



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Leandro Hideki Ynoue

**Perfil de reatividade de IgE, IgG4 e IgG1 ao extrato
alergênico de *Dermatophagoides farinae* em
indivíduos atópicos e não atópicos por meio de
imunoproteômica**

Uberlândia - MG
Agosto – 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Leandro Hideki Ynoue

**Perfil de reatividade de IgE, IgG4 e IgG1 ao extrato
alergênico de *Dermatophagoides farinae* em
indivíduos atópicos e não atópicos por meio de
imunoproteômica**

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas,
como parte das exigências para obtenção
do título de Doutor.

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Orientador

Prof. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva
Coorientadora

Uberlândia - MG
Agosto – 2011



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

www.imunoparasito.ufu.br - E-Mail: coipa@ufu.br - Telefax: (034)3218-2333

Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG

Leandro Hideki Ynoue

“Perfil de reatividade de IgE, IgG4 e IgG1 ao extrato alergênico de *Dermatophagoides farinae* em indivíduos atópicos e não atópicos por meio de imunoproteômica”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 12 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Keity Souza Santos
USP/SP

Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso
USP/RP

Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Fouad Salmen Espíndola
INGEB /UFU

Prof. Dr. Ernesto Akio Taki - orientador
ICBIM/UFU

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

Y53p Ynoue, Leandro Hideki, 1987-
Perfil de reatividade de IgE, IgG4 e IgG1 ao extrato alergênico de
Dermatophagoides farinae em indivíduos atópicos e não atópicos por
meio de imunoproteômica / Leandro Hideki Ynoue. - 2011.
96 f. : il.

Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
Co-orientadora: Deise Aparecida de Oliveira Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Alergia - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Silva, Deise Aparecida de Oliveira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 616-056.3

À toda minha família, em especial meu avô João Alves, que sempre me chamava de “Doutor”.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente;

Aos meus familiares que sempre me apoiaram. Aos meus pais, Pedro e Selma, que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo. Aos meus irmãos Rodrigo e Isadora, por sempre torcerem por mim. Ao meu sobrinho e afilhado Álvaro, pelos momentos de alegria;

Um agradecimento especial à minha amada namorada, Isabella Lima Siman, que também faz parte do meu convívio científico, pelo amor, confiança e incentivo;

Ao meu orientador, professor Dr. Ernesto Akio Taketomi, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, pela orientação e principalmente pelo bom convívio por todos esses anos de trabalho;

À Professora Dra. Deise Aparecida Oliveira Silva, minha co-orientadora, pela competência científica e orientação dada, e que me ensinou com prazer e dedicação parte do que sei, bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas;

À Professora Dra. Mônica Camargo Sopelete pelos ensinamentos, amizade, bom humor, puxões de orelha e pelo exemplo de profissionalismo;

Aos Professores Dr. Adriano Mota Loyola e Dr. José Roberto Mineo pela disponibilização do laboratório e de equipamentos para a realização de parte dos experimentos, principalmente durante o período de reforma do Laboratório de Alergia;

Aos membros da banca de qualificação: Prof. Dr. Carlos Veira Viera, Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior e Prof. Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo; por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho e suas valiosas sugestões;

Aos membros da banca de defesa da tese: Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, Prof. Dr. Foued Salmen Espinolá, Profa. Dra. Keity Souza Santos e Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza, pelo aceite em compor a banca examinadora, colaborando para o aprimoramento deste trabalho;

Aos que já passaram e aos que ainda compõem o grupo da Alergia: Ana Carolina, Bia, Bárbara, Cristiane, Daniela, Danielle, Diego, Jorge, Juliana, Karine, Laura, Lucas, Priscila, Meimei, Núbia, Rafael e Ronaldo, pela alegre convivência e sugestões; e alguns destes foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas de outros laboratórios: Ana Cláudia, Caroline, Cristina, Dâmaso, Gabriele, Fernanda, Fernando, Hercílio, Janaína, Mariana, Nágilla e Silas, pelos momentos de descontração e de ajuda mútua;

Aos técnicos de laboratório: Ângela, Edilge, Marley e Zilda pelos grandiosos serviços prestados para o bom funcionamento dos laboratórios;

Ao secretário do laboratório Max e às secretárias do Programa de Pós-Graduação Luceleide e Lucélia, pela atenção e disponibilidade;

Aos pacientes alérgicos atendidos pelo HC-UFG e todas as pessoas que doaram o material biológico necessário para a execução deste estudo.

“Só aqueles que têm paciência para fazer coisas simples com perfeição é que irão adquirir habilidade para fazer coisas difíceis com facilidade.”

Johann Christoph Friedrich von Schiller (1759-1805)

RESUMO

O ácaro *Dermatophagoides farinae* (Df) é considerado um dos principais ácaros da poeira domiciliar e uma importante fonte de alérgenos respiratórios do mundo todo. Alguns alérgenos de Df aparecem na forma de isoalérgenos que apresentam mudanças na sequência de aminoácidos ou glicosilação, que pode causar diferenças na sensibilização alergênica. O objetivo deste estudo foi investigar a reatividade dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 às isoformas antigênicas de Df em pacientes atópicos e indivíduos não atópicos, com potencial aplicação para diagnóstico de alergia e para imunoterapia alérgeno específica. Indivíduos atópicos (n=60) e não atópicos (n=30) foram selecionados com base no histórico clínico de alergia respiratória e teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a alérgenos de Df. Os soros dos indivíduos do estudo foram analisados por ELISA para quantificação dos níveis de IgE, IgG1 e IgG4 aos alérgenos de Df. O extrato total de Df foi separado por eletroforese uni- (1-D) e bi- (2-D) dimensionais e subsequentemente analisado por *immunoblot* 1-D e 2D para avaliação do perfil de IgE, IgG1 e IgG4 que reconheceram os componentes do extrato alergênico de Df no soro dos indivíduos atópicos e não atópicos. Os níveis de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a Df bem como as frequências no perfil de reatividade 1-D foram usados para selecionar os soros utilizados na análise imunoproteômica. O perfil de reatividade de IgE, IgG1 e IgG4 no *immunoblot* 2-D mostrou interessantes padrões de reconhecimento e alguns *spots* puderam ser relacionados a alérgenos hipotéticos conhecidos. Componentes que foram reconhecidos somente por IgE e por IgE/IgG4 no grupo atópico migraram exclusivamente abaixo de 37 kDa enquanto que a ligação somente para IgG1 migrou apenas acima desse limiar. A análise imunoproteômica tanto no grupo atópico quanto no não atópico mostrou um grande número de componentes antigênicos e a maioria deles pode ser relacionada a alérgenos hipotéticos conhecidos. Além disso, a imunoreatividade dessas proteínas pode ser útil para o sorodiagnóstico e abre oportunidades para o desenvolvimento de componentes para a realização de imunoterapia personalizada para pacientes com doenças alérgicas.

Palavras-chave: *Dermatophagoides farinae*; alérgenos; imunoproteômica; Anticorpos IgE, IgG1 e IgG4; *immunoblot* 2-D

ABSTRACT

Dermatophagoides farinae (Df) is considered one of the major house dust mite and it is an important source of indoor allergens worldwide. Several Df allergens occur as isoallergens that present changes in amino acid sequences or glycosylation, leading to differences in allergen sensitization. The aim of this study was investigate the reactivity of IgE, IgG1 and IgG4 antibodies to Df antigenic isoforms in Brazilian atopic and non-atopic subjects, with potential application for the allergy laboratorial diagnosis and follow-up of specific allergen immunotherapy. Atopic (n=60) and non-atopic (n=30) subjects were selected on the basis of the respiratory allergy history and skin prick test (SPT) to house dust mite allergens. Sera were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring levels of IgE, IgG1 and IgG4 antibodies to Df allergen. Crude Df extract was separated by one (1-D)- and two (2-D)-dimensional electrophoresis with subsequent 1-D and 2-D immunoblot for evaluating the profile of IgE-, IgG1-, and IgG4-binding components from the Df allergen extract in sera from atopics and non-atopics. Levels of IgE, IgG1 and IgG4 specific to Df and frequencies of 1-D reactivity profile were used to select sera to immunoproteomic analyses. 2-D IgE, IgG1 and IgG4 reactivity profile shown interestingly patterns of recognition and some spots could be related to hypothetical allergens. Single IgE and double IgE/IgG4 binding in atopic migrated only below 37 kDa and single IgG1 binding migrated exclusively above 37 kDa. The immunoproteomics approach in both atopic and non-atopic groups showed a great number of antigenic components and the most of them could be related to a known hypothetical allergen. In addition, the immunoreactivity of these proteins observed may be potentially useful for serodiagnosis and opens further opportunities for the development of a personalized immunotherapeuticalcomposition for treating patients with allergic disease.

