



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Produção de alérgenos recombinantes relacionados a Der p 1
de *Dermatophagoides pteronyssinus* com potencial aplicação
na avaliação da resposta imune humoral e celular em
pacientes com alergias respiratórias**

Laura Fontes Tomaz

Uberlândia

Agosto 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Produção de alérgenos recombinantes relacionados a Der p 1
de *Dermatophagoides pteronyssinus* com potencial aplicação
na avaliação da resposta imune humoral e celular em
pacientes com alergias respiratórias**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre.

Laura Fontes Tomaz

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Orientador

Prof. Dra. Danielle Reis Napolitano

Coorientadora

Uberlândia

Agosto 2011

A Deus, minha família e aos meus amigos

“O sucesso é ir de fracasso em
fracasso sem perder o entusiasmo.”

Winston Churchill

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por conceder-me bênçãos inexplicáveis.

Também aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, ensinando-me o caminho correto e me acolhendo nos momentos difíceis.

Ao meu marido, que esteve presente ao longo de toda esta caminhada, sempre me incentivando a acreditar que nada é impossível.

Ao professor Dr. Ernesto, por todos os seus ensinamentos e pela oportunidade, a mim dedicada, de amadurecimento profissional.

À coorientadora Danielle que acreditou em mim, mostrou-me o caminho da ciência, fez parte de todos os momentos desta pesquisa e pela imensa dedicação na realização deste trabalho.

À Dra. Deise que, com seu jeito generoso, transmite segurança a todos de seu convívio.

Ao Prof. Dr. Jair Júnior e Silas que me transmitiram suas experiências, facilitando assim a minha caminhada.

Ao Prof. Carlos Uêira que, através dos conhecimentos transmitidos, concedeu a oportunidade do êxito na conclusão deste trabalho.

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do laboratório de alergia, Ana Carolina, Bárbara, Bia, Boscolli, Carlos, Carol, Cristiane, Daniela, Fernando, Isabella, Jorge, Juliana, Karine, Leandro, Lucas, Priscila, Rafael, Núbia e Ronaldo e aos amigos do laboratório de Imunoparasitologia, pelos momentos felizes e de aprendizado.

Aos funcionários do laboratório de imunologia: Marley, Edilge, D. Zilda e Max, que tornaram viável a conclusão deste trabalho.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação, Dr. Carlos Henrique, por não medir esforços para o crescimento do programa.

À secretária Gisele, que facilita a vida de todos os alunos, com sua dedicação.

E, a todos os pacientes que colaboraram para execução deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Grupo de pacientes atópicos a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3 etilbenzotiazolino-6 sulfônico (2,2'- azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid)
APC	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Albumina de soro bovino
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
CaCl	Cloreto de cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CD	Grupo de diferenciação (Cluster of differentiation)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	3,3' diaminobenzina
DC	Célula dendrítica
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
Der p 1	Alérgeno principal de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> do Grupo 1
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DP	Desvio padrão
Dpt total	Extrato total de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
D.O	Densidade óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EUA	Estados Unidos da América
FcεRI	Receptor I de alta afinidade de IgE
g	Gramma
g	Força relativa da gravidade
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
HCl	Ácido clorídrico
IE	Índice Elisa

IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da classe G subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina da classe G subclasse 4
IL	Interleucina
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
ISAAC	Estudo Internacional da Asma e Alergias na Infância (International Study of Asthma and Allergies in Childhood)
M	Molar
Mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Número de indivíduos
NA	Grupo de pacientes não atópicos a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ND	Não determinado
Ni-NTA	Coluna de níquel
NK	Células natural killer
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pET14b	Plasmídeo de expressão
pET14b-Der p 1	Plasmídeo de expressão com o inserto Der p 1
rDer p 1	Proteína recombinante de Der p 1 expressa em sistema procarioto <i>E. coli</i>
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Tampão TE	10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH8
TCP	Teste cutâneo de puntura
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
Th9	Linfócito T <i>helper</i> 9
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
Treg	Célula T reguladora
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Hidroximetil-aminometano HCl
UA	Unidades alergênicas
UI	Unidades internacionais
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
W.H.O	Organização Mundial da Saúde (Organization Health World)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos pacientes incluídos no estudo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição taxonômica das espécies mais importantes na sensibilização alérgica, com ênfase para *Dermatophagoides pteronyssinus*. Adaptado de Arlian e Morgan (2003), Dabert e colaboradores (2010).

Figura 2. Sequência de aminoácidos que codifica a proteína Der p 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus* obtidas no Genbank com número de acesso AAB60215. Os números referem a posição dos aminoácidos e as cores representam os três principais epítomos (172-198, 199-210, e 211-243) da sequência inteira de Der p 1.

Figura 3. Expressão de rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃. *E. coli* BL21 (DE3) pLlysS foram transformadas com pET14b contendo os genes Der p 1/Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ e cultivadas por 18 horas com indutor de expressão (IPTG a 0,3 mM) a 30°C. Linha 1: Padrão de peso molecular. Linha 2: BL21 sem adição de IPTG. Linha 3: rDer p 1 em BL21 tratada com IPTG. Linha 4: pellet BL21 lisada com lisozima a 1 mg/mL, após centrifugação a 10.000 g. Linha 5: sobrenadante de BL21 lisada com lisozima a 1 mg/mL, após centrifugação a 10.000 g. Linha 6: BL21 sem adição de IPTG. Linha 7: rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ em BL21 tratada com IPTG.

Figura 4. Perfil cromatográfico das proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ em coluna de afinidade a Histidina. (A) O pico representa eluição da fração ligante da proteína rDer p 1 (frações 2 a 9). (B) O pico representa eluição da fração ligante da proteína rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ (frações 2 a 8). Ambas as proteínas foram eluídas com tampão (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl e 500mM Imidazol pH 7.4).

Figura 5. Slot-blot da proteína recombinante Der p 1 e epítomos ligantes de IgE relacionados a Der p 1. Membranas de nitrocelulose foram blotadas com rDer p 1 e rDer p 1 (fragmento 172-243) (5 µg). Como controle, padrão rDer p 1 (6.25ng), extrato total de Dp (10 µg) e BSA (5 µg) foram blotadas nas mesmas condições. Membranas foram testadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Der p 1 (linha 1), controle positivo de IgE de soro humano (linha 2), controle negativo de Ige de soro humano (linha 3), e somente diluente (linha 4). Após incubação com anticorpo secundário anti-IgE humano biotilado e estreptavidina-peroxidase, membranas foram reveladas com DAB.

Figura 6. Níveis de anticorpos IgE ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), Der p 1 nativo (nDer p 1) e as proteínas recombinantes Der p 1 (rDer p 1) e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ expressos em Índice ELISA (IE) em soro de indivíduos atópicos (n= 50) e não atópicos (n = 30). A linha tracejada indica o valor do *cut off* (IE > 1.2) e as barras horizontais representam os valores médios. Porcentagem de amostras positivas de cada grupo também esta indicada. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

Figura 7. Correlação entre os níveis de anticorpos IgE ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), Der p 1 nativo (nDer p 1) e as proteínas recombinante Der p 1 (rDer p 1) e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃, expressos em Índice ELISA (IE), em soro de pacientes atópicos (n= 50). As linhas tracejadas indicam o valor do *cut off* (IE > 1.2). As porcentagens de amostras duplo positivas, duplo negativas, e positivas somente para um dos alérgenos estão indicadas nos quadrantes correspondentes. O coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) também estão demonstrados.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	06
LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Alergia e atopia.....	16
1.2 Doenças Alérgicas.....	16
1.3 Alérgenos.....	18
1.4 Àcaros da poeira domiciliar.....	19
1.5 <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	21
1.6 Principais alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i>	22
1.7 Fisiopatologia da alergia.....	25
1.8 Diagnóstico da alergia.....	27
1.9 Alérgenos Recombinantes.....	28
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Geral.....	30
2.2 Específicos.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Aspectos éticos.....	31
3.2 Pacientes.....	31
3.3 Teste Cutâneo de puntura (TCP).....	32
3.4 Obtenção do soro de pacientes.....	32
3.5 Pesquisa da sequência gênica Der p 1 de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	32
3.6 Síntese dos genes artificiais.....	33
3.7 Produção de células bacterianas competentes.....	33
3.8 Reação de transformação de <i>Escherichia coli</i> DH5- α com pET14b-Der p 1 e	

pET14b-Der p 1 ₁₇₂₋₂₄₃	34
3.9 Extração do plasmídeo pET14b-Der p 1 e pET14b-Der p 1 ₁₇₂₋₂₄₃ de <i>Escherichia coli</i> DH5- α	34
3.10 Reação de transformação do vetor pET14b-Der p 1 e pET14b-Der p 1 ₁₇₂₋₂₄₃ em <i>E. coli</i> BL21.....	35
3.11 Expressão de rDer p 1 e rDer p 1 ₁₇₂₋₂₄₃ em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	35
3.11.1 Teste de Indução da Expressão de rDer p 1 e rDer p 1 ₁₇₂₋₂₄₃ em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	36
3.11.2 Produção de rDer p 1 e rDer p 1 ₁₇₂₋₂₄₃ em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS em larga escala.....	36
3.11.3 Teste de Solubilidade.....	37
3.12 Extração e purificação das proteínas rDer p 1 e rDer p 1 ₁₇₂₋₂₄₃	37
3.13 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	38
3.14 Detecção de rDer p 1 e rDer p 1 ₁₇₂₋₂₄₃ por Slot-blot.....	38
3.15 Mensuração de IgE específica ao extrato total de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Dpt), a proteína nativa Der p 1 (nDer p 1) e as proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1 ₁₇₂₋₂₄₃	39
3.16 Análise Estatística.....	40
3.17 Biossegurança.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Dados clínicos, demográficos e teste cutâneo dos pacientes.....	42
4.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1 ₁₇₂₋₂₄₃ ..	42
4.3 Imunodetecção das proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1 ₁₇₂₋₂₄₃	45
4.4 Reatividade de IgE ao extrato total de Dpt, nDer p 1 e as proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1 ₁₇₂₋₂₄₃	47
4.5 Correlação e associação entre os níveis de IgE ao extrato total de Dpt, nDer p 1 e as proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1 ₁₇₂₋₂₄₃	48
5. DISCUSSÃO.....	51

6. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS.....	73
Anexo A.....	73
Anexo B.....	75
Anexo C.....	76
Anexo D.....	79

RESUMO

Dermatophagoides pteronyssinus (Dp) é uma importante espécie de ácaro da poeira domiciliar e está associado com doenças alérgicas. Alérgenos de Dp são causas importantes de sensibilização e resposta mediada por imunoglobulina E (IgE) entre pacientes com asma e rinite alérgica. O objetivo deste estudo foi produzir as proteínas recombinantes Der p 1 e os epítomos ligantes de IgE relacionados com a proteína Der p 1 (fragmento com os aminoácidos 172-243 (rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃)) para avaliar sua reatividade a IgE no soro de indivíduos sensibilizados ao ácaro usando ensaio imunoenzimático. A sequência de Der p 1 total e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ foram amplificadas e subclonadas em *E. coli*. Após a expressão e a purificação, a reatividade de IgE para rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ foi determinada por ELISA. Os resultados demonstraram que a proteína rDer p 1 expressa em *E. coli* apresentou um peso molecular estimado de 26 kDa e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ aproximadamente 8kDa. A proteína Der p 1 expressa e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ reagiu positivamente a IgE em 88% e 84% nos soros de pacientes alérgicos, respectivamente. Entretanto, soros de pacientes negativos demonstrou reatividade cruzada para rDer p 1, conquanto o mesmo não foi observado com rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃. Pode-se sugerir que rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ são candidatos promissores para o diagnóstico de alergia causada por *D. pteronyssinus* em pacientes sensibilizados a este ácaro.

Palavras-chave: Alergia, *Dermatophagoides pteronyssinus*, alérgenos recombinantes.

ABSTRACT

Dermatophagoides pteronyssinus (Dp) is an important specie of house dust mite associated with allergic diseases. Allergens from Dp are important causes of sensitization and mediated responses to specific immunoglobulin E (IgE) among patients with asthma and allergic rhinitis. The aim of this study was to produce recombinant protein Der p 1 and Der p 1-related IgE binding epitopes (rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃) to evaluate their reactivity to IgE in the serum of mite sensitized individuals using enzyme immunoassays. The sequences of rDer p 1 and rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ were amplified and subcloned into *E. coli*. After expression and purification the reactivity of IgE to rDer p 1 and rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ was determined by ELISA. The results showed that rDer p 1 expressed in *E. coli* presented an estimated molecular weight of about 26 kDa and rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ about 8kDa. The expressed rDer p 1 protein and rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ reacted positively with IgE in 88% and 84% of sera from allergic patients, respectively. However, sera from negative patients showed crossreactivity to rDer p 1, although the same was not observed for rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃. It can be suggested that rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ are promising candidates for the diagnosis of allergy caused by *D. pteronyssinus* in mite sensitized patients.

Keywords: Allergy, *Dermatophagoides pteronyssinus*, recombinant allergens.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alergia e atopia

Considera-se o início histórico da alergia moderna o ano de 1819, quando John Bostock descreveu a “febre do feno”, denominada atualmente de rinite alérgica (MYGIND, 1993). Tempos depois, Clemens Von Pirquet relatou reações mais rápidas e graves em crianças que receberam injeções repetidas de antitoxina estreptocócica equina ou da vacina contra varíola. Diante destes fatos, em 1906, Von Pirquet, juntamente com Béla Schick, cunhou o termo *alergia* para descrever a reatividade modificada, onde *allos* denomina “outro”, ou desvio de um comportamento normal e *ergon* “reação” (MYGIND, 1993; SIMONS, 1994). Hodiernamente denominada como hipersensibilidade imediata, o termo alergia é utilizado para designar reações nas quais alguns indivíduos podem apresentar manifestações clínicas desencadeadas pela exposição a um determinado estímulo, que em pessoas normais é tolerável. Tal reação é caracterizada, muitas vezes, por mecanismos imunológicos mediados por células de padrão Th2 e anticorpos, geralmente representados pelo isotipo IgE (JOHANSSON et. al., 2004).

A atopia, muitas vezes caracterizada como alergia, refere-se à tendência pessoal ou familiar, de ordem genética que induz a síntese de IgE específica a componentes protéicos de alérgenos ambientais, tais como proteínas antigênicas de ácaros, fungos e pólenes (JOHANSSON et al., 2004; HOLGATE; POLOSA, 2008). Sendo assim, são considerados atópicos os indivíduos que quando expostos a diferentes alérgenos, respondem por meio da produção de altos níveis de IgE e desenvolvem doenças típicas, tais como asma, rinite ou dermatite atópica (JOHANSSON et al., 2004).

1.2 Doenças Alérgicas

Asma e rinite são as principais doenças alérgicas respiratórias no Brasil e no mundo. A prevalência da asma varia de 1% a 30% entre a população de diferentes países e a da rinite alérgica de 10% a 25% da população geral; nota-se, contudo, que ambas as doenças têm apresentado uma crescente prevalência nas últimas décadas. A rinite alérgica está ganhando grande importância sócio-econômica, devido ao rápido aumento de sua prevalência mundial e a ser a causa de vários desgastes, ocasionando modificações na vida social dos pacientes e afetando o desempenho escolar e a produtividade no trabalho (VON MUTIUS, 1998;

BEASLEY et al., 2000; BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001). Há uma alta concomitância da rinite alérgica em pacientes com asma, conforme Linneberg e colaboradores (2002), que descrevem que 25 a 50% dos indivíduos com rinite apresentam sintomas de asma. Nos Estados Unidos e na Europa, a porcentagem de adultos asmáticos com rinite é de 50 a 100 (GAUGRIS; SAZONOV-KOCEVAR; THOMAS, 2006). Esta coprevalência é possível, dentre outros fatores, pela íntima relação entre as mucosas das vias respiratória superior e inferior, além da similaridade dos componentes e mecanismos inflamatórios envolvidos nestes distúrbios (JEFFERY et al., 2006).

Com base nas observações clínicas, a asma alérgica é caracterizada por inflamação do sistema respiratório inferior, induzindo quadro de hiper-reatividade brônquica e, conseqüentemente, episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse (LEMANSKE-JUNIOR & BUSSE, 2003). Apesar de apresentar perfil imunológico semelhante à asma, a rinite alérgica se distingue pelas inflamações nasais, tais como: aumento de secreção, obstrução da cavidade, espirros e prurido. Pode também ser acompanhada de conjuntivite, constituindo-se num quadro denominado de rinoconjuntivite, que se caracteriza por lacrimejamento, prurido conjuntival e fotofobia (TERR, 1997; JOHANSSON et al., 2004).

Vários fatores podem influenciar no desenvolvimento de doenças alérgicas. Dentre eles, destacam-se os fatores genéticos, como é evidenciado pela maior ocorrência de atopia entre gêmeos univitelinos do que em gêmeos bivitelinos (COOKSON, 1999). Além disso, uma das principais preocupações em relação ao desenvolvimento de doenças alérgicas é a influência do meio ambiente. Sublinha-se que na sociedade moderna ocorre grande concentração habitacional nas metrópoles, com predomínio do estilo de vida sedentário e de confinamento, gastando-se a maior parte do tempo no ambiente interno das moradias, nos quais, muitas vezes, há a presença de carpetes, cortinas, condicionadores de ar e/ou animais domésticos; esses fatores, somados a outros, ocasionam o aumento da quantidade de substâncias estranhas e alérgenos circulantes, contribuindo para a maior sensibilização de indivíduos geneticamente predispostos. Igualmente, não se pode olvidar o uso abusivo de antibióticos, que leva à destruição significativa da flora bacteriana intestinal. Evidentemente, estes fatores contribuem para o aumento da prevalência de doenças alérgicas, principalmente a asma e a rinite (POPE et al., 1993; SOARES et al., 2007).

