



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

Resposta imune humoral e celular a
***Blomia tropicalis* e sua fração ligante de**
Concanavalina A em pacientes atópicos

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Ronaldo Alves

Uberlândia
2007



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

Resposta imune humoral e celular a
***Blomia tropicalis* e sua fração ligante de**
Concanavalina A em pacientes atópicos

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Ronaldo Alves

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Co-orientadora: Prof^a. Dr.^a Deise Aparecida de Oliveira Silva

Uberlândia
2007

Ronaldo Alves

**Resposta imune humoral e celular a
Blomia tropicalis e sua fração ligante de
Concanavalina A em pacientes atópicos**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Uberlândia, 25 de Maio de 2007
Banca Examinadora

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Prof Dr. Nelson Figueiredo Mendes

Prof. Dra. Neide Maria da Silva

Prof. Dr. Aguinaldo Coelho Silva

Dedico este estudo a todos aqueles que contribuíram para o meu aprendizado.... .A meus pais, irmãos, sobrinhos que nunca se cansaram de caminhar sempre ao meu lado, me dando forças de seguir em frente. E principalmente minha filha.

“A satisfação está no esforço feito para alcançar o objetivo,
e não só tê-lo alcançado”

“Mahatma Gandhi”

“Quando alguém tem força para vencer a si mesmo, nasce
para grandes empreendimentos”

“Jean Baptiste Lacordaire”

Agradecimentos

Ao Professor Dr. **Ernesto Akio Taketomi**, pelos ensinamentos, pela dedicação, competência, paciência e por demonstrar confiança em meu trabalho.

À **Deise Aparecida de Oliveira Silva**, que como uma verdadeira “mãe científica” dedicou boa parte do seu tempo na elaboração e execução deste estudo.

Às Professoras Dra. **Neide Maria Silva** e Dra. **Júlia Maria Costa-Cruz** e aos Professores Dr. **Nelson Figueiredo Mendes** e Dr. **Aguinaldo Coelho Silva**, por abdicarem de seu tempo para auxiliarem na concretização desse trabalho.

Aos amigos, **Karine Almeida, Priscila Ferreira, Cristiane Bernardes, Mônica Sopelete, Leandro Ynoue, Rafael Resende e Jorge Carísio** pelo apoio, desprendimento e prova de amizade que os tornam verdadeiros irmãos para mim.

Aos amigos da alergia, **Sheila Marra, Fabíola Alves, Gesmar Rodrigues, Meimei Queirós, Renato Araújo, Diego Oliveira** e aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia, **Cristina Rostkowska, Ana Cláudia Pajuaba, Samantha Bela, Thaisa Carrijo, Damaso Pacheco, Rosângela Rodrigues, Gleice Alves...**, pelos momentos de alegria e aprendizado.

Aos Professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pelo aprendizado e companheirismo.

A secretária do programa de pós-graduação **Elaine Fátima Silvério**, pelo auxílio nos momentos necessários.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia, **Max Aor Marques, Maria Andréia Pereira, Antônio Thomaz de Oliveira Júnior e Marley Dantas Barbosa**, que colaboram para o bom andamento dos nossos experimentos.

Agradecimento especial aos pacientes e voluntários, pelo ato de boa vontade sem a qual este trabalho não poderia ser realizado.

A todos aqueles que não mencionei, e tiveram uma colaboração que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradecimentos Especiais

A Deus, por me abençoar e me inspirar, por permitir a minha existência e iluminar sempre os meus passos na diretriz do bem. Aquele que sempre nos carrega nos braços nas travessias mais difíceis de nossa vida.

A meus Pais, Sebastião Custódio Alves e Ruth Rodrigues Alves, pelos cuidados na fase de criança e adolescência, pelo amor, apoio moral, exemplo de luta, trabalho, perseverança, disciplina, dinamismo e libertação. Aquele que em seus braços ternos de amor me envolve de alegria, paz, sentimento de luta e de esperança.

A meus irmãos, Alair, Aparecida, Anália, Vilson, Laércio e Geraldo, minhas cunhadas e cunhados, sobrinhos e sobrinhas pelo incentivo, carinho e proteção.

À minha Filha Laura Alves Carvalho, por ter vindo para alegrar meus dias.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1- INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Alergia	17
1.1.1. Fatores ambientais	17
1.1.2. Alérgenos	18
1.1.3. Manifestações clínicas	19
1.1.3.1. Atopia e alergia	19
1.1.3.2. Asma e rinite alérgica	20
1.2. Ácaros da poeira domiciliar	21
1.2.1. <i>Blomia tropicalis</i>	22
1.2.1.1. Classificação taxonômica	22
1.2.2. Alérgenos de <i>Blomia tropicalis</i>	23
1.3. O sistema imune e a resposta alérgica	25
1.4. Citocinas na alergia.....	26
1.5. Fisiopatologia da alergia.....	27
1.6. Glicoconjugados na resposta de anticorpos IgE.....	27
1.7. Proliferação linfocitária	30
1.8. Justificativa	30
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo geral	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Aspectos éticos	33
3.2. Casuística	33
3.3. Teste cutâneo de puntura (TCP)	34
3.4. Coleta de sangue	35
3.5. Preparação de extratos alergênicos de ácaros	35
3.5.1. Extratos alergênicos de ácaros para TCP	36
3.6. Obtenção do extrato de <i>B. tropicalis</i> ligante de Concanavalina A	36
3.7. Dosagem protéica	37
3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE)	37
3.9. ELISA para detecção de IgE sérica específica a <i>B. tropicalis</i>	37
3.10. ELISA para detecção de IgE sérica total.....	39

3.11. Avaliação da resposta imune celular	39
3.11.1. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC)	40
3.11.2. Resposta proliferativa	40
3.11.2.1. Resposta proliferativa na presença de inibidor de ConA.....	41
3.11.3. Produção de citocinas	41
3.11.4. Detecção das citocinas IFN- γ e IL-5	42
3.12. Análise estatística	43
3.13. Normas de biossegurança	43
4 - RESULTADOS	44
4.1. Características dos indivíduos do estudo	44
4.2. TCP aos extratos de <i>B. tropicalis</i> , <i>D. pteronyssinus</i> e <i>D. farinae</i>	46
4.3. Perfil cromatográfico das frações do extrato total de <i>B. tropicalis</i>	47
4.4. Concentração protéica	48
4.5. Análise eletroforética dos extratos de <i>B. tropicalis</i>	48
4.6. Níveis de anticorpos IgE aos extratos Bt-total e Bt-ConA	49
4.7. Correlação entre os níveis de IgE aos extratos Bt-total e Bt-ConA	49
4.8. IgE sérica total	51
4.9. Resposta proliferativa	52
4.10. Resposta proliferativa na presença de inibidor de ConA.....	54
4.11. Análise de citocinas	56
5 - DISCUSSÃO	59
6 - CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	
ANEXO A	76
ANEXO B	77
ANEXO C	78
ANEXO D	79
ANEXO E	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μCi	Microcurie
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
°C	Grau Celsius
+	Resultado de TCP Positivo
-	Resultado de TCP Negativo
ABTS	<i>2,2'-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i> (ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzolino-6-sulfônico])
APC	Célula apresentadora de antígeno
apud	Expressão latina para referenciar um autor cuja obra não se teve acesso, porem seu trabalho foi citado por um autor que se teve acesso
Blo t	Alérgeno de <i>Blomia tropicalis</i>
Blo t5	Alérgeno principal de <i>Blomia tropicalis</i> do grupo 5
BSA	Soroalbumina bovina
Bt	Extrato bruto de <i>Blomia tropicalis</i>
Bt total	Extrato total de <i>Blomia tropicalis</i>
Bt-ConA	Frações do extrato de <i>B. tropicalis</i> ligantes de Concanavalina A
Bt+	Grupo de pacientes atópicos com TCP positivo à <i>Blomia tropicalis</i>
Bt-	Grupo de pacientes atópicos com TCP negativo à <i>Blomia tropicalis</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (família de moléculas MHC)
cm	Centímetro
ConA	Concanavalina A
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
c.p.m.	Cintilações por minuto
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
D.O.	Densidade óptica
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
et al.	E colaboradores
FcεRI	Receptor de alta afinidade para porção Fcε de IgE
g	Gramas
g	Aceleração relativa da gravidade
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IE	Índice ELISA
IEst	Índice de estimulação
IFN-α	Interferon alfa
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering</i> (Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância)

kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligrama
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
n	Número de indivíduos
NA	Grupo de indivíduos não atópicos
nm	Nanômetro
p	Significância estatística
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e soroalbumina bovina
PHA	Fitohemaglutinina
pH	Potencial hidrogeniônico
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PWM	<i>Pokeweed</i>
r	Grau de correlação entre duas variáveis
RAST	Radioalergosorbent test (radioimunoensaio)
rBlo t	Alérgeno recombinante de <i>Blomia tropicalis</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TCP	Teste cutâneo de puntura
TCR	Receptor da célula T
T CD4 ⁺	Linfócito T CD4 positivo
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCL	Solução de Tris-adicionada de HCL
TT	Toxóide tetânico
Tween 20	<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i> (monolaurato de polioxietileno sorbitano)
UI/mL	unidade internacional por mililitro
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Blomia tropicalis*, ácaro da poeira domiciliar. 22
(<http://82.198.66.21/JTFd/index-57html/>)
- Figura 2:** Posição taxonômica de *B. tropicalis* e outros ácaros da poeira domiciliar. 23
- Figura 3.** Perfil cromatográfico das frações do extrato total de *Blomia tropicalis* obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A-Sepharose. O 1º pico representa o Bt-void, e a fração Bt-ConA está indicada nos 2º e 3º picos, eluídos pela adição de PBS contendo 0,05M de metil α -D-manopiranosídeo. Volume da resina: 5,0mL; amostra aplicada: 18mg em um volume de 2,0mL. 47
- Figura 4.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) dos extratos Bt total (1), e Bt-ConA (2) de *Blomia tropicalis*. Os padrões de massas moleculares (kDa) estão indicadas à esquerda e os componentes protéicos estimados dos extratos de *B. tropicalis* estão representados à direita. 48
- Figura 5.** Níveis de IgE específicos ao extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt-total) e à fração ligante de concanavalina A (Bt-ConA) em amostras de soros de pacientes com TCP positivo (Bt+, n=96) e negativo (Bt-, n=41) a *B. tropicalis* e de indivíduos não atópicos (NA, n=109). Dados são representados em box plot e expressos em índice ELISA (IE). A linha horizontal dentro do box indica o valor da mediana obtida para cada grupo. A linha pontilhada horizontal indica o ponto de corte da reação (IE>1,2). Os valores da mediana e taxas de positividade também estão indicados. *** p<0,001 na comparação entre os grupos pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. 50
- Figura 6.** Correlação entre os níveis séricos de IgE ao extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total) e à fração com afinidade por Con-A (Bt-ConA) em pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a *B. tropicalis* (Bt+, n=96), expressos em índices ELISA (IE). O coeficiente de correlação (rs) foi calculado pelo teste de correlação de Spearman. 51
- Figura 7.** Níveis de IgE sérica total em pacientes com TCP positivo (Bt+, n=96) e negativo (Bt-, n=41) a *B. tropicalis* e em indivíduos não atópicos (NA, n=109). Dados são representados em *box plot* e expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL). A linha horizontal dentro do box indica o valor da mediana obtida para cada grupo. *** p<0,001 na comparação entre os grupos pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. 52

Figura 8. Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 26 pacientes atópicos com TCP positivo para *Blomia tropicalis* (Bt+), 19 atópicos com TCP negativo para *B. tropicalis* (Bt-) e 24 indivíduos não atópicos (NA). Células foram estimuladas com o extrato total de *B. tropicalis* (Bt-total; 10µg/mL) e sua fração ligante de Concanavalina A (Bt-ConA; 5 µg/mL) durante 5 dias de cultura e analisadas pela incorporação de timidina tritiada [³H] em contador de cintilação líquida (c.p.m.). Toxóide tetânico (TT; 10µg/mL) foi usado como controle não-alergênico e o meio como controle negativo da cultura nas mesmas condições. Controles positivos da cultura foram incubados com mitógenos (fitohemaglutinina [PHA] a 10µg/mL ou concanavalina A [Con-A] a 5µg/mL) por 3 dias e estão demonstrados no canto superior esquerdo (inserto). Barras representam a média e o intervalo de confiança (IC) de 95%. Significância estatística foi determinada pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. *p<0.05, ***p<0.001 para as comparações entre os grupos para cada estímulo. #, ⊗, φ indicam diferenças significantes em relação ao meio (p<0.05).

Figura 9. Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 6 pacientes atópicos com TCP positivo para *Blomia tropicalis* (Bt+), 4 atópicos com TCP negativo para *B. tropicalis* (Bt-) e 4 indivíduos não atópicos (NA). Células foram estimuladas com o extrato total de *B. tropicalis* (Bt-total; 10µg/mL), fração ligante de Concanavalina A (Bt-ConA; 5µg/mL) e extrato Bt-ConA na presença de inibidor de ConA, metil-α-D-manopiranosídeo (50mM) durante 5 dias de cultura e analisadas pela incorporação de timidina tritiada [³H] em contador de cintilação líquida (c.p.m.). Toxóide tetânico (TT; 10µg/mL) foi usado como controle não-alergênico e o meio como controle negativo da cultura nas mesmas condições. Controles positivos da cultura foram incubados com mitógenos (fitohemaglutinina [PHA] a 10µg/mL ou concanavalina A [Con-A] a 5µg/mL) na ausência ou presença do inibidor de ConA por 3 dias e estão demonstrados no canto superior esquerdo (inserto). Barras representam a média e o intervalo de confiança (IC) de 95%. Significância estatística foi determinada pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. *p<0.05, ***p<0.001 para as comparações entre os grupos para cada estímulo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significantes entre os estímulos para cada grupo de paciente; letras minúsculas diferentes indicam diferenças significantes entre os grupos de pacientes para cada estímulo (p<0.05).

Figura 10. Níveis de IFN-γ detectados em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 26 pacientes atópicos com TCP positivo para *Blomia tropicalis* (Bt+), 19 atópicos com TCP negativo para *B. tropicalis* (Bt-) e 24 indivíduos não atópicos (NA). Células foram estimuladas com o extrato total de *B. tropicalis* (Bt-total; 10µg/mL) e sua fração ligante de Concanavalina A (Bt-ConA; 5µg/mL) durante 7 dias de cultura e mensurados por ELISA. Toxóide tetânico (TT; 10µg/mL) foi usado como controle não-alergênico e o meio como controle negativo da cultura nas mesmas condições. Controles positivos da cultura foram incubados com

mitógenos (fitohemaglutinina [PHA] a 10µg/mL ou concanavalina A [Con-A] a 5µg/mL) por 3 dias e estão demonstrados no canto superior esquerdo (inserto). Barras representam a média e o intervalo de confiança (IC) de 95%. Significância estatística foi determinada pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. #, ⊗, φ indicam diferenças significantes em relação ao meio (p<0.05).

Figura 11. Níveis de IL-5 detectados em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 26 pacientes atópicos com TCP positivo para *Blomia tropicalis* (Bt+), 19 atópicos com TCP negativo para *B. tropicalis* (Bt-) e 24 indivíduos não atópicos (NA). Células foram estimuladas com o extrato total de *B. tropicalis* (Bt-total; 10µg/mL) e sua fração ligante de Concanavalina A (Bt-ConA; 5µg/mL) durante 7 dias de cultura e mensurados por ELISA. Toxóide tetânico (TT; 10µg/mL) foi usado como controle não-alérgico e o meio como controle negativo da cultura nas mesmas condições. Controles positivos da cultura foram incubados com mitógenos (fitohemaglutinina [PHA] a 10µg/mL ou concanavalina A [Con-A] a 5µg/mL) por 3 dias e estão demonstrados no canto superior esquerdo (inserto). Barras representam a média e o intervalo de confiança (IC) de 95%. Significância estatística foi determinada pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. * p<0.05, ** p<0,01, *** p<0.001 para as comparações entre os grupos para cada estímulo. #, ⊗, φ indicam diferenças significantes em relação ao meio (p<0.05).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características demográficas e clínicas de pacientes com rinite alérgica e indivíduos não atópicos do estudo. 45
- Tabela 2.** Resultados do teste cutâneo de puntura (TCP) aos extratos de *B. tropicalis* (Bt), *D. pteronyssinus* (Dp) e *D. farinae* em 137 pacientes com rinite alérgica com ou sem asma de Uberlândia, MG. 46

Resumo

Blomia tropicalis (Bt), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e *D. farinae* (Df) são os ácaros da poeira domiciliar mais prevalente no nosso meio. Componentes ligantes de concanavalina A derivados de *B. tropicalis* (extrato Bt-ConA) têm mostrado serem altamente imunogênicos em doenças alérgicas. Este estudo objetivou avaliar as respostas imunes humoral e celular a *B. tropicalis* em pacientes sensibilizados. Um total de 246 indivíduos entre 18 e 60 anos, dos quais 137 (54 homens e 83 mulheres) apresentavam rinite alérgica com ou sem asma e 109 (37 homens e 72 mulheres) eram não-atópicos, foram selecionados para este estudo. Todos os indivíduos foram analisados por teste cutâneo de puntura (TCP), níveis de IgE sérica total e IgE específica a ambos os extratos Bt-total e Bt-ConA, resposta proliferativa e produção de citocinas (IFN- γ e IL-5) por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimulados com ambos os extratos. TCP mostrou que 70% dos pacientes estavam sensibilizados a Bt (Bt+) e nenhum paciente estava monossensibilizado a Bt. Níveis similares de IgE específica aos extratos de Bt-total e Bt-ConA foram encontrados em pacientes Bt+, enquanto maiores níveis de IgE sérica total foram encontrados em indivíduos atópicos do que não-atópicos. Significante proliferação de PBMC foi observada em resposta ao extrato Bt-total em pacientes sensibilizados a Bt, mas não em pacientes não sensibilizados e indivíduos não-atópicos. O extrato Bt-ConA induziu respostas proliferativas aumentadas em todos os grupos de pacientes, mas estas respostas foram diminuídas em presença de inibidor (metil- α -D-manopiranosídeo) de ConA, indicando a ação de ConA residual neste extrato. Produção significativa de IFN- γ foi observada somente após estimulação com Bt-ConA em pacientes Bt+, enquanto o extrato Bt-total não mostrou alterações. A produção de IL-5 foi consistentemente observada em pacientes Bt+ após estimulação específica com alérgeno ou mesmo sem estímulo, indicando que PBMC de pacientes alérgicos estão propensos a produzirem citocinas do tipo Th2, espontaneamente ou de forma induzida por reestimulação com alérgeno. Pode-se concluir que o extrato Bt-total contém alérgenos relevantes que estão envolvidos em ambas as respostas imunes humoral e celular, enquanto o extrato Bt-ConA contendo componentes glicosilados associados a resíduos de ConA possa ser importante indutor de resposta imune do perfil Th1 e portanto, apresentar potencial aplicação em procedimentos imunoterapêuticos.

Palavras-chave: *Blomia tropicalis*, Concanavalina A, Proliferação celular, IFN- γ , IL-5, Imunoglobulina E.