Keywords *Dermatophagoides farinae*; allergens; immunoproteomic; IgE, IgG1 and IgG4 antibodies; 2-D immunoblot

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Subpopulações de linfócitos T CD4+.	24
Figura 2. Classificação taxonômica do ácaro <i>Dermatophagoides farinae</i> .	33
Figura 3. Níveis de IgE, IgG4 e IgG1 a <i>Dermatophagoides farinae</i> (Df) expressos em índice ELISA (IE) no soro de pacientes atópicos (n = 60) e indivíduos não atópicos (n = 30).	52
Figura 4. Correlação e associação entre os níveis de IgE, IgG4 e IgG1 específicos a <i>Dermatophagoides farinae</i> (DF) nos pacientes atópicos (A , B e C) e indivíduos não atópicos (D).	54
Figura 5. Eletroforese e <i>immunoblot</i> uni-dimensionais (1-D) do extrato de <i>Dermatophagoides farinae</i> (Df). (A) MW, marcadores de peso molecular em kiloDaltons (kDa) à esquerda; o extrato total de Df foi separado por SDS-PAGE gradiente 9-17% e corado por Blue silver.	55
Figura 6. Frequências (%) dos componentes reconhecidos por anticorpos IgE(A), IgG1(B) e IgG4(C) específicos ao extrato de <i>Dermatophagoides farinae</i> (Df) em amostras de soros de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos por <i>immunoblot</i> 1-D.	56
Figura 7. Perfil eletroforético 2-D do extrato de <i>D. farinae</i> .	57
Figura 8. Perfis de <i>immunoblot</i> 2-D do extrato de <i>D. farinae</i> para a reatividade de IgE, IgG4 e IgG1 no soro de pacientes atópicos (A) com um <i>blot</i> representativo para cada isotipo de anticorpo. (B) Gel 2-D corado por <i>Blue silver</i> mostrando <i>spots</i> protéicos que foram reativos a IgE, IgG4 e/ou IgG1 após <i>matching</i> com o <i>immunoblot</i> 2-D correspondente.	62
Figura 9. Diagrama de Venn mostrando o número de <i>spots</i> antigênicos exclusivos e compartilhados entre os isotipos de anticorpos (IgE, IgG1 e IgG4) específicos a <i>D. farinae</i> que foram reconhecidos por anticorpos de indivíduos atópicos em <i>immunoblot</i> 2D.	63
Figura 10. Perfis de <i>immunoblot</i> 2-D do extrato de <i>D. farinae</i> para a reatividade de IgG4 e IgG1 no soro de indivíduos não atópicos (A), com um <i>blot</i> representativo para cada isotipo de anticorpo. (B) Gel 2-D corado por <i>Blue silver</i> mostrando <i>spots</i> protéicos que foram reativos a IgG4 e/ou IgG1 após <i>matching</i> com o <i>immunoblot</i> 2-D correspondente.	64
Figura 11. Diagrama de Venn mostrando o número de <i>spots</i> antigênicos exclusivos e compartilhados entre os isotipos de anticorpos (IgG4 e IgG1) específicos a <i>D. farinae</i> que foram reconhecidos por anticorpos de indivíduos não atópicos em <i>immunoblot</i> 2D.	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tipos de alergias e seus sintomas característicos.

19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades bioquímicas e reatividade à IgE dos alérgenos de <i>D. farinae</i> .	35
Tabela 2. Características clínicas e demográficas dos pacientes participantes no estudo.	41
Tabela 3. Lista das proteínas hipotéticas de <i>Dermatophagoides farinae</i> reconhecidas por anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos após análise imunoproteômica (área I do gel 2-D).	59
Tabela 4. Lista das proteínas hipotéticas de <i>Dermatophagoides farinae</i> reconhecidas por anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos após análise imunoproteômica 2-D (área II do gel 2-D).	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-D	Unidimensional
2-D	Bidimensional
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3 etilbenzotiazolino-6 sulfônico (2,2'- <i>azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i>)
Amb a	Alérgeno de <i>Ambrosia artemisiifolia</i>
AMP	Adenosina monofosfato
APC	Célula apresentadora de antígeno
APS	Persulfato de amônia
BBS	Salina tamponada com borato
Bet v	Alérgeno de <i>Betula verrucosa</i>
BSA	Soro albumina bovina
Ca	Cálcio
CD	Grupo de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>)
DAB	3,3'- diaminobenzidina
DC	Célula dendrítica
Der f	Alérgeno de <i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
Fc ϵ RI	Receptor de IgE de alta afinidade do tipo I
Fel d	<i>Felis domesticus</i>
g	Aceleração da gravidade
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
HCl	Ácido clorídrico
IE	Índice Elisa
IEF	Focalização isoelettrica
IgA	Imunoglobulina da classe A

IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da classe G subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina da classe G subclasse 4
IL	Interleucina
IPG	Gradiente de pH imobilizado
ISAAC	Estudo Internacional da Asma e Alergias na Infância (<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>)
I.I.U.S	União Internacional das Sociedades de Imunologia (<i>International Union of Immunology Societies</i>)
Mr	Massa molecular relativa
PBS	Solução salina tamponada com fostatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e leite desnatado em pó
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fenilmetilsulfonil (<i>Phenylmethylsulfonyl</i>)
R _F	mobilidade relativa
R _S	coeficiente de correlação de Spearman
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TCA	Ácido tricloroacético
TCP	Teste cutâneo de puntura
TEMED	N,N,N,N-tetrametilelenodiamina
TGF	Fator de transformação de crescimento (<i>Transforming Growth Factor</i>)
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
Th22	Linfócito T <i>helper</i> 22
Th9	Linfócito T <i>helper</i> 9
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)

Treg	Linfócito T regulador
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Hidroximetil-aminometano contendo HCl
Tween 20	Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)

SUMÁRIO

1 Introdução	18
1.1 Doenças alérgicas	19
1.2 Atopia e alergia.....	20
1.3 Exposição e sensibilização alergênicas	22
1.4 O sistema imune e a resposta alérgica	23
1.5 Fisiopatologia da reação alérgica	27
1.6 Ácaros da poeira domiciliar.....	29
1.7 Alérgenos.....	31
1.8 <i>Dermatophagoides farinae</i> e seus principais alérgenos	33
2 Objetivos.....	37
3 Material e Métodos	39
3.1 Pacientes e indivíduos controles.....	40
3.2 Teste cutâneo de punctura	40
3.3 Coleta de sangue	42
3.4 Obtenção do extrato antigênico	42
3.5 Dosagem protéica	43
3.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos séricos IgE, IgG4 e IgG1 anti- <i>D. farinae</i>	43
3.7 Eletroforese e <i>immunoblot</i> unidimensionais (1-D).....	45
3.8 <i>Immunoblot</i> 1-D.....	46
3.9 Eletroforese e <i>immunoblot</i> bidimensionais (2-D).....	47
3.10 Focalização isoelétrica e SDS-PAGE 2-D.....	48
3.11 <i>Immunoblot</i> 2-D.....	49
3.12 Análise de imagens	49
3.13 Análise estatística	50
3.14 Normas de biossegurança	50
4 Resultados.....	51
4.1 Níveis de anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 específicos a <i>D. farinae</i>	52
4.2 Perfil eletroforético e de <i>immunoblot</i> 1-D de <i>D. farinae</i>	53
4.3 Perfil eletroforético e de <i>immunoblot</i> 2-D de <i>D. farinae</i>	57
5 Discussão	66
6 Conclusões.....	75
7 Referências Bibliográficas.....	77
Anexos	91
ANEXO 1	92
ANEXO 2	93
ANEXO 3	94

1 Introdução



1.1 Doenças alérgicas

O impacto físico e psicológico de conviver com um tipo de alergia pode ser enorme, com consequências agravantes na qualidade de vida. Enquanto alguns sintomas alérgicos podem ser moderados, outros são graves e extremamente debilitantes. Atualmente, indivíduos com alergias tendem a apresentar mais de uma condição alérgica (polissintomáticos), particularmente, a rinite alérgica se apresenta concomitante com asma (43%), eczema (32%), alergia alimentar (29%) e urticária (19%) (VALOVIRTA; MYRSETH; PALKONEN, 2008).

O tipo de alergia que um paciente pode apresentar depende intimamente da sintomatologia apresentada quando exposto ao agente causador. Os tipos de alergias e seus respectivos sintomas estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Tipos de alergias e seus sintomas característicos.