Os estímulos responsáveis pelas manifestações clínicas da alergia podem ser desencadeados por componentes de origem protéica estranhos ao organismo, comumente conhecidos como alérgenos, presentes em componentes comuns ao nosso meio ambiente,

como polens de plantas ou ácaros da poeira domiciliar (HUBY; DEARMAN; KIMBER, 2000).

1.3 Alérgenos

Alérgenos são os antígenos causadores de doenças alérgicas, segundo Johansson et al. (2004). Estão presentes no ambiente extra-domiciliar, como por exemplo, os grãos de polens e principalmente no ambiente domiciliar, como em animais domésticos (cães e gatos), baratas, fungos e derivados de ácaros da poeira domiciliar (CROMWELL, 1997; GALLI; LANTZ, 1999). Geralmente, estes alérgenos são provenientes de diversas fontes, podendo ser de origem protéica, glicoprotéica, compostos inorgânicos que podem atuar como haptenos podendo ligar-se a proteínas e desempenhar papel imunogênico, ou até mesmo carboidratos podem ter relevância na sensibilização alérgica, conforme tem sido demonstrado pela avaliação da imunogenicidade da porção glicídica de muitas proteínas glicosiladas, salientando a importância dos epítomos de origem glicosídica, e não só os de origem peptídica na geração de respostas do sistema imunológico (FÖTISCH; VIETHS, 2001; MEYER; COMINH; DEMOLY, 2004).

A porção do alérgeno reconhecida pelos anticorpos e receptores de membrana das células efectoras é conhecida como epítomo, ou determinante antigênico. O epítomo de um alérgeno é pequeno, geralmente formado por resíduos de aminoácidos que combinam com a região variável do anticorpo e por outros aminoácidos que se ligam a células T. Constitui-se de forma linear, quando as sequências de aminoácidos estão contíguas, ou conformacional, caso os aminoácidos estejam separados na cadeia polipeptídica de forma que o dobramento possibilite espacialmente a ligação. Tal processo leva à caracterização do perfil de componente do sistema imune que será ativado após o seu reconhecimento (SELA, 1969; LAVER et al., 1990; ARLIAN; MORGAN; NEAL, 2002; CRAMERI, 2003).

A fim de possibilitar a organização das informações presentes no meio científico, fez-se necessário a criação de uma nomenclatura padronizada dos alérgenos, sobretudo no desenvolvimento de mecanismos de diagnóstico específico e de extratos imunoterápicos com alérgenos recombinantes, a qual foi viabilizada pelo Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos, que por sua vez, é regulado pela União Internacional das Sociedades de Imunologia (I.U.I.S.) e também pela Organização Mundial da Saúde (W.H.O.). Sendo assim, foi determinado que a designação dos alérgenos fosse representada pelas três primeiras letras do gênero ao qual o organismo pertence, juntamente com a primeira letra (ou mesmo as duas

primeiras, no caso de ambigüidade) da espécie a partir da qual o alérgeno é derivado, acrescido de um numeral arábico, que se refere ao grupo o qual pertence o alérgeno. Como exemplo, o alérgeno do grupo 1 derivado da espécie *Dermatophagoides pteronyssinus* é chamado, dessa forma, de Der p 1 (KING et al., 1995).

Para manter a unificação do sistema de nomenclatura, na qual uma determinada proteína é designada como alérgeno e nomeada segundo os critérios definidos, preconiza-se que a mesma se ligue à IgE de 5% dos soros de pessoas com alergia a ácaro da poeira domiciliar, o que é crítico para conhecer a importância relativa dos diferentes alérgenos (THOMAS et al., 2007). Se o alérgeno apresentar reatividade de IgE maior do que 50% dos pacientes contra uma determinada fonte alergênica, o alérgeno é denominado principal, ou *major*, em inglês. Se a reatividade de IgE for menor do que este valor, o alérgeno é “minoritário”, ou *minor* (LARSEN; LOWERSTEIN, 1996).

Existe uma diversidade de alérgenos capazes de provocar doenças alérgicas e, dentre estes, encontram-se os alimentares, os aeroalérgenos, os fármacos e a peçonha de alguns himenópteros. Os aeroalérgenos, designação dada aos alérgenos transportados pelo ar, estão frequentemente associados a partículas (como fezes de ácaros) e são os mais importantes agentes etiológicos da atopia (JOHANSSON et al., 2004). São proteínas relativamente pequenas, altamente solúveis em meio aquoso, o que permitem se dispersarem no muco e fluidos corporais.

1.4 Ácaros da poeira domiciliar

Desde a descoberta de que a poeira domiciliar tinha a capacidade de causar alergia, por conter antígenos que produzem uma reação imunológica mediada por IgE, por volta de 1920, muitos estudos têm sido feitos correlacionando a exposição de ácaros e sua influência na prevalência de doenças alérgicas (VOORHORST, 1967). Sendo assim, a exposição à aeroalérgenos provenientes de ácaros pode ser uma das causas primárias ou um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas, e pode agir também como sinal para exacerbação dos sintomas, os quais mais de 50% dos pacientes alérgicos são sensibilizados (PLATTS-MILLS; DE WECK, 1989; PLATTS-MILLS et al., 1992; SQUILLACE et al., 1997).

Ácaros da poeira domiciliar são animais microscópicos, praticamente invisíveis a olho nu, com tamanho entre 0,1 a 0,6 mm de comprimento, possuem corpo ovóide, com oito pernas articuláveis e um ciclo de vida passando pelos estágios de ovo, larva, protoninfa,

tritoninfa e adulto (ARLIAN; RAPP; AHMED, 1990; DE BOER, 1998; PIKE; CUNNINGHAM; LESTER, 2005). Algumas condições ambientais como temperatura em torno de 30°C e umidade do ar elevada (entre 75 e 80%), favorecem o crescimento e proliferação dos mesmos, determinando com isso diferenças geográficas e sazonais na prevalência e concentração de determinada espécie desses alérgenos (ARLIAN et al., 1992; ANDRADE et al., 1995; MUNIR et al., 1995; BOQUETE et al., 2006). A presença destes animais na poeira está intimamente relacionada ao seu hábito alimentar, que consiste de restos de pele humana e demais detritos orgânicos presentes no ambiente, não é sem razão, que a principal espécie de ácaro tem o nome científico de *dermatophagoides* que literalmente significa comedor de pele. Portanto, o colchão e o travesseiro tornam-se um hábitat ideal para a proliferação e crescimento dos mesmos (HART, 1998). O ácaro em si não produz nem conduz doenças, são as proteínas presentes no seu corpo e fezes que são capazes de induzir uma resposta imune e causar alergia em indivíduos susceptíveis (PLATTS-MILLS; DE WECK, 1989).

Várias medidas têm sido sugeridas para reduzir a exposição dos indivíduos asmáticos aos ácaros. As recomendações profiláticas são perfeitamente exequíveis na sua maioria, como por exemplo, o uso de acaricidas e aspiradores de pó, a lavagem dos cômodos com água quente, o encapamento de colchões e travesseiros e o uso de equipamentos que aumentam a ventilação no ambiente. Assim é possível eliminar do ambiente quase todos os objetos cujas superfícies favorecem a proliferação dos ácaros e/ou impregnação da matéria mucosa de suas fezes (HALLAS, 1991, HART, 1998, ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

Os ácaros presentes na poeira domiciliar foram descritos a partir da família Acaridae, Glycophagidae e Pyroglyphidae. Os ácaros da família Acaridae, *Acarus siro* e *Tyrophagus putrescentiae* são fontes de menor importância entre os alérgenos da poeira doméstica. Para a família Glyciphagidae, *Lepidoglyphus destructor* é considerado um ácaro essencialmente de armazenamento, enquanto que *Blomia tropicalis* tem emergido como um importante ácaro da poeira doméstica em regiões tropicais e subtropicais. Os ácaros da família Pyroglyphidae, *Dermatophagoides pteronyssinus*, são distribuídos a partir de regiões com clima temperado para tropical, enquanto *Dermatophagoides farinae* são encontrados em regiões mais secas. Por outro lado, o *Euroglyphus maynei* é encontrado em regiões temperadas, mas em menor abundância (PLATTS-MILLS, 2001; ARLIAN, 2002; THOMAS et al., 2007). *D. pteronyssinus* e *D. farinae* são os ácaros mais encontrados na poeira domiciliar, sendo representados por 80 a 90% do total (ARLIAN et al, 1992; GELBER et al., 1993). Ressalta-se

No Brasil, similares pesquisas têm confirmado estes dados em diferentes regiões. Em estudo conduzido por Arruda e colaboradores (1991) na cidade de São Paulo foi avaliado tanto a exposição quanto a sensibilização de crianças asmáticas, o que revelou altos níveis de alérgenos do ácaro *D. pteronyssinus* por grama de poeira com destaque para os dois principais grupos (Der p 1 e Der p 2) em 90% das residências, bem como altos níveis de IgE específica em 95% das crianças incluídas no estudo. Com este mesmo propósito, Terra e colaboradores (2004) avaliaram o grau de exposição à alérgenos da poeira domiciliar em Uberaba, constatando que *D. pteronyssinus* era a espécie mais frequente nas amostras analisadas.

Grande parte dos alérgenos de *D. pteronyssinus* são elementos presentes no corpo ou na matéria fecal dos ácaros. Os alérgenos relacionados às fezes são originados do trato gastrointestinal do ácaro, e alguns desses também se encontram presentes em sua saliva. Outra provável fonte de alérgenos desta espécie inclui enzimas associadas aos processos de mudanças de estágios (TOVEY; CHAPMAN; PLATTS-MILLS, 1981; ARLIAN et al., 1987).

1.6 Principais alérgenos de *D. pteronyssinus*

O ácaro *D. pteronyssinus* apresenta diversas proteínas com capacidade alergênica, algumas proteínas já são bem caracterizadas e organizadas em grupos definidos segundo parâmetros de identidade bioquímica, homologia e peso molecular. Desde a caracterização do primeiro alérgeno denominado P1 por Chapman e Platts-Mills (1980) tem sido crescente o número de alérgenos descobertos. Atualmente, pelo menos 18 grupos de alérgenos de *D. pteronyssinus* já foram caracterizados, dos quais 10 grupos de alérgenos foram clonados e identificados (SMITH et al., 2001). Assim, quinze grupos foram, oficialmente, descritos e listados pelo Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos, e três outros grupos descritos por Lorenz e colaboradores (2009) e O'Neil e colaboradores (2006), representados no Quadro 1.

Der p 1 e Der p 2 são as proteínas alergênicas mais importantes encontradas no ácaro *D. pteronyssinus*, não só devido às altas concentrações destas na poeira, mas também devido aos altos níveis de IgE específica às mesmas presente nos indivíduos alérgicos. Der p 1 é uma proteína glicosilada encontrada em fezes de ácaros com peso de 25 kDa com função de cisteína protease enquanto Der p 2 é uma proteína procedente do corpo do ácaro, com função biológica relacionada com transporte de colesterol e que apresenta peso aproximado de 14 kDa (PLATTS-MILLS et al., 1992; ICHIKAWA et al., 2005; JOHANNESSEN et al., 2005).

Chapman e colaboradores (1983) na avaliação da sensibilização de pacientes alérgicos, confirmou que 70-80% dos mesmos possuem anticorpos IgE específicos ao

alérgeno Der p 1. Em trabalho realizado por Smith e colaboradores (1998) em um grupo de crianças do estado do Novo México e da Virgínia nos EUA, foi verificado altos índices de sensibilização (90%) ao antígeno do grupo 2 (Der p 2). A relevância na sensibilização de indivíduos a outros alérgenos como Der p 3, 5, 6, 7 e 8 tem também sido avaliada por Thomas e colaboradores (2002) que encontraram 50% dos indivíduos sensibilizados a estes componentes, apresentando índices variáveis de IgE. Estudos dos grupos 11, 14, 15 e 18, os quais apresentam maiores pesos moleculares também tem revelado altos índices (54%-80%) de ligação à IgE, contudo as concentrações dos mesmos encontradas nos extratos apresentam variações devido aos diferentes métodos de obtenção dos extratos. Ressalta-se o fato, além disso, de que alérgenos presentes em baixas concentrações podem induzir a altos títulos de anticorpos IgE (THOMAS; SMITH; HALES, 2004; LEE et al., 2004; O'NEIL et al., 2006). Também, há que se ressaltar que polipeptídeos pertencentes a outros grupos não alergênicos, considerados, por isso, não tão relevantes, podem ser altamente imunogênicos, sendo capazes de induzir um balanço na resposta de citocinas Th1/Th2 (EPTON et al., 2002).

Alérgeno	Isoformas	Massa molecular relativa (kDa)	Identidade bioquímica
Der p 1	Der p 1.0101 – Der p 1.0124	24	Cisteína protease
Der p 2	Der p 2.0101 – Der p 2.0115	15	Família NPC2
Der p 3	Der p 3.0101	31	Tripsina
Der p 4	Der p 4.0101	60	Alfa Amilase
Der p 5	Der p 5.0101 e Der p 5.0102	14	ND
Der p 6	Der p 6.0101	25	Quimiotripsina
Der p 7	Der p 7.0101	26, 30 e 31	ND
Der p 8	Der p 8.0101	27	Glutaciona S-transferase
Der p 9	Der p 9.0101 e Der p 9.0102	29	Serina protease coleagenolítica
Der p 10	Der p 10.0101 – Der p 10.0103	36	Tropomiosina
Der p 11	Der p 11.0101	103	Paramiosina
Der p 13*	-	15	Proteína ligante de ácido graxo
Der p 14	Der p 14.0101	177 (variável)	Apolipoforina
Der p 15*	-	63-105	Quitinase
Der p 18*	-	60	Quitinase
Der p 20	Der p 20.0101	40	Arginina quinase
Der p 21	Der p 21.0101	16	ND
Der p 23	Der p 23.0101	14	Função desconhecida, homologia ao domínio A da peritrofina

Quadro 1. Listagem dos grupos de alérgenos de *D. pteronyssinus* de acordo com a identidade bioquímica. Segundo: *Subcomitê de Nomenclatura dos alérgenos. I.U.I.S (www.allergen.org), Lorenz e colaboradores (2009), O’Neil e colaboradores (2006) e Allergome (www.allergome.com)*. *Alérgenos não presentes na lista oficial da I.U.I.S. NPC2, Niemann-Pick C2; -, não existente; ND, não determinado.

A alta alergenicidade de Der p 1 está relacionada com sua função biológica, pois sua ação de protease sobre CD23, um importante inibidor da síntese de IgE, resulta em uma estimulação mais intensa para a síntese de anticorpos IgE. Der p 1 também atua como adjuvante de células Th2 clivando CD25 e agravando os efeitos broncoconstritores em pulmões de pacientes asmáticos (HEWITT et al., 1995).

1.7 Fisiopatologia da alergia

O desencadeamento da resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigênico e de várias etapas da resposta imune do hospedeiro. O processamento do alérgeno pela APC resulta na formação de peptídeos que são apresentados à célula T CD4⁺ em associação com moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (MARONE, 1998).

O reconhecimento do conjunto peptídeo/MHC II por uma célula T CD4⁺ com receptor específico para o alérgeno, reforçado pela ligação de moléculas coestimulatórias B7-1(CD80)/B7-2 (CD86) e CD28, leva à ativação de células Th (T *helper* ou T auxiliadora), particularmente do fenótipo Th2, o qual está associado com resposta imune a alérgenos e helmintos. O sistema imune caracteriza-se por apresentar pelo menos dois tipos distintos de células T *helper*, Th1 e Th2. O fenótipo Th1 primariamente é responsável pela imunidade a bactérias intracelulares, protozoários, e vírus. Uma resposta imune típica de células Th1 específicas é caracterizada por respostas cutâneas de hipersensibilidade tardia e ativação de linfócitos B produtores de anticorpos IgG. Células Th2 ativadas secretam citocinas, tais como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que estimulam as células B a produzirem anticorpos IgE e IgG4, bem como ativam eosinófilos, basófilos e mastócitos. A IL-5 é um importante fator de crescimento seletivo para diferenciação terminal, ativação e manutenção dos eosinófilos nos tecidos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Uma variedade de citocinas tem sido implicadas na modulação da síntese de IgE. A presença de IFN- γ e TNF- β produzidas por células do perfil Th1 inibem a síntese de IgE pelas células B, enquanto IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 estimulam sua síntese (WORM; HENZ, 1997).