Abstract

Blomia tropicalis (Bt), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) and *D. farinae* (Df) are the prevalent house dust mites (HDMs). Concanavalin A-binding components derived from *B. tropicalis* (Bt-ConA extract) have shown to be highly immunogenic in allergic diseases. This study aimed to evaluate the humoral and cellular immune responses to *B. tropicalis* in sensitized patients. A total of 246 subjects aged 18 and 60 years were selected for this study. Among them, 137 (54 male and 83 female) had allergic rhinitis with or without asthma and 109 (37 male and 72 female) were non-atopic subjects. All subjects were tested for skin reactivity (SPT), total serum IgE and specific IgE levels to both Bt-total and Bt-ConA extracts, proliferative response and cytokine (IFN- γ and IL-5) production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with both extracts. SPT showed that 70% of patients were sensitized to Bt (Bt+) and no patient was monosensitized to Bt. Similar levels of specific IgE to Bt-total and Bt-ConA extracts were found in Bt+ patients, while higher levels of total serum IgE were found in atopic than non-atopic subjects. Significant PBMC proliferation was observed in response to Bt-total extract in Bt-sensitized, but not in Bt-non-sensitized patients and non-atopic subjects. Bt-ConA extract induced increased proliferative responses in all patient groups, but these responses were decreased in the presence of ConA inhibitor (methyl- α -D-mannopyranoside). Significant IFN- γ production was observed only after Bt-ConA stimulation in Bt+ patients, while Bt-total extract showed no changes. IL-5 production was consistently seen in Bt+ patients after allergen-specific stimulation or even with no stimulus, indicating that PBMC from allergic patients are prone to produce spontaneously or allergen-restimulation induced Th2-type cytokines. It can be concluded that the Bt-total extract contains relevant allergens that are involved in both humoral and cellular immune responses, while the Bt-ConA extract containing glycosylated components associated with ConA residues might be an important inducer of Th1 immune response and therefore, to present a potential use in immunotherapeutic procedures.

Key words: *Blomia tropicalis*, Concanavalin A, Cellular proliferation, IFN- γ , IL-5, Immunoglobulin E

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alergia

1.1.1. Fatores ambientais

O estilo de vida tem sofrido dramática mudança durante os últimos anos, e o microambiente exerce uma enorme influência na alergia. Atualmente as pessoas permanecem por várias horas em locais fechados e isso faz com que a alergia se torne uma enfermidade com um alto nível de importância (PLATTTS-MILLS et al., 1997). Baseado nesta afirmação, alguns dados apontam para uma maior atenção a este problema. No Brasil, muitas alterações têm ocorrido nos diferentes ambientes, ocasionadas pelo aumento da temperatura ambiental, diminuição da ventilação, utilização de carpetes e tapetes, presença de objetos decorativos que retêm a poeira bem como a utilização de condicionadores de ar. Todos estes fatores podem ocasionar aumento na quantidade de substâncias estranhas ou alérgenos que circulam nos interiores das residências ou nos ambientes de trabalho e subseqüentemente, são inalados pelos seus usuários. Então, estas alterações ambientais têm contribuído para aumentar a prevalência tanto da sensibilização alérgica, como de doenças alérgicas respiratórias (asma e rinite).

O aumento da prevalência destas doenças está associado com o alto grau de sensibilização a alérgenos domiciliares. Num recente estudo realizado na Itália, por Perfetti et al. (2004), foram encontrados níveis elevados de alérgenos de ácaros da poeira em móveis estofados situados no ambiente de trabalho. Em outra investigação, Hellsemar et al. (2005) indicaram que o modelo de construção das casas podem influenciar na exposição a alérgenos e no desenvolvimento de doenças alérgicas, ao verificar que crianças que moravam em casas com ventilação mecânica apresentaram mais sintomas respiratórios característicos de alergia. A utilização de janelas e estruturas que permitiriam a ventilação natural nas residências seria um fator reducional para o problema.

No Brasil, os estudos de prevalência alérgica mostram dados relevantes. Lugares públicos, como escolas e creches, são considerados locais de grande fonte de ácaros da poeira domiciliar e baratas (RULLO et al., 2002) e a exposição a estes constitui, desta forma, um importante fator de risco para desenvolvimento de asma brônquica (PLATTS-MILLS; CHAPMAN, 1987), especialmente em crianças de idade escolar (SMITH; DISNEY; WILLIAMS, 1969; SEARS; HERVISON; HOLDAWAY, 1989).

1.1.2. Alérgenos

Antígenos causadores de doenças alérgicas são designados como alérgenos, segundo Johansson et al. (2004). Muitas vezes, estes são proteínas (geralmente glicoproteínas) que podem conter uma cadeia lateral de carboidrato, outras vezes, esse sacáride pode ser o próprio alérgeno e em raros casos, compostos inorgânicos, que podem atuar como haptenos que quando ligados a moléculas maiores, chamadas carreadoras, passam a desempenhar papel imunogênico (BENJAMINI; LESKOWITZ, 1998).

O sistema imune normalmente discrimina entre próprio e não próprio, tanto que somente moléculas estranhas ao organismo são imunogênicas (PARSLOW, 1997), sendo que qualquer substância capaz de induzir uma resposta imune e causar alergia é um alérgeno em potencial (TERR, 1997).

Muitos alérgenos podem apresentar sítios glicosilados, o que parece ser um importante determinante para sua alergenicidade. Os oligossacarídeos aderem às proteínas, geralmente entre os aminoácidos asparagina e serina/treonina, antes ou após a síntese protéica. Isto pode influenciar em várias de suas propriedades, como estabilidade, solubilidade, hidrofobicidade e até mesmo sua carga elétrica (PETERSEN; SCHRAMM; SCHLAAK, 1998; WEBER; SCHRODER; THALBERG, 1987). Entretanto, pouco se sabe sobre estes alérgenos, o que reforça a necessidade de estudos verificando a influência destas cadeias glicosiladas na sua apresentação a células do sistema imune e no desencadeamento da resposta alérgica.

1.1.3. Manifestações clínicas

Alguns indivíduos podem apresentar manifestações clínicas desencadeadas pela exposição a um determinado estímulo, que em pessoas normais, é tolerável. Tais manifestações são chamadas de reações de hipersensibilidade. A alergia é uma destas reações, caracterizada pela presença de mecanismos imunológicos, mediados por células e anticorpos. Esses últimos geralmente são representados pela imunoglobulina E (IgE). Os indivíduos que respondem a estes estímulos, através da produção de altos níveis de IgE, são designados como atópicos (JOHANSSON et al., 2004).

1.1.3.1 Atopia e alergia

Atopia é uma tendência pessoal ou familiar a produzir anticorpos IgE, em resposta a baixas doses de alérgenos, frequentemente proteínas, e desenvolver doenças típicas, como asma, rinoconjuntivite ou dermatite atópica (JOHANSSON et al., 2001). O estado atópico é reconhecido por testes cutâneos, presença de IgE alérgeno-específica, elevação dos níveis de IgE sérica total e presença de eosinófilos no sangue (COOKSON, 1999).

Para Woolcock (2000), a alergia se tornou o principal problema de saúde em muitas sociedades modernas, onde sua prevalência aumentou em até 34% em crianças e 16,3% em adultos entre as décadas de 60 e 90.

Em 1998, um estudo feito pelo comitê *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC), adotando um questionário padronizado revelou que os mais altos índices de prevalência da doença foram encontrados na Austrália, Nova Zelândia, Reino Unido, Estados Unidos e algumas cidades da América Latina. Ao contrário, os índices mais baixos foram encontrados em países não industrializados e áreas tipicamente rurais.

Em um estudo revisado por Ring e colaboradores (RING et al., 2001), diversos autores apontam hipóteses que revelam um crescimento acelerado da prevalência em alergia em países ocidentais, tidos como países de sociedade moderna. Dentre elas, destaca-se a influência de fatores químicos, físicos, biológicos e psico-sociais,

como causadores e adjuvantes, além de fatores de predisposição genética populacional e fisiológica.

Percebe-se, também, que áreas urbanizadas apresentam maiores índices de sensibilização a ácaros da poeira domiciliar e fungos, comparadas a áreas tipicamente rurais, reforçando ainda mais a hipótese da influência da poluição urbana no aumento de patologias respiratórias (GALVÃO; KALIL; CASTRO, 2002).

1.1.3.2 Asma e rinite alérgica

Algumas manifestações clínicas da alergia ocorrem sob a forma de asma e rinite. Como uma síndrome clínica das vias aéreas, a asma é caracterizada por reação imunológica, sob a forma de inflamação do sistema respiratório inferior, induzindo a um quadro de hiper-reatividade brônquica e, conseqüentemente, episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse particularmente a noite e pela manhã ao acordar (LEMANSKE-JUNIOR; BUSSE, 2003). A asma é uma doença multifatorial, e está associada com fatores familiares, infecciosos, alergênicos, sócio-econômicos e ambientais (MANNINO, 1998). Contudo, a maioria dos casos de asma alérgica ocorre em indivíduos que exibem resposta de hipersensibilidade a alérgenos ambientais definidos (EVANS III, 1993; GOLDSTEIN et al., 1994).

De acordo com Platts-Mills e colaboradores (PLATTS-MILLS et al., 1995), os casos de asma não alérgica representam menos de 2% dos asmáticos ou menos de 0,2% da população em geral pertencem a essa categoria. Um estudo realizado por Beasley (2002), demonstra que a asma afeta quase 155 milhões de indivíduos no mundo inteiro, sendo que bilhões de dólares são gastos por ano, nos diversos países do mundo, para o seu tratamento.

Mesmo apresentando perfil imunológico semelhante, a rinite alérgica se distingue da asma pelos sintomas característicos de inflamações nasais, como: aumento de secreção, obstrução da cavidade, espirros e prurido vestibular. Pode também ser acompanhada de conjuntivite - em um quadro denominado rinoconjuntivite - caracterizado por lacrimejamento, prurido conjuntival e fotofobia (TERR, 1997; JOHANSSON et al., 2004). Ambas as doenças podem ser desencadeadas por elementos extrínsecos capazes de causar uma reação alérgica

aos alérgenos, presentes em estruturas comuns ao nosso ambiente, como pólenes de plantas, pêlos de animais, esporos de fungos, insetos e ácaros da poeira domiciliar.

A íntima relação entre a asma e a rinite é freqüentemente demonstrada em estudos epidemiológicos. Neste aspecto, relata-se que a prevalência de asma é maior em pacientes com rinite do que em pacientes com ausência de inflamações nasais (VIGNOLA et al. 1998; LEYNAERT et al., 1999). Além disso, indivíduos com diagnóstico clínico positivo de asma têm dez vezes mais chances de desenvolver rinite alérgica, como descrito por Rusconi et al. (1999).

1.2. Ácaros da poeira domiciliar

Alérgenos derivados de ácaros da poeira domiciliar têm sido reconhecidos como uma importante causa na indução da síntese de IgE e *Dermatophagoides* sp. (família Pyroglyphidae) constituem a fauna predominante na poeira domiciliar do mundo todo. A vigilância americana revelou em 1992 que, além de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, as espécies mais comuns de ácaros na fauna da poeira domiciliar foram *Blomia tropicalis* e *Euroglyplus maynei*. Adicionalmente, em regiões tropicais e subtropicais, alérgenos produzidos por *B. tropicalis*, são importantes causas da sensibilização mediada por IgE em pacientes com asma e rinite alérgica.

Em 1993, um estudo multicêntrico por meio de testes alérgicos realizados nos países da América Latina, incluindo o Brasil, Venezuela e Colômbia, confirmou a alta prevalência de sensibilização a ácaros, notavelmente *B. tropicalis*, em pacientes portadores de asma (FERNANDEZ-CALDAS et al., 1993).

Apesar de serem representantes do Filo Arthropoda, que inclui animais com o corpo segmentado e extremidades articuláveis (STORER, 1998), os ácaros da poeira domiciliar diferem muito dos insetos e demais representantes do grupo, quanto à morfologia e fisiologia. Por esta razão, várias medidas adotadas para controlar insetos não são eficazes para o controle destes ácaros. Neste sentido, muito tem se sugerido para reduzir sua proliferação em ambientes domésticos, como por exemplo, o uso de acaricidas e aspiradores de pó, a lavagem dos cômodos com água quente, o revestimento de colchões e travesseiros com materiais não porosos e uso de estruturas que aumentem a ventilação no ambiente. Essas medidas devem

ser adotadas preferencialmente em conjunto (HALLAS, 1991; HART, 1998; ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

1.2.1. *Blomia tropicalis*

Blomia tropicalis foi primeiramente descrito por Van Bronswijk; De Cock; Ishima (1973), sendo inicialmente registrado como ácaro de estocagem. É um ácaro pequeno, medindo 230 a 465 μ m, de forma globular e distingue-se facilmente de outros ácaros da poeira domiciliar por apresentar um aspecto semelhante a porco espinho, com longas antenas que saem do seu corpo (Figura 1).

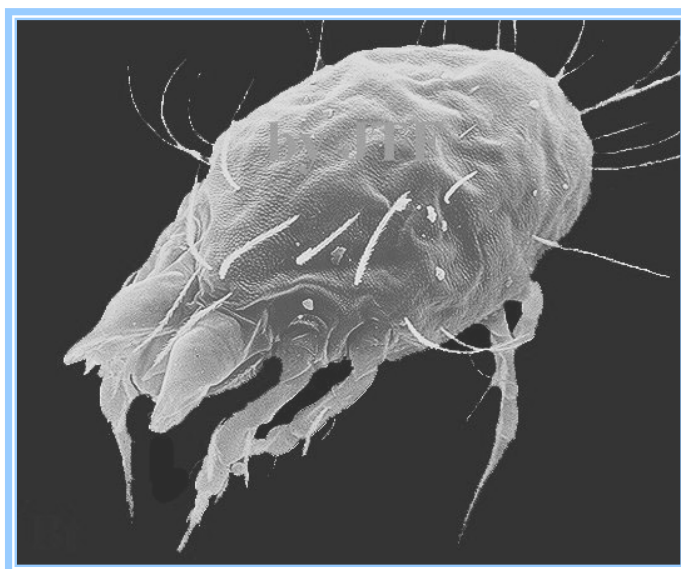


Figura 1: *Blomia tropicalis*, ácaro da poeira domiciliar.
(<http://82.198.66.21/JTFd/index-57.html/>)

1.2.1.1. Classificação taxonômica

A classificação taxonômica resumida de *B. tropicalis*, segundo Colloff (1998) é: Reino: Metazoa; Filo: Artropoda; Classe: Arachnida; Ordem: Astigmata; Família: Echimyopodidae; Gênero: *Blomia*; Espécie: *B. tropicalis*.

A posição taxonômica de *B. tropicalis* em relação aos outros ácaros da poeira domiciliar segundo Puerta e colaboradores (PUERTA et al., 2005) está ilustrada na Figura 2.

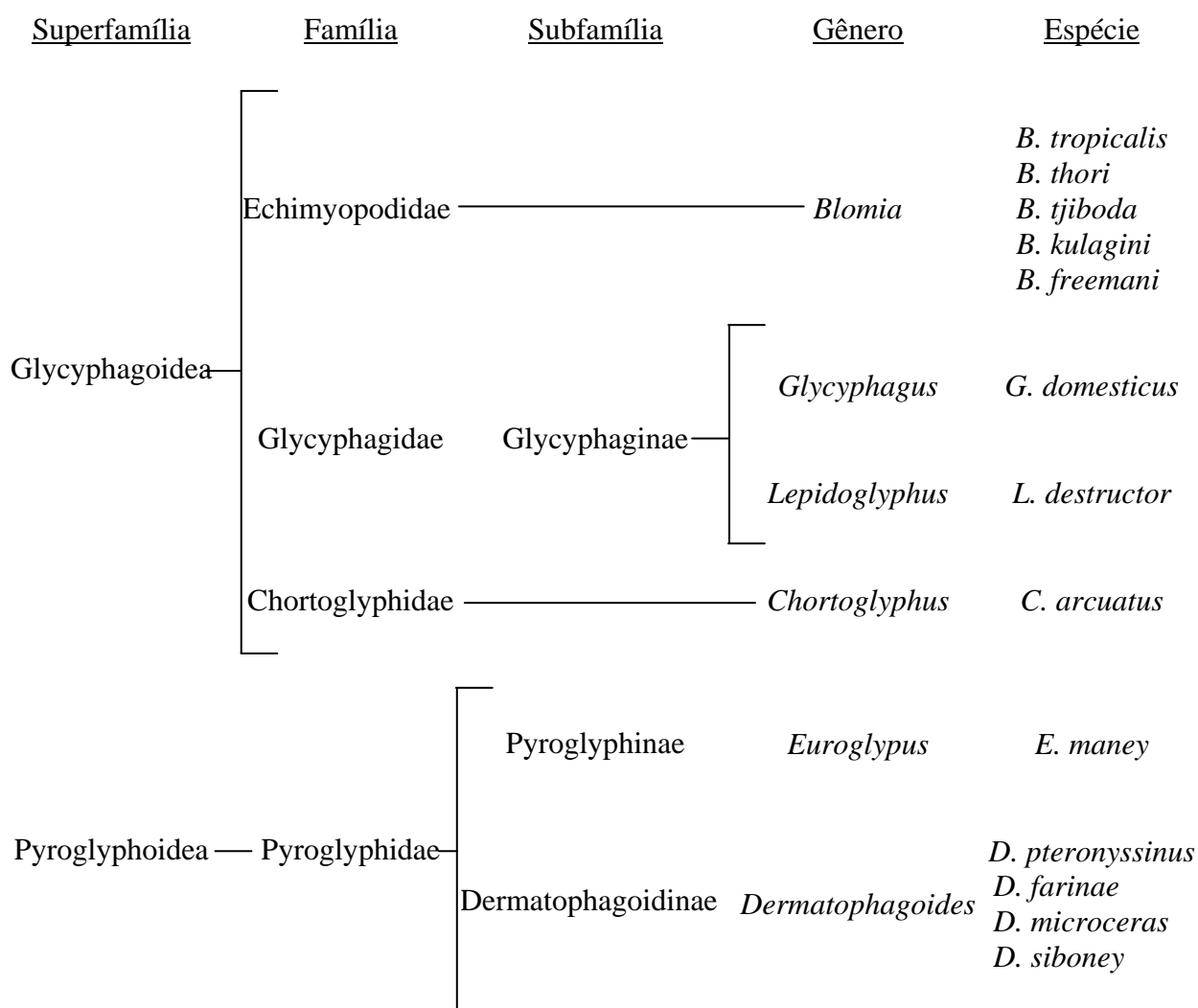


Figura 2. Posição taxonômica de *B. tropicalis* e outros ácaros da poeira domiciliar

1.2.2. Alérgenos de *Blomia tropicalis*

Ao longo da década passada, os avanços da biologia molecular proporcionaram através de técnicas como a clonagem molecular, o desenvolvimento de alérgenos puros e quimicamente bem definidos, sendo utilizados como importantes ferramentas no diagnóstico e na imunoterapia de doenças alérgicas respiratórias.

Até 1997, somente três alérgenos de *B. tropicalis* haviam sido clonados e caracterizados quanto a suas funções alergênicas (CARABALLO et al., 1998). Estes alérgenos incluem: (1) Blo t 5, o primeiro alérgeno de *B. tropicalis* a ser clonado, possuindo cerca de 40% de homologia na seqüência de aminoácidos ao Der p 5, um alérgeno de 14 kDa de *D. pteronyssinus*. A prevalência de anticorpos IgE a Blo t 5 recombinante entre pacientes asmáticos foi de 45% (ARRUDA et al., 1997; ARRUDA et al., 1995; CARABALLO, PUERTA, MARTINEZ, 1994); (2) Blo t 13 (previamente denominado Blo t 6) de peso molecular de 14,8 kDa, demonstrou baixa freqüência (11%) de reatividade com IgE de soros de pacientes alérgicos a *B. tropicalis* e 42% de identidade com a Sm14, uma proteína ligante de ácidos graxos (FABP) de *Schistosoma mansoni*, (CARABALLO et al., 1997); e (3) Blo t 12 (previamente conhecido como Blo t 11a) cujo recombinante rBlo t 11a possui peso molecular de 14,2kDa e demonstrou 50% de reatividade com IgE de soros de pacientes alérgicos a *B. tropicalis* (PUERTA et al., 1996).