Condição	Sintomas
Rinite alérgica	Espirros repetitivos; bloqueio, corrimento ou prurido nasal; alteração no olfato e no paladar; e dificuldade respiratória.
Rinoconjuntivite alérgica	Sintomas nasais da rinite alérgica acompanhados por lacrimejamento e prurido, ou dor e inchaço nos olhos.
Asma alérgica	Dificuldade em respirar, falta de ar, tosse e aperto no peito.
Eczema ou dermatite	Prurido grave, secura e descamação excessiva da pele.
Urticária	Pápulas intensamente pruriginosas (erupções) na pele.
Anafilaxia	Inchaço por edema da boca, língua, lábios, pele e pálpebras progredindo para vômitos, sibilos, dificuldade respiratória, colapso cardiovascular e morte.
Alergia alimentar	Os sintomas variam de acordo com a gravidade da reação, mas podem incluir uma combinação das opções acima, além de sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia.

Fontes: Blaiss (2007); Hamid; Tulic (2009); Kemp (2009); Demain; Minaei; Tracy (2010); Worth; Sheikh (2010); Schaefer (2011).

1.2 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).

O termo atopia foi primeiramente empregado por Coca e Cooke em 1923, para descrever um grupo de doenças que apresentavam, em comum, um mecanismo fisiopatológico envolvendo reações de hipersensibilidade do tipo I, onde os indivíduos apresentavam testes cutâneos positivos para aeroalérgenos e história familiar de asma e/ou rinite e/ou dermatite atópica (COCA; COOKE, 1923 apud JOHANSSON et al., 2001).

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 (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.

No Brasil, os estudos de prevalência alérgica mostram dados relevantes. Lugares públicos, como escolas, creches, hotéis, ônibus e taxis são considerados locais de grande fonte de ácaros da poeira domiciliar e baratas (RULLO et al., 2002; PEREIRA et al., 2004; SIMPLICIO et al., 2007) 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; WILLIANS, 1969; SEARS; HERVISON; HOLDAWAY, 1989).

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).

Alergia é a manifestação clínica da atopia causada por uma resposta exagerada do sistema imune a substâncias normalmente inofensivas (alérgenos) (ARSHAD, 2010). Asma e rinite alérgicas são as manifestações mais comuns de doença clínica após exposição aos alérgenos do meio ambiente, enquanto dermatite atópica é a menos frequente. Duas ou mais formas clínicas de atopia podem coexistir no mesmo paciente e ao mesmo tempo, ou em diferentes tempos no curso da doença, podendo ainda ser assintomática (TERR, 1997b).

A rinite pode ser classificada em alérgica e não alérgica e seus sintomas característicos são obstrução nasal e corrimento nasal. Além disso, a rinite alérgica pode ser diferenciada em perene ou sazonal e apresentar outros sintomas como espirros e prurido nas vias aéreas superiores, nos olhos e na faringe (KEMP, 2009). Além disso, a rinite alérgica é a condição crônica alérgica mais comum encontrada na prática médica. Sua incidência é crescente em paralelo com outras doenças mediadas por IgE, afetando de 10 a 30% dos adultos e acima de 40% das crianças. (BERGER, 2003).

1.3 Exposição e sensibilização alergênicas

A exposição a um alérgeno pode acontecer através de inalação, ingestão, injeção ou contato com a pele ou mucosas (TERR, 1997a) e a sensibilização a um determinado alérgeno ambiental é o resultado de uma complexa inter-relação das propriedades físicas e químicas de um dado alérgeno, do modo e da quantidade de exposição, bem como dos fatores genéticos próprios do indivíduo exposto (TERR, 1997b).

Os estilos de vida têm sofrido dramática mudança durante os últimos 30 anos. A maioria dos indivíduos passou a permanecer até 20 horas em ambientes internos "domiciliares" (no interior de casas e estabelecimentos) (PLATTS-MILLS, 1994). Com este novo estilo de vida, 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 ambientes de casa ou do trabalho e subsequentemente são inalados pelos seus usuários. Consequentemente, estas alterações ambientais têm contribuído grandemente para aumentar a prevalência tanto da sensibilização alergênica 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.

Acredita-se que a exposição alergênica exerce três importantes papéis no desenvolvimento da alergia respiratória: (a) a exposição a um dado alérgeno, particularmente na infância, induzirá em indivíduos geneticamente susceptíveis, o desenvolvimento de hipersensibilidade mediada por IgE; (b) em indivíduos susceptíveis, a exposição contínua ao alérgeno leva à hipersensibilidade das vias aéreas; e (c) muitos dos pacientes com hiper-

reatividade brônquica têm crises recorrentes de obstrução aérea, que podem ser desencadeados por múltiplos fatores, como ar frio, fumaça de cigarro (passivo), estresse e variações diurnas (PLATTS-MILLS; MITCHELL; TOVEY, 1984).

Em um estudo de caso, Gehring e colaboradores (2001) demonstraram a relação entre exposição aos alérgenos domiciliares e sintomas respiratórios. A exposição aos alérgenos de ácaros da poeira domiciliar aumentou o risco de sibilos e dispneia e alérgenos de gatos estavam associados à tosse noturna, mesmo naqueles indivíduos não sensibilizados. Indivíduos expostos a concentrações elevadas de mais de um alérgeno tiveram quase sete vezes mais riscos de apresentarem sintomas respiratórios, comparados àqueles não expostos. Ademais, relata-se que esporos de fungos e alérgenos de gatos constituem um importante fator de risco para sensibilização e que grande parte da prevalência de asma pode ser devida a alérgenos de ácaros (DHARMAGE et al., 2001). É importante ressaltar que, segundo o Instituto de Medicina (2000), níveis de alérgenos de ácaros com valores superiores a 2 µg/g de poeira são suficientes para que um indivíduo predisposto possa se sensibilizar. Para alérgenos de animais de estimação, estes valores são reduzidos a 1 µg/g de poeira.

1.4 O sistema imune e a resposta alérgica

O desencadeamento de uma resposta alérgica depende da natureza do estímulo抗原 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.

As subpopulações de linfócitos T CD4+ (Th = T *helper*) são categorizados com base nas suas funções celulares distintas e na capacidade de secreção de citocinas como mostrados na figura 1.

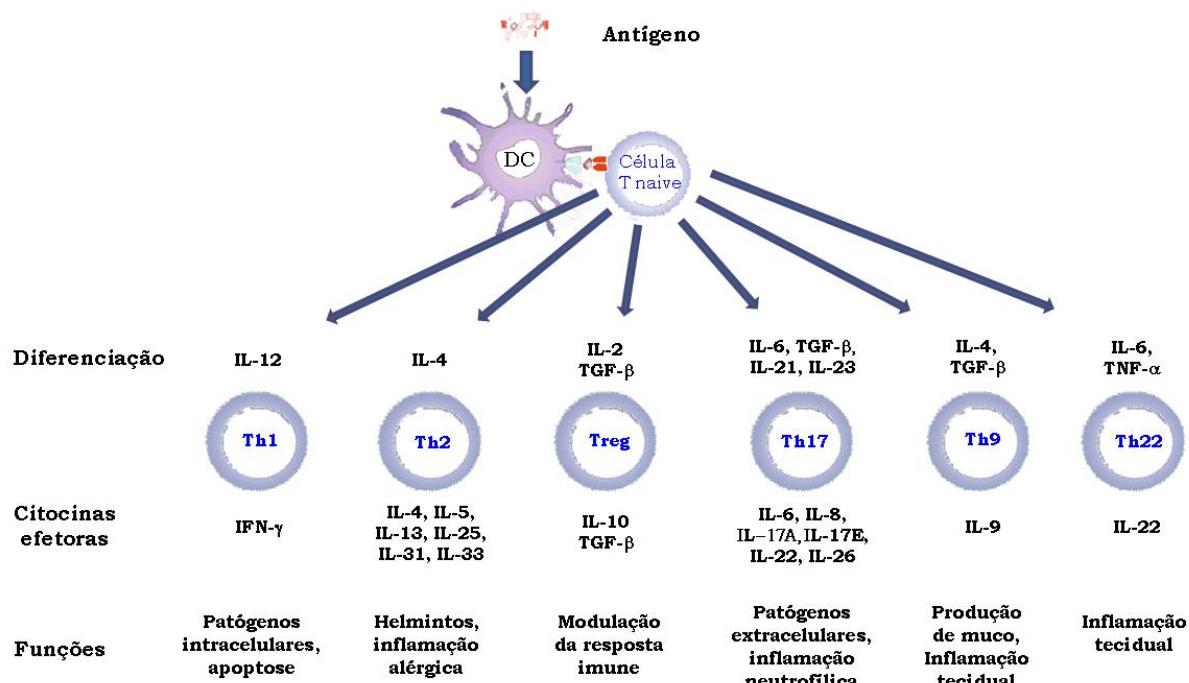


Fig. 1. Subpopulações de linfócitos T CD4+. Adaptado de Jutel; Akdis, 2011.

