vigilância Sanitária.

## Referências

1. American Society of Health-System Pharmacists. Concepts in Immunology and Immunotherapeutics, Third Edition 1997; 54-66. ISBN 1-879907-71-2.
2. Kreeger KK. Asthma, Genetics, and the environment. *The Scientist*, vol. 17, issue 7/30, apr. 7; 2003.
3. Chapman MD. Measuring allergen exposure in the home: who benefits? *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2001; 86 (5): 489-491.
4. Barnes C, Tuck J, Simon S, Pacheco F, Hu F, Portnoy J. Allergenic materials in the house dust of allergy clinic patients. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2001; 86: 517-523.
5. Duran SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergens immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998; 102: 157-164.
6. Muler U, Akdis CA, Fricker M, Akdis M, Blesken T, Bettens F, Blasser K. Successful

- immunotherapy with T-cell cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell allergy in patients allergic to bee venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998; 101: 747-754.
7. Yamada S, Nolte H, Zychlinsky E. Identification and characterization of allergens in two species of tuna fish. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1999; 82: 395-400.
  8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
  9. Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

---

#### Endereço para correspondência

Ezequias Pessoa de Siqueira  
Laboratorio de Quimica de Produtos Naturais Centro de  
Pesquisa René Rachou  
Av Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto  
CEP 30190-002 – Caixa postal 1743  
Belo Horizonte – MG – Brasil  
Tel: (031) 3349-7791  
Fax: (031) 3295-3115  
e-mail: ezequias@cpqrr.fiocruz.br

Recebido em 31/01/2005  
Aprovado em 22/06/2005