Desta forma, as principais etapas envolvidas no desenvolvimento da reação de hipersensibilidade imediata são: (1) exposição ao alérgeno que estimula respostas imunes com padrão Th2 com consequente produção de IgE em indivíduos geneticamente predispostos; (2) ligação do anticorpo IgE a receptores Fc ϵ nos mastócitos; (3) ligação cruzada dos antígenos pelas moléculas de IgE previamente ligadas aos receptores Fc ϵ nos mastócitos; e (4) ativação de mastócitos que leva à despolarização da membrana celular, influxo de Ca²⁺ extracelular e posterior liberação de Ca²⁺ intracelular, culminando com a ativação de enzimas, para liberação de mediadores inflamatórios (ROITT; BROSTOFF & MALE, 2002), tais como as prostaglandinas D2 (PGD₂) ou leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) e a exocitose de grânulos secretores. A exocitose de histamina e outros mediadores pré-formados promovem aumento

da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema e contração de músculos lisos, fenômenos esses responsáveis pelas manifestações clínicas preliminares das reações alérgicas, ocorrendo nos primeiros 30 minutos seguidos à exposição alergênica (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Nas 12 (doze) horas que sucedentes, ocorre progressiva infiltração tecidual de células inflamatórias, desde neutrófilos a eosinófilos e células mononucleares, em resposta a mediadores químicos (TERR, 1997; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Desde a década de 80, quando Coffman e Mosmann identificaram a existência das subpopulações de linfócitos Th1 e Th2, os imunologistas acostumaram-se com a ideia da diferenciação terminal de linfócitos altamente especializados e restritos à produção de determinadas citocinas (MOSMANN et al., 1986). A partir de então, à medida que se identificavam células que produziam preferencialmente certos padrões de citocinas, novos subtipos de linfócitos foram classificados, incluindo as células T reguladoras, Th17, Th9, Th22 e T helper foliculares. No entanto, esse conceito da estabilidade do diferentes subtipos linfócitos T tem cedido lugar à idéia da plasticidade celular. Hoje, sabe-se da existência de plasticidade entre células Th17 e T reguladoras, T reguladoras e Th1, Th2 e Th9. Assim, o comprometimento de linfócitos T com determinados subtipos "Th" pode ser alterado pelos estímulos presentes no microambiente tecidual, que induzem a diferenciação de células com mais de um padrão, Th1/Th2, Th2/Th9, Th2/Th17, por exemplo (MURPHY et al., 2010; PRUSSIN; YIN; UPADHYAYA, 2010).

Subpopulações de células T $CD4^+CD25^+$ denominadas de células Treg produtoras de TGF- β e IL-10 têm sido reconhecidas com propriedades imunomoduladoras (inibitórias) do perfil Th1 bem como estímulo para a produção de anticorpos da classe IgA (WEINER, 1997). Além disso, tem sido mostrada sua capacidade de regular a resposta imune Th2, apresentando possível papel no controle de respostas alérgicas (McHUGH; SHEVACH, 2002). Em suma, acredita-se que Treg contribui para controlar a resposta imune inflamatória alérgica de vários modos: supressão de células apresentadoras de antígenos indutoras de células T efetoras, supressão de mastócitos, basófilos e eosinófilos, supressão da síntese de anticorpos IgE e indução de anticorpos IgG4 (AKDIS; AKDIS, 2007; MEILER et al.; 2008; NANDAKUMAR; MILLER; KUMARAGURU, 2009).

Tais estudos demonstram que o processo inflamatório alérgico é resultado de um complexo sistema de liberação de mediadores, cujo sincronismo está diretamente relacionado ao equilíbrio entre as atividades dos diferentes perfis de células TCD4+.

1.8 Diagnósticos de Alergia

O diagnóstico da alergia baseia-se na combinação de história típica de sintomas alérgicos, associado aos resultados obtidos através de testes diagnósticos. Estes podem ser realizados por meio de métodos *in vivo* (testes cutâneos de puntura ou intradérmico) e/ou *in vitro* (determinação dos níveis de IgE sérica específica), que são úteis para a identificação da sensibilização de pacientes a um painel de alérgenos (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001).

Os testes cutâneos de hipersensibilidade imediata podem ser epicutâneos (conhecido como teste cutâneo de puntura (TCP)) ou intradérmicos. O teste cutâneo, por sua vez é o mais empregado por ser um método simples, de rápida execução, baixa ocorrência de efeitos adversos, altamente sensível e específico e são mais econômicos quando comparado à determinação laboratorial da IgE sérica específica. Contudo, o teste cutâneo não diagnostica a doença alérgica, apenas determina a presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos, importantes na patogênese da doença alérgica (OWNBY, 1988; TURKELTAUCB; GERGEN, 1989; DREBORSG, 1989; BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001).

Ambos os métodos *in vivo* (TCP e intradérmico) dependem da apresentação do alérgeno à IgE alérgeno-específica ligada aos receptores de IgE na superfície dos mastócitos residentes na pele. Com a ligação de uma quantidade suficiente de IgE aos receptores e então aos alérgenos, há a agregação dos complexos na superfície celular e assim via mecanismos intracelulares há à liberação de mediadores pré-formados e síntese e liberação de outros mediadores. A presença de mediadores vasoativos leva à formação de eritema e edema local. A histamina, o mediador mais prevalente causa coceira no local da puntura, juntamente com vasodilatação e extravasamento plasmático, o que produz a pápula (WILLIAMS, 2008).

Os testes *in vitro* são preferencialmente utilizados quando os pacientes não podem ser submetidos ao teste cutâneo em virtude da presença de lesões cutâneas, ingestão de medicamentos ou história de possível anafilaxia. Um resultado positivo, assim como nos testes cutâneos, não é suficiente para o diagnóstico, é necessário ter associação com a clínica do paciente, que geralmente se caracteriza por espirro, coriza, coceira e congestão (BERNSTEIN; STORMS, 1995; MASTRANDREA et al., 1997; SILVA et al., 2001).

Vários estudos demonstram que o emprego de testes, *in vivo* e *in vitro* para a determinação de IgE específica a aeroalérgenos domiciliares, pode ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico de pacientes atópicos.

1.9 Alérgenos Recombinantes

Tradicionalmente, extratos alergênicos obtidos de fontes naturais têm sido utilizados para diagnóstico e imunoterapia. Contudo, apesar dos avanços nas técnicas de purificação e padronização de alérgenos, esses extratos consistem em misturas complexas de componentes heterogêneos e muitas vezes com quantidades indefinidas e até mesmo ausentes dos alérgenos relevantes. Com o uso da tecnologia de DNA recombinante, tornou-se possível caracterizar de forma precisa a natureza molecular dos alérgenos, produzir os mesmos com elevado grau de pureza, obter altos rendimentos a baixo custo, determinar a sua concentração protéica e poder produzir misturas padronizadas de alérgenos de diferentes fontes. Com essas novas técnicas, é possível manter as mesmas características imunológicas dos alérgenos naturais ou até modificar algumas de suas propriedades, com a finalidade de reduzir a alergenicidade e aumentar a imunogenicidade, podendo ser usados para melhoria da eficácia clínica do diagnóstico e tratamento de alergias respiratórias (CHAPMAN et al., 2000; LIM et al., 2004; GAO et al., 2007; VALENTA et al., 2010).

Atualmente, os estudos em geral de alérgenos recombinantes têm focado em comparações entre proteínas nativas, proteínas recombinantes e peptídeos derivados da molécula recombinante. Estudos comparativos entre proteínas recombinantes inteiras e fragmentos (peptídeos) têm demonstrado diferenças de reatividade para IgE, podendo ser encontradas porções tanto hiper- quanto hipoalergênicas da molécula. Niederberger e colaboradores (2004) produziram peptídeos derivados de Bet v 1, o principal alérgeno de pólen de Bétula, cuja reatividade para IgE foi 100 vezes menor que da proteína inteira, para utilização em diferentes protocolos de vacinação. Por outro lado, vários pesquisadores têm focado sua atenção na identificação de epítomos de alérgenos que se liguem mais fortemente a IgE, com o objetivo de melhora do diagnóstico de doenças alérgicas (Yi et al., 2002; RAMOS et al., 2003). Os primeiros alérgenos recombinantes para diagnóstico *in vivo* de alergia IgE mediada foram usados com sucesso em 1994, assim, os testes cutâneos realizados mostraram que eles possuem reatividade específica *in vivo* comparável aos alérgenos naturais (MENZ et al., 1996; HEISS et al., 1999).

Têm sido utilizados vários sistemas de expressão para produção de alérgenos recombinantes. A maioria dos protocolos utiliza o sistema de expressão em *E. coli*, um organismo procarioto, pouco exigente e de crescimento acelerado, com ciclos completos a cada 20 minutos. No entanto, alguns casos de proteínas expressas não reativas neste sistema foram evidenciados, possivelmente devido às diferenças nos mecanismos de expressão e/ou

modificações pós-traducionais, exclusivas de sistemas eucariotos. Proteínas com atividade enzimática como Der p 1, quando produzidas em bactéria como *Escherichia coli*, são secretadas na forma de pré-proteínas e apresentam menor ligação a anticorpos IgE de pacientes atópicos, quando comparadas a proteínas nativas (THOMAS et al., 1988; YUUKI et al., 1991; BEST et al., 2000; CUI et al., 2009; KOYANAGI et al., 2010). Na tentativa de reparar esses danos, outros sistemas de expressão em organismos eucariotos vêm sendo requeridos, entre eles, insetos (células de *Drosophila*), animais (células de ovário de Hamster), *Pichia pastoris* e células de tabaco (GELLISSEN, 2000; JACQUET et al., 2000; MASSAER et al., 2001; JACQUET et al., 2002; VAN OORT et al., 2002; TAKAI et al., 2002; BURTIN et al., 2009)

Nas últimas décadas grande progresso na caracterização molecular dos alérgenos foi alcançado e os determinantes maiores mais importantes foram clonados. Portanto, cada vez mais alérgenos recombinantes estão sendo produzidos para serem incorporados no diagnóstico e tratamento de doenças alérgicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

➤ O objetivo principal desta proposta foi utilizar a metodologia de produção de proteínas recombinantes, relacionadas com o alérgeno Der p 1 de *D. pteronyssinus*, de alta pureza, sensibilidade e especificidade, com a finalidade de aplicação na avaliação da resposta imune humoral e celular de pacientes com doenças alérgicas respiratórias.

2.2 Específicos

➤ Clonar, expressar e purificar a proteína Der p 1 recombinante de *D. pteronyssinus* e epítomos recombinantes derivados de Der p 1;

➤ Verificar se as proteínas produzidas são reconhecidas pelo anticorpo monoclonal (origem comercial) e policlonal (proveniente de pacientes atópicos) através de Slot blot;

➤ Comparar a resposta de anticorpo IgE a alérgenos de *D. pteronyssinus*, Der p 1 recombinante e epítomos recombinantes derivados de Der p 1 em pacientes atópicos através de ensaio imunoenzimático.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob processo nº 322/08 (Anexo A), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos, segundo as normas da Resolução CNS 196/96. Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento livre e esclarecido (Anexo B), estando cientes de todos os procedimentos adotados e responderam a um questionário clínico elaborado segundo *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISSAC, 1998) (Anexo C).

3.2 Pacientes

Um total de 80 pacientes foi avaliado e distribuído em dois grupos. O primeiro grupo composto por 50 indivíduos atópicos, com idade entre 18 e 48 anos, de ambos os gêneros foi selecionado no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Os critérios de inclusão para esses pacientes foram: (1) história clínica de sintomas respiratórios relacionados com exposição à poeira domiciliar; (2) teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a *D. pteronyssinus* (Dp) e (3) presença de IgE sérica específica ao alérgeno determinada por ELISA. Os critérios de exclusão para o estudo foram: (1) uso de anti-histamínicos ou corticosteróides por via oral ou tópica, na semana anterior ao teste; (2) uso de corticosteróides sistêmicos por período de tempo prolongado; (3) presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo; (4) estar incluso em procedimento de imunoterapia ao alérgeno testado. No segundo grupo, 30 pacientes não-atópicos, de ambos os gêneros e idade entre 18 e 47 anos, foram selecionados entre os alunos dos cursos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários da UFU e de membros da população de Uberlândia. Os critérios de inclusão foram ausência de sintomas e de antecedentes pessoais de doenças alérgicas e TCP negativo a um painel de extratos alergênicos inaláveis.

3.3 Teste Cutâneo de Puntura (TCP)

O TCP foi realizado de acordo com Ownby (1988), utilizando vários extratos alergênicos inaláveis: ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*); epitélio de cão (*Canis familiaris*), epitélio de gato (*Felis domesticus*), barata (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*) e fungo (*Alternaria alternata*). Para o controle positivo, utilizou-se cloridrato de histamina a 10 mg/mL e para o controle negativo utilizou-se solução salina fisiológica em fenol 0,4% e glicerina diluída a 50% (SQUILLACE et al., 1997; OPPENHEIMER, NELSON, 2006). Os extratos alergênicos comerciais e soluções controle foram comprados da FDA Allergenic, RJ, Brasil. Após 15 minutos da realização do teste, as pápulas foram mensuradas e o teste foi considerado positivo quando as mesmas apresentaram diâmetro médio maior que 3 mm que aquelas do controle negativo (ANEXO D).

3.4 Obtenção do soro de pacientes

Soros de indivíduos atópicos foram utilizados neste trabalho, de acordo com o quadro clínico do paciente e teste cutâneo positivo ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, bem como soros de indivíduos normais (teste cutâneo negativo). As amostras de sangue (10 ml) foram coletadas sem anti-coagulante de cada indivíduo por punção venosa na região do antebraço. Posteriormente, foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos e os soros obtidos foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.5 Pesquisa da sequência gênica Der p 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus*

Através da análise da sequência gênica de Der p 1 do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* presente na poeira domiciliar, em bancos de dados no *Pubmed* (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>) com número de acesso U11695, evidenciamos que essa sequência apresenta 1099 pb e codifica um produto protéico de 320 aminoácidos (número de acesso AAB60215). Além disso, esse mesmo alérgeno está oficialmente nomeado e depositado no banco de dados IUIS Allergen Nomenclature (<<http://www.allergen.org/allergen.aspx>>), onde foi possível verificar que o peso predito dessa proteína é de aproximadamente 24 kDa. Também, foram profetados epítomos ligantes de IgE relacionados a Der p 1 (Der p 1₁₇₂₋₂₄₃) após análise dos pontos quentes da sequência

nativa, incluindo os três principais epítomos ligantes de IgE (aminoácidos 172-198, 199-210 e 211-243) conforme já descrito (GREENE; THOMAS, 1992; JEANNIN et al., 1992; JEANNIN et al., 1993; DE HALLEUX et al., 2006). Este fragmento (aminoácidos 172-243) codifica uma sequência gênica com 216 pb e um produto protéico de 72 aminoácidos com peso molecular aproximado de 8 kDa (Fig. 2).

	20	40	60
MKIVLAIASL	LALSAVYARP	SSIKTFEELYK	KAFNKSYATF EDEEAARKNF LESVKYVQSN
	80	100	120
GGAINHLSL	SLDEFKNRFL	MSAEAFEHLK	TQFDLNAETN ACSINGNAPA EIDLRQMRTV
	140	160	180
TPIRMQGGCG	SCWAFSGVAA	TESAYLAYRN	QSLDLAEQEL VDCASQHGCH GDTIPRGIEY
	200	220	240
IQHNGVVQES	YYRYVAREQS	CRRPNAQRFG	ISNYCQIYPP NVNKIREALA QTHSAIAVII
	260	280	300
GIKDLDAFRH	YDGRITIIQRD	NGYQPNYHAV	NIVGYSSNAQG VDYWIVRNSW DTNWDNGYGY
	320		
YFAANIDLMM	IEEYPYVVIL		

Figura 2. Sequência de aminoácidos que codifica a protein Der p 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus* obtidas no *Genbank* com número de acesso AAB60215. Os números referem à posição dos aminoácidos e as cores representam os três principais epítomos (172-198, 199-210, e 211-243).

3.6 Síntese dos genes artificiais

Inicialmente, para a síntese dos genes artificiais, a sequência de DNA foi determinada por busca em banco de dados tais como o *GenBank* (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>). Posteriormente, a empresa responsável pela produção dos genes artificiais (*Genscript*: <<http://www.genscript.com>>) dispôs a sequência na forma semelhante à proteína nativa e também forneceu um fragmento composto dos três principais epítomos ligantes de IgE, utilizando a metodologia de síntese “Gene-on-Demand®”, produzindo sequências de DNA em tandem, com presença de sítios de restrição para as enzimas NdeI e BamHI. As mesmas foram ligadas e clonadas no vetor pUC18 e sub-clonadas para o vetor de expressão pET14b (Novagen), afim de armazenar e promover a expressão do gene, respectivamente.

3.7 Produção de células bacterianas competentes

As células tornaram-se competentes com utilização inicial de um pré-inóculo em meio de cultura LB caldo (10 g de NaCl, 10 g de bactroptona e 5 g de extrato de levedura por litro

pH 7,5) (Sigma-Aldrich Co., MO, EUA) crescido previamente por 18 horas (*E. coli* cepa DH5- α (Novagen, EUA)). Inoculou-se 250 μ l do pré-inóculo em 25 ml de meio de cultura LB caldo incubado em agitador orbital a 180 rpm a 37°C até atingir densidade óptica (D.O) de 0,1 a 0,3 (aproximadamente 1 hora). As células foram posteriormente centrifugadas a 3000 x g a 4°C durante 15 minutos e o sedimento ressuspense em 5 ml de solução de CaCl₂ a 50 mM a 4°C com suave agitação por inversão do tubo. A partir desse momento a suspensão de células manteve-se no banho de água com gelo. Centrifugou-se novamente a 3000 x g a 4°C por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspense lentamente em 500 μ l de solução de CaCl₂ a 50 mM a 4°C com adição de 250 μ l de meio de cultura LB caldo. As células foram mantidas por 1 hora em banho de gelo, sendo a partir de então consideradas competentes (AZEVEDO, 2003). As células assim tratadas foram imediatamente utilizadas para transformação de *E. coli* com pET14b-Der p 1 e pET14b-Der p 1₁₇₂₋₂₄₃.