Assim, os alérgenos de *Blomia tropicalis* até então reportados parecem ser proteínas de baixo peso molecular, na faixa de 14-15kDa (CARABALLO et al., 1998). Entretanto, Ramos e colaboradores (RAMOS et al., 2001) identificaram um alérgeno (Blo t 11), cuja seqüência primária possui 90% de homologia com o Der f 11, uma paramiosina de *D. farinae* de 98kDa. O alérgeno recombinante produzido (rBlo t 11) demonstrou 52% de reatividade com IgE de soros de pacientes asmáticos reativos pelo teste cutâneo ao extrato de *B. tropicalis* (RAMOS et al., 2003).

Um estudo realizado no Laboratório de Imunologia e alergia, da Universidade Federal de Uberlândia, revelou que 44/89 (49,4%) pacientes com asma apresentaram positividade cutânea para *B. tropicalis* e dentre estes, apenas 8/44 (18,2%) mostraram-se positivos ao alérgeno Blo t 5, denotando que devem existir outros alérgenos relevantes em *B. tropicalis*, além do Blo t 5 (TAKETOMI et al., 1999). Neste momento, ainda não se dispõe de anticorpos monoclonais capazes de serem utilizados na determinação da exposição alergênica a *B. tropicalis*. Tal fato foi demonstrado nesta Unidade de Pesquisa, utilizando anticorpos monoclonais pareados contra Blo t 5 em ensaios ELISA tipo *sandwich*, onde não foram detectadas reações positivas em amostras de poeira domiciliar, apesar da reatividade normal e esperada da curva padrão com o Blo t 5 recombinante (MEDEIROS et al., 2002).

1.3. O sistema imune e a resposta alérgica

O desencadeamento de uma resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigênico e de várias etapas da resposta imune do hospedeiro. O processamento do alérgeno pela célula apresentadora de antígeno (APC) resulta na formação de peptídeos que são apresentados à célula T CD4⁺ em associação com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II (MARONE, 1998). O reconhecimento do conjunto peptídeo/MHC II por uma célula T CD4⁺ com receptor específico para o alérgeno, reforçado pela ligação das moléculas co-estimulatórias B7-1 (CD80)/B7-2 (CD86) e CD28, leva à ativação da célula Th (T *helper* ou T auxiliadora) primária.

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, vírus e produz IFN- γ e TNF- β . 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.

O fenótipo Th2 está associado com respostas imunes a alérgenos e helmintos. A célula Th2 ativada expressa ligante de CD40 e secreta IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, citocinas que auxiliam as células B a produzirem anticorpos IgE e IgG4 (SLUNT et al., 1996). Além disso, IL-3, IL-5 e GM-CSF secretadas pelas células Th2 ativadas ativam eosinófilos, basófilos e mastócitos. A IL-4 estimula a expressão de VCAM-1 (molécula-1 de adesão celular vascular) nas células endoteliais, resultando em aumento da ligação dos linfócitos, monócitos e especialmente eosinófilos (ABBAS; LICHTMAN, 2003). A IL-5 é um importante fator de crescimento seletivo para diferenciação terminal, ativação e manutenção dos eosinófilos nos tecidos, possivelmente inibindo a sua apoptose. Entretanto, a presença de IFN- γ , produzido por células Th1 inibe a síntese de IgE pelas células B (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 2000).

Células Th1 e Th2 interagem negativamente entre si por meio da produção das citocinas antagônicas, isto é, IFN- γ produzido pelas células Th1 inibem o desenvolvimento das células Th2 e a IL-4 produzida pelas células Th2 inibem as

células Th1. Uma sub-população de linfócitos T produzindo citocinas típicas de ambos os fenótipos Th1 e Th2 é denominada de Th0 (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

Recentemente, tem sido descrita uma nova sub-população de células T *helper* denominada de Th3, que secreta tipicamente IL-4, IL-10 e TGF- β responsáveis pela regulação da resposta imune alérgica (AKDIS, 2006). Weiner (1997) sugere a existência de sub-populações únicas de células T CD4+CD25+ denominadas de células T reguladora produtoras de IL-10 e TGF- β , tendo propriedades imunorreguladoras (inibitórias) para Th1 bem como de auxílio para a produção de anticorpos da classe IgA. Mais recentemente, uma sub-população de células T CD4+CD25+ tem sido mostrado regular a resposta imune Th2, apresentando um possível papel no controle de respostas alérgicas (McHUGH; SHEVACH, 2002). Estudos indicam que o mecanismo de supressão das respostas em diferentes condições patológicas (auto-imunidade, respostas alérgicas e infecciosas, entre outras) destas células é dependente da produção e secreção de mediadores como TGF- β e/ou IL-10 (BELKALD et al., 2002; PICCIRILLO et al., 2002).

Uma variedade de outras citocinas e fatores têm sido implicados na modulação da síntese de IgE. IFN- γ , IFN- α , TNF- β , IL-8, IL-10 têm sido mostrados inibir a síntese de IgE em algumas circunstâncias, enquanto que sua estimulação com IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, TNF- α têm sido observada (WORM; HEINZ, 1997).

1.4. Citocinas na alergia

Dados acumulados recentemente de trabalhos com camundongos e humanos identificaram citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) como os principais responsáveis pelo desenvolvimento de doenças alérgicas (NGOC et al., 2005). Linfócitos Th2 ativados produzem IL-4, IL-5 e IL-13, os quais são responsáveis pela produção de IgE pelos linfócitos B, ativação e recrutamento de eosinófilos e produção de muco (ROMAGNANI, 1994; AKDIS; BLASER; AKDIS, 2004). Já interferon- γ (IFN- γ), uma citocina Th1, tem sido mostrada como uma concorrente das citocinas Th2, na manutenção da resposta inflamatória crônica nas doenças alérgicas (NGOC et al., 2005). Mais recentemente, evidências sugerem que células T reguladora (T-reg) podem contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos nas doenças

alérgicas. A maioria das células T-reg são conhecidas pela produção de IL-10 e TGF- β . Em estudos animais *in vivo*, células T-reg suprimem a resposta de células Th1 e Th2 de memória pela liberação de IL-10 e TGF- β (AKDIS; BLASER; AKDIS, 2004; CHEN et al., 2003; AKDIS et al., 2004).

1.5. Fisiopatologia da alergia

A ligação de um alérgeno com moléculas de IgE acopladas a superfície de mastócitos/basófilos leva a despolarização da membrana celular, influxo de Ca^{2+} extracelular e posterior liberação de Ca^{2+} intracelular, culminando com a ativação de enzimas, como a miosina quinase e a fosfolipase A2, além da queda nos níveis intracelulares de AMP cíclico (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2002).

Nos mastócitos, o resultado desta ativação é a geração de mediadores lipídicos, como as prostaglandinas D2 (PGD₂) ou leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) e a exocitose de grânulos secretores (ABBAS; LICHTMAN, 2003). A exocitose de histamina e outros mediadores pré-formados promove aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema e contração de músculos lisos, fenômenos esses responsáveis pelas manifestações clínicas preliminares das reações alérgicas, hipersensibilidade de tipo 1 (ABBAS; LICHTMAN, 2003), ocorrendo nos primeiros 30 minutos após a exposição alérgica (TERR, 1997).

Nas 12 (doze) horas que se sucedem, ocorre uma progressiva infiltração tecidual de células inflamatórias, desde neutrófilos a eosinófilos e células mononucleares em resposta a mediadores químicos (TERR, 1997). Os principais mediadores da resposta tardia são as citocinas, as interleucinas do tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13), os quimiotáticos celulares e as moléculas de adesão (GALLI; LANTZ, 1999).

1.6. Glicoconjugados na resposta de anticorpos IgE

As lectinas (lectina – do latim: *legere*, que significa escolher, selecionar) são conhecidas pela propriedade de interagirem com açúcares, o que as tornam excelentes ferramentas na purificação de glicoproteínas solúveis e de membranas,

como: hormônios, proteínas do plasma, antígenos, anticorpos ou mesmo organelas e células como um todo (SCRIBA, 2004). Tal atributo tem feito com que as lectinas se tornassem um paradigma no que diz respeito ao reconhecimento entre proteína e carboidrato, desta forma, seu uso na imunologia e na glicobiologia tem se tornado uma ferramenta essencial.

As lectinas interagem com as moléculas de carboidratos de maneira não covalente e reversível, porém com um alto grau de especificidade (GOLDSTEIN; PORETZ, 1986). Devido a essas características, as lectinas podem ser utilizadas em aplicações envolvidas na purificação e na caracterização de glicoconjugados.

Os mitógenos apresentam origens diversas podendo ser oriundos de (1) plantas como as lectinas fitohemaglutinina (PHA) purificada a partir de *Phaseolus vulgaris*, concanavalina A (ConA), uma lectina ligante de manose, purificada do extrato de semente do feijão *Canavalia ensiformis* e pokeweed (PWM) isolada de *Phytolacca americana*; (2) de produtos bacterianos (Cowan 1, derivado de *Staphylococcus aureus*); (3) de químicos como *phorbol myristate acetate* (PMA); (4) de antígenos amplamente distribuídos na natureza (*Candida albicans* e toxoide tetânico); ou ainda de (5) citocinas e anticorpos monoclonais contra receptores de superfície (anti-CD3 ou anti-CD2).

As lectinas de plantas têm sido utilizadas em vários estudos imunológicos devido ao seu alto grau de especificidade por açúcares e poderem, em alguns casos, estimular células do sistema imune. Essas podem ser classificadas, de acordo com sua capacidade em aumentar a síntese de DNA e de induzir transformação blástica em populações específicas de linfócitos, em mitogênicas, não mitogênicas ou indiferentes (KÉRY, 1991). A ativação de linfócitos por lectinas mitogênicas é comparável à ativação antigênica, com conseqüentes modificações morfológicas, modulação fenotípica de determinantes de superfície e liberação de citocinas e imunoglobulinas (WHISLER; YATES, 1980). Por outro lado, contrastando-se com a atividade antigênica, a estimulação induzida pela lectina origina uma ativação policlonal das células imunes (WHISLER; YATES, 1980; MILLER et al., 1982). Observações posteriores sugeriram que as lectinas mitogênicas interagem com TCR de linfócitos T, com ambas as cadeias α e β e dessa forma, transmitem sinais mitogênicos, originando ativação policlonal nessas células (CHILSON; BOYLSTON; CRUMPTON, 1984; LECA et al., 1986; CLEVERS et al., 1988).

Os extratos alergênicos são uma mistura heterogênea de proteínas, glicoproteínas e componentes não alergênicos (VERMA; PASHA; GANGAL, 1994), sendo que os antígenos glicosilados têm sido reconhecidos com papel crucial em diferentes patologias e, dentre os fungos patogênicos, são importantes componentes glicoprotéicos de *Paracoccidioides brasiliensis* (PUCCIA et al., 1994), *Cryptococcus neoformans* (PITZURRA et al., 1997), *Histoplasma capsulatum*, apresentando correlação entre antigenemia e terapia (GOMEZ et al., 1999).

No estudo de doenças atópicas, componentes glicosilados ricos em manana, de *Candida albicans*, são reconhecidos por anticorpos IgE em pacientes com manifestações alérgicas, incluindo asma, rinite e dermatite atópica (SAVOLAINEN, 1995). A lectina Concanavalina-A imobilizada em agarose, mostra-se como ferramenta de fundamental importância para isolamento de polissacarídeos e glicoproteínas (LLOYD; BITTON, 1971), por sua propriedade ligante de metil- α -D-manopiranosídeo, resíduo de manose.

Em ácaros, proteínas de alto peso molecular de *D. pteronyssinus* e *D. farinae* foram isoladas e caracterizadas imuno e físicoquimicamente utilizando cromatografia de afinidade de Concanavalina-A, em que suas propriedades alergênicas foram avaliadas, sendo caracterizadas diferentes isoformas do alérgeno Der p 4 (BALDO; UHLENBRUCK, 1977; STEWART; TURNER, 1980),

Assim, as lectinas vêm sendo utilizadas como ferramentas de investigação em situações variadas: detecção de glicosilação anormal (PAREKH et al., 1985, BROOKS; LEATHEN, 1991), glicotipagem de células animais (CUMMINGS, 1997), indução da produção de citocinas (SOUZA, 1998), identificação e separação de subpopulações linfocitárias (KEARSE; SINGER, 1994; WU-HSIEH; CHEN; LEE, 1998) e isolamento de antígenos glicosilados (GENNARI-CARDOSO, 1998).

A ConA tem sido frequentemente utilizada como ferramenta no isolamento de glicoconjugados (NIELSEN et al., 1990; GUPTA et al., 1996; NIGAM; GHOSH; SARMA, 2003), e a reatividade da IgE a estes componentes isolados também constitui um alvo em pesquisas envolvendo doenças alérgicas (GUPTA et al., 2004). Neste sentido, um estudo das frações ligantes de ConA derivadas do extrato bruto de *B. tropicalis* poderá esclarecer aspectos importantes dos alérgenos desta espécie envolvidos na sensibilização e na imunoterapia alergênica.

1.7 Resposta proliferativa

A resposta proliferativa pode ser mensurada através de cultura de células do sangue total, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ou ainda em cultura de sub-populações de linfócitos. Contudo, em muitos casos mais de um tipo celular é requerido para uma dada resposta. Desta forma, os protocolos mais freqüentemente utilizados nos ensaios de proliferação celular utilizam-se de PBMC.

Um dos mais freqüentes ensaios de proliferação linfocitária utiliza-se de uma medida indireta, a estimativa da produção de DNA, para avaliação da proliferação. Esta estimativa é realizada pela incorporação de um nucleosídeo radioativo, a timidina marcada com trítio (H^3) no DNA recém formado no processo de multiplicação ou proliferação celular. Devido sua fácil aplicação, as lectinas de plantas são utilizadas como ferramentas biológicas adequadas em várias investigações de processos imunológicos mediados por células, principalmente na indução da produção de citocinas (PEACOCK; COLSKY; PINTO, 1990).

A ligação dos receptores de membrana dos linfócitos com seus respectivos ligantes resulta em uma série de eventos intracelulares, coletivamente denominados de ativação dos linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Esta sinalização transmembrânica causa uma mudança no comportamento do linfócito culminando com a ativação gênica induzindo proliferação dos linfócitos, produção de anticorpos e citocinas entre outros.

As respostas funcionais dos linfócitos podem ser estudadas mais facilmente pelo uso de ativadores policlonais, que se ligam a muitos ou a todos os complexos do receptor da célula T (TCR), independente da especificidade simulando as ativações do complexo do TCR induzidas pelo antígeno associado ao MHC (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Assim muitos ligantes ou mitógenos podem atuar como ativadores policlonais e estimular proliferação dos linfócitos.

1.8 Justificativa

O aumento da prevalência de doenças alérgicas nas últimas décadas parece estar associado ao estilo de vida ocidental, mas os mecanismos envolvidos não são

completamente compreendidos. Extensivo progresso tem sido alcançado para compreender os mecanismos das doenças alérgicas, com a complexa interação de células T efectoras, células B, células NKT, células teciduais residentes e células T reguladora. Espera-se que o padrão de resposta imune normal a alérgenos leve ao estado de tolerância imunológica (ausência de resposta específica); contudo, detectáveis respostas de células T e anticorpos (particularmente IgG4 e IgG1) têm sido demonstrados em indivíduos sensibilizados, mas clinicamente saudáveis (AKDIS, 2006).

Quando indivíduos saudáveis não alérgicos entram em contato com um alérgeno em potencial, o sistema imune mostra tolerância específica ao alérgeno, utilizando múltiplos mecanismos com a finalidade de manter baixa a intensidade da inflamação e pequena destruição tecidual, em particular por meio do desenvolvimento de células T reguladora (produtoras de IL-10 e TGF- β). Em contrapartida, diferenciação e expansão clonal de células T *helper* 2 (Th2) ocorre em resposta a antígenos ambientais comuns em indivíduos geneticamente susceptíveis. Citocinas tais como IL-4 e IL-13 induzem a mudança de classe de imunoglobulina para IgE e expansão das populações de célula B *naive* tanto quanto posterior expansão de células B de memória expressando IgE. Uma diferente susceptibilidade à morte celular induzida pela ativação entre células Th1 (produtoras de IFN- γ) e Th2 (produtoras de IL-4, IL-5, IL-13) que controla o destino da célula T poderia eventualmente causar desequilíbrio nas sub-populações de células T *helper*, levando a uma resposta Th2 no sangue periférico em indivíduos atópicos e polialérgicos. Isto é frequentemente associado com aumento na IgE sérica total e algumas vezes eosinofilia tecidual induzida pela citocina IL-5 (AKDIS, 2006).

Assim, a realização deste estudo será importante para auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na elaboração das respostas imunes humoral e celular aos alérgenos derivados de *Blomia tropicalis*, incluindo antígenos glicosilados, em indivíduos atópicos como também em indivíduos saudáveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta imune humoral e celular ao extrato bruto de *B. tropicalis* (Bt-total) e sua fração ligante de Concanavalina A (Bt-ConA) em pacientes atópicos.

2.2. Objetivos específicos

- Obter o extrato bruto de *B. tropicalis* e sua fração ligante de Concanavalina A em coluna de afinidade.
- Determinar os níveis de IgE sérica total e IgE sérica específica aos extratos Bt-total e Bt-ConA em pacientes atópicos e indivíduos não-atópicos.
- Analisar a resposta proliferativa de PBMCs estimuladas com os extratos alergênicos (Bt-total e Bt-ConA) em pacientes atópicos e indivíduos não-atópicos.
- Investigar a produção de citocinas (IL-5 e IFN- γ) por PBMCs estimuladas com os extratos alergênicos (Bt-total e Bt-ConA) em pacientes atópicos e indivíduos não-atópicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos (Anexos A e B).

A concordância em participar da pesquisa foi confirmada pela assinatura de um Termo de Consentimento pós-informado (Anexo C) pelo indivíduo do estudo, explicitando o nome da pesquisa, seu objetivo, os procedimentos a serem realizados, tais como colheita de sangue, teste cutâneo de leitura imediata, esclarecimentos sobre riscos e benefícios, além de poderem se retirar do estudo a qualquer momento sem necessidade de explicação prévia ou prejuízo ao atendimento atual ou futuro dos indivíduos da pesquisa.

Em seguida, os indivíduos responderam a uma breve ficha de identificação e a um questionário clínico elaborado segundo ISAAC (1998), com algumas modificações, que foi aplicado com a presença do médico alergologista para maior conhecimento da sua história clínica (Anexo D).

3.2. Casuística

Foram selecionados 246 indivíduos, de ambos os sexos e idade entre 18 e 60 anos, dos quais 137 (54 homens e 83 mulheres) apresentavam rinite alérgica com ou sem asma e 109 (37 homens e 72 mulheres) não tinham sintomas ou histórico clínico de doenças alérgicas e apresentaram teste cutâneo de puntura (TCP) negativo para todos aeroalérgenos testados (não-atópicos).

O diagnóstico de rinite alérgica (intermitente ou persistente, leve ou moderada) foi estabelecido com base na presença de manifestações de espirros, rinorréia e/ou obstrução nasal intermitentes, relacionadas à exposição a alérgenos inaláveis e na história pessoal e/ou familiar de doenças atópicas (BOUSQUET, VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001). O diagnóstico clínico de asma foi

estabelecido considerando a presença de episódios de dispnéia e sibilância, obedecendo aos critérios já estabelecidos (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006).

Todos os pacientes com doença alérgica respiratória foram atendidos no Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), no período de maio de 2005 a fevereiro de 2007. Os indivíduos não-atópicos foram selecionados entre os alunos dos cursos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários da UFU e de membros da população de Uberlândia, durante o mesmo período.