Existem dois tipos de células Th bem caracterizados e com funções antagônicas, Th1 e Th2. As células Th1 estão envolvidas na defesa mediada por células contra microrganismos intracelulares e na promoção de respostas IgG. Seu fenótipo é dominado pelas citocinas IL-2, IFN-γ, e TNF-β. As células Th1 são diferenciadas após o estímulo com IL-12, IL-18, e IL-17. Também deve ser enfatizado que as células Th1 participam nos mecanismos efetores das doenças alérgicas, como indução de apoptose de queratinócitos na dermatite atópica bem como do epitélio e das células musculares lisas dos brônquios na asma (JUTEL; AKDIS, 2011).

As células Th2 predominantemente medeiam respostas por IgE e a inflamação alérgica, e também então envolvidas na imunidade à parasitas. O fenótipo de células Th2 é caracterizado pela secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-4, IL-5, e IL-13, as quais estão agrupadas no cromossomo 5q, muito próximos do GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos). Essas citocinas estão associadas com a patogênese da IgE e a eosinofilia. Os fatores que polarizam para o perfil Th2 incluem o MCP-1 (Proteína quimiotática de monócitos-1) e o ligante de OX40, o qual está diretamente relacionado com a exacerbação a produção de IL-4 (JUTEL; AKDIS, 2011). Além disso, 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; PILLAI, 2008).

A presença de IFN- γ , produzido por células Th1 inibe a síntese de IgE pelas células B (BOUSQUET et al., 2000). 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 relatados como inibidores da 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; HENZ, 1997).

Outra subpopulação de células T bem caracterizada é a chamada Treg (células T regulatórias) que são caracterizadas por sua capacidade de secreção de IL-10 e TGF- β (fator de transformação do crescimento). Elas possuem a habilidade de controlar e modificar o desenvolvimento das doenças alérgicas alterando algumas das principais vias de sensibilização bem como as fases efetoras da resposta (PALOMARES, et al., 2010). As Treg diminuem as propriedades inflamatórias bem como a capacidade das células dendríticas na diferenciação de células Th2 efetoras, além de promover o desenvolvimento de células dendríticas tolerogênicas (WING et al., 2008). Além disso, as Treg diretamente inibem a

ativação de células Th2 alérgeno-específicas, minimizando então a produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9, que são citocinas essenciais durante a fase efetora das reações alérgicas (AKDIS, et al., 2004; JUTEL, et al., 2003). As Treg também suprimem a inflamação alérgica através da ação direta nos mastócitos, basófilos e eosinófilos (GRI et al., 2008; NONAKA et al., 2008) e exercem um efeito direto nas células B, suprimindo a produção de IgE alérgeno específica e induzindo IgG4 (MEILER et al., 2008).

Atualmente, novas subpopulações de Th têm sido caracterizadas com importantes papéis na resposta imune. As células Th17 exercem proteção contra patógenos extracelulares e participa na inflamação tecidual (BETTELLI et al., 2006; SCHMIDT-WEBER; AKDIS; AKDIS, 2007) e também tem sido relacionadas na patogênese de doenças autoimunes (HARRINGTON et al., 2005). A diferenciação das células Th17 é induzida por IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- β (AKDIS; AKDIS, 2009) e elas são caracterizadas pela alta capacidade em produzir IL-17. Na alergia, a IL-17 participa no influxo de granulócitos em modelo de inflamação das vias aéreas (HELLINGS et al., 2003; SERGEJEVA et al., 2005). Alguns estudos demonstram que a IL-17 E (IL-25), um membro da família IL-17, possui um importante papel na asma alérgica. A administração de IL-25 nos pulmões de camundongos resultou em eosinofilia, aumento de IgE e IgG1 séricas, elevou a expressão tecidual de IL-4, IL-5, e IL-13, além de hipertrofia das células epiteliais e secreção exacerbada de muco. (HURST et al., 2002; DONG, 2008).

Mais recentemente tem sido caracterizada uma população distinta de células Th efetoras, Th9, envolvidas na inflamação tecidual (AKDIS; AKDIS, 2009). Esta população é caracterizada pela secreção de IL-9 e IL-10 e diferenciam-se após estímulo de IL-4 e TGF- β . Inicialmente foi identificada como uma subpopulação de células Th2 devido à produção em grandes quantidades de IL-9. Atualmente, é notória a participação de células Th9 como principal colaborador no desenvolvimento e na progressão de alergias, especialmente a asma.

(XING; WU; NI, 2011). Outro perfil que está sendo estudado recentemente é o de células Th22 caracterizado pela produção de IL-22. Essa citocina possui tanto propriedades pró-inflamatórias quanto protetoras, mas seus efeitos não estão completamente entendidos. Recentemente, a IL-22 foi demonstrada em regular negativamente a resposta alérgica devido ao aumento de eosinófilos após a neutralização desta citocina. No entanto, o recrutamento de neutrófilos não foi afetado pela neutralização de IL-22 (SCHNYDER; LIMA; SCHNYDER-CANDRIAN, 2010).

1.5 Fisiopatologia da reação alérgica

O primeiro contato do alérgeno com o sistema imune ocorre pela barreira do tecido epitelial. Na maioria das vezes ocorre o auxílio por parte dos neutrófilos, macrófagos e IgA secretora na neutralização e eliminação do alérgeno presente na mucosa. Os componentes alergênicos remanescentes são capturados pelas células dendríticas imaturas ou pelas células B, designadas de células apresentadoras de抗ígenos (FOKKENS, 1999). Nos indivíduos normais, a presença destes componentes induz tolerância imunológica, caracterizada pela ausência de reatividade. Já naqueles que apresentam predisposição genética para desenvolver alergia, este evento pode resultar na polarização dos linfócitos T para o perfil Th2. Nesse contexto, estudo realizado por Weidinger e colaboradores (2008) demonstrou que os polimorfismos do gene RAD50, podem afetar a expressão da cadeia alfa do receptor de alta afinidade de IgE (FCER1A).

Nos indivíduos alérgicos, mastócitos e basófilos expressam receptor de alta afinidade para o fragmento cristalizável das moléculas de IgE (Fc ϵ RI). Sabe-se que outros tipos celulares como monócitos (MAURER et al., 1994), células dendríticas circulantes (MAURER

et al., 1996), células de Langerhans (WANG et al., 1992) e eosinófilos (GOUNNI et al., 1994) também expressam receptor Fc ϵ RI.

A ligação de um antígeno a moléculas de IgE da superfície de mastócitos/basófilos gera despolarização da membrana celular, influxo de Ca $^{++}$ extracelular e posterior liberação de Ca $^{++}$ intracelular, culminando com a ativação de enzimas como miosina quinase e a fosfolipase A2, além da queda dos níveis intracelulares de AMP cíclico (KINET, 1999; TURNER; KINET, 1999; KALESNIKOFF; GALLI, 2008).

A exocitose de histamina e outros mediadores pré-formados promovem aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema e contração de músculos lisos, fenômenos esses responsáveis pelas manifestações das reações de hipersensibilidade do tipo I ou imediata (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008), ocorrendo nos primeiros 30 minutos após a exposição alergênica. Nas doze horas que se sucedem, ocorre uma progressiva infiltração tecidual de células inflamatórias, como neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares em resposta a mediadores químicos (TERR, 1997a).

Nos mastócitos, o resultado da ativação é a produção de mediadores lipídicos, como prostaglandinas D2 (PGD₂) ou leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTB₄) e a produção de grânulos secretores (SAMPSON, 2000; MARSHALL, 2004; KALESNIKOFF; GALLI, 2008). Os principais mediadores da resposta de fase tardia na hipersensibilidade imediata são as citocinas do tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13), os quimiotáticos celulares e as moléculas de adesão (GALLI; LANTZ, 1999).