3.8 Reação de transformação de *E. coli* DH5- α com pET14b-Der p 1 e pET14b-Der p 1₁₇₂₋₂₄₃

A transformação das células competentes foi realizada através da incubação de 20 μ l destas a partir de suspensões celulares com D.O 0,6 acrescidos de 20 ng de pET14b-Der p 1 e/ou pET14b-Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ em gelo durante 5 minutos. Posteriormente, realizou-se o choque térmico da reação por 3 minutos a 42°C com subsequente banho de gelo por 10 minutos. Adicionou-se 250 μ l de meio SOC (Qiagen Inc., CA, EUA) e a reação foi incubada por 1 hora a 37°C em agitação orbital a 180 rpm. A suspensão bacteriana obtida foi adicionada a placas de petri contendo meio de cultura LB Agar com ampicilina (Sigma) a 10 μ g/ml e incubada por 18h a 37°C. Foram utilizados diferentes volumes de suspensão bacteriana (10 μ l, 15 μ l, 25 μ l, 50 μ l e 150 μ l). As colônias transformadas foram coletadas e incubadas em meio de cultura LB caldo acrescido de ampicilina a 10 μ g/ml por 18h a 37°C para extração do plasmídeo contendo o inserto.

3.9 Extração do plasmídeo pET14b-Der p 1 e pET14b-Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ de *Escherichia coli* DH5- α

A fim de promover a extração do inserto pET14b-Der p 1 e pET14b-Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ da *E. coli* DH5- α (bactéria de estocagem) para transfectar em BL21 (Novagen) (bactéria de expressão) utilizou-se o protocolo “Miniprep Plasmid DNA kit” (Qiagen) conforme instruções do fabricante. Os inóculos crescidos por 18 horas foram centrifugados a 4700 rpm

por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi processado utilizando o Kit Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit). Brevemente, foram adicionados em cada reação 250 µl do tampão P1 e posteriormente 250 µl do tampão P2 e 350 µl do tampão N3, invertendo o tubo cuidadosamente 6 vezes. Centrifugou-se a 25°C por 10 minutos com rotação de 10000 x g. O sobrenadante foi aplicado à coluna fornecida pelo Kit e foi realizada outra centrifugação por 1 minuto a 10000 x g a 25°C para retenção do DNA. Para lavagem da micro-coluna, utilizou-se 750 µl do tampão PE, com posterior centrifugação por 1 minuto 10000 x g a 25°C. Para remover resíduos do tampão de lavagem, desprezou-se o sobrenadante e centrifugou-se por 1 minuto 10000 x g a 25°C. Para eluir o DNA a micro-coluna foi transferida para um microtubo limpo e foi adicionado 50 µl de tampão EB, centrifugando-se novamente por 1 minuto 10000 x g a 25°C. A confirmação da presença do gene para Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ foi realizada através da análise por eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen, CA, EUA) com corrida de 50 minutos a 120 Volts, utilizando como corante Blue Green Loading (LGC Biotecnologia LTDA).

3.10 Reação de transformação do vetor pET14b-Der p1 e o pET14b-Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ em *E. coli* BL21

A transformação de *E. coli* com pET14b-Der p 1 e pET14b-Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ foi realizada em condições semelhantes como descrito no item 3.9.

3.11 Expressão de Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ recombinante em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

A expressão da proteína Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ recombinante foi dividida em três etapas:

- 1) Teste de indução da expressão protéica em menor escala, com o objetivo de verificar se a expressão foi alcançada.
- 2) Produção em larga escala, visando a produção de proteínas recombinantes para posterior purificação em quantidade suficiente para os ensaios biológicos subsequentes.
- 3) Teste de solubilidade para avaliar as melhores condições de purificação e escolha do tampão de lise.

3.11.1 Teste de Indução da Expressão de Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ em *E. coli* BL21(DE3) pLysS

Para realizar o teste de expressão de Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS foram selecionadas 6 colônias. As colônias foram inoculadas em 5 ml de meio de cultura LB caldo com ampicilina a 10 µg/ml e incubadas por 18 horas a 37°C em agitação de 180 rpm. Um volume de 250 µl dos inóculos foi suspenso em 25 ml de meio de cultura LB caldo com ampicilina a 10 µg/ml e incubado em agitação de 180 rpm a 37°C até atingir a D.O de 0.6 (aproximadamente 3 horas). As alíquotas de 1 ml de suspensão bacteriana sem indução (Tempo Inicial) foram separadas, centrifugadas a 9000 x g por 2 minutos e o sedimento foi ressuspenso em 50 µl de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH 6 SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% Glicerol a 20%). O volume restante foi utilizado para os testes de indução da expressão protéica.

Para iniciar os ensaios de expressão adicionou-se IPTG (Sigma) aos inóculos em concentração de 0,3 mM, sendo estes incubados a 30°C em agitação de 180 rpm por 18 horas. Foram retiradas alíquotas de 1 ml após o período de indução (Tempo Final) e o sedimento foi ressuspenso em 100 µl de tampão de amostra. Para verificar a expressão da Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃, o conteúdo protéico das amostras foi analisado em gel SDS-PAGE como descrito por LAEMMIL (1970) (ítem 3.13). O Benchmark (Invitrogen) foi usado como padrão de peso molecular.

3.11.2 Produção de Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS em larga escala

Para produção de Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ em larga escala utilizou-se a cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformada com vetor pET14b selecionada no teste de expressão, sendo esta inoculada em 100 ml de meio de cultura LB caldo com ampicilina a 10 µg/ml a 37°C por 18 horas. As células foram re-inoculadas em 900 ml de meio de cultura LB caldo, totalizando um volume final de 1L, e incubadas a 37°C até atingir uma D.O de 0,6 (aproximadamente 1 hora). Adicionou-se 0,3 mM de IPTG e incubou-se por 18 horas no agitador orbital a 180 rpm a 20°C.

Células foram cultivadas por 18 horas sem adição de IPTG para serem utilizadas como controle negativo, a fim de avaliar a eficiência da indução protéica de Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃. Para tal, foram separadas alíquotas de 1ml do tempo sem indução (Tempo inicial) e tempo induzido (Tempo final). Ambas as alíquotas foram centrifugadas a 9000 x g por 2 minutos e

ressuspensas em tampão de amostra, 50 µl e 100 µl respectivamente. Posteriormente o perfil das bandas de indução foi avaliado em gel gradiente SDS-PAGE de 15%.

3.11.3 Teste de Solubilidade

Para avaliar o melhor tampão a ser utilizado na purificação, 100 µl da suspensão bacteriana do tempo induzido (Tempo final) foi utilizada. Centrifugou-se a suspensão a 9000 x g por 2 minutos e o sedimento foi ressuspense em 50 µl de PBS. Para a reação de lise bacteriana incubou-se por 30 minutos no gelo 5 µl de lisozima (Sigma) com 45 µl de bactéria com PBS, posteriormente congelou-se a amostra no gelo seco e descongelou a 42°C por 6 vezes. Centrifugou-se a 10000 x g por 20 minutos e o sobrenadante foi guardado para análise posterior com 100 µl de tampão de amostra. O sedimento foi ressuspense com 500 µl de PBS e centrifugado por 20 minutos a 10000 x g, novamente o sedimento foi ressuspense com 500 µl de PBS e centrifugado a 10000 x g. Adicionou-se ao sedimento final 100 µl de tampão de amostra. Posteriormente o sobrenadante e o sedimento final foram analisados em gel gradiente SDS-PAGE 15%.

3.12 Extração e purificação das proteínas rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada através da utilização do sedimento obtido como descrito no item 3.11.2, este foi ressuspense em tampão de lise (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Uréia pH 8.0) na razão de 5 ml de tampão por 1 g de sedimento. Após a solubilização do sedimento por 30 minutos à 4°C, este foi submetido à sonicação (Bandelin Sonoplus HD 2070) (10 vezes por 30s, 50 W, no gelo) para melhor rompimento das células e liberação das proteínas.

As proteínas com cauda de histidina foram purificadas por cromatografia com afinidade a níquel no HPLC (Amersham Biosciences, AKTA Purifier). Primeiramente, a coluna de níquel foi equilibrada com o Tampão de Ligação (8 M Uréia, 20 mM fosfato de sódio anidro, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazol pH 7.4). Após injetar a amostra na coluna, o Tampão de Ligação foi aplicado novamente antes do Tampão de Eluição (500 mM Imidazol, 20 mM fosfato de sódio, 0.5 M NaCl pH 7.4) para lavagem das proteínas que não contêm cauda de histidina. As proteínas eluídas foram dialisadas e concentradas em Amicon (Millipore, MA, EUA) contra tampão fosfato salino (PBS) com membrana de 3.5 kDa.

O conteúdo protéico da proteína recombinante Der p 1 e o seu fragmento foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando BSA como padrão protéico para a curva de calibração.

3.13 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil de bandas polipeptídicas das proteínas recombinante foi analisado por SDS-PAGE, em condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com Laemmli e colaboradores (1970).

Os gel de separação foi preparado a 15%, composto de uma solução Tris-HCl 375mg/mol, pH 8,8, dodecil sulfato de sódio (SDS, Bio-Rad) 0.1%, N, N'-Metileno-bis-acrilamida (Bio-Rad) 15%, N,N,N,N-tetrametilenodiamina (TEMED, Bio-Rad) 0.125% e persulfato de amônia (Bio-Rad) 0,125%, diluídos em água deionizada. O gel de empilhamento foi preparado a 5%, com os mesmos compostos, porém utilizando Tris-HCl 125mg/mol (pH 6.8) como solução tamponante. O tempo de polimerização foi de aproximadamente 40 minutos para o gel de separação e 20 minutos para o gel de empilhamento.

As amostras foram previamente diluídas em tampão de amostra, contendo Tris-HCl 0.1M (pH 6.8), SDS 4%, azul de bromofenol 0.2% e glicerol 20%, e submetidos a aquecimento a 95°C em banho seco (Termobath ALB64 - Finemould Precision Ind., Co., Seoul, Coréia do Sul), por 5 minutos, para desnaturação protéica antes da aplicação no gel, utilizando sistema para mini-gel (Mighty Small Multiple Caster, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA).

A eletroforese foi realizada sob condições de corrente de 20mA por aproximadamente 50 minutos. Após a corrida os géis foram corados com Coomassie Blue (Coomassie brilliant blue R250, Sigma) e para descorar o gel utilizou-se uma solução descorante (Etanol 30%, Ácido Acético 10% e Água deionizada 60%). Todo o processo para corar e descorar o gel foi realizado sob agitação pendular lenta, à temperatura ambiente.

3.14 Detecção de rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ por Slot-blot

Para verificar a reatividade específica das proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ previamente produzida e purificada, foi realizada a técnica de Slot-blot. Inicialmente, foi realizada a sensibilização das fitas de nitrocelulose como se segue: (I) Der p 1 recombinante padrão (Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA, EUA) na concentração de

6.25 ng/slot; (II) extrato de Dp total (10 µg/slot); (III) soro albumina bovina (BSA, Sigma) (5 µg/slot); (IV) rDer p 1 (5 µg/slot) e (V) rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃. As fitas de nitrocelulose foram sensibilizadas (10 µl/slot) utilizando equipamento a vácuo (Bio-dot®SF, Bio-Rad, Hercules, California, EUA).

Após a secagem das membranas por uma hora à temperatura ambiente, as fitas foram bloqueadas com 800 µl de PBS acrescido de Tween 20 a 0.05% (PBS-T) e 5% de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) (PBS-T-M) por 2 horas à temperatura ambiente, seguido de três lavagens com PBS-T. As fitas foram incubadas por 18 horas a 4°C com 500 µl de anticorpo monoclonal de camundongo anti-Der p 1 (4C1) biotilado (Indoor Biotechnologies) diluído 1:500 em PBS-T em Molico a 1%, ou controle positivo e negativo de soro, diluído (1:2) em PBS-T-M. Um Segundo passo utilizando anti-IgE humana biotilada (Kierkegaard and Perry Lab., Gaithersburg, EUA) diluído 1:500 foi incluído para a incubação dos soros humanos.

Após lavagem com PBS-T, membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluído 1:500 em PBS-T-M 1% e reveladas com 10 mg de hidrocloreto 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) diluído em 15 ml de solução salina tamponada com Tris 20 mM (pH 7.4) e 12 µl de peróxido de hidrogênio. Agitação pendular lenta e constante foi utilizada durante toda a reação que foi interrompida com água destilada após a visualização das bandas.

3.15 Mensuração de IgE específica ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), a proteína nativa Der p 1 (nDer p 1) e as proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para a detecção de anticorpos IgE contra alérgenos de ácaros em amostras de soros dos pacientes, como anteriormente descrito (Queirós et al., 2008), com algumas modificações. Placas de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas (50µl/poço) com os extratos alergênicos de Dp Total (4 µg/poço) (FDA Allergenic) ou rDer p 1 (0.25 µg /poço) ou rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ (0.25 µg /poço) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas (150µl/poço) com PBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA, Sigma Chemical Co.) a 1% por uma hora à temperatura

ambiente. Após um novo ciclo de lavagens, as amostras de soros (50µl/poço) foram adicionadas em duplicata na diluição 1:2 em PBS-T-BSA 1% e incubadas por 2 horas a 37° C. Em paralelo, soros controles negativos foram incluídos em cada placa. Após um ciclo de seis lavagens, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgE humana biotilado (50µl/poço) (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EUA) diluído a 1:1000 em PBS-T-BSA 1% por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (50µl/poço) (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:500 em PBST-BSA 1%. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente e novas lavagens, as placas foram reveladas por meio da adição do substrato enzimático (50µl/poço) (ABTS a 0,01 M em tampão citrato-fosfato a 0,07 M, pH 4,2 contendo 0,03% de H₂O₂). Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de placas de microtitulação (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 405 nm. Os níveis de anticorpos IgE foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE), segundo a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / \text{cut off}$, onde *cut off* foi calculado como a média da DO de soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos para excluir valores de reatividade limítrofes próximos a valores de $IE = 1,0$.

Para detecção de níveis de IgE a proteína Der p 1 nativa, foi realizado um ELISA reverso (Queirós et al. 2008). Placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Der p 1 (clone 5H8; Indoor Biotechnologies) a 1.0 µg/poço e incubados subsequentemente com extrato total Dp, amostras de soros, anticorpo secundário biotilado, conjugado estreptavidina peroxidase e substrato enzimático como descrito acima para o ELISA convencional. Níveis de IgE para o alérgeno Der p 1 foram expressos em IE, como descrito acima.

3.16 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças entre os grupos em relação à idade foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney e relativas ao gênero pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). As diferenças observadas na positividade ao SPT, co-sensibilização e diagnóstico entre o grupo atópico, foram avaliados pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, quando apropriado. As diferenças no tamanho da pápula no grupo de atópicos foram avaliadas por ANOVA com o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. As

diferenças nos níveis específicos de IgE entre os grupos atópicos e não atópicos foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney e dentro de cada grupo pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn. As correlações entre os níveis de anticorpos IgE específicos a Dpt, nDer p 1, rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ foram analisadas pelo teste de correlação de Spearman. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.17 Biossegurança

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

4. RESULTADOS

4.1 Dados clínicos, demográficos e teste cutâneo dos pacientes

As características clínicas e demográficas dos 80 indivíduos que aceitaram participar do estudo e preencheram os critérios éticos e seletivos definidos em Material e Métodos (item 3.1) são mostradas na Tabela 1.

De acordo com o histórico clínico de sintomas de asma e/ou rinite e resultados do TCP ao extrato de alérgenos de ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*) os indivíduos foram distribuídos nos grupos atópico (A) e não atópico (NA). Observou-se através da realização do teste cutâneo que os ácaros Dp e Df foram os alérgenos mais prevalentes no grupo de sensibilização atópica, com positividade ao teste cutâneo e tamanho médio da pápula significativamente maiores em relação ao alérgeno Bt ($p < 0.0001$). Ademais, 97,5% dos pacientes atópicos foram co-sensibilizados a Dp e Df comparado com 70% de co-sensibilização a Bt ($p = 0.0005$).

O diagnóstico mais freqüente foi a rinite comparada com a asma sozinha ou asma associada à rinite ($p < 0.0001$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada para gênero e idade entre os grupos atópicos e não-atópicos.

4.2 Expressão e purificação da proteína recombinante Der p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃

A cinética de expressão da proteína recombinante Der p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ transformada em *E. coli* BL21 com o plasmídeo pET14b-Der p 1 e pET14b-Der p 1₁₇₂₋₂₄₃, a priori, foi avaliada através do teste de expressão em menor escala. Este foi realizado em diferentes tempos, variando do tempo zero a 18 horas com temperatura de 30°C e com rotação de 180 rpm. Após adicionar o promotor IPTG na concentração de 0,3 mM houve um aumento significativo da expressão da proteína rDer p 1 que apresentou peso aproximado de 26 kDa e da rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ com peso aproximado de 8kDa. Neste ensaio foi obtido um maior rendimento quando as bactérias transformadas foram cultivadas por 18 horas com indutor de expressão IPTG a 0,3 mM (Dados não mostrados).