Os critérios de exclusão para este estudo foram:

- Indivíduos em uso dos seguintes medicamentos, por via oral ou tópica:
 - Anti-histamínicos de primeira e segunda geração entre 24 e 72 horas antes do teste cutâneo (BERNSTEIN; STORMS, 1995);
 - Corticosteróides sistêmicos por tempo prolongado (>20mg/dia por mais de sete dias) (SLOTT; ZWEIMAN, 1974);
 - Corticosteróides tópicos até 3 semanas anteriores ao teste cutâneo (PIPKORN; HAMMERLUND; ENERBAECK, 1989);
- Pacientes que tinham sido submetidos a uma prévia imunoterapia;
- Presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;
- Recusa em participar do estudo.

3.3. Teste cutâneo de puntura (TCP)

A hipersensibilidade imediata foi avaliada por meio de TCP de acordo com Ownby (1988), utilizando os seguintes extratos alergênicos glicerinados: ácaros (*B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae*) preparados como descrito a seguir no item 3.5.1; extratos comerciais de baratas (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*), fungos (*Alternaria alternata*) e epitélios de cão (*Canis familiaris*) e gato (*Felis domesticus*) (IPI/ASAC, São Paulo, Brasil). Para o controle positivo, utilizou-se cloridrato de histamina a 10mg/mL (IPI/ASAC, São Paulo, Brasil) 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) (Anexo E).

Após anti-sepsia da face interna do antebraço anterior com álcool 70%, uma gota de aproximadamente 10µL de cada extrato foi depositada a uma distância de 3 cm uma da outra. A puntura cutânea foi realizada com auxílio de um puntor de metal estéril apropriado (ALK Lancet, Schwabmünchen, Alemanha) sobre a gota do extrato. Após 15 minutos da realização do teste, as pápulas foram mensuradas com uma régua, graduada em milímetros, nos seus dois diâmetros (o maior e o perpendicular a este). As pápulas que apresentaram diâmetros médios ≥ 3 mm em relação aos do controle negativo foram consideradas positivas (KANCELJAK-MACAN et al., 2002).

3.4. Coleta de sangue

Paralelamente ao teste cutâneo de puntura, amostras de sangue (5mL) foram coletadas de cada indivíduo, utilizando tubos de coleta a vácuo (Vacutainer® - Precision Glide/Becton Dickson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, EUA) e agulhas 21G1 para punção venosa na região do antebraço. Após a formação do coágulo, os tubos foram centrifugados 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. Preparação dos extratos alergênicos de ácaros

A extração dos alérgenos de *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae* foi realizada de acordo com o protocolo anteriormente descrito (PEREIRA et al., 2005). Em resumo, aproximadamente 200g de material seco de cultivo dos ácaros, gentilmente cedido pelo Dr. Federico Montealegre (Immunochemistry Laboratory, Medical School of Ponce, Porto Rico, EUA), foram peneirados para separar corpos e fezes dos ácaros do restante do material de cultivo. Em seguida, 10g do material peneirado foram misturados a 50mL de solução salina tamponada com borato a 5mM (pH 8,0) contendo inibidores de proteases: leupeptina 1µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1mM (Sigma Chemical

Co.), benzamidina 1 mM (Sigma Chemical Co.) e aprotinina 10 μ g/mL (Sigma Chemical Co.). Essa mistura foi macerada em nitrogênio líquido para ruptura dos ácaros e incubada durante 18 horas a 4°C em agitação orbital. Posteriormente, o material foi centrifugado a 20.000 x g durante 45 minutos a 4°C e o sobrenadante (extrato total) foi concentrado e dialisado em Amicon (W.R. Grace & Co., Beverly, EUA) com membrana YM-10 (*cut off* de 10kDa, Whatman International Ltd, Maidstone, Inglaterra) contra solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2 (PBS). Os extratos alergênicos (Bt-total, Dp-total e Df-total) foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C.

3.5.1. Extratos alergênicos de ácaros para TCP

Os extratos alergênicos de ácaros utilizados no TCP foram preparados a partir dos extratos totais (Bt-total, Dp-total e Df-total) na concentração protéica de 2mg/mL em fenol 0,4% e glicerina 50% (Bayer Corporation, Spokane, EUA). Estes extratos foram armazenados em frascos de vidro do tipo âmbar com conta-gotas a 4°C até a realização dos testes.

3.6. Obtenção do extrato de *B. tropicalis* ligante de Concanavalina A

Aproximadamente 2mL do extrato Bt-total (concentração protéica de 9mg/mL) foram aplicados em 5mL de resina de ConA-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Upsala, Suécia) previamente equilibrada como descrito anteriormente (ALMEIDA, 2005). Após incubação por 2 horas a 4°C, a resina foi lavada com PBS e as proteínas retidas na resina foram eluídas com PBS contendo 0,05M de metil- α -D-manopiranosídeo. As frações foram coletadas e monitoradas em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, SP, Brasil) a 280nm. As frações que apresentaram densidade óptica >0,02 foram misturadas, concentradas e dializadas em Amicon utilizando membrana YM-10 (*cut-off* 10kDa) contra PBS a 4°C. A fração de *B. tropicalis* com afinidade para ConA (Bt-ConA) foi distribuída em alíquotas e armazenada a -20°C.

3.7. Dosagem protéica

As concentrações protéicas dos extratos alergênicos totais (Bt-total, Dp-total e Df-total) e do extrato Bt-ConA foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Para a curva de calibração da dosagem protéica foi utilizado soroalbumina bovina (BSA; Sigma Chemical Co.) em diluições duplas seriadas de 500 a 8 μ g/mL em PBS. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro a 660nm. Os valores de densidade óptica obtidos foram convertidos em μ g/mL com base na curva padrão, utilizando o programa *Microplate Manager* 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA).

3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os componentes protéicos dos extratos Bt-total e Bt-ConA foram visualizados por meio de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 12% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em condições desnaturantes e não-redutoras (LAEMMLI, 1970), utilizando um sistema para mini-gel (SE 215 Mighty Small Multiple Caster, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA).

Imediatamente antes da aplicação no gel, as amostras foram centrifugadas (20.000 x g por 5 minutos), o sobrenadante diluído em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2%, glicerol a 20%) e aquecido a 100°C durante 5 minutos. As amostras foram aplicadas nos poços do gel, paralelamente aos padrões de peso molecular (Sigma Marker, Sigma).

A eletroforese foi realizada sob condições de corrente constante a 20mA (Sistema LKB-BROMMA-2301 Macrodrive 1, Pharmacia, Suécia) por aproximadamente 1 hora. Após a corrida, os géis foram colorados por *Coomassie Blue* (Coomassie brilliant blue-R250, Sigma).

3.9. ELISA para detecção de IgE sérica específica a *B. tropicalis*

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram utilizados para a detecção de anticorpos IgE aos extratos Bt-total e Bt-ConA em amostras de soros de pacientes

atópicos e indivíduos não atópicos, segundo técnica descrita por Pereira e colaboradores (2005), com algumas modificações.

Placas de microtitulação de alta afinidade, com 96 poços (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com os extratos alergênicos Bt-total ou Bt-ConA na concentração protéica de 20µg/mL (50µL/poço) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas por três vezes com PBS contendo Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate, Sigma) a 0,05% (PBS-T) e os sítios ativos foram bloqueados (100µL/poço) com PBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA, Sigma) a 1% por uma hora à temperatura ambiente.

Após um novo ciclo de lavagens, as amostras de soros foram adicionadas na diluição 1:2 (50µL/poço) em PBS-T-BSA 1% em duplicata 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 (50µL/poço) com o anticorpo secundário anti-IgE humana biotinilado (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EUA) diluído a 1:500 em PBS-T-BSA 1% por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, foi adicionado (50µL/poço) o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) na diluição de 1:500 em PBS-T-BSA 1%.

Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente e novas lavagens, as placas foram reveladas por meio da adição do substrato enzimático (2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid [ABTS] a 0,01M em tampão citrato-fosfato a 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de água oxigenada [H₂O₂]).

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 405nm. O limiar de positividade (*cut off*) da reação foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Os níveis de anticorpos IgE foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE) conforme anteriormente descrito (ALMEIDA et al., 2006), segundo a fórmula:

$$IE = DO_{\text{amostra}} / \textit{cut off}$$

DO_{amostra}: densidade óptica média obtida de cada amostra de soro

Cut off = DO média de soros controles negativos + 3 desvios padrões

Valores de IE>1,2 foram considerados positivos para excluir os valores de reatividade limítrofes ao ponto de corte (EI=1,0)

3.10. ELISA para detecção de IgE sérica total

ELISA para detecção de IgE sérica total foi realizada segundo a técnica descrita anteriormente (SILVA et al., 2001), com algumas modificações.

Microplacas de poliestireno de alta afinidade, com 96 poços (Immulon 2, Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IgE humana (clone GE-1; Sigma) na diluição de 1:5.000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C.

As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente. As amostras de soro foram diluídas a 1:5, 1:50 e 1:500 em PBS-T-BSA 1% e incubadas por 2 horas a 37°C. Paralelamente, foi realizada a curva padrão, em duplicata, em diluições duplas seriadas em PBS-T-BSA, em cada placa, utilizando soro de referência (LHY), contendo 500 unidades internacionais (UI) de IgE sérica total/mL de soro, sub padronizado, anteriormente, por quimiluminescência.

Após novas lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário biotilado de cabra anti-IgE humana (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.) na diluição de 1:4.000 e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Subseqüentemente, o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) foi adicionado na diluição de 1:500 e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após o último ciclo de lavagens, foi adicionado o substrato enzimático, constituído de uma solução ABTS (Sigma) 0,01M em tampão citrato-fosfato contendo água oxigenada a 0,03%.

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de ELISA a 405nm e convertidos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL), de acordo com a curva padrão, utilizando-se o programa *Microplate manager PC*, versão 4.0 (Bio-Rad Laboratorie Inc.).

3.11. Avaliação da resposta imune celular

Para avaliar a resposta imune celular a *B. tropicalis*, foram selecionados 26 pacientes atópicos com TCP positivo para Bt, Dp e Df (grupo Bt+), 19 pacientes atópicos com TCP negativo para Bt, mas positivo para os outros dois ácaros (grupo

Bt-) e 24 indivíduos não-atópicos com TCP negativo para todos aeroalérgenos testados (grupo NA).

3.11.1. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Foram coletados aproximadamente 30mL de sangue heparinizado dos pacientes atópicos e indivíduos controles. Adicionou-se PBS estéril ao sangue na proporção 2:1 e, após completa homogeneização, foi adicionado Histopaque (d=1,077; Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia), na proporção 1:5 e centrifugado a 1000g a 15°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e a nuvem celular (PBMC) foi coletada e lavada por duas vezes com PBS estéril gelado por centrifugação a 300g por 10 minutos a 4°C. O sedimento celular (PBMC) foi ressuspensão com 5mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Escócia) contendo gentamicina (40µg/mL) e soro humano AB a 10% (Sigma) e a suspensão celular mantida em banho de gelo até a contagem das células viáveis, utilizando o corante azul de Tripán 0,4% (Sigma), em câmara hemocitométrica de Neubauer.

3.11.2. Resposta proliferativa

PBMCs foram adicionadas em placas de cultura, 96 poços, fundo chato, estéril (Costar-Corning Incorporated) na concentração de 2×10^5 células/poço/200 µL, em triplicata, e estimuladas com os extratos alergênicos Bt-total (10µg/mL) ou Bt-ConA (5µg/mL). Como controle positivo da cultura, células foram estimuladas com os mitógenos fitohemaglutinina (PHA: 10µg/mL) ou concanavalina A (ConA: 5µg/mL) e com toxóide tetânico (TT: 10µg/mL) como controle não-alergênico. Como controle negativo, células foram incubadas com meio de cultura somente. As células foram incubadas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ durante 3 dias quando estimuladas com mitógenos (PHA, ConA) ou 5 dias quando estimuladas com antígenos (Bt-total, Bt-ConA e TT). As concentrações ótimas dos estímulos e tempos de incubação foram determinadas em experimentos prévios.

Aproximadamente 8 horas antes do término do período de estimulação, as

células foram pulsadas (25µL/poço) com 0,5µCi de timidina tritiada [³H] (New England Nuclear, Boston, EUA) e coletadas em filtro de fibra de vidro (Cambridge Technology, Watertown, EUA) por meio de coletor de células (*Cell Harvester* - Cambridge Technology Inc., Cambridge, EUA). Para a leitura da incorporação de timidina tritiada, foram adicionados 2mL de líquido de cintilação biodegradável não-aquoso (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra) em cada tubo e analisado em um contador β de cintilação líquida (Packard Tri-Card - 2100TR, Downers Grove, EUA) em c.p.m. (contagem por minuto).

3.11.2.1. Resposta proliferativa na presença de inibidor de ConA

Para avaliar a interferência de ConA residual no extrato Bt-ConA sobre a resposta proliferativa, PBMCs foram obtidas de 14 pacientes aleatoriamente selecionados (6 do grupo Bt+, 4 do grupo Bt- e 4 do grupo NA) e cultivadas com os estímulos como acima descrito. Em paralelo, foi adicionado o extrato Bt-ConA na presença de um inibidor de ConA, metil-α-D-manopiranosídeo (FERRO PFANSTIEHL LABORATORIES, INC., Waukegan, IL, USA) a 50mM, cuja concentração foi previamente estabelecida em experimentos preliminares. Como controle, foi também adicionado o mitógeno ConA na presença do respectivo inibidor. Todas as etapas subsequentes do ensaio foram realizadas como descrito anteriormente.

3.11.3. Produção de citocinas

PBMCs foram adicionadas em placas de cultura, 48 poços, fundo chato, estéril (Costar-Corning Incorporated) na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/poço/250µL e estimuladas com os extratos alergênicos Bt-total (10µg/mL) ou Bt-ConA (5µg/mL). Como controle positivo da cultura, células foram estimuladas com os mitógenos fitohemaglutinina (PHA: 10µg/mL) ou concanavalina A (ConA: 5µg/mL) e com toxóide tetânico (TT: 10µg/mL) como controle não-alergênico. Como controle negativo, células foram incubadas com meio de cultura somente. As células foram

incubadas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ e os sobrenadantes da cultura foram coletados, de poços independentes, aos 3 (PHA) e 7 dias (Bt-total, Bt-ConA, ConA, TT) após estimulação. Após centrifugação a 3300g por 5 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram armazenados a -70°C para posterior detecção de citocinas.

3.11.4. Detecção das citocinas IFN- γ e IL-5

Os sobrenadantes de cultura foram analisados para a detecção das citocinas IFN- γ e IL-5 pela técnica ELISA de duplo anticorpo tipo *sandwich*, segundo protocolo recomendado pelos fabricantes (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Em resumo, microplacas de poliestireno de alta afinidade com 96 poços (Corning-Costar Incorporated) foram sensibilizadas (50 μ L/poço) com os respectivos anticorpos monoclonais de captura: anti-IFN- γ (4 μ g/mL) ou anti-IL-5 (2 μ g/mL) diluídos em PBS. As placas foram incubadas em câmara úmida por aproximadamente 18 horas à temperatura ambiente.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS contendo Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate; Sigma) a 0,05% (PBS-T), e subsequentemente bloqueadas (100 μ L/poço) com PBS adicionado de soroalbumina bovina (BSA; Sigma) a 1% para IL-5 e com PBS + BSA 1% acrescido de NaN₃ (azida sódica) para IFN- γ por 1 h à temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas com PBS-T e incubadas com os sobrenadantes de cultura (50 μ L/poço) não diluídos, em duplicata. Paralelamente, foram realizadas curvas padrões com as respectivas citocinas humanas recombinantes, em diluições duplas seriadas variando de 2000 a 3,9pg/mL para IFN- γ e de 1500 a 2,9pg/mL para IL-5.

Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas por 4 vezes com PBS-T e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinizados: anti-IFN- γ (18 μ g/mL) ou anti-IL-5 (22,5 μ g/mL) durante 2 horas à temperatura ambiente. Após novas lavagens como anteriormente descrito, foi adicionado o conjugado streptavidina-peroxidase (R&D Systems) na diluição 1:200 e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro.

Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição (50µL/poço) do substrato enzimático tetrametilbenzidina (TMB; Sigma) diluído em tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 4,5) e 0,03% de H₂O₂. Após 20 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição (25µL) de ácido sulfúrico 2 N. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 450nm. Os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com as curvas padrões, utilizando-se o *software* Microplate Manager (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Os limites de detecção das citocinas foram de 7,8pg/mL (IFN- γ) e 11,7pg/mL (IL-5). Valores abaixo do limite de detecção de cada ensaio foram considerados como o último ponto da curva.

3.12. Análise estatística

Análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.). Como os dados não apresentaram uma distribuição normal (Gaussiana), foram utilizados testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de comparação múltipla de Dunn para comparar os níveis de IgE sérica total e IgE sérica específica aos alérgenos de *B. tropicalis*, respostas proliferativas e níveis de citocinas entre os diferentes grupos de pacientes. Para comparação entre proporções foi utilizado o teste do qui-quadrado com correção de Yates ou o teste exato de Fisher, quando apropriado. Correlações entre os níveis de anticorpos IgE aos extratos Bt-total e Bt-ConA foram calculadas pelo teste de correlação de Spearman. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3.13. Normas de biossegurança

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização de equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança (CHAVES-BORGES, MINEO, 1997).

4. RESULTADOS

4.1. Características dos indivíduos do estudo

As características demográficas e clínicas dos indivíduos do estudo estão demonstradas na Tabela 1. Os indivíduos foram distribuídos em três grupos de acordo com os resultados do TCP para o extrato Bt-total:

- (1) Grupo Bt+: pacientes com TCP positivo ao extrato Bt-total;
- (2) Grupo Bt-: pacientes com TCP negativo ao extrato Bt-total, mas TCP positivo aos extratos de Dp e/ou Df;
- (3) Grupo NA: indivíduos não-atópicos com TCP negativo a todos aeroalérgenos testados.

Segundo a história clínica dos pacientes, rinite sem asma foi o diagnóstico predominantemente observado nos dois grupos de pacientes atópicos (Bt+=81,3% e Bt-=90,2%) em relação ao quadro clínico de rinite associado com asma (Bt+=18,7% e Bt-=9,8%; $p < 0,0001$). Nenhuma diferença significativa quanto aos diagnósticos clínicos foi observada entre os grupos de pacientes atópicos Bt+ e Bt- ($p > 0,05$).

Quanto à reatividade cutânea aos ácaros testados, o tamanho médio da pápula ao extrato Dp foi significativamente maior no grupo Bt+ ($9,8 \pm 3,4$ mm) que no grupo Bt- ($7,5 \pm 2,7$ mm), bem como em relação aos extratos Bt ($7,4 \pm 3,0$ mm) e Df ($7,9 \pm 2,8$ mm) ($p < 0,05$), embora nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada nas taxas de positividade do TCP (90-100%). Além disso, não houve diferença significativa entre o tamanho médio das pápulas para o extrato Dp ($7,5 \pm 2,7$ mm) e Df ($7,3 \pm 2,6$ mm) dos pacientes do grupo Bt- ($p > 0,05$).

De acordo com os critérios de seleção dos grupos, todos os indivíduos do grupo NA apresentaram um TCP negativo aos extratos de ácaros bem como aos outros aeroalérgenos testados (dados não mostrados). Todos os indivíduos apresentaram reatividade cutânea positiva para histamina.

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com rinite alérgica e indivíduos não atópicos do estudo.