A intensidade da resposta imune a alérgenos é decisiva no desenvolvimento de uma condição alérgica sabidamente mediada por IgE, ou de uma condição saudável. Outras classes de anticorpos têm sido analisadas frente a esta variação de resposta, como IgA e as subclasses de IgG (BATARD et al., 1993; BATARD et al., 2006; JACKOLA et al., 2002). Esta classe de

imunoglobulina apresenta subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) estabelecidas e nomeadas de acordo com a cronologia do descobrimento, sendo elas produto da duplicação do gene da imunoglobulina G segundo Flanagan e Rabbitts (1982), sendo a IgG1 a mais abundante (>50%) comparada às outras subclasses (AALBERSE et al., 2009).

Em indivíduos saudáveis, a resposta de células B a alérgenos provenientes de ácaros da poeira domiciliar varia entre ausência de resposta, ou produção predominantemente de anticorpos IgG alérgeno-específicos, IgG1 ou IgG4, na presença ou ausência de baixas concentrações de IgE, já em indivíduos alérgicos além da detecção de altos níveis de IgE pode ser também detectados níveis de IgG, sendo que os níveis de IgG1 são similares aos de indivíduos saudáveis, diferente de IgG4 (AKDIS, 2006; KENEMY et al., 1989). Aalberse e colaboradores (2009) ressalta que a presença de anticorpos da subclasse IgG1 é acentuada em respostas antimicrobianas geralmente regidas pelo perfil Th1, o que tem sido também demonstrado para a produção de anticorpos IgG1 a antígenos associados a respostas alérgicas suscitada por um milieu Th1, em especial IFN γ . Altas doses de alérgenos podem favorecer a indução de uma resposta do tipo Th1, e alguns estudos com aeroalérgenos sugerem que a exposição ao alérgeno pode favorecer tolerância imunológica (SECRIST; DEKRUYFF; UMETSU, 1995; PERZANOWSKI et al., 2002). Dentre as funções desempenhadas pela subclasse IgG1 está a potencialidade de agir como bloqueadora via competição direta por compartilharem a mesma especificidade a epítopos ligantes de IgE (DEVEY; WILSON; WHEELER, 1976; BOLUDA; CUADRA; BERRENS, 1996).

1.6 Ácaros da poeira domiciliar

A poeira domiciliar consiste de partículas em suspensão de fontes orgânicas e inorgânicas. Segundo Seltzer (1994), a poeira doméstica é uma mistura de fibras vegetais,

fibras de carpetes, partículas de móveis estofados, areia, terra, peças do vestuário, escamação humana, restos alimentares, resíduos químicos e produtos de vários microrganismos (bactérias, vírus e fungos) e macrorganismos (animais domésticos, insetos e aracnídeos).

Ao contrário do que se acredita, os ácaros de uma forma geral, não são tão próximos filogeneticamente dos insetos, e diferem muito na sua morfologia e fisiologia. Estes microrganismos geralmente medem entre 0,1 e 0,6 mm, e não são visíveis a olho nu. Suas formas adultas possuem corpos ovais, de cor creme a um branco translúcido, possuem 4 pares de pernas e são dioicos. O período para se completar o ciclo de desenvolvimento do ácaro é incerto, em torno de 2 a 6 semanas. Estima-se que cada fêmea produza de 40 a 100 ovos durante os seus 2 a 5 meses de sobrevida (MILIÁN; DÍAZ, 2004).

Bogdanov, em 1864, descreveu dois exemplares de ácaros, de ambos os sexos, isolados de peles curtidas, aos quais denominou *Dermatophagoides*, nomeando assim o gênero. Após essa primeira descrição, Trouessart, em 1897, descreveu a espécie *Dermatophagoides pteronyssinus*, consagrando assim a denominação final da espécie, que significa, em grego, “comedor de pele sem asas” (BAGGIO; AMBROZIO; ANTILA, 1989), mais tarde a descrição da espécie *Dermatophagoides farinae* foi feita por Hughes em 1964.

Vários estudos realizados em diversas partes do mundo têm comprovado a hipótese da exposição alergênica a ácaros como fator decisivo para a sensibilização de indivíduos susceptíveis (SPORIK et al., 1990; ARRUDA et al., 1991; TUNNICLIFFE et al., 1999). Alérgenos derivados de ácaros da poeira domiciliar têm sido reconhecidos como uma importante causa na indução da síntese de IgE e *Dermatophagoides* spp. (família Pyroglyphidae) constituem a fauna predominante na poeira domiciliar do mundo todo. Segundo Platts-Mills; De Weck (1989), os ácaros *Dermatophagoides* spp. se alimentam principalmente de descamações da pele humana e de animais domésticos, sendo que em suas

fezes estão presentes os seus principais componentes capazes de induzir uma resposta imune e causar alergia em indivíduos susceptíveis e que geralmente são proteínas ou glicoproteínas.

1.7 Alérgenos

As alergias são causadas por reações imunológicas a alérgenos, que são substâncias capazes de desencadear respostas IgE específicas que, em alguns indivíduos, são suficientemente fortes para serem associadas com evidência clínica de respostas de hipersensibilidade imediata (PLATTS-MILLS; SOLOMON, 1993; CROMWELL, 1997).

Muitos alérgenos, por si só são fortes imunógenos, apresentando pesos moleculares acima de 10 kDa. Outros, porém, de pesos moleculares entre 1 e 6 kDa podem ou não ser imunógenos e, os abaixo de 1kDa geralmente não são imunogênicos. Essas moléculas de baixo peso molecular são denominadas haptenos e, quando ligadas a moléculas maiores, chamadas carreadoras, passam a desempenhar papel imunogênico (BENJAMINI; LESKOWITZ, 1998). Frequentemente, alérgenos são proteínas (geralmente glicoproteínas) ou haptenos que podem ligar-se a proteínas (CROMWELL, 1997). O mais importante, contudo, é a substância ser reconhecida como estranha. 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, 1997a).

Apesar de antígenos alimentares, drogas, insetos e contactantes (o látex, por exemplo) estarem, às vezes, envolvidos em algumas doenças atópicas e de hipersensibilidade tipo I, os aeroalérgenos são os mais frequentes agentes etiológicos da atopia (SMITH et al., 1998). Aeroalérgenos, alérgenos transportados pelo ar, frequentemente estão associados a partículas (grãos de pólen, fezes de ácaros, secreções animais), e são comumente subdivididos em

domiciliares (por exemplo, aqueles derivados de ácaros da poeira domiciliar, de baratas e de animais de companhia) e não domiciliares (como aqueles derivados de grãos de pólen). São proteínas, relativamente pequenas, altamente solúveis em meio aquoso, o que permite se dispersarem no muco e outros fluidos corporais (GALLI; LANTZ, 1999; CROMWELL, 1997).

A nomenclatura atual dos alérgenos foi desenvolvida através de duas interações, uma de 1986 e outra de 1994, desde então ela permaneceu inalterada (MARSH et al., 1986; KING et al., 1994). O nome do alérgeno não é em itálico, tem um espaço após cada um dos dois primeiros elementos, e usa números arábicos por exemplo: Der p 1, Bet v 1, Fel d 1 e Amb a 1. Além disso, a nomenclatura pode ainda envolver diferentes formas moleculares de um mesmo alérgeno: isoalérgenos e isoformas (ou variantes).

Isoalérgenos são múltiplas formas moleculares de um mesmo alérgeno que partilham uma extensa reatividade cruzada IgE. Eles são definidos na nomenclatura como alérgenos de uma única espécie se possuirem identidade de 67% ou maior da sequência de aminoácidos. O melhor exemplo é o alérgeno de pólen de bétula, Bet v 1, que tem mais de 40 seqüências representando 31 isoalérgenos, com 73- 98% de identidade da sequência (CHAPMAN, 2003). Os isoalérgenos Bet v 1 são distinguidos por números adicionais: Bet v 1.01 a Bet v 1.31.

Diferentemente, isoforma é um termo referente a variantes polimórficas de um mesmo alérgeno, que normalmente apresentam mais de 90% identidade da seqüência. As isoformas são distinguidas na nomenclatura por 2 números adicionais. As 42 isoformas de Bet v 1 são listadas como Bet v 1,0101 a Bet v 1,0142. Estudos recentes têm mostrado que alérgenos de ácaro mostraram um grande número de isoformas: 23 para Der p 1 (Der p 1,0101 a Der p 1,0123) e 13 para Der p 2, (SMITH et al., 2001). Estes polimorfismos podem afetar as respostas de células T ou alterar os sítios de ligação do anticorpo e devem ser levados em

consideração nas formulações para a imunoterapia alérgênica (PIBOONPOCANUN et al., 2006).

1.8 *Dermatophagoides farinae* e seus principais alérgenos

A classificação taxonômica de *D. farinae*, segundo Arlian; Platts-Mills (2001) e o site de taxonomia vinculado ao portal UniProt (TAXONOMY, 2011), pode ser resumida como ilustrada no figura 2.