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos pacientes incluídos no estudo.

Características	Grupos		Valor de <i>p</i>
	Atópico	Não atópico	
N	50	30	
Gênero			0.9513 ^a
Masculino	17	10	
Feminino	33	20	
Idade			
Mediana (intervalo)	24 (18-48)	25 (18-47)	0.4702 ^b
Positividade no TCP (%)			
Dp	100	0	
Df	97.5	0	
Bt	70*	0	< 0.0001 ^a
Tamanho da pápula (média ± DP, mm)			
Dp	8.9 ± 2.9	0	
Df	8.7 ± 3.2	0	
Bt	4.7 ± 3.3*	0	< 0.0001 ^c
Co-sensibilizações (%)			
Dp/Df	97.5	0	
Dp/Bt	70*	0	0.0005 ^a
Diagnóstico(n)			
A	1	0	
R	39*	0	< 0.0001 ^a
A+R	10	0	

^aTeste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado;

^bTeste de Mann-Whitney.

^cANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni;

*Diferenças significantes foram analisadas dentro do grupo atópico.

TCP, teste cutâneo de puntura; Dp, *Dermatophagoides pteronyssinus*; Df, *Dermatophagoides farinae*; Bt, *Blomia tropicalis*; A, asma; R, rinite.

A expressão de Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ em larga escala foi realizada com a colônia pré-selecionada no ensaio cinético em um volume total de 1L, com tempo de expressão de dezoito horas a 30°C e rotação de 180 rpm. A fração da amostra de Der p 1 induzida e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ foi analisada em gel SDS-PAGE 15%, sendo encontrado uma banda mais forte na fração induzida quando comparada comparada com a fração sem indução protéica com IPTG. O teste de solubilidade realizado para avaliar o melhor tampão a ser usado na purificação, demonstrou que a proteína recombinante Der p 1 encontra-se nos corpos de inclusão (sedimento), se portando como proteína insolúvel, sendo portanto necessário utilizar um tampão com alta molaridade de uréia para conseguir lisar a célula bacteriana e solubilizar a proteína no sobrenadante (Fig. 3).

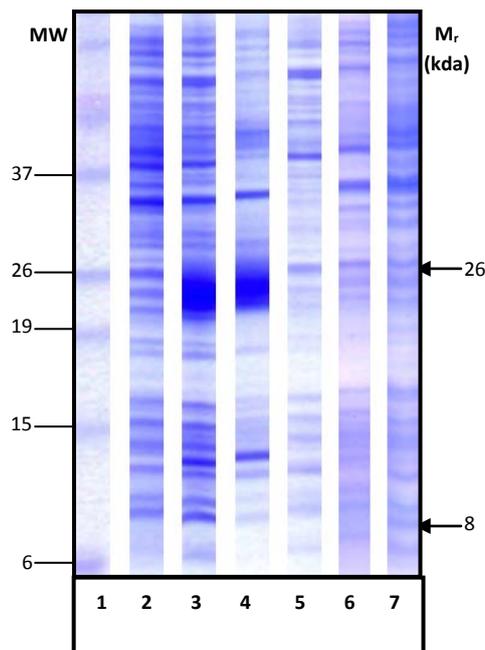


Figura 3. Expressão de rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃. *E. coli* BL21 (DE3) pLlysS foram transformadas com pET14b contendo os genes Der p 1/Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ e cultivadas por 18 horas com indutor de expressão (IPTG a 0,3 mM) a 30°C. Linha 1: Padrão de peso molecular. Linha 2: BL21 sem adição de IPTG. Linha 3: rDer p 1 em BL21 tratada com IPTG. Linha 4: pellet BL21 lisada com lisozima a 1 mg/mL, após centrifugação a 10.000 g. Linha 5: sobrenadante de BL21 lisada com lisozima a 1 mg/mL, após centrifugação a 10.000 g. Linha 6: BL21 sem adição de IPTG. Linha 7: rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ em BL21 tratada com IPTG.

As frações de rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ foram eluídas em coluna de Níquel com afinidade a Histidina utilizando o tampão de eluição (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl e 500mM Imidazol pH 7.4). As frações da proteína rDer p 1 foram encontradas nos tubos (2 a

9) e o seu maior pico (tubo 2) apresentou D. O máxima de 600 (Fig. 4A). Entretanto, a proteína rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ eluída nos tubos (2 a 8) apresentou D.O máxima de 450 e o seu maior pico também foi encontrado no tubo 2 (Fig. 4B). As frações obtidas de cada proteína foram misturadas (tubos de 2 a 9 e tubos de 2 a 8), concentradas e dialisadas.

A Dosagem protéica de rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ recombinante pelo método de Lowry demonstrou que a concentração da proteína rDer p 1 foi de 50 mg/L e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ 47 mg/L.

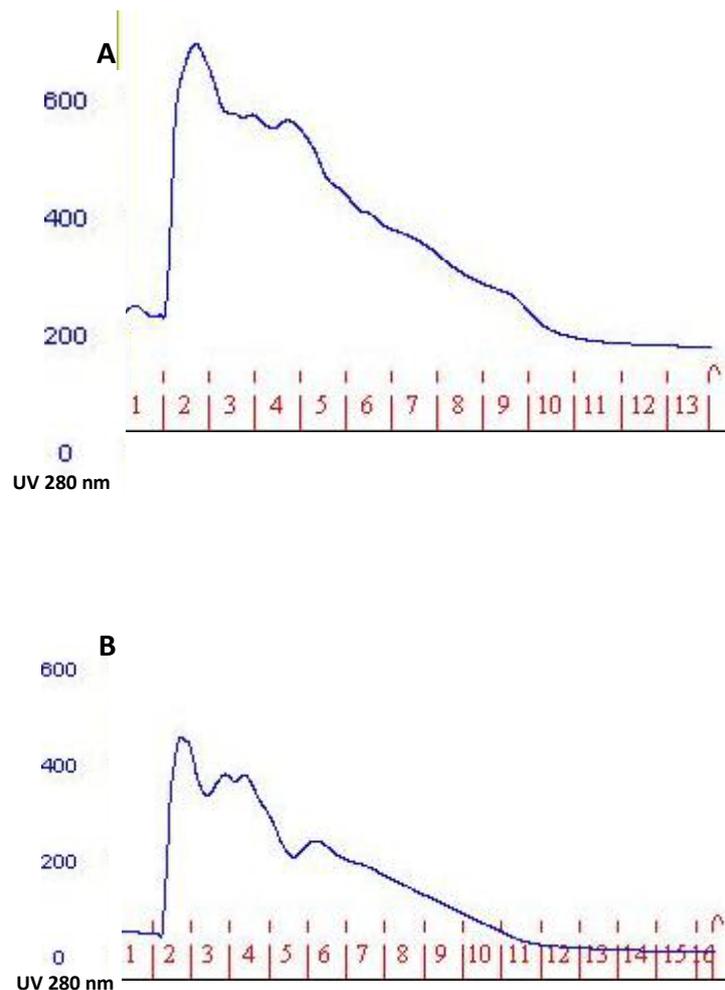


Figura 4. Perfil cromatográfico das proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ em coluna de afinidade a Histidina. (A) O pico representa eluição da fração ligante da proteína rDer p 1 (frações 2 a 9). (B) O pico representa eluição da fração ligante da proteína rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ (frações 2 a 8). Ambas as proteínas foram eluídas com tampão (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl e 500mM Imidazol pH 7.4).

4.3 Imunodeteção das proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃

Análise através de slot-blot confirmou a especificidade do anticorpo para rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ através da reatividade de IgE em soro de paciente alérgico (Fig. 5). Observou-se uma forte reatividade de IgE no soro controle positivo a ambas proteínas recombinantes, bem como ao extrato total de Dp, com uma fraca reação ao padrão rDer p 1 e nenhuma reatividade ao controle negativo (BSA). Controle negativo de soro humano demonstrou background, enquanto nenhuma reatividade foi encontrada na ausência de soro (somente diluente).

Quando o anticorpo anti-Der p 1 foi testado, uma forte reatividade foi notada ao extrato bruto de Dp comparado a uma fraca reatividade para rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ e ao padrão rDer p 1, enquanto nenhuma reatividade foi observada para a recombinante Der p 1 inteira

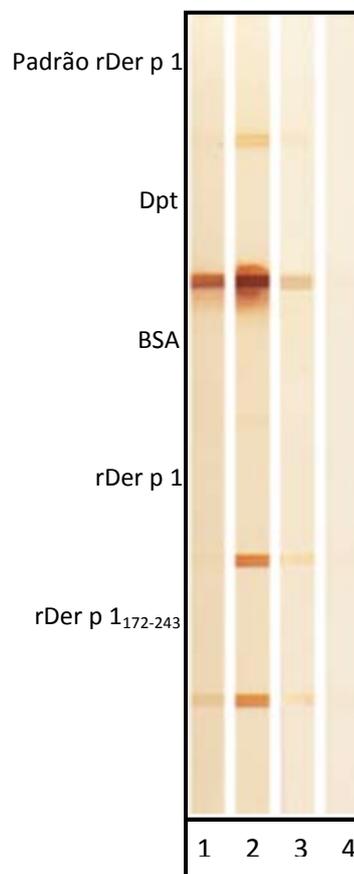


Figura 5. Slot-blot da proteína recombinante Der p 1 e epítomos ligantes de IgE relacionados a Der p 1. Membranas de nitrocelulose foram blotadas com rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ (5 µg). Como controle, padrão rDer p 1 (6.25ng), extrato total de Dp (10 µg) e BSA (5 µg) foram blotadas nas mesmas condições. Membranas foram testadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Der p 1 (linha 1), controle positivo de IgE de soro humano (linha 2), controle negativo de Ige de soro humano (linha 3), e somente diluente (linha 4). Após incubação com anticorpo secundário anti-IgE humano biotilado e estreptavidina-peroxidase, membranas foram reveladas com DAB.

4.4 Reatividade de IgE ao extrato total de Dpt, nDer p 1 nativo e as proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃

Ensaio quantitativo de IgE específica foram realizados por ELISA em soros de indivíduos atópicos e não-atópicos (Fig. 6). Como esperado, os níveis de IgE ao extrato total e a soropositividade foram significativamente maiores em indivíduos atópicos (mediana IE= 3,8; 100%) do que em indivíduos não-atópicos (mediana IE= 0,9; 0%) ($p < 0.0001$). A reatividade de IgE ao alérgeno nativo Der p 1 foi observada em 86% dos pacientes atópicos (mediana IE= 2,7) e quando comparada aos pacientes não atópicos (3,3%; mediana IE= 0,9) ($p < 0.0001$) foi significativamente maior. Em contrapartida, reatividade de IgE a proteína recombinante Der p 1 foi observada em níveis e taxas similares em indivíduos atópicos (mediana IE= 1,8; 88%) e não atópicos (mediana IE= 1,9; 87%), enquanto que a reatividade de IgE a rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ foi observada somente em atópicos (mediana IE = 1.6; 84%) ($p < 0.0001$).

A reatividade de IgE comparada as proteínas obtidas de *D. pteronyssinus* dentro do grupo atópico ao extrato bruto, demonstrou que os níveis séricos de IgE foi maior que das proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃, embora não tenha sido maior que a nDer p 1. Quando avaliada a soropositividade a Dpt no grupo de pacientes atópicos, encontramos que a porcentagem de indivíduos positivos foi maior do que para todas as proteínas Der p 1 ($p < 0.0001$). Ademais, os níveis de IgE a nDer p 1 foi maior do que para ambas recombinantes Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ ($p < 0.01$), embora não tenha sido encontrada nenhuma diferença significativa para soropositividade entre a proteína nativa e a recombinante de Der p 1.

No grupo não atópico, contudo, níveis de IgE e soropositividade a rDer p 1 foi maior do que para todas proteínas do ácaro ($p < 0.001$), enquanto rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ não demonstrou reatividade de IgE no grupo não atópico.

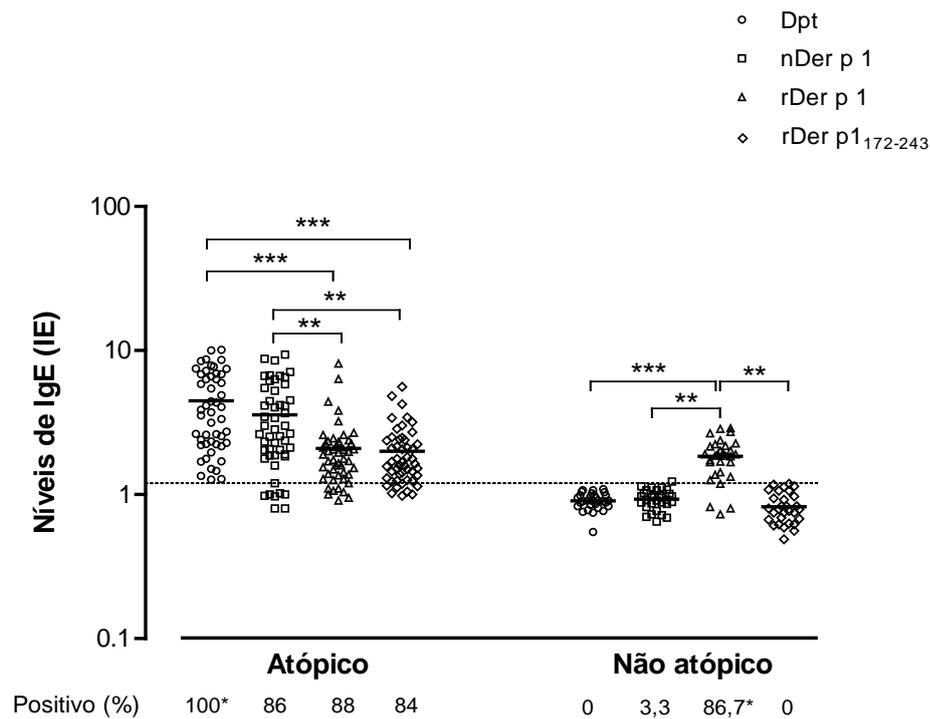


Figura 6. Níveis de anticorpos IgE ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), Der p 1 nativo (nDer p 1) e as proteínas recombinantes Der p 1 (rDer p 1) e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ expressos em Índice ELISA (IE) em soro de indivíduos atópicos (n= 50) e não atópicos (n = 30). A linha tracejada indica o valor do *cut off* (IE > 1.2) e as barras horizontais representam os valores médios. Porcentagem de amostras positivas de cada grupo também esta indicada. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

4.5 Correlação e associação entre os níveis de IgE ao extrato total de Dpt, nDer p 1 e as proteínas recombinantes Der p 1 e Der p 1₁₇₂₋₂₄₃

Correlações entre os níveis séricos de anticorpos IgE específicos a Dpt, nDer p 1, rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ foram analisadas somente no grupo de pacientes atópicos por meio do teste de correlação de Spearman (Figura 7).

Foi observada significativa correlação positiva entre os índices de IgE específica a Dpt e nDer p 1 ($r = 0,5497$; $p < 0,0001$) bem como entre os índices de IgE específica a rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ ($r = 0,6575$; $p < 0,0001$), representados nas Figuras 7A e 7F, respectivamente. Não houve correlação significativa entre os índices de IgE específicas a Dpt e rDer p 1, Dpt e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃, nDer p 1 e rDer p 1 e nDer p 1 quando correlacionado com rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃, representados nas Figuras 7B, 7C, 7D e 7E, respectivamente.

Associações entre as amostras IgE soropositivas e soronegativas para cada alérgeno foram também analisadas e observou-se uma frequência similar (84%) de pacientes duplo-positivos para Dpt/nDer p 1 (Fig. 7A), Dpt/rDer p 1 (Fig. 7B), e Dpt/rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ (Fig. 7C). Entretanto, a frequência observada de pacientes IgE positivos somente a Dpt e negativos aos outros alérgenos foi de 16%.

Os pacientes que apresentaram dupla positividade para nDer p 1/rDer p 1 foi de 70% (Fig. 7D). O mesmo valor foi encontrado para nDer p 1/rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ (Fig. 7E). Foi observada uma frequência similar de pacientes positivos somente a nDer p 1 (14%) bem como para as proteínas recombinantes rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ (14%). Quando a soropositividade foi analisada entre as proteínas recombinantes, foram encontradas 74% de amostras duplo-positivas, 6% de duplo-negativas e 10% positivas somente a uma das proteínas (Fig. 7F).