Características	Grupos		
	Bt+	Bt-	NA
Número de indivíduos (n)	96	41	109
Idade (anos)			
Média ± desvio padrão	27,3 ± 9,5	28,3 ± 9,2	31,1 ± 11,7
Sexo (M/F)	40/56	14/27	37/72
Diagnóstico Clínico (n, %)			
Rinite	78 (81,3%) ^a	37 (90,2%) ^a	0
Rinite+Asma	18 (18,7%) ^b	4 (9,8%) ^b	0
TCP (tamanho médio da pápula em mm) e Positividade (%) [§]			
<i>B. tropicalis</i> (Bt)	7,4 ± 3,0 ^a	0	0
	100% ^a	0	0
<i>D. pteronyssinus</i> (Dp)	9,8 ± 3,4 ^b	7,5 ± 2,7 ^a	0
	99% ^a	100% ^a	0
<i>D. farinae</i> (Df)	7,9 ± 2,8 ^a	7,3 ± 2,6 ^a	0
	100% ^a	90% ^a	0

Bt+: pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo ao extrato de *B. tropicalis*;
 Bt- : pacientes com TCP negativo ao extrato de *B. tropicalis*;
 NA: indivíduos não-atópicos com TCP negativo aos extratos de aeroalérgenos testados;

[§] Positividade ao TCP foi determinada a partir do diâmetro médio da pápula e estabelecida como ≥ 3 mm em relação ao controle negativo da reação. Os dados estão representados como média ± desvio padrão do tamanho da pápula e porcentagem de positividade.

^{a,b} Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, como determinado pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn para o tamanho médio da pápula, e pelo teste qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher para diferença entre proporções ($p < 0,05$).

4.2. TCP aos extratos de *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae*

Os resultados do TCP aos extratos de *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae* realizado nos pacientes com rinite alérgica com ou sem asma estão demonstrados na Tabela 2.

Dos 137 pacientes, 96 (70,1%) apresentaram reatividade cutânea ao extrato total de *B. tropicalis* (Bt+), 95 (69,4%) foram concomitantemente positivos aos três ácaros (Bt+/Dp+/Df+) e somente um (0,7%) paciente foi positivo a ambos extratos Bt e Df (Bt+/Dp-/Df+). Nenhum paciente estava monossensibilizado a *B. tropicalis* (Bt+/Dp-/Df-).

Por outro lado, dos 41 (29,9%) pacientes com TCP negativo ao extrato total de *B. tropicalis* (Bt-), 37 (27%) foram reativos a ambos extratos de Dp e Df (Bt-/Dp+/Df+) e apenas quatro (2,9%) mostraram reatividade cutânea ao extrato Dp somente (Bt-/Dp+/Df-).

Tabela 2. Resultados do teste cutâneo de puntura (TCP) aos extratos de *B. tropicalis* (Bt), *D. pteronyssinus* (Dp) e *D. farinae* em 137 pacientes com rinite alérgica com ou sem asma de Uberlândia, MG.

TCP	Número (%)*
Bt +	96 (70,1)
Bt + / Dp + / Df +	95 (69,4)
Bt + / Dp + / Df -	0 (0)
Bt + / Dp - / Df +	1 (0,7)
Bt + / Dp - / Df -	0 (0)
Bt -	41 (29,9)
Bt - / Dp + / Df +	37 (27,0)
Bt - / Dp + / Df -	4 (2,9)
Bt - / Dp - / Df +	0 (0)

*Dados são representados como o número de pacientes e a porcentagem entre parênteses. (+): Positivo; (-): Negativo.

4.3. Perfil cromatográfico das frações do extrato total de *B. tropicalis*

O perfil cromatográfico das frações do extrato total de *B. tropicalis* obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A-Sepharose está ilustrado na figura 3. O primeiro pico representa as frações protéicas que não foram retidas pela resina de ConA (Bt-void) e as frações (segundo e terceiro picos) que interagiram por afinidade com a resina (Bt-ConA) foram eluídas com 0,05M metil α -D-manopiranosídeo. As frações 37 a 43 e 46 a 49 foram reunidas, constituindo o “pool” das frações que interagiram com a resina (extrato Bt-ConA).

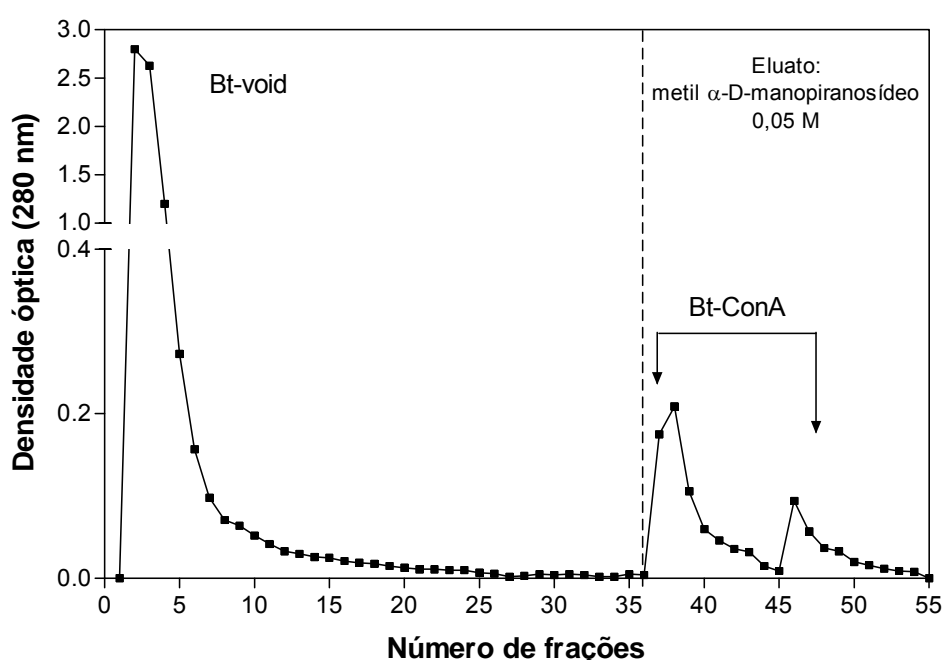


Figura 3. Perfil cromatográfico das frações do extrato total de *Blomia tropicalis* obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A-Sepharose. O 1º pico representa o Bt-void, e a fração Bt-ConA está indicada nos 2º e 3º picos, eluídos com 0,05M metil α -D-manopiranosídeo. Volume da resina: 5,0mL; amostra aplicada: 18mg em um volume de 2,0mL.

4.4. Concentração protéica

A concentração protéica dos extratos e frações obtidas foi: Bt-total=9.000 μ g/mL; Bt-void=3.800 μ g/mL e Bt-ConA=490 μ g/mL (após concentração e diálise em PBS).

4.5. Análise eletroforética dos extratos de *B. tropicalis*

A figura 4 ilustra o perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12% dos extratos Bt-total e Bt-ConA após coloração com *Coomassie blue*. O extrato Bt-total apresentou vários componentes protéicos com massas moleculares aparentes variando de 14 a 152kDa enquanto o extrato Bt-ConA apresentou componentes protéicos com massas moleculares aparentes predominantemente acima de 27kDa (27, 29, 37, 50, 66, 93, 123 e 152kDa).

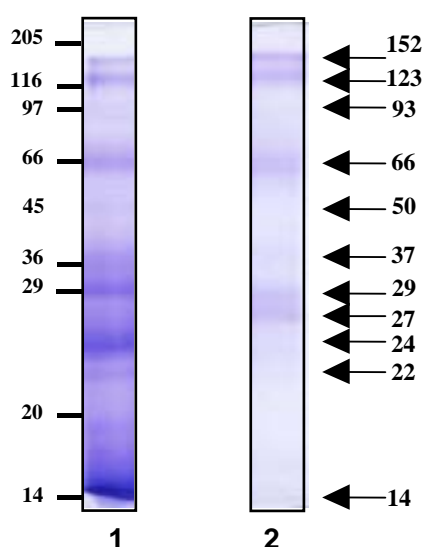


Figura 4. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) dos extratos Bt-total (1) e Bt-ConA (2) de *Blomia tropicalis*. Os padrões de massas moleculares (kDa) estão indicados à esquerda e os componentes protéicos estimados dos extratos de *B. tropicalis* estão representados à direita.

4.6. Níveis de anticorpos IgE aos extratos Bt-total e Bt-ConA

Os níveis de anticorpos IgE específicos aos extratos Bt-total e Bt-ConA determinados por ELISA em soros de pacientes com TCP positivo (Bt+) e negativo (Bt-) a *B. tropicalis* e indivíduos não-atópicos (NA) estão demonstrados na figura 5.

Os níveis séricos de IgE a ambos extratos Bt-total e Bt-ConA foram significativamente maiores no grupo Bt+ (IE = 1,73 e IE = 1,20, respectivamente) que no grupo Bt- (IE = 0,86 e IE = 0,84, respectivamente) ou grupo NA (IE = 0,78 e IE = 0,78, respectivamente) ($p < 0,001$).

De todos os pacientes com TCP positivo a *B. tropicalis* (grupo Bt+), 73% tinham anticorpos IgE séricos específicos ao extrato Bt-total e 50% ao extrato Bt-ConA determinados por ELISA, com diferença significativa entre as taxas de soropositividade ($p = 0,0013$). Por outro lado, em pacientes do grupo Bt- e em indivíduos NA, nenhuma reatividade de IgE sérica a ambos extratos Bt-total e Bt-ConA foi detectada.

Soros analisados em placas previamente sensibilizadas com ConA (controle negativo para o extrato Bt-ConA) não mostraram qualquer reatividade, com valores de IE abaixo do ponto de corte ($IE < 1.2$) (dados não mostrados).

4.7. Correlação entre os níveis de IgE aos extratos Bt-total e Bt-ConA

A correlação entre os níveis séricos de anticorpos IgE aos extratos Bt-total e Bt-ConA foram analisadas nos pacientes do grupo Bt+ (Figura 6). Observou-se uma significativa e alta correlação positiva entre os níveis de IgE ao extrato Bt total versus Bt-ConA ($r_s = 0,7305$; $p < 0,0001$).

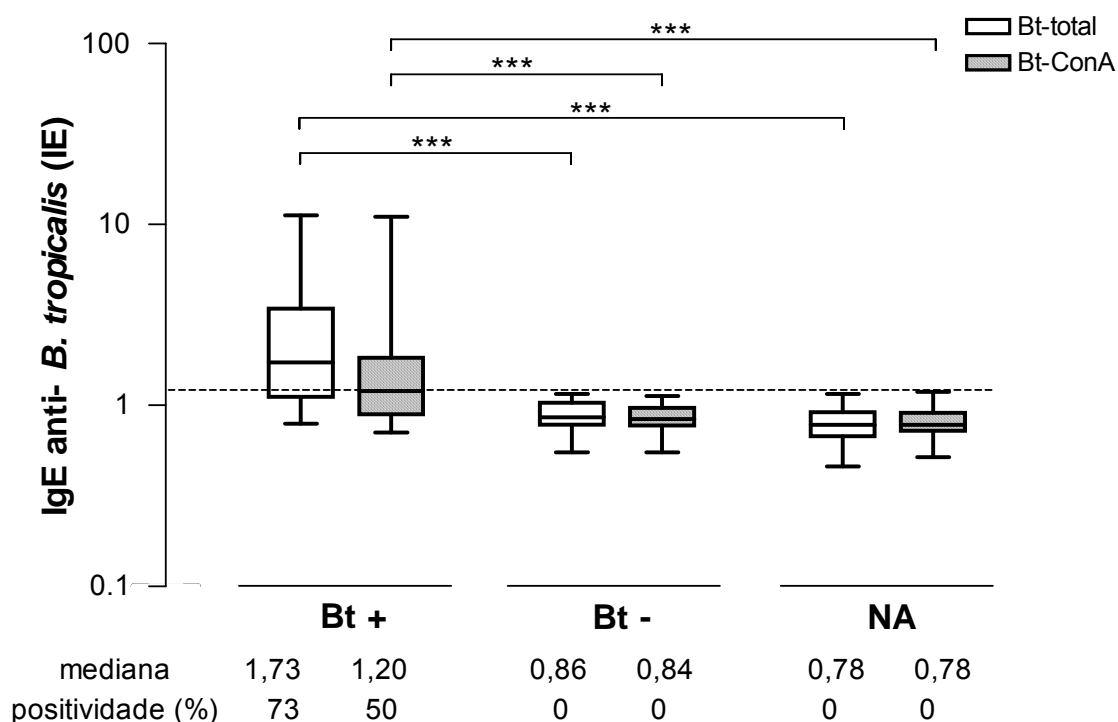


Figura 5. Níveis de IgE específicos ao extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt-total) e à fração ligante de concanavalina A (Bt-ConA) em amostras de soros de pacientes com TCP positivo (Bt+, n=96) e negativo (Bt-, n=41) a *B. tropicalis* e de indivíduos não atópicos (NA, n=109). Dados são representados em *box plot* e expressos em índice ELISA (IE). A linha horizontal dentro do *box* indica o valor da mediana obtida para cada grupo. A linha pontilhada horizontal indica o ponto de corte da reação (IE>1,2). Os valores da mediana e taxas de positividade também estão indicados. *** p<0,001 na comparação entre os grupos pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn.

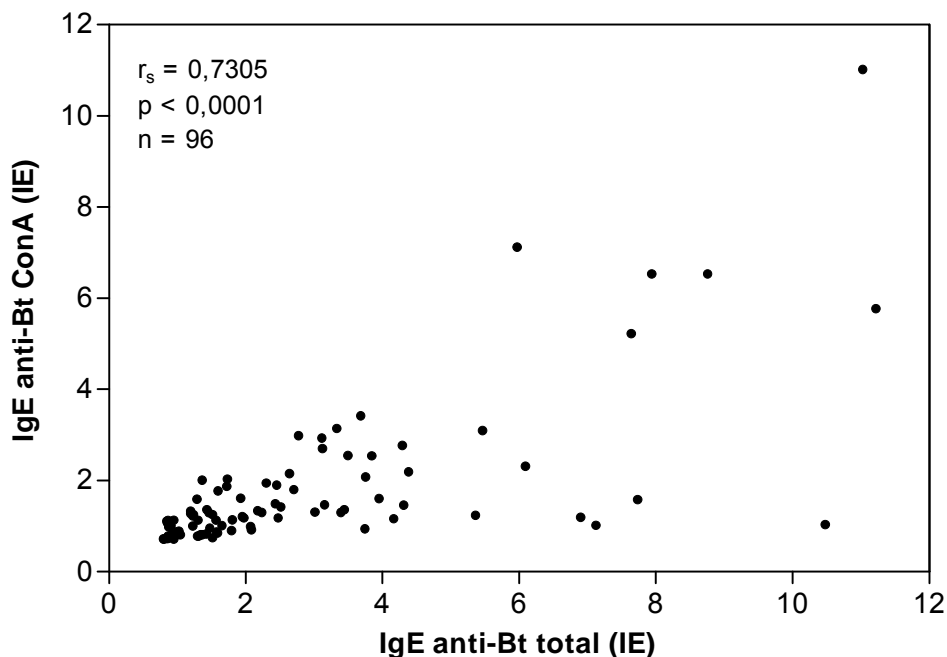


Figura 6. Correlação entre os níveis séricos de IgE ao extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt-total) e à fração ligante de Concanavalina A (Bt-ConA) em pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a *B. tropicalis* (Bt+, n=96), expressos em índices ELISA (IE). O coeficiente de correlação (r_s) foi calculado pelo teste de correlação de Spearman.

4.8. IgE sérica total

Os níveis de IgE sérica total determinados por ELISA em pacientes atópicos (grupos Bt+ e Bt-) e em indivíduos não-atópicos (NA) estão ilustrados na Figura 7. Níveis de IgE sérica total em pacientes do grupo Bt+ (196,2UI/mL) e do grupo Bt- (105,8UI/mL) foram significativamente maiores que aqueles detectados em indivíduos não-atópicos (21,7UI/mL) ($p < 0,001$), mas sem diferenças significantes entre os pacientes atópicos ($p > 0,05$).

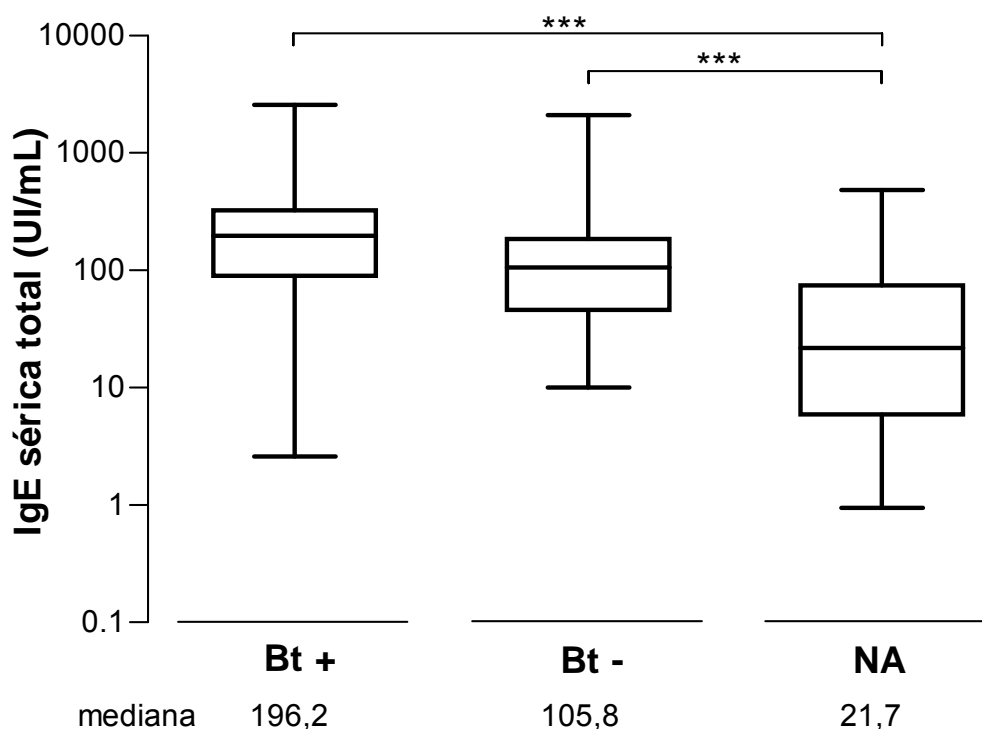


Figura 7. Níveis de IgE sérica total em pacientes com TCP positivo (Bt+, n=96) e negativo (Bt-, n=41) a *B. tropicalis* e em indivíduos não atópicos (NA, n=109). Dados são representados em *box plot* e expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL). A linha horizontal dentro do *box* indica o valor da mediana obtida para cada grupo. *** $p < 0,001$ na comparação entre os grupos pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn.

4.9. Resposta proliferativa

Respostas proliferativas foram analisadas em 26 pacientes do grupo Bt+, 19 pacientes do grupo Bt- e em 24 indivíduos do grupo NA (Figura 8). Respostas proliferativas induzidas pelo alérgeno Bt-total foram significativamente maiores quando comparado ao controle negativo da cultura (meio) somente em pacientes atópicos do grupo Bt+, enquanto o extrato Bt-ConA induziu respostas proliferativas aumentadas em todos grupos de indivíduos ($p < 0,05$).