O ácaro *D. farinae* tem sido reconhecido como importante fonte de alérgenos em todo o mundo, exercendo um relevante papel nas doenças alérgicas, particularmente asma e rinite alérgica, em indivíduos geneticamente predispostos (DUFF; PLATTS-MILLS, 1992). No Brasil, vários estudos realizados em nossa região têm demonstrado que o *D. farinae* é o ácaro mais prevalente na poeira domiciliar (SIMPLICIO et al., 2007; SOPELETE et al., 2000). O crescimento e a proliferação do ácaro são dependentes de diversas condições, principalmente da temperatura e umidade, os quais parecem ser os fatores decisivos e limitantes para o seu desenvolvimento (DUFF; PLATTS-MILLS, 1992).

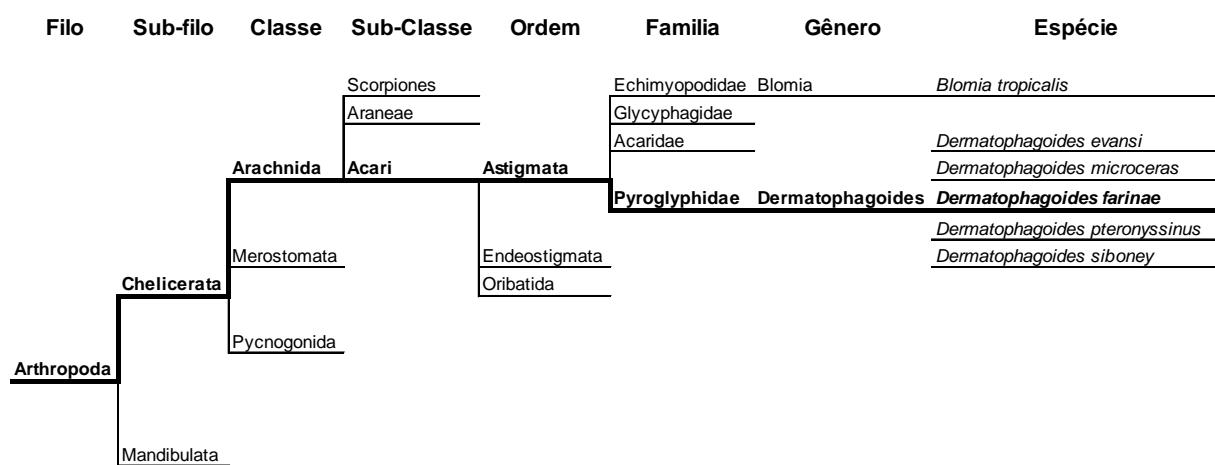


Figura 2. Classificação taxonômica do ácaro *Dermatophagoides farinae*. Adaptado de: Taxonomy, 2011.

Alguns alérgenos possuem fatores essenciais para sua alergenicidade. Estudos anteriores têm mostrado que alérgenos com atividade enzimática sensibilizam a superfície da mucosa facilitando o seu próprio reconhecimento (BUFE, 1998). Os alérgenos possuem diferentes estruturas e são classificadas em diferentes famílias de proteínas de acordo com as suas funções biológicas, sugerindo que exista pouca ou nenhuma característica estrutural comum ou propriedade intrínseca entre os alérgenos tornando-os alergênicos (CHAPMAN et al., 2000). Entretanto parece existir uma importante conexão entre a função biológica, integridade estrutural e capacidade de ligação à IgE para um alérgeno em especial manter sua alergenicidade (BUFE, 1998). Para alguns alérgenos tem sido demonstrado que a ligação efetiva à IgE depende da integridade da sua estrutura tridimensional. Por exemplo, a dissolução das pontes dissulfeto de Der f 2 pela mutação de dois resíduos de aminoácido resultou na completa perda da atividade ligante de IgE (TAKAI et al., 1997). Outros fatores não podem ser deixados de lado como participantes da sensibilização na reação alérgica frente a um alérgeno, como predisposição genética ou defeitos na regulação das respostas de IgE de um indivíduo, infecções virais e o grau de exposição (BUFE, 1998; ROBINSON et al., 1997).

Os alérgenos desta espécie, bem como das demais espécies de ácaros são divididos em grupos, de acordo com a composição bioquímica, homologia e massa molecular, nomeados de acordo com a ordem de descoberta. Até o momento, foram oficialmente descritos 19 alérgenos de *D. farinae*, segundo o Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia (ALLERGEN NOMENCLATURE, 2011), portal Allergome (ALLERGOME, 2011) sendo que algumas de suas principais características bioquímicas bem como o reconhecimento por IgE estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades moleculares e reatividade à IgE dos alérgenos de *D. farinae*.

Grupo	Função molecular	MW (kDa) SDS-PAGE ¹	Isoalérgenos e variantes ²	Reconhecimento por IgE (%) ³
Der f 1	Cisteína protease	27	Der f 1.0101 - 1.0110	87
Der f 2	Família das NPC2	15	Der f 2.0101 - 2.0117	94
Der f 3	Tripsina	29	Der f 3.0101	16
Der f 5	Desconhecida	15*	Der f 5.0101	ND
Der f 6	Quimiotripsina	25	Der f 6.0101	41
Der f 7	Desconhecida	30-31	Der f 7.0101	46
Der f 8	Glutationa-S-transferase	25*	Der f 8.0101	ND
Der f 9	Serina protease	26*	Der f 9.0101	ND
Der f 10	Tropomiosina	37	Der f 10.0101 - 10.0102	81
Der f 11	Paramiosina	98	Der f 11.0101	79
Der f 13	Proteína ligante de ácidos graxos	16*	Der f 13.0101	ND
Der f 14	Apolipoforina	177	Der f 14.0101	84
Der f 15	98,000 quitinase	98-109	Der f 15.0101	70
Der f 16	Gelsolina	53	Der f 16.0101	47
Der f 17	Proteína ligante de Ca ⁺⁺	53	Der f 17.0101	35
Der f 18	Quitinase	60	Der f 18.0101	54
Der f 20	Arginina quinase	40*	Der f 20.0101	ND
Der f 21	Desconhecida	16*	Der f 21.0101	ND
Der f 22	Desconhecida	17*	Der f 22.0101	10

Fonte: Thomas e colaboradores (2002); Allergen nomenclature (2011); Allergome (2011); ¹MW calculado do SDS-PAGE do alérgeno natural; ^{*}Calculado pela sequência de aminoácidos;

²Isoalérgenos descritos até o momento; ³Frequência de reconhecimento por IgE de humanos; ND não determinado.

Dessa forma, a utilização de ensaios de imunoproteômica podem ser ferramentas úteis para a identificação de novos alérgenos e suas possíveis isoformas derivados de *Dermatophagoides farinae*. Devido a importante associação entre a presença de anticorpos IgE e o diagnóstico etiológico da doença alérgica e de anticorpos bloqueadores das subclasses IgG1 e IgG4 e a resposta à imunoterapia, a análise da reatividade diferencial desses anticorpos aos componentes proteicos provenientes de ácaros da poeira domiciliar observada

entre pacientes atópicos podem ser importantes para o desenvolvimento de um diagnóstico mais preciso bem como auxiliar no monitoramento da imunoterapia específica com alérgenos.

2 Objetivos



- ❖ Avaliar a reatividade do extrato de *Dermatophagoides farinae* aos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos;
 - ❖ Detectar os componentes de *Dermatophagoides farinae* reconhecidos pelos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 do soro de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos;
 - ❖ Avaliar o diferencial de reatividade dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes de *D. farinae* com potencial aplicabilidade no diagnóstico de alergias e monitoramento de imunoterapia alérgeno-específica.

3 Material e Métodos



3.1 Pacientes e indivíduos controles

Foram selecionados 60 pacientes adultos com rinite alérgica associada ou não com asma persistente, leve a moderada, que foram atendidos no Ambulatório de Alergia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia, e consistiram no grupo atópico. O diagnóstico de rinite alérgica foi estabelecido segundo normas internacionais (BOUSQUET et al., 2008) e o de asma seguiu o protocolo executivo GINA (BATEMAN et al., 2008). Os pacientes foram selecionados com base na história de sintomas respiratórios relacionados à exposição aos ácaros da poeira doméstica, exame clínico e teste cutâneo de punctura (TCP) positivo ao extrato total de *D. farinae* (Df).