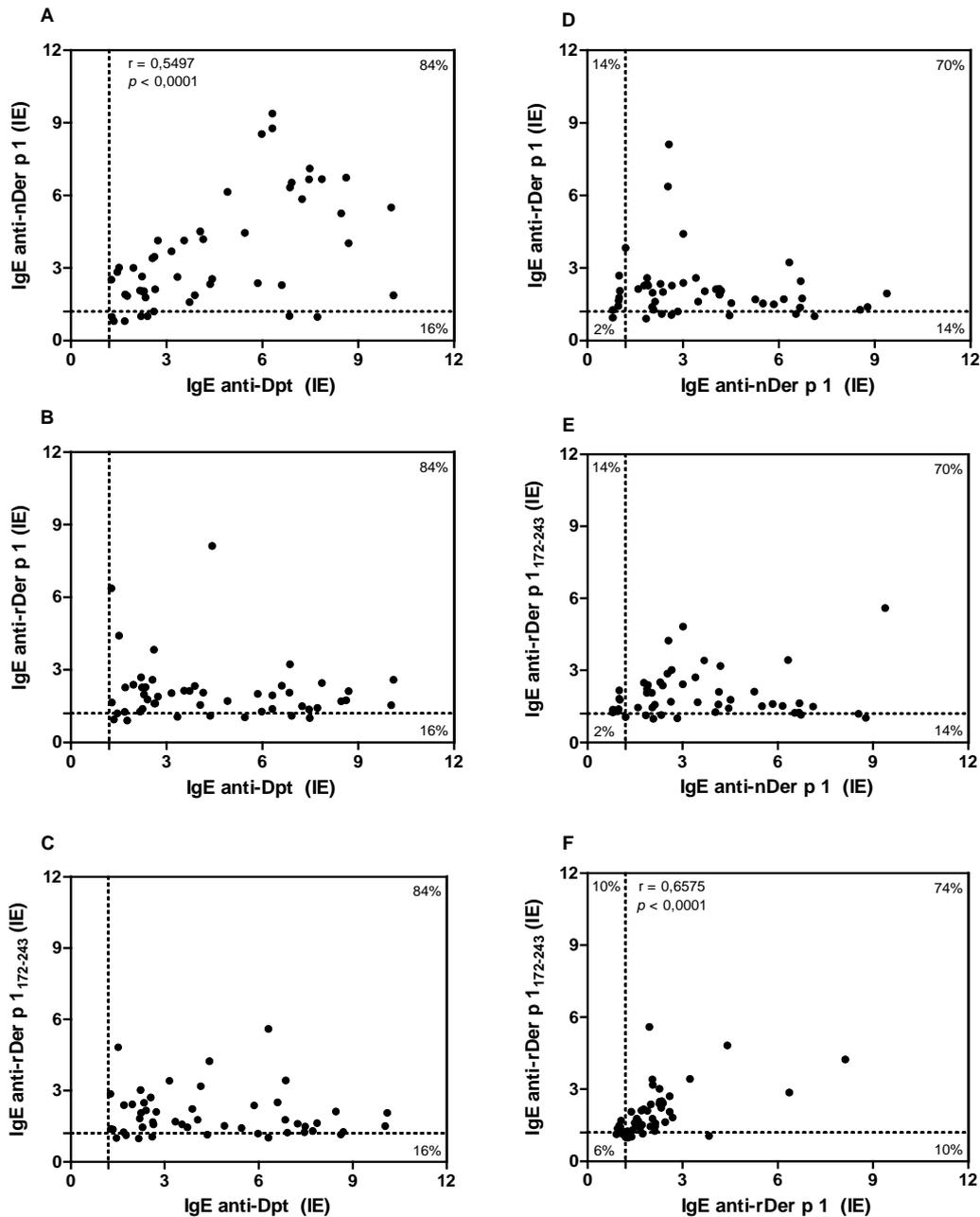


Figura 7. Correlação e associação entre os níveis de anticorpos IgE ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), Der p 1 nativo (nDer p 1) e as proteínas recombinantes Der p 1 (rDer p 1) e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃, expressos em Índice ELISA (IE), em soro de pacientes atópicos (n=50). As linhas tracejadas indicam o valor do *cut off* (IE > 1.2). As porcentagens de amostras duplo positivas, duplo negativas, e positivas somente para um dos alérgenos estão indicadas nos quadrantes correspondentes. O coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) também estão demonstrados.

DISCUSSÃO

No presente estudo, através de dados na literatura construímos um fragmento recombinante com os três principais epítomos ligantes de IgE (172-243) relacionados a proteína Der p 1 nativa, com potencial aplicação na avaliação da resposta imune humoral e celular em pacientes com alergias respiratórias. Foram realizados testes com o fragmento e com a proteína Der p 1 inteira, para avaliar a sua reatividade ao anticorpo IgE em soro de pacientes atópicos. Ambas as proteínas recombinantes produzidas estão relacionadas com Der p 1, o alérgeno imunodominante de *D. pteronyssinus*.

Para expressão das proteínas recombinantes utilizamos o sistema de expressão em organismo procarioto (*E. coli*) por ser uma alternativa simples, com baixo custo e quando comparada com a purificação da proteína nativa do extrato total, produz altos rendimentos. A grande importância da produção de proteínas recombinantes para uso em diagnóstico ou imunoterapia se deve ao grande aumento na prevalência de doenças alérgicas, as quais são ligadas a vários fatores como predisposição genética, influências ambientais, exposição aos alérgenos, dentre outros (TORRES-BORREGO; MOLINA-TERÁN; MONTES-MENDOZA, 2008).

Devido à grande dificuldade encontrada em se utilizar extratos totais para diagnóstico, este, por consistir em misturas complexas de componentes heterogêneos e muitas vezes por não conter os alérgenos relevantes, fez-se necessário a utilização da tecnologia de DNA recombinante que possibilita a produção de proteínas recombinantes de diferentes fontes, podendo apresentar características similares aos alérgenos nativos ou até possibilitar a construção de proteínas com propriedades modificadas, facilitando assim, a produção de fragmentos para uso em diagnóstico ou moléculas híbridas hipoalergênicas para o tratamento de alergias respiratórias (CHAPMAN et al. 2000; LIM et al., 2004).

Atualmente, há pelo menos 18 grupos de alérgenos de *D. pteronyssinus* já descritos. O principal alérgeno, Der p 1, com peso aproximado de 24 kDa, foi expresso e caracterizado com sucesso em sistemas de expressão em organismos eucariotos. Porém, o mesmo não ocorre em sistemas procariotos, devido à falha dos procariotos em não apresentarem modificações pós-traducionais (CHUA et al., 1992; SCOBIE et al., 1994). Thomas e colaboradores, em 1988, na tentativa de expressar a proteína Der p 1 em *E. coli*, detectaram uma proteína reativa para IgE produzida em coelhos, porém com deficiência na detecção de

soro de pacientes alérgicos, utilizando-se as técnicas de ELISA e dot-blot. Uma possível explicação, seria a conformação inadequada dos epítomos que ocorre durante a expressão em sistemas procariotos, o que leva a alterações ou mascaramento de epítomos ligantes de IgE com reconhecimentos prejudicados (Yi et al., 2004). Na tentativa de reparar esses danos, outros sistemas de expressão em organismos eucariotos vêm sendo requeridos e produzidos com sucesso, entre eles: insetos (células de *Drosophila*), animais (células de ovário de Hamster), *Pichia pastoris* e células de tabaco (GELLISSEN, 2000; JACQUET et al., 2000; MASSAER et al., 2001; JACQUET et al., 2002; VAN OORT et al., 2002; TAKAI et al., 2002; BURTIN et al., 2009).

Os estudos relacionados a alérgenos recombinantes, têm focado em comparações entre proteínas nativas, proteínas recombinantes e peptídeos derivados da molécula recombinante. Comparações entre proteínas recombinantes inteiras e fragmentos (peptídeos) têm demonstrado diferenças de reatividade para IgE, podendo ser encontradas porções tanto hiperquanto hipoalergênicas da molécula. Niederberger e colaboradores (2004) na tentativa de produzir peptídeos derivados de Bet v 1, o principal alérgeno de pólen de Bétula, para utilização em protocolos de vacinação, encontraram uma reatividade para IgE 100 vezes menor que da proteína inteira, portanto com a sua imunogenicidade preservada.

Como esperado, a expressão da proteína recombinante Der p 1 apresentou peso (26 kDa) ligeiramente maior que o predito, devido a presença da cauda de histidina que corresponde a 6 resíduos de aminoácidos. A expressão da fração induzida comparada a fração não induzida foi visivelmente maior, embora, tenham ocorrido perdas no rendimento ao longo do processo devido à localização da proteína nos corpos de inclusão, a qual apresentou dificuldades na re-solubilização. Porém, a expressão do fragmento foi realizada com sucesso, e a mesma, mesmo sendo produzida em organismo procarioto não apresentou problemas com a conformação, provavelmente por não conter os sítios de glicosilação necessários para a modificação pós-traducional.

A análise dos indivíduos atópicos e não atópicos selecionados em nosso estudo revelou predominância do gênero feminino em ambos os grupos, com representatividade de 66% no grupo A e de 57% no grupo NA. Um fator que pode estar envolvido nesta predominância de pacientes do gênero feminino poderia ser a percepção diferente dos sintomas em relação aos homens, o que leva a procura de atendimento clínico visando à melhora dos sintomas e conseqüentemente da qualidade de vida, muito afetada pela cronicidade da rinite e também da asma (BAQUEIRO et al., 2007).

A alta prevalência (97.5%) encontrada para sensibilização concomitante aos alérgenos de *D. pteronyssinus* e de *D. farinae* determinados por reatividade ao TCP no grupo A, confirma que os ácaros do gênero *Dermatophagoides* são importante fonte de alérgenos, os quais quando inalados se tornam o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias, particularmente rinite e asma, em indivíduos geneticamente predispostos. (BARNES; MARSH, 1998; PLATTS-MILLS; WHEATLEY; AALBERSE, 1998). Em nossos estudos anteriores realizados em outro grupo de pacientes, a maioria deles estavam sensibilizados aos alérgenos de Dpt (61.7%) e Df (59.9%), confirmando a importância desses ácaros como fonte de alérgenos. Entretanto, 80% dos pacientes tinham sintomas de rinite comparado com 43% de sintomáticos a asma, o que vai de acordo com nossos resultados, pois a maioria dos pacientes (78%) tinha sintomas de rinite (SOARES et al., 2007).

Para validar a proteína recombinante Der p 1 expressa e o seu fragmento, foram realizadas técnicas de Slot-blot utilizando anticorpo monoclonal anti-Der p 1 de camundongo e anticorpo policlonal de soro de paciente atópico, e, como controle negativo soro de paciente não atópico. A proteína recombinante Der p 1 foi evidenciada somente no ensaio utilizando anticorpo policlonal. Como a proteína Der p 1 é uma cisteína protease glicosilada, ela precisa que ocorra as modificações pós-traducionais necessárias para não obter uma conformação alterada da molécula, e assim levar ao mascaramento de epítomos ligantes de IgE que ocorre com a expressão em sistema procarioto (YI et al., 2004), esta poderia ser uma explicação para a não marcação no ensaio utilizando anticorpo monoclonal. Assim como encontrado no nosso trabalho, Bussières e colaboradores (2009), quando utilizaram anticorpo monoclonal anti-Der p 1, não conseguiram detectar a proteína recombinante Der p 1 produzida em *E. coli*. Entretanto em outro trabalho, Asturias e colaboradores (2009), conseguiram detectar a proteína Der p 1 no ensaio utilizando anticorpo monoclonal anti-Der p 1 quando utilizaram a proteína nativa purificada do extrato total, demonstrando que a glicosilação é requerida para tal reconhecimento. Ademais, o fragmento que contém os principais epítomos ligantes de IgE (aminoácidos 172-243), foi reconhecido e validado em ambos os ensaios, embora com marcação mais forte quando utilizado o anticorpo policlonal.

Para avaliar a reatividade de IgE ao alérgeno Der p 1 em nossos pacientes, realizamos o ELISA indireto para detecção de IgE a proteína recombinante Der p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃. Para comparar a resposta da reatividade de IgE das proteínas recombinantes de Der p 1, foi também realizado um ELISA reverso para capturar a proteína Der p 1 nativa do extrato total. O ensaio imunoenzimático tem sido adotado como uma das principais técnicas *in vitro* no

diagnóstico de alergias, de forma complementar ao TCP. No presente estudo, encontramos reatividade de IgE sérica para o extrato total de *D. pteronyssinus* através de ELISA indireto em 100% dos pacientes atópicos com testes cutâneos positivos ao extrato total. Estes dados reforçam que proteínas presentes nos ácaros da poeira domiciliar estimulam respostas imunes mediadas por IgE quando pacientes alérgicos inalam os antígenos presentes.

Apesar do sucesso em expressar a proteína inteira, sua reatividade a IgE foi inespecífica quando comparada a proteína nativa, pois pacientes não atópicos reconheceram a molécula. O mesmo não aconteceu com o fragmento, que foi bem expresso no sistema procarioto e, quando testado sua reatividade a IgE demonstrou soropositividade comparada a proteína nativa. Outros alérgenos importantes na reatividade de IgE em soro de pacientes alérgicos encontrados no extrato total de Dp não decorrem do mesmo problema, pois são bem expressos em *E. coli*. Entre eles estão os alérgenos Der p 2, Der p 5, Der p 7 e Der p 10, com reatividade a IgE de 70, 60, 52 e 15.2%, respectivamente. (LYNCH et al., 1997; RESCH et al., 2011).

Uma pesquisa recente demonstrou por meio da comparação de diferentes extratos de *D. pteronyssinus* que a mistura dos grupos de alérgenos 1, 2, 5, 7, 8 e 10 se ligam em média a 76% de IgE específica a *D. pteronyssinus* (BRUNETTO et al., 2009). Porém, um teste diagnóstico consistindo somente do alérgeno Der p 1 na avaliação da sensibilização de pacientes alérgicos, confirmou que 70-80% dos mesmos possuem anticorpos IgE específicos ao alérgeno Der p 1 (CHAPMAN et al., 1983; DE HALLEUX et al., 2006). Em outro estudo, Pittner e colaboradores (2004), constataram que 91% de um total de 78 pacientes possuíam reatividade de IgE específico ao alérgeno Der p 1, mostrando que esse alérgeno é importante para o diagnóstico de alergia ao ácaro *D. pteronyssinus*, pois abrange muitos pacientes. Já, Iraola e colaboradores (2010) relataram que 81% dos pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* eram sensibilizados a Der p 1, o que vai de encontro com os nossos resultados, pois, quando capturamos a proteína nativa do extrato total, evidenciamos que aproximadamente 86% dos pacientes eram positivos a Der p 1.

Na tentativa de produzir uma única molécula com os dois principais alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2), Asturias e colaboradores (2009) produziram duas moléculas híbridas em sistema procarioto contendo Der p 1 na forma madura combinada com formas truncadas de Der p 2, com os epítomos de IgE mascarados para utilização em imunoterapia, o que resultou numa molécula com imunogenicidade preservada, portanto eficaz para uso em tratamento de doenças alérgicas. Já Bussièrre e colaboradores (2009), produziram quatro moléculas fundidas com quebra dos epítomos de IgE relacionadas com os

dois principais alérgenos de *D. pteronyssinus*, mas não conseguiram alcançar os mesmos resultados, pois essas moléculas mesmo apresentando propriedades antigênicas, devido a instabilidade encontrada, não poderiam ser usadas nem para imunoterapia, nem para diagnóstico em pacientes alérgicos.

As significativas correlações e associações encontradas entre Dpt, nDer p 1, rDer p 1 e rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ demonstram uma correlação significativa entre Dpt e nDer p 1, indicando que o nível de sensibilização para o extrato total de *D. pteronyssinus* é proporcional ao nível da proteína Der p 1 nativa. Porém, o mesmo não ocorre quando comparado com as proteínas recombinantes. Uma possível justificativa seria que o ELISA reverso para detectar a proteína Der p 1 nativa é muito mais sensível do que o indireto para detectar as recombinantes, por isso os níveis de IgE anti-rDer p 1 e anti-rDer p 1₁₇₂₋₂₄₃ foram menores daqueles encontrados quando utilizado o ELISA para capturar a proteína nativa. Em um trabalho do nosso grupo, Silva e colaboradores (2001), demonstraram justamente que o ELISA reverso era mais sensível que o indireto quando comparado para a proteína Der p 2. Ademais, as associações de amostras soropositivas entre os alérgenos analisados mostraram resultados similares, indicando que as proteínas recombinantes de Der p 1 produzidas foram capazes de reagir com IgE de pacientes atópicos na mesma proporção. Além disso, o fragmento produzido se mostrou uma molécula imunologicamente ativa para reconhecer IgE dos pacientes atópicos da mesma forma que a proteína rDer p 1 total, com a vantagem de não ter reações inespecíficas com soro de pacientes não atópicos.

Neste trabalho foram realizadas avaliações na resposta ao anticorpo IgE, porém em trabalhos adicionais esse fragmento poderá ser utilizado para avaliação da resposta frente a IgG1 e IgG4, que juntamente com avaliação de citocinas e proliferação celular permite o acompanhamento de pacientes sob imunoterapia. Portanto, futuramente serão realizados experimentos com o fragmento obtido para estimulação em cultura de PBMCs para avaliar o perfil de resposta imune celular, citocinas, e proliferação celular após estimulação das mesmas com esta proteína.

6. CONCLUSÕES

- As proteínas estudadas neste trabalho, assim como vários alérgenos do ácaro *D. pteronyssinus* foram capazes de detectar a produção de anticorpos IgE específicos em pacientes atópicos.
- A proteína recombinante Der p 1 apesar de ter tido uma alta expressão em *E. coli*, não foi detectada pelo anticorpo monoclonal anti-Der p 1 e apresentou inespecificidade no soro de pacientes não atópicos, provavelmente devido a conformação alterada da proteína quando produzida em sistema procarioto.
- A proteína recombinante Der p 1₁₇₂₋₂₄₃ por ser reconhecida pelos anticorpos monoclonal/policlonal e apresentar soropositividade similar ao alérgeno Der p 1 nativo é uma potencial candidata para aplicação na avaliação da resposta imune humoral e celular em pacientes com alergias respiratórias.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, p. 432-452, 2003.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6 ed. Philadelphia, USA: Saunders, 2008. 562 p.

AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanism of allergen-specific immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 780-9, 2007.

ALLERGEN NOMENCLATURE. Disponível em: <<http://www.allergen.org/allergen.aspx>>. Acesso em 02 dez. 2010.

ALLERGOME. Disponível em: <http://www.allergome.org/script/search_step2.php>. Acesso em 02 dez. 2010.

ANDRADE, A. D.; BARTAL, M.; BIRNBAUM, J.; LANTEAUME, A.; CHARPIN, D.; VERVLOET, D. House dust mite allergen content in two areas large differences in relative humidity. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 74, p. 314-316, 1995.

ARLIAN, L. G.; BERNSTEIN, I. L.; GEIS, D. P.; VYSZENSKI-MOHER, D. L.; GALLAGHER, J. S.; MARTIN, B. Investigations of culture medium-free house dust mites. III. Antigens and allergens of body and fecal extract of *Dermatophagoides farinae*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 79, n. 3, p.457-66, 1987.

ARLIAN, L. G., RAPP, C. M.; AHMED, S. G. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 6, p. 1035-1040, 1990.

ARLIAN, L.G.; BERNSTEIN, D.; BERNSTEIN, I.L.; FRIEDMAN, S.; GRANT, A.; LIEBERMAN, P.; LOPEZ, M.; METZGER, J.; PLATTS-MILLS, T.; SCHATZ, M.; SPECTOR, S.; WASSERMAN, S.I.; ZEIGER, R.S. Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 90, p. 292-300, 1992.

ARLIAN, L. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, p. s406–s413, 2001. Supplement 3.

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S.; NEAL, J. S. Dust mite allergens: ecology and distribution. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 2, p. 401-411, 2002.

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S. Biology, ecology, and prevalence of dust mites. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 443– 468, 2003.

ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; NASPITZ, C. K. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 21, n. 4, p. 433-439, 1991.

ASTURIAS JA, IBARROLA I, ARILLA MC, VIDAL C, FERRER A, GAMBOA PM, VIÑUELA JE, SANZ ML, ANDREU C, MARTÍNEZ A. Engineering of major house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2 for allergen-specific immunotherapy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 39, n. 7, p. 1088-98, 2009.

AZEVEDO, O. M.; FELIPE, S.S.M.; BRIGIDO, M.M.; MARANHÃO, Q.A. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**, 1 ed. Brasília, BR: Editora Universidade de Brasília, 2003. 129p.

BAQUEIRO, T.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; CARVALHO, F. M.; SANTOS, N. M.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M. Asthma and rhinitis symptoms in individuals from different socioeconomic levels in a Brazilian city. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 28, n. 3, p. 362-367, 2007.

BARNES, K. C.; MARSH, D. G. The genetics and complexity of allergy and asthma. **Immunology today**, v. 19, n. 7, p. 325-332, 1998.

BEST, E.A.; STEDMAN, K.E.; BOZIC, C.M.; HUNTER, S.W.; VAILES, L.; CHAPMAN, M.D.; McCALL, C.A.; McDERMOTT, M.J. A Recombinant group 1 house dust mite allergen, rDer f 1, with biological activities similar to those of the native allergen. **Protein Expression and Purification**, v. 20, p. 462–471, 2000.

BERNSTEIN, I. L.; STORMS, W. W. PRACTICE PARAMETERS FOR ALLERGY DIAGNOSTIC TESTING. Joint task force on practice parameters for the diagnosis and treatment of asthma. The American College of Allergy, Asthma and Immunology. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 75, n. 6, p. 543-625, 1995.

BOQUETE, M.; IRAOLA, V.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; ARENAS VILLAROEL, L.; CARBALLADA, F. J.; GONZÁLEZ DE LA CUESTA, C.; LÓPEZ-RICO, M. R.; NÚÑEZ ORJALES, R.; PARRA, G. A.; SOTO-MERA, M. T.; VARELA, S.; VIDAL, C. House dust mite species and allergen levels in Galicia, Spain: a cross-sectional, multicenter, comparative study. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 16, p. 169-76, 2006.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, p. 147-334, 2001.

BREASLEY, R.; CRANE, J.; LAI, C. K.; PEARCE, N. Prevalence and etiology of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, p. 466-72, 2000.

BRUNETTO, B.; TINGHINO, R.; BRASCHI, M. C.; ANTONICELLI, L.; PINI, C.; IACOVACCI, P. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. **Allergy**, v. 65, n. 2, p. 184-90, 2009.

BURTIN, D.; CHABRE, H.; OLAGNIER, B.; DIDIERLAURENT, A.; COURET, M.; COMEAU, D.; WAMBRE, E.; LAPARRA, H.; VAN OVERTVELT, L.; MONTANDON, F.; BATARD, T.; JONVAL, V.; LORPHELIN, A.; MERLE, C.; BERROUET, C.; PARRY, L.; GOMORD, V.; VAN REE, R.; MOINGEON, P. Production of native and modified recombinant Der p 1 molecules in tobacco plants. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 39, p. 760-770, 2009.

BUSSIÈRES, L.; BORDAS-LE FLOCH, V.; BULDER, I.; CHABRE, H.; NONY, E.; LAUTRETTE, A.; BERROUET, C.; NGUEFEU, Y.; HORIOT, S.; BARON-BODO, V.; VAN OVERTVELT, L.; DE CONTI, A. M.; SCHLEGEL, A.; MAGUET, N.; MOUZ, N.; LEMOINE, P.; BATARD, T.; MOINGEON, P. Recombinant fusion proteins assembling Der p 1 and Der p 2 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus*. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 153, n. 2, p. 141-51, 2010.

CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. E. Purification and characterization of the major allergen from *D. pteronyssinus*-antigen PI. **Journal of Immunology**, v. 125, n. 2, p. 587-592, 1980.

CHAPMAN, M.D.; ROWNTREE, S.; MITCHELL, E.B.; DI PRISCO DE FUENMAJOR, M.C.; PLATTS-MILLS, T.A. Quantitative assessments of IgG and IgE antibodies to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, p. 27–33, 1983.

CHAPMAN, M.D.; SMITH, A.M.; VAILES, L.D.; ARRUDA, K.L.; DHANARAJ, V.; POMES, A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 409-418, 2000.

CHUA, K. Y.; KEHAL, P. K.; THOMAS, W. R.; VAUGHAN, P. R.; MACREADIE, I. G. High-frequency binding of IgE to the Der p allergen expressed in yeast. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 89, p. 95–102, 1992.

COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, London, v. 402, p. 5-11, 1999.

CRAMERI, R. Correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. **Biochemical Journal**, v. 376, 1, e1–e2, 2003.

CROMWELL, O. Biochemistry of allergens. In: KAY, A. B. **Allergy and Allergic Diseases**, Oxford, 1. ed., v. 2, p. 797-810, 1997.

CUI, Y.; CAI, H.; LI, L.; ZHOU, Y.; GAO, C.; SHI, W.; YU, M. Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of the group 3 allergen of *Dermatophagoides farinae*. **Chinese Medical Journal**, v. 112, p. 2657-2661, 2009.

DABERT, M.; WITALINSKI, W.; KAZMIERSKI, A.; OLSZANOWSKI, Z.; DABERT, J. Molecular phylogeny of acariform mites (Acari, Arachnida): Strong conflict between phylogenetic signal and long-branch attraction artifacts. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. xx, p. xx-xx, 2010.

DE BOER, R. Reflections on the control of mites and mite allergens. **Allergy**, v. 53, 41-46, 1998. Supplement 48.

DE HALLEUX, S.; STURA, E.; VANDERELST, L.; CARLIER, V.; JACQUEMIN, M.; SAINT-REMY, J. M. Three-dimensional structure and IgE-binding properties of mature fully active Der p 1, a clinically relevant major allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. 571-6, 2006.

DREBORSG, Ed. Skin tests used in type I allergy testing. Position Paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*, v. 1-59, 1989. Supplement 10.

EPTON, M. J.; SMITH, W.; HALES, B. J.; HAZELL, L.; THOMPSON, P. J.; THOMAS W. R. Non-allergenic antigen in allergic sensitization: responses to the mite ferritin heavy chain antigen by allergic and non-allergic subjects. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, n. 9, p. 1341-1347, 2002.

FÖTISCH, K.; VIETHS, S. N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, p. 373–390, 2001.

GALLI, S. J.; LANTZ, C. S. Allergy. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1999. p. 1127-1174.

GAO, Y.F; WANG, D.Y.; ONG, T.C.; TAY, S.L.; YAP, K.H.; CHEW, F.T. Identification and characterization of a novel allergen from *Blomia tropicalis*: Blo t 21. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, p. 105-112, 2007.

GAUGRIS, S.; SAZONOV-KOCEVAR, V.; THOMAS, M. Burden of concomitant allergic rhinitis in adults with asthma. **Journal of Asthma**, v. 43, p. 1-7, 2006.

GELBER, L. E.; SELTZER, L. H.; BOUZOUKIS, J. K.; POLLART, S. M.; CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. Sensitization and exposure to indoor allergens as risk factors for asthma among patients presenting to hospital. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 147, p. 573-578, 1993.

GELLINSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 741-750, 2000.

GENBANK. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 05 Fev. 2009.

GENSCRIPT. Disponível em: <<http://www.genscript.com>>. Acesso em 25 Maio 2009.

GREENE, W. K.; THOMAS, W. R. IgE binding structures of the major house dust mite allergen Der p I. **Molecular Immunology**, v. 29, p. 257–62, 1992.

HALLAS, T. E. The biology of mites. **Allergy**, v. 46, p. 6-9, 1991. Supplement 11.

HART, B. J. Life cycle and reproduction of house-dust mites: environmental factors influencing mite populations. **Allergy**, v. 53, p. 13-7, 1998. Supplement 48.

HEISS, S.; MAHLER, V.; STEINER, R.; SPITZAUER, S.; SCHWEIGER, C.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Component-resolved diagnosis (CRD) of type I allergy with recombinant grass and tree pollen allergens by skin testing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, p. 830-837, 1999.

HEWITT, C.R.A.; BROWN, A.P.; HART, B.J.; PRITCHARD, D.I.; A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: Innate protection by antiproteases. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p. 1537-1544, 1995.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 218-230, 2008.

HUBY, R. D. J.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Why are some proteins allergens? **Toxicological Sciences**, v. 55, n. 2, p. 235, 246, 2000.

ICHIKAWA, S.; TAKAI, T.; INOUE, T.; YUUKI, T.; OKUMURA, Y.; OGURA, K.; INAGAKI, F.; HATANAKA, H. NMR study on the major mite allergen Der f 2: Its refined tertiary structure, epitopes for monoclonal antibodies and characteristics shared by ML protein group members. **Journal of Biochemistry**, v. 137, p. 255-263, 2005.

IRAOLA, V.; BOQUETE, M.; PINTO, H.; CARBALLADA, F.; CARBALLÁS, C.; CARNÉS, J. Pattern of Sensitization to Major Allergens Der p 1 and Der p 2 in Mite-Sensitized Individuals from Galicia, Spain. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 20, p. 270-2, 2010.

ISAAC. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. **Lancet**, v. 351, n. 9111, p. 1225-1323, 1998.

JACQUET, A.; HAUMONT, M.; MASSAER, M.; DAMINET, V.; GARCIA, L.; MAZZU, P.; JACOBS, P.; BOLLEN, A. Biochemical and immunological characterization of a recombinant precursor form of the house dust mite allergen Der p 1 produced by *Drosophila* cells. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 677-84, 2000.

JACQUET, A.; MAGI, M.; PETRY, H.; BOLLEN, A. High-level expression of recombinant house dust mite allergen Der p 1 in *Pichia pastoris*. **Clinical and Experimental Allergy**, v.32, p. 1048-53, 2002.

JEANNIN P, DELNESTE Y, BUISINE E, LE MAO J, DIDIERLAURENT A, STEWART GA, TARTAR A, TONNEL AB, PESTEL J. Immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides derived from the mite allergen, Der pI. **Molecular Immunology**, v. 30, p. 1511, 1993.

JEANNIN, P.; DIDIERLAURENT. A.; GRAS-MASSE, H.; ELASS, A. A.; DELNESTE, Y.; CARDOT, E.; JOSEPH, M.; TARTAR, A.; VERGOTEN, G.; PESTEL, J. Specific histamine release capacity of peptides selected from the modeled Der p I protein, a major allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Molecular Immunology**, v. 29, p. 739-749, 1992.

JEFFERY, P. K.; HAAHTELA, T. Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one airway condition. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 6, p. 55, 2006. Supplement 1.

JOHANSSON, S. G.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S.; LANIER, B. Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; ORTEGA-MARTELL, J. A.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; RING, J.; THIEN, F.; VAN CAUWENBERGE, P.; WILLIAMS, H. C. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 113, n. 5, p. 832-836, 2004.

JOHANNESSEN, B.R.; SKOV, L.K.; KASTRUP, J.S.; KRISTENSEN, O.; BOLWIG, C.; LARSEN, J.N.; SPANGFORT, M.; LUND, K.; GAJHEDE, M. Structure of the house dust mite allergen Der f 2: Implications for function and molecular basis of IgE cross-reactivity. **FEBS Letters**, v. 579, p. 1208-1212, 2005.

KING, T.P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D.G.; PLATTS-MILLS, T.A. E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. **Allergy**, Copenhagen, v. 50, n. 9, p. 765-774, 1995.

KOYANAGI, S.; MURAKAMI, T.; MAEDA, T.; KAWASTER, K.; OKAMURA, H.; ODA, Y.; MIYATSER, Y.; SUGAWARA, K.; MIZOKAMI, H. Production scale purification of the recombinant major house dust mite allergen Der f 2 mutant C8/119S. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, p. 597-601, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAVER, W. G.; AIR, G. M.; WEBSTER, R. G.; SMITH-GILL, S. J. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. **Cell**, v. 61, n. 4, p. 553-556, 1990.

LARSEN, J. N.; LOWERSTEIN, H. Allergen nomenclature. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, p. 577-718, 1996.

LEE, C. S.; TSAI, L. C.; CHAO, P. L.; LIN, C. Y.; HUNG, M. W.; CHIEN, A. I.; CHIANG, Y. T.; HAN, S. H. Protein sequence analysis of a novel 103-kDa Dermatophagoides pteronyssinus mite allergen and prevalence of serum immunoglobulin E reactivity to rDer p 11 in allergic adult patients. **Clinical and Experimental Allergy**; v. 34, n. 3, p. 354-362, 2004.

LEMANSKE-JUNIOR, R.F.; BUSSE, W.W. Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. s502-519, 2003. Supplement 2.

LINNEBERG, A.; HENRIK NIELSEN, N.; FROLUND, L.; MADSEN, F.; DIRKSEN, A.; JORGENSEN, T. The link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population-based study.: The Copenhagen Allergy Study. **Allergy**, v. 57, p. 1048-1052, 2002.

LIM, L.H.; LI, H.Y.; CHEONG, N.; LEE, B.W.; CHUA, K.Y. High-level expression of a codon optimized recombinant dust mite allergen, Blo t 5, in Chinese hamster ovary cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 991-996, 2004.

LYNCH, N. R.; THOMAS, W. R.; GARCIA, N. M.; DI PRISCO, M. C.; PUCCIO, F. A.; L'OPEZ, R. I.; HAZELL, L. A.; SHEN, H. D.; LIN, K. L.; CHUA, K. Y. Biological activity of recombinant Der p 2, Der p 5 and Der p 7 allergens of the house-dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, n. 1, p. 59-67, 1997.

LORENZ, A. R.; LÜTTKOPF, D.; MAY, S.; SCHEURER, S.; VIETHS, S. The principle of homologous groups in regulatory affairs of allergen products-a proposal. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 148, n. 1, p. 1-17, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, n. 1, p. 265-275, Jan. 1951.

MARONE, G. Asthma: recent advances. **Immunology today**, v. 19, n. 1, p. 5-9, 1998.

MASSAER, M.; MAZZU, P.; HAUMONT, M.; MAGI, M.; DAMINET, V.; BOLLEN, A.; JACQUET, A. High-level expression in mammalian cells of recombinant house dust mite allergen ProDer p 1 with optimized codon usage. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 125, p. 32-43, 2001.

MASTRANDREA, F.; SERIO, G.; MINARDI, A.; CORADDUZZA, G.; ROSSI, N.; SCARCIA, G.; MAIETTA, G.; IACOBELLI, A.; LAMANNA, C.; TURSI, A. IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy. **Allergy**, v. 52, n. 11, p. 1115-1119, 1997.

McHUGH, R. S.; SHEVACH, E. M. The role of suppressor T cells in regulations of immune responses. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 110, n. 5, p. 693-702, 2002.

MEILER, F.; KLUNKER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. **Allergy**, v. 63, n. 11, p. 1455-1463, 2008.