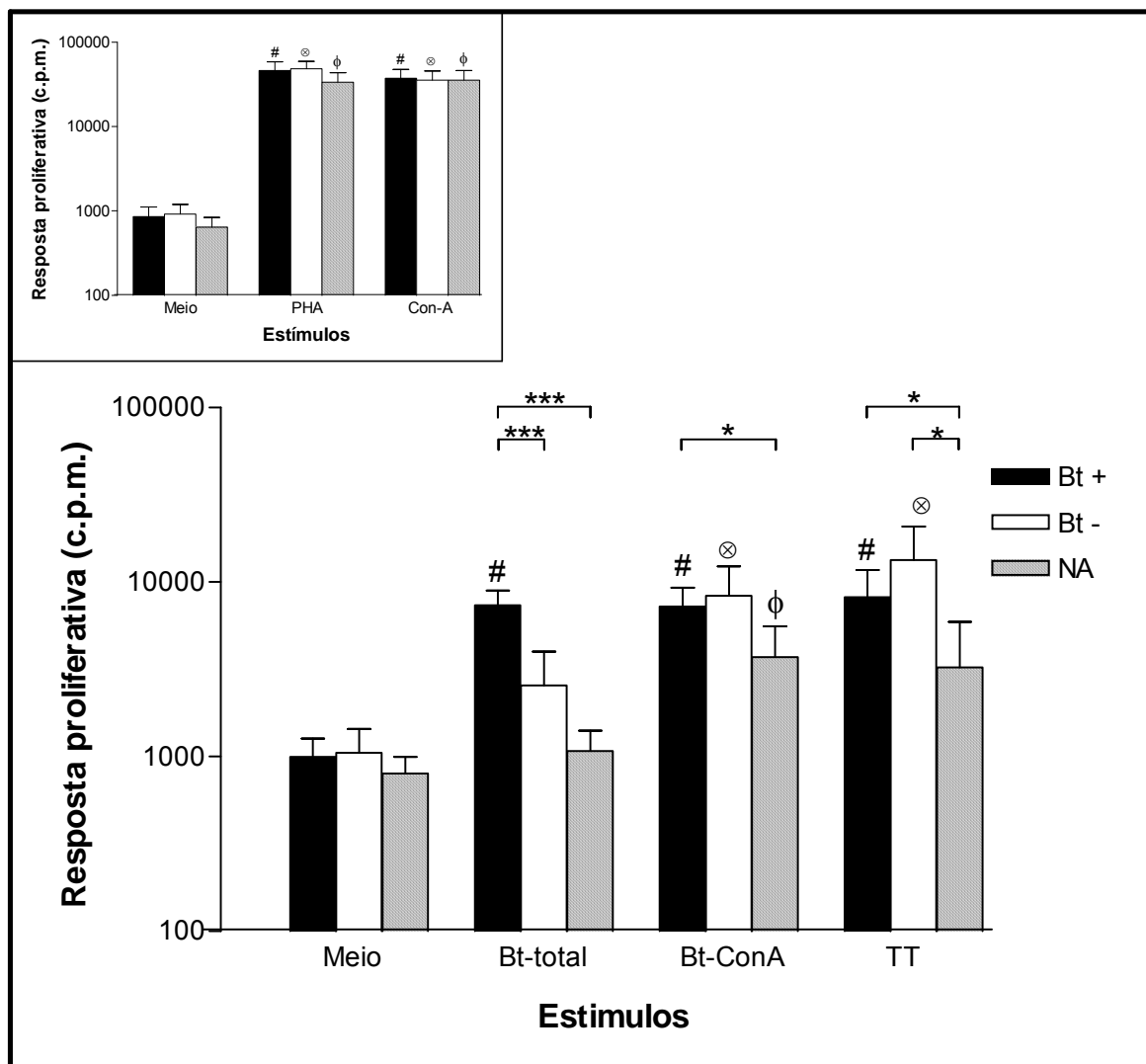


Figura 8. Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 26 pacientes atópicos com TCP positivo para *Blomia tropicalis* (Bt+), 19 atópicos com TCP negativo para *B. tropicalis* (Bt-) e 24 indivíduos não atópicos (NA). Células foram estimuladas com o extrato total de *B. tropicalis* (Bt-total; 10µg/mL) e sua fração ligante de Concanavalina A (Bt-ConA; 5µg/mL) durante 5 dias de cultura e analisadas pela incorporação de timidina tritiada [³H] em contador de cintilação líquida (c.p.m.). Toxóide tetânico (TT; 10µg/mL) foi usado como controle não-alergênico e o meio como controle negativo da cultura nas mesmas condições. Controles positivos da cultura foram incubados com mitógenos (fitohemaglutinina [PHA] a 10µg/mL ou concanavalina A [Con-A] a 5µg/mL) por 3 dias e estão demonstrados no canto superior esquerdo (inserto). Barras representam a média e o intervalo de confiança (IC) de 95%. Significância estatística foi determinada pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. *p<0.05, ***p<0.001 para as comparações entre os grupos para cada estímulo. #, ⊗, φ indicam diferenças significantes em relação ao meio (p<0.05).

Por outro lado, respostas proliferativas induzidas pelo antígeno TT foram significativamente elevadas em ambos os grupos de pacientes atópicos ($p < 0,05$). Controles positivos da cultura (PHA e Con-A) mostraram taxas de proliferação de 30 a 50 vezes maiores em relação ao meio somente (Figura 8, inserto).

Comparando os grupos, o extrato Bt-total induziu uma significativamente maior resposta proliferativa em pacientes atópicos do grupo Bt+ que no grupo Bt- e indivíduos NA ($p < 0,001$). Em contraste, o extrato Bt-ConA mostrou resposta celular significativamente aumentada no grupo Bt+ em relação ao grupo NA ($p < 0,01$).

Ambos os grupos de pacientes atópicos (Bt+ e Bt-) mostraram respostas proliferativas significativamente elevadas após estimulação com TT quando comparado aos indivíduos NA ($p < 0,05$).

4.10. Resposta proliferativa na presença de inibidor de ConA

A interferência de ConA residual no extrato Bt-ConA sobre a resposta proliferativa foi avaliada em ensaios de proliferação na presença do inibidor de ConA (50mM metil- α -D-manopiranosídeo) em PBMC de 6 pacientes do grupo Bt+, 4 pacientes do grupo Bt- e 4 indivíduos do grupo NA (Figura 9). De forma reprodutível aos ensaios anteriores (Figura 8), o extrato Bt-total induziu significativa resposta proliferativa em pacientes atópicos do grupo Bt+ quando comparado ao meio ($p < 0,05$), enquanto o extrato Bt-ConA induziu respostas proliferativas aumentadas em todos grupos de indivíduos em relação ao meio ($p < 0,05$). Entretanto, na presença do inibidor de ConA, estas respostas induzidas pelo extrato Bt-ConA foram significativamente diminuídas ($p < 0,05$).

Na comparação entre os grupos, somente o extrato Bt-total foi capaz de induzir respostas proliferativas significativamente aumentadas em pacientes atópicos do grupo Bt+ quando comparado aos grupos de pacientes atópicos Bt- e indivíduos NA ($p < 0,05$). Respostas proliferativas induzidas pelo antígeno TT também foram reproduzidas e mostraram-se significativamente elevadas em ambos os grupos de pacientes atópicos ($p < 0,05$). Controles positivos da cultura (PHA e Con-A) mostraram taxas de proliferação significativamente maiores em relação ao meio, enquanto uma significativa diminuição da resposta proliferativa foi observada somente para o mitógeno ConA na presença do seu inibidor específico (Figura 9, inserto).

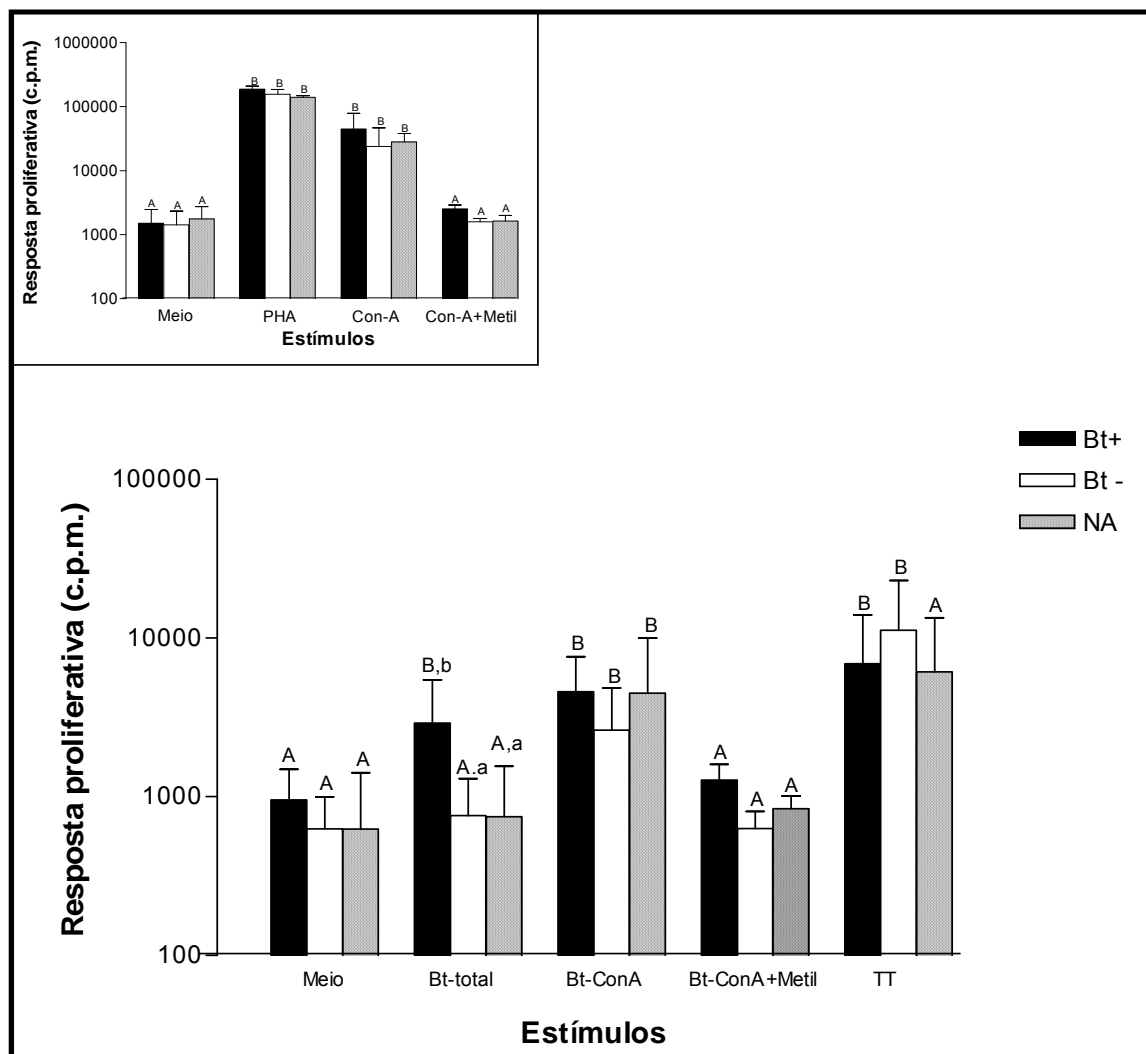


Figura 9. Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 6 pacientes atópicos com TCP positivo para *Blomia tropicalis* (Bt+), 4 atópicos com TCP negativo para *B. tropicalis* (Bt-) e 4 indivíduos não atópicos (NA). Células foram estimuladas com o extrato total de *B. tropicalis* (Bt-total; 10µg/mL), fração ligante de Concanavalina A (Bt-ConA; 5µg/mL) e extrato Bt-ConA na presença de inibidor de ConA, metil-α-D-manopiranosídeo (50mM) durante 5 dias de cultura e analisadas pela incorporação de timidina tritiada [³H] em contador de cintilação líquida (c.p.m.). Toxóide tetânico (TT; 10µg/mL) foi usado como controle não-alergênico e o meio como controle negativo da cultura nas mesmas condições. Controles positivos da cultura foram incubados com mitógenos (fito hemaglutinina [PHA] a 10µg/mL ou concanavalina A [Con-A] a 5µg/mL na ausência ou presença do inibidor de ConA por 3 dias e estão demonstrados no canto superior esquerdo (inserto). Barras representam a média e o intervalo de confiança (IC) de 95%. Significância estatística foi determinada pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. *p<0.05, ***p<0.001 para as comparações entre os grupos para cada estímulo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significantes entre os estímulos para cada grupo de paciente; letras minúsculas diferentes indicam diferenças significantes entre os grupos de pacientes para cada estímulo (p<0.05).

4.11. Análises de citocinas

Níveis de IFN- γ foram mensurados em sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com os extratos alergênicos (Bt-total e Bt-ConA) ou controle não-alergênico (TT), ou controles positivo (PHA e Con-A) e negativo (meio somente) (Figura 10). Nenhuma diferença significativa foi observada na produção de IFN- γ após qualquer estímulo entre os grupos de pacientes ($p > 0,05$), exceto para o extrato Bt-ConA que induziu níveis significativamente aumentados no grupo de pacientes atópicos Bt+ quando comparado ao meio ($p < 0,05$). Controles positivos foram capazes de aumentar significativamente a produção de IFN- γ em relação ao meio em todos os grupos de indivíduos ($p < 0,05$) (Figura 10, *inserto*).

Níveis de IL-5 foram mensurados em sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com os extratos alergênicos (Bt-total e Bt-ConA) ou controle não-alergênico (TT), ou controles positivo (PHA e Con-A) e negativo (meio somente) (Figura 11). Nenhuma diferença significativa foi observada na produção de IL-5 após qualquer estímulo em relação ao meio sozinho ($p > 0,05$), mas níveis significativamente maiores de IL-5 foram detectados no grupo de pacientes atópicos Bt+ quando comparado aos indivíduos NA para qualquer estímulo analisado ($p < 0,05$). Níveis de IL-5 foram também significativamente maiores no grupo de pacientes atópicos Bt- após estimulação com o controle não-alergênico (TT) em relação ao grupo de indivíduos NA ($p < 0,01$). Como esperado, controles positivos foram capazes de aumentar significativamente a produção de IL-5 em relação ao meio em todos os grupos de indivíduos ($p < 0,05$) (Figura 11, *inserto*).

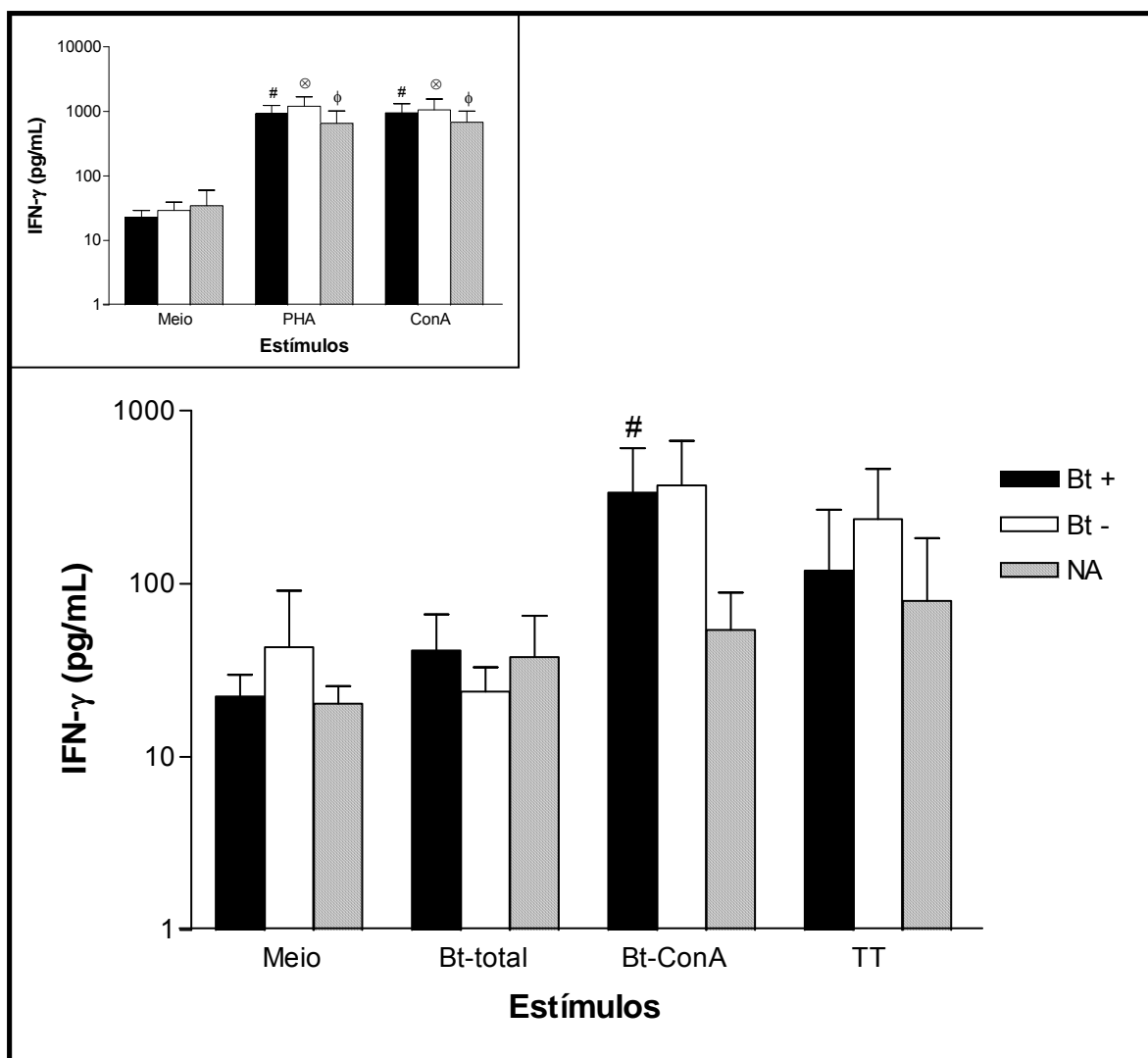


Figura 10. Níveis de IFN- γ detectados em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 26 pacientes atópicos com TCP positivo para *Blomia tropicalis* (Bt+), 19 atópicos com TCP negativo para *B. tropicalis* (Bt-) e 24 indivíduos não atópicos (NA). Células foram estimuladas com o extrato total de *B. tropicalis* (Bt-total; 10 μ g/mL) e sua fração ligante de Concanavalina A (Bt-ConA; 5 μ g/mL) durante 7 dias de cultura e mensurados por ELISA. Toxóide tetânico (TT; 10 μ g/mL) foi usado como controle não-alergênico e o meio como controle negativo da cultura nas mesmas condições. Controles positivos da cultura foram incubados com mitógenos (fitohemaglutinina [PHA] a 10 μ g/mL ou concanavalina A [Con-A] a 5 μ g/mL) por 3 dias e estão demonstrados no canto superior esquerdo (inserto). Barras representam a média e o intervalo de confiança (IC) de 95%. Significância estatística foi determinada pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. #, \otimes , ϕ indicam diferenças significantes em relação ao meio ($p < 0.05$).