Como grupo controle, 30 indivíduos adultos saudáveis, sem sintomas ou história clínica de doenças alérgicas respiratórias e com TCP negativo a um painel de alérgenos inaláveis padronizados, foram selecionados entre alunos e professores da Universidade Federal de Uberlândia, e consistiram no grupo não atópico. As características demográficas e clínicas dos indivíduos incluídos no estudo são apresentadas na Tabela 2.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (Anexo 1). O termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) bem com uma breve ficha de identificação e um questionário clínico elaborado segundo ISAAC (1998), com algumas modificações (Anexo 3) foram obtidos de todos os participantes.

3.2 Teste cutâneo de punctura

A hipersensibilidade imediata foi avaliada pelo TCP de acordo com as normas recomendadas pela *European Academy of Allergology and Clinical Immunology* (EAACI) (MALLING, 1993). Para a realização do teste, foram utilizados extratos alergênicos comerciais (FDA Allergenic Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) de ácaros (*D. pteronyssinus*, *D.*

farinae e *B. tropicalis*), epitélio de cão (*Canis familiaris*), epitélio de gato (*Felis domesticus*), baratas (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*) e fungo (*Alternaria alternata*). O controle positivo da reação consistiu de solução de histamina (10 mg/mL) e o controle negativo foi realizado com o diluente da preparação alergênica tamponado com glicerol a 50%.

Tabela 2. Características clínicas e demográficas dos pacientes participantes no estudo.

Características	Grupos	
	Atópicos	Não atópicos
Número de indivíduos	60	30
Gênero		
Masculino	19	4
Feminino	41	26
Idade		
Mediana (faixa)	24.5 (18-53)	21.5 (18-47)
Positivos TCP (%)		
Df	100	0
Dp	98.3	0
Bt	71.7	0
Pápula (mediana,mm)		
Df	8.0	0
Dp	8.0	0
Bt	5.0	0
Diagnóstico (n)		
R	46	0
A+R	14	0

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

As puncturas foram realizadas na face interna do antebraço sobre microgotas (~30 µL) de cada extrato alergênico, com auxílio de lancetas apropriadas (ALK-Abelló, Horsholm, Dinamarca), mantendo-se uma distância de 3 cm entre os extratos. A leitura do teste foi realizada após 15 minutos, medindo-se o tamanho médio da pápula em mm, calculado a partir do maior diâmetro e o seu correspondente perpendicular. O critério de positividade para o TCP foi um tamanho médio de pápula superior a 3,0 mm, subtraindo o valor da média obtida para o controle negativo.

3.3 Coleta de sangue

Foram coletadas amostras de sangue (20 mL) de cada indivíduo na mesma ocasião da realização dos testes cutâneos de punctura, utilizando-se tubos de coleta a vácuo de 5 mL e agulhas 21G1 (*Vacutainer® - Becton Dickson Vacutainer Systems*, Franklin Lakes, EUA) para punção venosa na região do antebraço. As amostras de sangue foram centrifugadas a 700 g por 10 minutos e os soros obtidos foram armazenados a -20°C em alíquotas até a realização dos testes sorológicos.

3.4 Obtenção do extrato antigênico

A extração de抗ígenos de *D. farinae* foi realizada de acordo com o método adotado por Pereira e colaboradores (2005). Inicialmente, 200 g de material do ácaro em meio de cultura (gentilmente cedido pelo Prof. Federico Montealegre, Laboratório de Imunoquímica, Escola de Medicina de Ponce, Porto Rico, EUA) foram peneirados (Peneiras Granutest, ABNT 35, TYLER 32, Telastem, São Paulo, Brasil) para separar o material de cultura dos corpos e fezes dos ácaros. Dez gramas do material acarológico constituído de corpos e fezes foram diluídos em 50 mL de solução salina tamponada com borato (BBS) 5 mM, pH 8,0, contendo os seguintes inibidores de proteases: fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, ICN Biomedicals Inc., Aurora, EUA) 1 mM, benzamidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) 1 mM, aprotinina (Sigma) a 2 mM e leupeptina (Sigma) 1 μ M. Após criólise com nitrogênio líquido, o material foi macerado exaustivamente com gral e pistilo para o rompimento do exoesqueleto do ácaro. A solução foi então transferida para tubos cônicos de 50 mL e submetidos à agitação orbital lenta, por 18 horas a 4°C.

O material foi centrifugado a 3.000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante novamente centrifugado a 30.000 g por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante final foi filtrado

em sistema Amicon (W.R. Grace & Co., Bervely, EUA), utilizando membrana porosa com limite de exclusão de 10 kDa (YM-10, Whatman International, Maidstane, Inglaterra), em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM, pH 7,2. O material solúvel retido pela membrana porosa foi dividido em alíquotas de 1 mL e estocado em microtubos de polipropileno a -80°C para posterior utilização nos demais procedimentos.

3.5 Dosagem protéica

A concentração proteica do extrato de *D. farinae* foi determinada de acordo com o método proposto por Lowry e colaboradores (1951). A curva de calibração foi realizada com soroalbumina bovina (BSA, Sigma) em diluições duplas seriadas de 500 a 15,6 µg/mL. Os valores da densidade óptica (D.O.) a 650 nm das amostras analisadas foram obtidos e comparados à curva de calibração, utilizando o programa Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA), para o cálculo da concentração proteica das amostras. A concentração protéica do extrato de *D. farinae* foi de 3500 µg/mL.

3.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos séricos IgE, IgG4 e IgG1 anti-*D. farinae*

A mensuração de anticorpos séricos IgE, IgG4 e IgG1 específicos a *D. farinae* foi realizada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo Pereira e colaboradores (2005), com modificações. Placas de microtitulação de alta afinidade (*Costar, Corning Laboratories Inc.*, New York, EUA) foram sensibilizadas por 18 horas a 4°C com o extrato total Df (20 µg/poço). As placas foram lavadas com PBS+Tween 20 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA) 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Nas etapas subsequentes, foi utilizado PBS-T-BSA 1% como diluente e as placas foram lavadas

com PBS-T após cada etapa da reação. As amostras de soros foram diluídas 1:5 (IgE e IgG4) ou 1:20 (IgG1), adicionadas em duplicata e incubadas por 2 horas a 37°C.

Subsequentemente, as placas foram incubadas com os anticorpos secundários biotinilados consistindo de anti-IgE humana (1:1000; Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, EUA), anti-IgG4 humana (1:2000, Sigma) ou anti-IgG1 humana (1:4000, Sigma) por 1 hora a 37°C. Na etapa final, o conjugado esteptavidina-peroxidase (Sigma) foi adicionado na diluição de 1:500 (IgE), 1:1000 (IgG4) e 1:2000 (IgG1) durante 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi revelada por meio da adição de 2,2'-diazino do ácido etil-benzotiazolino sulfônico (ABTS; Sigma) a 0,01 M em tampão citrato-fosfato 0,07 M, pH 4,2 contendo 0,03% água oxigenada.

A densidade óptica (D.O.) foi determinada a 405 nm em leitor de ELISA (*Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA*). Dois soros controles positivos e três soros controles negativos foram incluídos em cada placa para o controle de qualidade da reação e cálculo do índice de reatividade ELISA. Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE) de acordo com a seguinte fórmula:

$$IE = \frac{DO}{DO \text{ controle} + 3\delta}$$

onde, DO = média da densidade óptica da amostra testada; DO controle = média das densidades ópticas de soros controles negativos; δ = desvio-padrão das densidades ópticas das amostras de soros controles negativas.

Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos para excluir valores limítrofes de reatividade próximos a IE = 1.0.

3.7 Eletroforese e *immunoblot* unidimensionais (1-D)

3.7.1 Eletroforese 1-D em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As proteínas do extrato de *D. farinae* foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente de concentração (9-17%) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970). Primeiramente, foram preparados os géis de separação a 9% e a 17% separadamente, ambos compostos por solução de Tris-HCl 0,373 M (pH 8,8), SDS a 0,1%, acrilamida-bis na proporção 30:0,8, N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED) a 0,125%, persulfato de amônia (APS) a 0,125%, glicerol (2 e 10% para os géis de 9 e 17%, respectivamente) e azul de bromofenol (0,2%) que foi adicionado apenas no gel a 17%, e então diluídos em água deionizada de acordo com as concentrações do gel. O gel de empilhamento a 3% foi preparado utilizando solução de Tris-HCl 0,122 M (pH 6,8), SDS 0,1%, acrilamida-bis a 30:1,6, TEMED a 0,125% e APS a 0,125% e azul de bromofenol (0,2%). Todos reagentes utilizados na preparação dos géis foram obtidos da Bio-Rad Laboratories. O processo de polimerização teve um tempo médio de 2 horas para o gel de separação e 1 hora para o gel de empilhamento.