MENZ, G.; DOLECEK, C.; SCHÖNHEIT-KENN, U.; FERREIRA, F.; MOSER, M.; SCHNEIDER, T.; ET AL. Serological and skin-test diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 26, p. 50-60, 1996.

MEYER, P.; COMINH, H. B.; DEMOLY, P. Nomenclature révisée des termes d'allergologie. **Archives de pédiatre**, v. 11, p. 1131-1134, 2004.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação..** 1ª edição, ed. EDUFU, 2005, 273p.

MOSMANN TR, BOND MW, COFFMAN RL, OHARA J, PAUL WE. T-cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 15, p. 5654-8, 1986.

MUNIR, A. K.; BJÖRKSTÉN, B.; EINARSSON, R.; EKSTRAND-TOBIN, A.; MÖLLER, C.; WARNER, A.; KJELLMAN, N. I. Mite allergens in relation to home conditions and sensitization of asthmatic children from three climatic regions. **Allergy**, v. 50, p. 55-64, 1995.

MURPHY KM, STOCKINGER B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. **Nature Immunology**, v. 11, n. 8, p. 674-80, 2010.

MYGIND, N. Alergia - Um texto Ilustrado. 1ª. Rio de Janeiro: **Revinter**, 1993. 481 p.

NANDAKUMAR, S.; MILLER, C. W.; KUMARAGURU, U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. **Clinical Molecular Allergy**, v. 12, p. 7-5, 2009.

NIEDERBERGER, V.; HORAK, F.; VRTALA, S.; SPITZAUER, S.; KRAUTH, M-T.; VALENT, P.; REISINGER, J.; PELZMANN, M.; HAYEK, B.; KRONQVIST, M.; GAFVELIN, G.; GRONLUND, H.; PUROHIT, A.; SUCK, R.; FIEBIG, H.; CROMWELL, O.; PAULI, G.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; VALENTA, R. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 101, p. 14677-14682, 2004.

O'NEIL, S. E.; HEINRICH, T. K.; HALES, B. J.; HAZELL, L. A.; HOLT, D. C.; FISCHER, K.; THOMAS, W. R. The chitinase allergens Der p 15 and Der p 18 from *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, n. 6, p. 831-839, 2006.

OPPENHEIMER, J.; NELSON, Skin Testing. **Annals of Allergy and Asthma and Immunology**, McLean, v. 96, n. 1, p. 6-12, Feb. 2006.

OWNBY, D. R. Allergy testing: in vitro versus in vivo. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 35, n. 5, p. 995-1009, 1988.

PLATTS-MILLS, T. A. Indoor Allergens. In: ADKINSON, N. F. JR., YUNGINGER, J. W.; BUSSE, W. W.; BOCHNER, B. S.; HOLGATE, S. T.; SIMONS, F. E. R. Ed. **Allergy Principles and Practice**. New York: Mosby; 2003. p. 465-78.

PLATTS-MILLS, T.A.; CHAPMAN, M.D. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 80, p. 755-775, 1987.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; SOLOMON, W. R. Aerobiology and inhalant allergens. In: MIDDLETON, E. Jr.; REED, C. E.; ELLIS, E. F.; ADKINSON, N. F. Jr.; YUNGINGER, J. W.; BUSSE, W. W. **Allergy: principles and practice**, 4. ed. St. Louis: Mosby-Year Book, p.469-528, 1993.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; VERVLOET, D.; CHAPMAN, M. D. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 89, n. 5, p. 1046-1060, 1992.

PLATTS-MILLS, T. A.; VAUGHAN, J. W.; BLUMENTHAL, K.; WOODFOLK, J. A.; SPORIK, R. B. Decreased prevalence of asthma among children with high exposure to cat allergen: relevance of the modified Th2 response. **Mediators of Inflammation**, v. 10, p. 288-91, 2001.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; CHAPMAN, M. D. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, n. 6, p.s2-s24, 1997.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; WECK, A. L. Dust mite allergens and asthma - A worldwide problem. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 83, n. 2, p. 416-427, 1989.

PLATTS-MILLS, T. A.; WHEATLEY, L. M.; AALBERSE, R. C. Indoor versus outdoor allergens in allergic respiratory disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, n. 6, p. 634-639, 1998.

PIKE, A. J.; CUNNINGHAM, M. J.; LESTER, P. J. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) at constant and simultaneously fluctuating temperature and humidity conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 266-269, 2005.

PITTNER, G.; VRTALA, S.; THOMAS, W. R.; WEGHOFER, M.; KUNDI, M.; HORAK, F.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, n. 4, p. 597-603, 2004.

POPE, A.M.; PATTERSON, R.; BURGE, H. **Indoor Allergens. Assessing and controlling adverse health effects**. Washington, DC: National Academy Press, 1993.

PRUSSIN, C.; YIN, Y.; UPADHYAYA, B. T(H)2 heterogeneity: Does function follow form? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.126, n. 6, p. 1094-8, 2010.

PUBMED. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 02 maio 2009.

QUEIRÓS, M. G. J.; SILVA, D. A. O.; ALVES, R.; CHIBA, H. F.; AMARAL, V. B. S.; ALMEIDA, K .C.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SOPELETE, M. C.; SILVA SEGUNDO, G. R.; MOREIRA, P. F. S.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite-specific immunotherapy using allergen and/or bacterial extracts in atopic patients in Brazil. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 18, p. 84-92, 2008.

RESCH, Y.; WEGHOFER, M.; SEIBERLER, S.; HORAK, F.; SCHEIBLHOFER, S.; LINHART, B.; SWOBODA, I.; THOMAS, W. R.; THALHAMER, J.; VALENTA, R.; VRTALA, S. Molecular characterization of Der p 10: a diagnostic marker for broad sensitization in house dust mite allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 10, p. 1365-2222, 2011.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6.ed., São Paulo: Manole, 2002. 500 p.

SCOBIE, G.; RAVINDRAN, V.; DEAM, S. M.; THOMAS, M.; SREEDHARAN, S. K.; BROCKLEHURST, K.; KALSHEKER, N. Expression cloning of a dust mite cysteine proteinase, Der p1, a major allergen associated with asthma and hypersensitivity reactions. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, n. 4, p. 448S, 1994.

SELA, M. Antigenicity: some molecular aspects. **Science**, v. 166, p. 1365–1374, 1969.

SIMONS, F. E. R. Ed. **Ancestors of Allergy**. New York: New York Global Medical Communications, 1994. p. 110-117.

SILVA, D. A. O.; GERVÁSIO, A. M.; SOPELETE, M. C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; SUNG-SANG, J. S.; TAKETOMI, E. A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 86, n. 5, p. 545-550, 2001.

SMITH, A.M.; BENJMIN, D.C.; HOZIC, N.; DEREWENDA, U.; SMITH, W-A.; THOMAS, W.R; GAFVELIN,G.; HAGE-HAMSTEN, M.; CHAPMAN, M.D. The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. **Journal of Allergy and clinical Immunology**, v.107, p. 977-984, 2001.

SMITH, A. M.; YAMAGUCHI, H.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; FU, S. M. Prevalence of IgG Anti-Der p 2 Antibodies in Children from High and Low Antigen Exposure Groups: Relationship of IgG and Subclass Antibody Responses to Exposure and Allergic Symptoms. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 86, n. 1, p. 102–109, 1998.

SOARES, F. A.; SEGUNDO, G. R.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; SUNG, S. S.; TAKETOMI, E. A. Indoor allergen sensitization profile in allergic patients of the allergy clinic in the University Hospital in Uberlandia, Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 1, p. 25-28, 2007.

SQUILLACE, S. P.; SPORIK, R. B.; RAKES, G.; COUTURE, N.; LAWRENCE, A.; MERRIAM, S.; ZHANG, J.; PLATTS-MILLS, A. E. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. Multiple regression analysis of a population-based study. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v. 156, n. 6, p. 1760-1764, 1997.

TAKAI, T.; MINEKI, R.; NAKAZAWA, T.; TAKAOKA, M.; YASUEDA, H.; MURAYAMA, K.; OKUMURA, K.; OGAWA, H. Maturation of the activities of recombinant mite allergens Der p 1 and Der f 1, and its implication in the blockade of proteolytic activity. **FEBS Letter**, v. 531, p. 265-72, 2002.

TERR, A.I. The atopic diseases. In: STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLow, T.G. **Medical Immunology**, 9.ed., Stanford: Appleton & Lange, 1997, p. 389-388.

TERRA, S. A.; SILVA, D. A.; SOPELETE, M. C.; MENDES, J.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite allergen levels and acarologic analysis in house dust samples in Uberaba, Brazil. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 14, n. 3, p. 232-7, 2004.

THOMAS, W. R.; HALES, B. J. T and B Cell Responses to HDM Allergens and Antigens. **Immunologic Research**, v. 37, p. 187-199, 2007.

THOMAS, W. R.; HEINRICH, T. K.; SMITH, W. A.; HALES, B. J. Pyroglyphid House Dust Mite Allergens. **Protein and Peptide Letters**, v. 14, p. 943-953, 2007.

THOMAS, W. R.; SMITH, W. A.; HALES, B. J. The allergenic specificities of the house dust mite. **Chang Gung Medical Journal**, v. 27, n. 8, p. 563-569, 2004.

THOMAS, W. R.; SMITH, W. A.; HALES, B. J.; MILLS, K. L.; O'BRIEN, R. M. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 129, n. 1, p. 1-18, 2002.

THOMAS, W. R.; STEWART, G. A.; SIMPSON, R. J.; CHUA, K. Y.; PLOZZA, T. M.; DILWORTH, R. J.; NISLET, A.; TURNER, K. J. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *E. coli*. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 85, p. 127-129, 1988.

TORRES-BORREGO, J.; MOLINA-TERÁN, A. B.; MONTES-MENDOZA, C. Prevalence and associated factors of allergic rhinitis and atopic dermatitis in children. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 36, n. 2, p. 90-100, 2008.

TOVEY, E. R.; CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. Mite faeces are a major source of house dust allergens. **Nature**, v. 289, n. 5798, p. 592-593, 1981.

TURKELTAUB, P. C.; GERGEN, P. J. The risk of adverse reactions from percutaneous prick-puncture allergen skin testing, venepuncture, and body measurements: data from the Second National Health and Nutrition Examination Survey 1976-80 (NHANES II). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 84, n. 6, p. 886-890, 1989.

VALENTA, R.; FERREIRA, F.; FOCKE-TEJKL, M.; LINHART, B.; NIEDERBERGER, V.; SWOBODA, I.; VRTALA, S. From allergen genes to allergy vaccines. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 211-41, 2010.

VAN BRONSWIJK, J. E. M. H.; SINHA, R. N. Pyroglyphid mites (Acari) and house dust allergy. **Journal of Allergy**, v. 47, n. 1, p. 31-52, 1971.

VAN OORT, E.; DE HEER, P. G.; VAN LEEUWEN, W. A.; DERKSEN, N. I.; MÜLLER, M.; HUVENEERS, S.; AALBERSE, R. C.; VAN REE, R. Maturation of *Pichia pastoris* derived recombinant pro-Der p 1 induced by deglycosylation and by the natural cysteine protease Der p 1 from house dust mite. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 671-9, 2002.

VOORHORST, R.; SPIEKSMAN, F. T. H. M.; VAREKAMP, H.; LEUPEN, M. J.; LYKLEMA, A. W. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces: identity with the house dust allergen. **Journal of Allergy**, v. 39, n. 6, p. 325-339, 1967.

VON MUTIUS, E. The rising trends in asthma and allergic disease. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 28, p. 45-49, 1998.

YI, F. C.; CHEONG, N.; SHEK, P. C.; WANG, D. Y.; CHUA, K. Y.; LEE, B. W. Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, p. 1203-1210, 2002.

YI, F. C.; CHUA, K. Y.; CHEONG, N.; SHEK, L. P.; LEE, B. W. Immunoglobulin E reactivity of native Blot 5, a major allergen of *Blomia tropicalis*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, p. 1762-67, 2004.

YUUKI, T.; OKUMURA, Y.; ANDO, T.; YAMAKAWA, H.; SUKO, M.; HAIDA, M.; OKUDAIRA, H. Cloning and expression of cDNA coding for the major house dust mite allergen Der f II in *Escherichia coli*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 1233-1238, 1991.

WILLIAMS, L. W. Allergy Skin Tests: Use and Interpretation. In: CASTRO, M.; KRAFT, M. **Clinical Asthma**. Elsevier: 2008.

WEINER, H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. **Immunology today**, v. 18, n. 7, p. 335-343, 1997.

WORM, M.; HENZ, B. M. Molecular regulations of human IgE synthesis. **Journal of molecular medicine**, v. 75, n. 6, p. 440-447, 1997.

ANEXO A



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: cep@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 322/08 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O
 PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 133/08

Projeto Pesquisa: “Método de produção de alérgenos recombinantes de *blomia tropicalis* e de *dermatophagoides pteronyssinus* para utilização em diagnóstico (reatividade de IgE in vitro e teste cutâneo) de alergias respiratórias”.

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do relatório final: julho de 2010.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 08 de agosto de 08.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
 Coordenadora do CEP/UFU

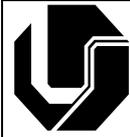
Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

ANEXO B



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas
 Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
 Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902
 Telefone: 034-3218-2394

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado “**Método de produção de alérgenos recombinantes de *Blomia tropicalis* e de *Dermatophagoides pteronyssinus* para utilização em diagnóstico (reatividade de IgE *in vitro* e teste cutâneo) de alergias respiratórias**”, cujo objetivo principal é produzir proteínas recombinantes, relacionadas com alérgenos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*, com a finalidade de aplicação no diagnóstico de doenças alérgicas respiratórias.

Estou ciente de todos os procedimentos abaixo relacionados aos quais serei submetido (a) e que serão realizados na Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica do Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Campus Umuarama, Bloco 4C, a saber:

- realização de exames complementares tais como teste cutâneo com alérgenos inaláveis
- necessidade de coleta de sangue para dosagem de anticorpos específicos a aeroalérgenos

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação. Terei a liberdade de me retirar da pesquisa a qualquer momento em que desejar, sem a necessidade prévia de explicações. Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação.

Uberlândia, _____ de _____ de 20____.

 ASSINATURA

 TESTEMUNHA

ANEXO C


Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas
 Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
 Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902
 Telefone: 034-3218-2394

QUESTIONÁRIO CLÍNICO

Nome: _____

Data: ___/___/___

Idade: _____ Data de nascimento: ___/___/___

Sexo: () Masculino () Feminino

Grau de escolaridade: () Ensino Fundamental () Ensino Médio () Ensino Superior

Nível sócio-econômico (renda familiar):

- () até 1 salário mínimo () de 5 a 10 salários mínimos
 () de 1 a 2 salários mínimos () mais de 10 salários mínimos
 () de 2 a 5 salários mínimos

Questionário 1 (Módulo Asma)

1) Alguma vez na vida você teve sibilos (chiado no peito)?

- () Sim () Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6.

2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito)?

- () Sim () Não

3) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?

- () Nenhuma crise
 () 1 a 3 crises
 () 4 a 12 crises
 () mais de 12 crises

4) Nos últimos 12 (doze) meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?

- () Nunca acordou com chiado
 () Menos de uma noite por semana
 () Uma ou mais noites por semana

5) Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?

- () Sim () Não

6) Alguma vez na vida você teve asma?

- () Sim () Não

- 7) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?
 Sim Não
- 8) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?
 Sim Não

Questionário 2 (Módulo Rinite)

Todas as perguntas são sobre problemas que ocorreram quando você não estava gripado ou resfriado

- 1) Alguma vez na vida você teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?
 Sim Não
- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?
 Sim Não
- 3) Nos últimos 12 (doze) meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?
 Sim Não
- 4) Em qual dos últimos 12 (doze) meses este problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu).
 Janeiro Maio Setembro
 Fevereiro Junho Outubro
 Março Julho Novembro
 Abril Agosto Dezembro
- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal?
 Nada
 Pouco
 Moderado
 Muito
- 6) Alguma vez na vida você teve rinite?
 Sim Não

Questionário 3 (Módulo Eczema)

- 1) Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses?
 Sim Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6

- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve essas manchas na pele (eczema)?
 Sim Não
- 3) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?
 Sim Não
- 4) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) desapareceram completamente nos últimos doze meses?
 Sim Não
- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa dessa coceira na pele?
 Nunca nos últimos 12 (doze) meses
 Menos de uma noite por semana
 Uma ou mais noites por semana
- 6) Alguma vez na vida você teve eczema?
 Sim Não

Anexo D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica

Av. Pará, 1720 - Campus Umuarama - Bloco 4C - CEP 38400-902 - Uberlândia - MG

Telefone: (34) 3218-2195 - Fax: (34) 3218-2333

TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA

(Ácaros de poeira domiciliar)

Nº	Extrato	Tamanho da pápula (mm)*	Tamanho do eritema (mm)
1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
2	<i>Dermatophagoides farinae</i>		
3	<i>Blomia tropicalis</i>		
4	<i>Canis familiaris</i>		
5	<i>Felis domesticus</i>		
6	<i>Periplaneta americana</i>		
7	<i>Blatella germanica</i>		
8	<i>Alternaria alternata</i>		
9	Solução salina		
10	Histamina		

*Valores de referência:

Positivo - diâmetros ortogonais maiores ou iguais a 3 mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.

Negativo - diâmetros ortogonais menores do que 3 mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Responsável técnico