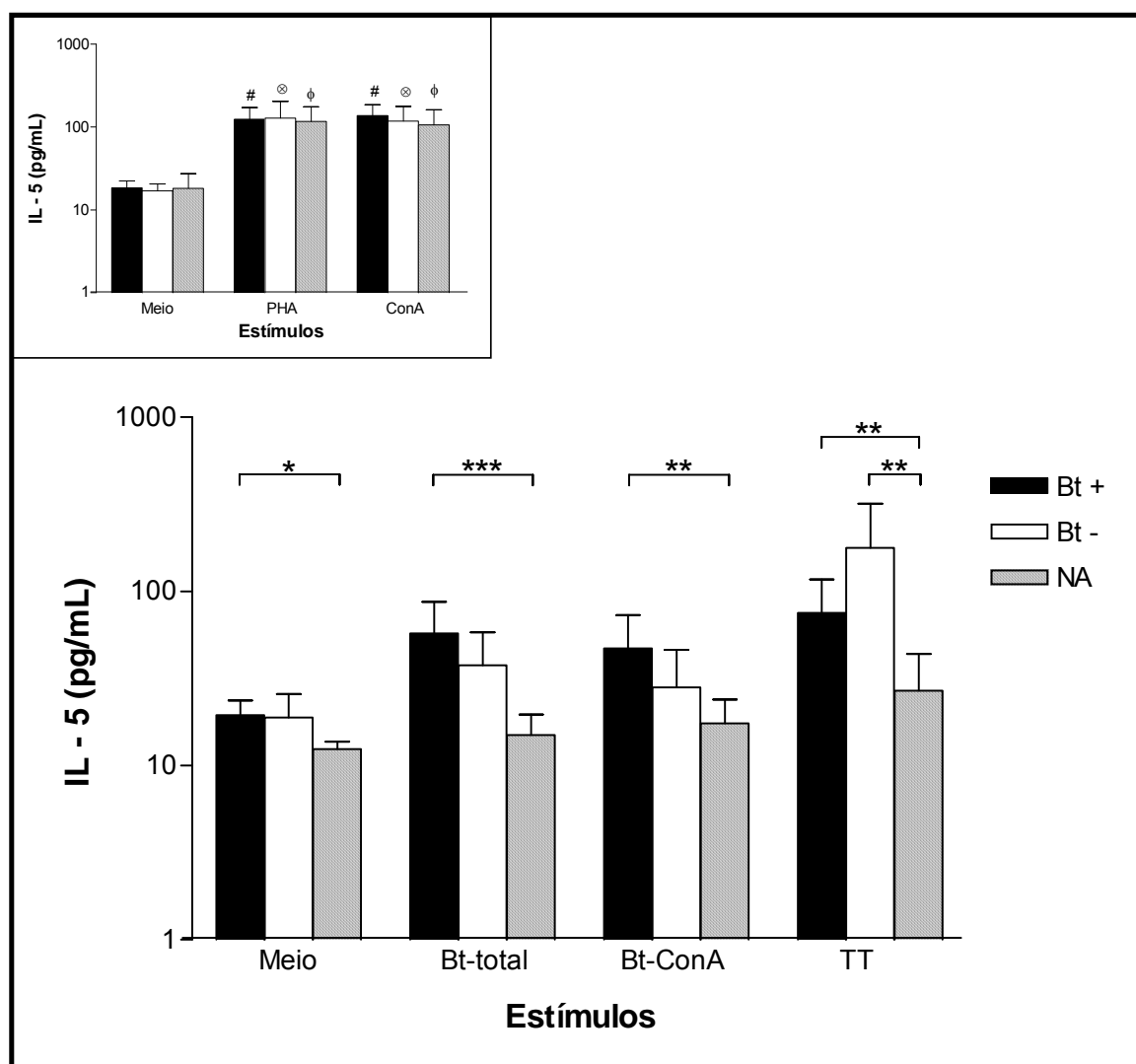


Figura 11. Níveis de IL-5 detectados em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 26 pacientes atópicos com TCP positivo para *Blomia tropicalis* (Bt+), 19 atópicos com TCP negativo para *B. tropicalis* (Bt-) e 24 indivíduos não atópicos (NA). Células foram estimuladas com o extrato total de *B. tropicalis* (Bt-total; 10 μ g/mL) e sua fração ligante de Concanavalina A (Bt-ConA; 5 μ g/mL) durante 7 dias de cultura e mensurados por ELISA. Toxóide tetânico (TT; 10 μ g/mL) foi usado como controle não-alergênico e o meio como controle negativo da cultura nas mesmas condições. Controles positivos da cultura foram incubados com mitógenos (fitohemaglutinina [PHA] a 10 μ g/mL ou concanavalina A [Con-A] a 5 μ g/mL) por 3 dias e estão demonstrados no canto superior esquerdo (inserto). Barras representam a média e o intervalo de confiança (IC) de 95%. Significância estatística foi determinada pelos testes Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para as comparações entre os grupos para cada estímulo. #, ⊗, φ indicam diferenças significantes em relação ao meio ($p < 0.05$).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, a grande maioria (70,1%) dos pacientes com rinite alérgica associada ou não à asma estava sensibilizada a *B. tropicalis*, com quase todos os pacientes (69,4%) apresentando TCP positivo concomitantemente aos três ácaros (*B. tropicalis*, *D. pteronyssinus*, e *D. farinae*) e nenhum paciente estando monossensibilizado a *B. tropicalis*. Estes resultados foram similares aos obtidos por um estudo prévio, realizado por nós, com outro grupo de pacientes atópicos da mesma região (PEREIRA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006), que encontraram 56-58% de pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* (Bt+), com 51-52% reativos a dois ácaros (Bt e Dp) e somente 5,5-6% monossensibilizados a *B. tropicalis*. Estes achados confirmam que a sensibilização concorrente com os três ácaros tem complicado a avaliação do papel de *B. tropicalis* nestes pacientes e que a sensibilização a *Dermatophagoides* spp parece ser o mecanismo principal na patogênese das doenças alérgicas respiratórias em nosso país.

Em nosso prévio trabalho (ALMEIDA et al., 2006), nós fracionamos o extrato total de *B. tropicalis* por cromatografia de afinidade com Con-A Sepharose resultando em frações enriquecidas de manose (extrato Bt-ConA) e apresentando predominantemente componentes de peso molecular acima de 27kDa. Tais compostos glicosilados mostraram ser reativos aos anticorpos IgE e subclasses de IgG no soro de pacientes atópicos, sugerindo que diferentes epítomos de *B. tropicalis* poderiam induzir a síntese de diferentes classes de anticorpos, com anticorpos IgE e IgG1 reconhecendo mais epítomos glicosilados do que anticorpos IgG4 (ALMEIDA et al., 2006).

Neste estudo, níveis similares de anticorpos IgE específicos aos extratos Bt-total and Bt-ConA foram encontrados entre pacientes Bt+, demonstrando que o extrato Bt-ConA também contém alérgenos clinicamente relevantes responsáveis pela indução de anticorpos IgE. Em adição, pacientes não sensibilizados a *B. tropicalis* ou indivíduos não-atópicos não mostraram reatividade a ambos os extratos, confirmando a alta especificidade do ensaio.

Apesar dos níveis similares de anticorpos IgE específicos, as taxas de soropositividade aos extratos de Bt-total e Bt-ConA foram significativamente diferentes, indicando que os componentes glicosilados não são uniformemente reconhecidos por pacientes atópicos e que o fracionamento do extrato total poderia

ter contribuído para a perda de alguns epítomos sensibilizantes relevantes. Contudo, em nosso prévio estudo (ALMEIDA et al., 2006), uma significativa correlação positiva foi encontrada entre os níveis de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 aos extratos Bt-total e Bt-ConA, indicando que antígenos glicosilados poderiam constituir alérgenos principais e podem estar envolvidos tanto na sensibilização alérgica (resposta de anticorpos IgE) como na manutenção da homeostase (respostas de anticorpos IgG1 e IgG4) relacionado à exposição alérgica natural e refletindo uma consequência normal de resposta imune protetora para ambos, indivíduos atópicos e não-atópicos.

Como esperado, os níveis séricos de IgE total foram predominantemente encontrados em ambos os grupos de pacientes atópicos, independentemente dos agentes acarinos sensibilizantes, *B. tropicalis* e/ou *Dermatophagoides* spp. Assim, apesar de que a detecção de IgE sérica total não é capaz de discriminar entre diferentes pacientes atópicos, este procedimento pode representar um parâmetro laboratorial útil para diferenciar indivíduos atópicos de não atópicos. Por outro lado, ELISA para a detecção de anticorpos IgE específicos a *B. tropicalis* e subclasses de IgG pode ser considerado como um método adicional para avaliar a resposta imune humoral a *B. tropicalis* em pacientes atópicos.

Em relação à resposta imune celular, significativa proliferação de PBMC foi observada em resposta ao extrato alérgico Bt-total em pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* (grupo Bt+), mas não em pacientes não sensibilizados (grupo Bt-) e indivíduos não-atópicos (grupo NA). Estes dados indicam que a resposta alérgica envolve não somente a produção de IgE específica a alérgenos com liberação de histamina, mas também a proliferação celular, particularmente de linfócitos T específicos aos alérgenos e secreção de citocinas (VALENTA et al., 1993). Em contraste, o extrato alérgico Bt-ConA induziu respostas proliferativas aumentadas em todos os grupos de pacientes, embora significativamente apenas em pacientes atópicos Bt+ em relação aos não-atópicos. Estes achados poderiam indicar um papel dos componentes glicosilados enriquecidos de manose presentes neste extrato como indutores potenciais da proliferação celular. Alternativamente, estes achados poderiam refletir uma ação residual de ConA presente no extrato Bt-ConA. Para esclarecer esta última hipótese, ensaios de proliferação celular com o extrato Bt-ConA na presença de inibidor específico de ConA mostraram que estas respostas foram significativamente diminuídas, reforçando a presença de resíduos de ConA no extrato Bt-ConA. Vale destacar que o extrato de Bt-ConA foi testado por meio de

anticorpos policlonais de camundongos anti-ConA e nenhuma reatividade específica foi observada (dados não mostrados). Portanto, estudos posteriores aprimorando o processo de *cross-linking* da coluna de ConA-Sepharose serão necessários para avaliar o real papel destes antígenos glicosilados enriquecidos de manose.

Pouco é conhecido sobre a resposta imune celular a *B. tropicalis*. Recentemente, Lozano e colaboradores (LOZANO; CANO; BONFANTE, 2004) avaliaram a resposta proliferativa de PBMC ao extrato alergênico de Bt e proteína recombinante de BtM, demonstrando que alérgenos recombinantes são também capazes de induzir resposta imune celular similar à respostas induzidas por alérgenos nativos, com aplicações potenciais em procedimentos imunoterapêuticos. Neste contexto, o extrato Bt-ConA contendo componentes glicosilados associados a resíduos de ConA poderia constituir em um novo e poderoso extrato alergênico para imunoterapia específica, já que foi demonstrado em nosso prévio estudo (ALMEIDA et al., 2006) que o extrato Bt-ConA é capaz de reconhecer anticorpos IgG1 específicos (resposta imune do perfil Th1) mais do que anticorpos IgG4 específicos (resposta imune do perfil Th2), refletindo provavelmente a sua capacidade de indução de uma resposta imune protetora por meio do desenvolvimento de células Th1.

Para reforçar estes dados, no presente estudo, significativa produção de IFN- γ , uma citocina típica do perfil Th1, foi observada somente após estimulação com o extrato Bt-ConA em pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* (grupo Bt+) enquanto o extrato alergênico Bt-total não mostrou significativa alteração na produção desta citocina. Em contrapartida, significativa produção de IL-5, uma citocina típica do perfil Th2, foi consistentemente observado em pacientes alérgicos a *B. tropicalis* sob estimulação com alérgenos específicos (Bt-total e Bt-ConA) bem como com antígeno não relacionado (TT) e mesmo sem estímulo (somente meio), indicando que PBMC de pacientes alérgicos estão propensos a produzirem citocinas do perfil Th2, espontaneamente ou de forma induzida por reestimulação com alérgeno.

Com base nestes resultados, pode-se concluir que o extrato Bt-total contém alérgenos relevantes que estão envolvidos em ambas as respostas imunes humoral e celular, enquanto o extrato Bt-ConA contendo componentes glicosilados associados a resíduos de ConA possa ser importante indutor de resposta imune do perfil Th1 e portanto, apresentar potencial aplicação em procedimentos imunoterapêuticos.

6. CONCLUSÕES

1. Níveis de IgE específica foram similares aos extratos Bt-total e Bt-ConA em soros de pacientes atópicos sensibilizados a *B. tropicalis*, demonstrando que alérgenos glicosilados enriquecidos de manose podem ser clinicamente relevantes para a indução de anticorpos IgE.
2. Pacientes não sensibilizados a *B. tropicalis* ou indivíduos não-atópicos não apresentaram qualquer reatividade a ambos extratos (Bt-total e Bt-ConA), confirmando a alta especificidade deste ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgE específicos a *B. tropicalis*.
3. Taxas de soropositividade de IgE para o extrato Bt-ConA foram menores que para o extrato Bt-total, indicando que os componentes glicosilados enriquecidos de manose deste extrato não são uniformemente reconhecidos pelos pacientes atópicos sensibilizados a *B. tropicalis*.
4. Pacientes atópicos sensibilizados a *B. tropicalis* mostraram maior resposta proliferativa de PBMC ao extrato Bt-total que os pacientes atópicos não sensibilizados e indivíduos não-atópicos, indicando a participação de linfócitos T alérgeno-específicos na resposta alérgica.
5. O extrato Bt-ConA induziu potente resposta proliferativa em todos os grupos de pacientes, particularmente nos atópicos sensibilizados a *B. tropicalis*, sugerindo a presença de resíduos de ConA no extrato como indutores da proliferação celular.
6. Significante produção de IFN- γ por PBMC de pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* foi observada após estimulação com o extrato Bt-ConA, mas não com o extrato Bt total, sugerindo que componentes glicosilados associados a resíduos de ConA deste extrato possam ser importantes indutores de citocinas do perfil Th1.

7. Significante produção de IL-5 por PBMC de pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* foi observada após estimulação com os diferentes estímulos antigênicos (Bt-total, Bt-ConA, TT, meio), indicando que os pacientes alérgicos estão propensos a produzir citocinas do perfil Th2, seja espontaneamente ou induzida por reestimulação alérgica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5. ed. Philadelphia, PA, USA: Saunders. p. 432-452, 562p, 2003.

AKDIS, M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. **Current Opinion Immunology**. n. 18(6), p. 738-44. Oct. 2006.

AKIDS, C. Allergy and hypersensitivity Mechanisms of allergic disease. **Current Opinion Immunology**. v. 18. p. 718-726, 2006.

AKDIS, C. A.; BLASER, K.; AKDIS, M. Genes of tolerance. **Allergy**, Copenhagen, v. 59, p. 897-913, Set. 2004.

AKDIS, M.; VERHAGEN, J.; TAYLOR, A.; KARAMLOO, F.; KARAGIANNIDIS, C.; CRAMERI, R.; THUNBERG, S.; DENIZ, G.; VALENTA, R.; FIEBIG, H.; KEGEL, C.; DISCH, R.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 199, n. 11, p. 1567-75, 2004.

ALMEIDA, K. C.; SILVA, D. A.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Responses of IgE, IgG1, and IgG4 to concanavalin A-binding *Blomia tropicalis* antigens in allergic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v 39, n 11, p 1445-1454, 2006.

ALMEIDA, K. C. **Resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes ligantes de Concanavalina A isolados de *Blomia tropicalis* (Acari: Echimyopodidae) em indivíduos alérgicos e não alérgicos**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

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**, St. Louis, v. 107, p. 406-413, Mar. 2001, Supplement 3.

ARRUDA, L. K.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; NASPITZ, C. K.; MONTEALEGRE, F.; VAILES, L. D.; CHAPMAN, M. D. Identification of *Blomia tropicalis* allergen Blo t 5 by cDNA cloning. **International Archives of Allergy and Clinical Immunology**, Basel, v. 107, n. 1-3, p. 456-457, 1995.

¹SILVA, M. A.; PINHEIRO, M. S. F.; FREITAS, N. E. **Guia para normatização de trabalhos técnicos-científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses**. 2.ed. Uberlândia, EDUFU, 159p. 2002.

ARRUDA, L. K.; VAILES, L. D.; PLATTS-MILLIS, T. A. E.; CHAPMAN, M. D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; MONTEALEGRE, F.; LIN, K-L.; CHUA, K-Y.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 155, p. 343-350, 1997.

BALDO, B. A; UHLENBRUCK, G. Selective isolation of allergens. I. Reaction of house dust mite extracts with tridacnin and concanavalin A and examination of the allergenicity of the isolated components. **Clinical Allergy**, Oxford, v. 7, p. 429-443, 1977.

BEASLEY, R. The burden of asthma with specific reference to the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 109, s482-s489, 2002. Supplement 5.

BELKALD, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, London, v. 420, p. 502-507, 2002.

BENJAMINI, E.; LESKOWITZ, S. Immunogens and antigens. In: **Immunology a short course**. New York: Alan R. Liss, p. 31-42, 1998.

BERNSTEIN, I. L.; STORMS, W. W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v. 75, n. 6 Pt 2, p. 543-625, 1995.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. Aria Workshop Group; World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 108, p. s147- s334. 2001. Suppl. 5.

BOUSQUET, J.; LOCKEY, R. F.; MALLING, H. J. Imunoterapia com alérgenos: vacinas terapêuticas para doenças alérgicas. **Revista Brasileira Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 23, p. 05-38, 2000.

BROOKS, S. A.; LEATHEM, A. J. Prediction of lymphonode involvement in breast cancer by detection of altered glycosylation in the primary tumour. **Lancet**, London, v. 338, p. 71-74, 1991.

CARABALLO, L.; MERCADO, D.; JIMÉNEZ, S.; MORENO, L.; PUERTA, L.; CHUA, K. Y. Analysis of the cross-reactivity between BtM and Der p 5, two group 5 recombinant allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **International Archives of Allergy and Clinical Immunology**, Basel, v. 117, n. 1, p. 38-45, 1998.

CARABALLO, L.; PUERTA, L.; JIMÉNEZ, S.; MARTINEZ, B.; MERCADO, B.; AVJIOGLO, A.; MARSH, D. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 112, p. 341-347, 1997.

CARABALLO, L.; PUERTA, L.; MARTINEZ, L. Identification of allergens from *Blomia tropicalis*. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 1056-1060, 1994.

CHAVES-BORGES, F.A.; MINEO, J.R. **Medidas de biossegurança em Laboratório**. EDUFU, Uberlândia. P. 55, 1997.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 198, p. 1875-1886, Dez. 2003.

CHILSON, O. P.; BOYLSTON, A. W.; CRUMPTON, M. J. *Phaseolus vulgaris* phytohaemagglutinin (PHA) binds to be human T Lymphocyte antigen receptor. **The European Molecular Biology Organization Journal**, Oxford, v.3, n. 13, p. 3229-3284, 1984.

CLEVERS, H.; ALRCON, B.; WILEMAN, T.; TERHORST, C. The cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. **Annual Review of Immunology**, Palo, Alto, v. 6, n. 4, p. 629-662, 1988

COLLOFF, M. J. Taxonomy and identification of dust mites. **Allergy**, Copenhagen, v. 53, p. 7-12, Supplement 48, 1998.

COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, London, v. 402, p. 18-23, 1999.

CUMMINGS, R. D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. In: GABIUS, H. J.; GABIUS, S. **Glyco-sciences, status and perspectives**. Chapman & Hall GmbH, p. 191-1136, capítulo 10, 1997.

EVANS III, R. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. In: MIDDLETON, E. J.; REED, C. E.; ELLIS, E.F.;ADKINSON, N. F. J.; YUNINGER, W.; BUSSE, W. W. **Allergy: Principles and Practice**. St. Louis: Mosby-Year Book, v. 1, p. 1109-1136, 1993.

FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; BAENA-CAGNANI, C.; LÓPEZ, M.; PATIÑO, C.; NEFFEN, H.; SANCHEZ-MEDINA, M.; CARABALLO, L.; HUERTA, J.; MALKA, S.; NASPITZ, C.; LOCKEY, R. Cutaneous sensitivity to six mite species in asthmatic patients from five Latin American countries. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 3, n. 5, p. 245-249, 1993.

FOTO *Blomia tropicalis*. Disponível em: <<http://82.198.66.21/JTFd/index-57.html>>. Acesso em: 03 out. 2005.

GALLI, S. J.; LANTZ, C. S. Allergy. In: Paul, W.E. **Fundamental Immunology**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, p. 1127-1174, 1589p, 1999.

GALVÃO, C. E. S.; KALIL, J.; CASTRO, F. F. M. Sensibilização a aeroalérgenos em dois grupos escolares nas zonas rural e urbana de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 25, n. 1, 2002.

GENNARI-CARDOSO, M. L. **Paracoccina: lectina de *Paracoccidioides brasiliensis*, ligante de N-acetil-glicosamina interage com componentes de matriz extracelular**. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1998.

GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, R. D. Isolation, physico-chemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. **The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**, Orlando: Academic Press, 1986. p. 33-247.

GOLDSTEIN, R. A.; PAUL, W. E.; METCALFE, D. D.; BUSSE, W. W.; REECE, E. R. Asthma. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 121, p. 698-708, 1994.

GOMEZ, B.L.; FIGUEROA, J.I.; HAMILTON, A.J.; DIEZ, S.; ROJAS, M.; TOBON, A.; RESTREPO, A.; HAY, R.J. Detection of the 70kDa *Histoplasma capsulatum* antigen in histoplasmosis patients: correlation between antigenemia and therapy follow-up. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 3, p. 675-680, 1999.

GUPTA, R.; SHARMA, V.; SRIDHARA, S.; SINGH, B. P.; ANORA, N. Identification of serine protease as a major allergen of *Curvularia lunata*. **Allergy**, Copenhagen, v. 59, n. 4, p. 421-427, 2004.

HALLAS, T. E. The biology of mites. **Allergy**, Copenhagen, v. 46, p. s6-s9, 1991, Supplement 11.

HART, B. J. Life cycle and reproduction of house-dust mites: environmental factors influencing mite populations. **Allergy**, Copenhagen, v. 53, p. s13-s17, 1998. Supplement 48.

HESSELMAR, B.; ABERG, B.; ERIKSSON, B.; BJORKSTÉN, B.; ABERG, N. Building characteristics affect the risk of allergy development. **Pediatric Allergy and Immunology**, Copenhagen, v. 16, n. 2, p. 126-131, Mar. 2005.

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**, London, v. 351, p. 1225-1323, 1998.

IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, **Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia**, v 29, n. 5, p. 222, 2006.

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.

JOHANSSON, S. G. O.; HOURIHANE, J. O. B.; BOUSQUET, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; DREBORG, S.; HAAHTELA, T.; KOWALSKI, M. L.; MYGIND, N.; RING, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; WÜTHRICH, B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, Copenhagen, v. 56, n. 9, p. 813-824, 2001.

KANCELJAK-MACAN, B.; MACAN, J.; PLAVEC, D.; KLEPAC, T.; MILKOVIC-KRAUS, S. The 3 mm skin prick test (SPT) threshold criterion is not reliable for *Tyrophagus putrescentiae*: the re-evaluation of SPT criterion to dust mites. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n. 12, p. 1187-1190, Dec. 2002.

KEARSE, K. P.; SINGER, A. Isolation of immature and mature T cell receptor complexes by lectin affinity chromatography. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 167, p. 75-81, 1994.

KÉRY, V. Lectin-carbohydrate interactions in immunoregulation. **The International Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 23, n. 7-8, p. 631-640, 1991.

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

LECA, G.; BOUMSELL, M.; FABBI, M.; REINHERZ, E. L.; KANELLOPOULOS, J. M. The sheep erythrocyte receptors and both and chains of the human T-lymphocyte antigen receptor bind the mitogenic lectin (phytohaemagglutinin) from *Phaseolus vulgaris*. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 535-544, 1986.

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

LEYNAERT, B.; BOUSQUET, J.; NEUKIRCH, C.; LIARD, R.; NEUKIRCH, F. Perennial rhinitis: an independent risk factor for asthma in non-atopic subjects: the European Community Respiratory Health Survey. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 104, n. 2, p. 301-304, 1999.

LLOYD, K. O.; BITTON, M. A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 107, p. 663-671, 1971.

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

LOZANO, C. P.; CANO, J. M.; BONFANTE, L. H. Respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica al alérgeno recombinante BtM del ácaro del polvo casero *Blomia tropicalis*. **Allergologia et Immunopathologia**, Madrid, v. 32, n. 5, p. 247-251, 2004.

MANNINO, H. J. Reproducibility of skin sensitivity using a quantitative skin prick test. **Allergy**, Copenhagen, v. 40, p. 100-404, 1998.

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

McHUGH, R. S.; SHEVACH, E. M. The role of suppressor T cells in regulations of immune responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 110, n. 5, p. 693-702, 2002.

MEDEIROS, M. JR.; FIGUEIREDO, J. P.; ALMEIDA, M. C.; ATTA, A. M.; TAKETOMI, E. A.; SILVA, D. A. O.; TERRA, S. A.; AMORIM, W. W.; PINHO, R. S.; ARAÚJO, M. I.; CARVALHO, E. M. Association between mite allergen (Der p 1, Der f 1, Blo t 5) levels and microscopic identification of mites or skin prick test results in asthmatic subjects. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, 129, n. 3, p. 237-241, 2002.

MILLER, H. C.; CHANEY, W. G.; KLINMAN, N. R.; ESSELMAN, W. J. Regulation of B cell tolerance by murine gangliosides. **Cellular Immunology**, New York, v. 143, n. 2, p. 2933-2938, 1982.

NIELSEN, B. M.; SMESTAD-PAULSEN, B.; CLONIS, Y.; MELLBYE, K. S. Purification of the glycoprotein allergen Ag7 from mugwort pollen by concanavalin A affinity chromatography. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 3-4, p. 305-316, Nov. 1990.

NIGAM, S.; GHOSH, P. C.; SARMA, P. U. A new glycoprotein allergen/antigen with the protease activity from *Aspergillus fumigatus*. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 132, n. 2, p. 124-131, 2003.

NGOC, L. P.; GOLD, D. R.; TZIANABOS, A. P.; WEISS, S. T.; CELEDÓN, S. T. Cytokines, allergy and asthma. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, London, v. 5, p. 161-166, Abr. 2005.

OPPENHEIMER, J.; NELSON, H.S. Skin Testing. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 96, n. 2, p. s6-s12, Feb. 2006. Suppl 1.

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

PAREKH, R. B.; DWEK, R. A.; SUTTON, D. J.; FERNANDES, D. J.; LEUNG, A.; STANWORTH, D.; RADEMARCHER, T. W.; MIZOUCHI, T.; TANAGUCHI, T.; MATSUDA, A. K.; TAKEUCHI, F.; NAGONO, Y.; MIYAMOTO, T.; KOBATA, A. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of serum IgG. **Nature**, London, v. 316, p. 452-457, 1985.

PARSLOW, T. G. Immunogens, antigens, & vaccines. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARNSLOW, T. G. **Medical Immunology**. 9.ed. Stamford: Appleton & Lange, p.74-82, 900 p, 1997.

PEACOCK, J. S.; COLSKY, A. S.; PINTO, V. B. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p.147-157, 1990.

PEREIRA, E. A. L.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ALMEIDA, K. C.; ALVES, R.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 3, p. 401-406, 2005.

PERFETTI, L.; FERRARI, M.; GALDI, E.; POZZI, V.; COTTICA, D.; GRIGNANI, E.; MINOIA, C.; MOSCATO, G. House dust mites (Der p 1, Der f 1), cat (Fel d 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in indoor work-places (offices and archives). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 328, n. 1-3, p.15–21, 2004.

PETERSEN, A.; SCHRAMM, G.; SCHLAAK, M. Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p1 of timothy grass pollen. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 315-321, 1998.

PICCIRILLO, C. A.; LETTERIO, J. J.; THORNTON, A. M.; McHUGH, R. S.; MAMURA, M.; MIZUHARA, H.; SHEVACH, E. M. CD24+CD25+ regulatory T cells mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor β 1 production and responsiveness. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 196, n. 2, p. 237-245, 2002.

PIPKORN, U.; HAMMARLUND, A.; ENERBACK, L. Prolonged treatment with topical corticosteroids results in an inhibition of the allergen-induced wheal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 19-25, 1989.

PITZURRA, L.; VECCHIARELLI, A.; PEDUCCI, R.; CARDINALI, A.; BISTONI, F. Identification of a 105kDa *Cryptococcus neoforms* mannoprotein involved in human cell-mediated immune response. **Journal of Medicine and Veterinary Mycology**, v. 35, n. 4, p. 299-303, 1997.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W.; ALBERSE, R.; CHAPMAN, M. Indoor allergens and asthma. Report of a Third International Workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 100, p. S1–S24, 1997. Supplement 6.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; SPORIK, R. B.; WHEATLEY, L. M.; HEYMANN, P. W. Is there a dose-response relationship between exposure to indoor allergens and symptoms of asthma? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 96, n. 4, p. 435-440, 1995.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; CHAPMAN, M. D. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control [Review]. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 80, n. 6, p. 755-775, 1987.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; RODRIGUES, E. G.; CARMONA, A. K.; OLIVEIRA, M. C.; JULIANO, L. Purification of the specific exocellular antigen gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological and proteolytic activities, In: MARESKA, B.; KOBAYASHI, G. S. (ed.) **Molecular biology of pathogenic fungi: a laboratorial manual**. New York: Telos Press, p. 507-515. 1994.

PUERTA, L.; LAGARES, A.; MERCADO, D.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; CARABALLO, L. Allergenic composition of the mite *Suidasia medanensis* and cross-reactivity with *Blomia tropicalis*. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 1, p. 41-47, 2005.

PUERTA, L.; CARABALLO, L.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; AVJIOGLO, A.; MARSH, D.; LOCKEY, R. F.; DAO, M. L. Nucleotide sequence analysis of a complementay DNA coding for *Blomia tropicalis* allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 98, p. 932-937, 1996.

RAMOS, J. D. A.; TEO, A. S. M.; OU, K. L.; TSAI, L. C.; LEE, B. W.; CHEONG, N.; CHUA, K. Y. Comparative allergenicity studies of native and recombinant *Blomia tropicalis* Paramyosin (Blo t 11). **Allergy**, Copenhagen, v. 58, p. 412-419, 2003.

RAMOS, J. D. A.; NGE, C.; WAH, L. B.; YAN, C. K. cDNA cloning and expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 126, p. 186-193, 2001.

RING, J.; KRÄMER, U.; SCHÄFER, T.; BEHRENDT, H. Why are allergies increasing? **Current Opinion in Immunology**, London, v. 13, n. 6, p. 701-708, 2001.

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

ROMAGNANI, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 12, p. 227-257, 1994.

RULLO, V. E. V.; RIZZO, M. C.; ARRUDA, L. K.; SOLÉ, D.; NASPITZ, C. K. Daycare centers and schools as sources of exposure to mites, cockroach, and endotoxin in the city of São Paulo, Brazil. **Jornal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 110, n. 4, 2002.

RUSCONI, F.; GALASSI, C.; CORBO, G. M.; FORASTIERE, F.; BIGGERI, A.; CICCONE, G.; RENZONI, E. Risk factors for early, persistent, and late-onset wheezing in young children. SIDRIA Collaborative Group. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 160, n. 5, p. 1617-1622, Nov. 1999.

SAVOLAINEN, J. A standardized densitometric immunoblotting analysis of *Candida albicans* protein allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 25, p. 357-363, 1995.

SCRIBA, G. K. E. Affinity Chromatography. In: DINGERMAN, T.; STEINHILBER, D.; FOLKERS, G. **Molecular Biology in Medical Chemistry**, 1. ed, Washington: Wiley-VCH, 2004, p. 211-224.

SEARS, M. R.; HERVISON, G. P.; HOLDAWAY, M. D. The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite, and cat dander in the development of childhood asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 419-24, 1989.

SILVA, D. A. O.; GERVÁSIO, A. M.; SOPELETE, M. C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; SUNG, S. S. J.; 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**, McLean, v. 86, n. 5, p. 545-550, 2001.

SLOTT, R. I.; ZWEIMAN, B. A Controlled study of the effect of corticosteroids on immediate skin test reactivity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 54, n. 4, p. 229-235, 1974.

SLUNT, J. B.; TAKETOMI, E. A.; WOODFOLK, J. A.; HAYDEN, M. L.; PLATTS-MILLS, T. A. E. The immune response to *Trichophyton tonsurans*. Distinct T cell cytokine profiles to a single protein among subjects with immediate and delayed hypersensitivity. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, n. 4, p. 5192-5197, 1996.

SMITH, J. M.; DISNEY, M. E.; WILLIAMS, J. D. Clinical significance of skin reactions to mite extracts in children with asthma. **British Medical Association**, London, v. 1, n. 659, p. 723-726, 1969.

SOUZA, M. A. **Lectina KM de *artocarpus integrifolia* induz produção de interleucina e proteção contra a infecção por *Leishmania major***. Ribeirão Preto, SP, p.123. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1998.

SQUILLACE, S. P.; SPORIK, R. B.; RAKES, G.; COUTURE, N.; LAWRENCE, A.; MERRIAM, S.; ZHANG, J.; PLANTTS-MILLS, T. A. E. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 156, p. 1760-1764, 1997.

STEWART, G. A.; TURNER, K. J. Physicochemical and immunochemical characterization of the high molecular weight allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* with particular reference to the tridacnin, Con-A and S107 reactive components. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, Adelaide, v. 58, n. 3, p. 275-288, 1980.

STORER, T. **Zoologia geral**. 6.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. 770 p.

TAKETOMI, E. A.; MOREIRA, M. R.; SILVA, D. A. O.; GERVÁSIO, A. M.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D. IgE antibody response to *D. pteronyssinus* and *B. tropicalis*, and to recombinant Der p 5 and Blo t 5 allergens among asthmatic patients in Brazil [Abstract]. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 103, n. 3, p. 244-245, 1999.

TERR, A. I. Mechanisms of hypersensitivity. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Medical Immunology**. 9.ed. Stamford: Appleton & Lange, p.376-388, 900p, 1997.

VALENTA, R.; SPERR, R.; FERREIRA, F.; VALENT, P.; SILLABER, C.; TEJKL, M.; DUCHÊNE, M.; EBNER, C.; LECHNER, K.; KRAFT, D.; SCHEINER, O. Induction of specific histamine release from basophils with purified natural and recombinant birch pollen allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 91, n. 1, p. 88-97, 1993.

VAN BRONSWIJK, J. E. M. H.; DE COCK, A. W. A. M.; ISHIMA, S. The genus *Blomia oudemans* (Acari: Glycyphagidae). I. Description of *Blomia tropicalis* sp. n. from house dust in tropical and subtropical regions. **Acarologia**, Paris, v. 15, n. 5, p. 477-489, 1973.

VERMA, J.; PASHA, S.; GANGAL, S.V. Purification and characterization of Fus sI₃₅₉₆, a 65kDa allergen of *Fusarium solani*. **Mol Cell. Biochem.**, v. 131, p. 157-166, 1994.

VIGNOLA, A. M.; CHANEZ, P.; GODARD, P.; BOUSQUET, J. Relationships between rhinitis and asthma. **Allergy**, Copenhagen, v. 53, n. 9, p. 833-839, Sep. 1998.

WEBER, A.; SCHRODER, H.; THALBERG, K. Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. **Allergy**, Copenhagen, v. 42, n. 6, p. 464, 1987.

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

WHISLER, R. L.; YATES, A. J. Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. I - Characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 125, p. 2106-2111, 1980.

WOOLCOCK, A. J. The busben of asthma. **American Concrete Institute Supplement**, Michigan, v. 1, p. 53-56, 2000.

WORM, M.; HEINZ, B. M. Molecular regulation of IgE synthesis. **Journal of Molecular Medicine**, Amsterdam, v. 75, p. 440-447, 1997.

WU-HSIEH, B. A.; CHEN, W.; LEE, H. J. Nitric oxide synthase expression in macrophages of *Histoplasma capsulatum* – infected mice is associated with splenocyte apoptosis and unresponsiveness. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 66, n. 11, p. 5520-5526, 1998.

ANEXOS**Anexo A****Universidade Federal de Uberlândia****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP -38400-089 ☎(034) 239 4131 - 235-2078

Uberlândia, 02 de maio de 2002.

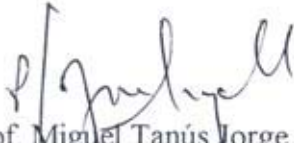
Processo nº 048/2002

PROJETO DE PESQUISA: “Caracterização da resposta imune celular a *Blomia tropicalis* a às suas frações alergênicas em pacientes atópicos”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ernesto Akio Taketomi

PARECER:

O projeto acima identificado, foi **aprovado** para ser realizado conforme os autores se comprometem.



Prof. Miguel Tanús Jorge
CEP/UFU

Anexo B



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 099/04

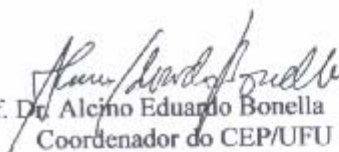
Registro CEP: 46/2000

Projeto Pesquisa: “*Identificação de frações alergênicas e avaliação da resposta imune humoral a Blomia Tropicalis*”.

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

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

Uberlândia, 10 de maio de 2004.


 Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
 Coordenador do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- 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 do 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 aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.c). 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 C



Universidade Federal de Uberlândia
 Instituto de Ciências Biomédicas
 Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
 Av. Pará, 1720, Campus Umuarama - Bloco 4C
 Uberlândia, MG - Brasil - 38.400-902
 Telefone: (34) 3218-2195 - TELEFAX: (34) 3218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado “**Caracterização da Resposta Imune Celular a *Blomia tropicalis* e às suas frações alergênicas em Pacientes Atópicos**”, O referido projeto tem como objetivo principal avaliar a resposta celular frente aos alérgenos de *Blomia tropicalis* que induzem ativação de células T e determinar o perfil de citocinas das células T circulantes de pacientes alérgicos com resposta cutânea positiva a *Blomia tropicalis*.

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:

- Necessidade de coleta de sangue para dosagem de anticorpos específicos a aeroalérgenos.
- Realização de exames complementares tais como teste cutâneo com alérgenos inaláveis.

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca 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 necessidade prévia de explicações.

Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação.

Uberlândia, ____ de _____ de 200__.

 TESTEMUNHA

 ASSINATURA

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
 Uberlândia, MG - Brasil - 38.400-902
 Telefone: (34) 3218-2195 - TELEFAX: (34) 3218-2333

Nome: _____

Data: ___/___/___

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

Sexo: () Masculino () Feminino

Grau de escolaridade: () Primeiro grau () Segundo grau () Faculdade

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).
- | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Janeiro | <input type="checkbox"/> Maio | <input type="checkbox"/> Setembro |
| <input type="checkbox"/> Fevereiro | <input type="checkbox"/> Junho | <input type="checkbox"/> Outubro |
| <input type="checkbox"/> Março | <input type="checkbox"/> Julho | <input type="checkbox"/> Novembro |
| <input type="checkbox"/> Abril | <input type="checkbox"/> Agosto | <input type="checkbox"/> Dezembro |
- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal?
- | | |
|----------|--------------------------|
| Nada | <input type="checkbox"/> |
| Pouco | <input type="checkbox"/> |
| Moderado | <input type="checkbox"/> |
| Muito | <input type="checkbox"/> |
- 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 E

Teste Cutâneo de Puntura

Data: ___/___/___

Nome: _____

Data de Nascimento: ___/___/___

Endereço: _____

Telefone: _____

Antígeno	Pápula	Eritema	Antígeno	Pápula	Eritema
<i>D. pteronyssinus</i>			<i>Periplaneta sp.</i>		
<i>D. farinae</i>			<i>B. germanica</i>		
<i>B. tropicalis</i>			<i>A. alternata</i>		
<i>Canis familiaris</i>			Controle (-)		
<i>Felis domesticus</i>			Histamina		

Valores de Referência:

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

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

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Responsável Técnico