Previamente à aplicação das amostras nos géis, os extratos foram diluídos em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8), SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% e glicerol 20%. As amostras foram então aquecidas a 95°C em banho seco (Termobath ALB64, Finemould Precision Ind., Seul, Coréia do Sul) por 5 minutos para desnaturação proteica completa. Foi então aplicado em cada poço do gel 20 µg de proteína total em volume de 20 µL quando o gel foi corado, ou 400 µg de proteína total em volume de 250 µL em poço único para posterior eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. Para o cálculo das massas

moleculares relativas das bandas referentes à amostra, foi utilizado em paralelo um marcador de peso molecular (BenchMarkTM Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, USA).

A eletroforese foi realizada no sistema *Mini-vertical Gel Electrophoresis Unit SE 260* (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) sob corrente constante de 20 mA por aproximadamente 1 hora e 30 min. O tampão de corrida (pH 8,3) foi composto por glicina (Sigma) a 0,19 M, Tris-base a 0,025 M, SDS (Sigma) 0,1%.

O gel foi então corado com solução *Blue silver* como anteriormente descrito (CANDIANO et al., 2004), sob agitação lenta e constante à temperatura ambiente e com reposição do corante até a visualização das bandas polipeptídicas. Após a visualização das bandas, o corante foi descartado e o gel foi lavado com água destilada para posterior digitalização e análise de imagens.

3.8 *Immunoblot* 1-D

Para identificar os componentes do extrato Df reconhecidos por anticorpos IgE, IgG4 ou IgG1, 30 amostras de soros selecionadas de pacientes atópicos com altos valores de IE para IgE (IE > 5,0) e 15 amostras de soros de cada grupo atópico e não atópico com IE > 2,0 para IgG4 e IgG1 foram analisadas no *immunoblot* 1-D como descrito anteriormente (PEREIRA, et al., 2005).

Os componentes polipeptídicos de Df separados em SDS-PAGE gradiente 9-17% foram transferidos para membranas de nitrocelulose (0,45 µm; Bio-Rad Laboratories) como anteriormente descrito (TOWBIN, STSEHELIN, GORDON, 1979), utilizando um sistema de transferência semiúmido (*Multiphor II Electrophoresis Unit, Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia*), utilizando tampão de transferência constituído por glicina 0,04 M, Tris 0,05 M, SDS a 0,04% e metanol a 20% sob corrente de 0,8 mA por cm² de gel durante 2 h.. A eficiência da

transferência foi visualizada pela coloração da membrana com *Ponceau S* a 0,5% diluído em ácido tricloroacético (TCA) 0,25%.

Após secagem à temperatura ambiente, a membrana foi cortada em tiras de aproximadamente 3 mm de largura que foram acondicionadas nas canaletas das placas de *immunoblot* (Bio-Rad Laboratories) e bloqueadas com 800 µL de PBS-T contendo leite desnatado em pó (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) a 5% (PBS-T-M) por 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com PBS-T e incubadas com amostras de soros diluídas 1:5 (IgE ou IgG4) e 1:20 (IgG1) em PBS-T-M 1% por 18 horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem os anticorpos secundários biotinilados anti-IgE humana (1:500; Kirkegaard), anti-IgG4 humana (1:2000; Sigma) ou anti-IgG1 humana (1:4000; Sigma) foram adicionados e incubados por 2 horas à temperatura ambiente, seguido pela adição de estreptavidina peroxidase (Sigma) diluída 1:500, 1:1000 ou 1:2000 (IgE, IgG4 or IgG1, respectivamente) por 1 hora à temperatura ambiente.

Os componentes que reagiram aos respectivos anticorpos foram visualizados pela adição de 3,3'-tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB, Sigma) diluído em 10 mL de solução salina tamponada com Tris (TBS) 20 mM (pH 7,2) e 0,03% H₂O₂ até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida com a adição de água destilada para posterior digitalização e análise de imagens.

3.9 Eletroforese e *immunoblot* bidimensionais (2-D)

Para eletroforese e *immunoblot* 2-D, todos os procedimentos foram realizados utilizando o sistema *Mini Protean Cell* (Bio-Rad Laboratories) e todos os reagentes foram adquiridos da referida empresa e utilizados de acordo com as recomendações do fabricante.

3.10 Focalização isoelétrica e SDS-PAGE 2-D

Amostras do extrato Df (300 µg) foram dialisadas em água destilada e as proteínas foram precipitadas com TCA a 50% como descrito anteriormente (DAMERVAL et al., 1985). Os precipitados foram solubilizados e desnaturados em 40 µL de solução de lise (8 M ureia, 2% Triton X-100, 40 mM Tris, 65 mM ditiotreitol - DTT), e incubados sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora antes de serem centrifugados (10.000 g, 30 minutos, 23°C). Os sobrenadantes foram misturados com o tampão de reidratação (8 M uréia, 2% Triton X-100, 0,0025% azul de bromofenol, 65 mM DTT, and 0.2% anfólitos) por 1 hora à temperatura ambiente e novamente centrifugados (13.000 g, 30 minutos, 23°C) para remover partículas insolúveis.

As amostras foram então submetidas à focalização isoelétrica (IEF) em tiras de gradiente de pH imobilizado de 7 cm (ReadyStrip™ IPG Strip pH 4-7), com reidratação passiva por 4 horas e reidratação ativa por 12 horas a 50 V em temperatura ambiente. Para prevenir desidratação, as tiras foram cobertas com 2 mL de óleo mineral. A IEF foi realizada a 20°C e os seguintes parâmetros para a focalização foram aplicados: 50 µA/tira, rápido aumento de voltagem por 1 hora de 50 a 1000 V, voltagem linear de 4000 V e finalmente máxima voltagem de 16.000 V por 24 horas. Após a IEF, as tiras foram tratadas com tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M ureia, 30% glicerol, 2% SDS, 0,001% azul de bromofenol, 130 mM DTT) por 10 minutos à temperatura ambiente. As tiras foram lavadas em tampão Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS), e cada tira foi aplicada em um gel gradiente 9-17% (SDS-PAGE) e selado com solução de agarose 1%. As proteínas de peso molecular padrão (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder, Invitrogen) foram aplicadas em paralelo com a tira focalizada. A eletroforese foi realizada e os géis foram corados com solução Blue silver (CANDIANO et al., 2004).

3.11 *Immunoblot* 2-D

Neste ensaio, 5 amostras de soros positivos para IgE de pacientes atópicos, 3 amostras de soros positivos para IgG1 de cada grupo atópico e não atópico e 3 amostras de soros positivos para IgG4 de cada grupo atópico e não-atópico foram selecionadas com base no perfil de sororeatividade para cada isotipo de anticorpo (IgE, IgG4 e IgG1) apresentado no *immunoblot* 1-D, de modo a obter uma ampla heterogeneidade de reatividade.

Os polipeptídeos presentes no gel de eletroforese 2-D foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose como acima descrito e a imunodetecção de anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 específicos a *D. farinae* foi realizada seguindo o protocolo descrito para *immunoblot* 1-D.

3.12 Análise de imagens

Os géis corados e *immunoblots* 1-D foram digitalizados e analisados com o programa *ImageQuant 300* versão 1.0 (GE Healthcare, Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Suécia) de acordo com a curva do padrão de peso molecular para determinar a mobilidade relativa (R_F) e a massa molecular aparente das bandas (Mr).

Os géis corados e *immunoblots* 2-D foram digitalizados e analisados com o programa *ImageMaster™ 2-D Platinum 7.0* versão 5.0 (GE Healthcare) para estimar a massa molecular experimental (Mr) e o ponto isoelétrico (pI) de cada *spot* proteico. Foram realizadas triplicatas biológicas de cada gel e um gel médio foi obtido após análise de pareamento (*matching*) dos *spots* proteicos com os três géis correspondentes. Os *spots* proteicos detectados em pelo menos 2 dos géis analisados foram considerados no gel médio. Os *spots* antigênicos dos *immunoblots* 2-D foram comparados entre os grupos atópico e não atópico, analisando *spots*

exclusivos ou compartilhados entre os diferentes isotipos de anticorpos. Para os *spots* antigênicos dos *immunoblots* 2-D foi feita uma busca no banco de dados UniProtKB/TrEMBL, com base nos valores de Mr e pI experimentais, para obter relação com proteínas ou alérgenos hipotéticos já descritos.

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças nos níveis de anticorpos específicos entre os grupos atópico e não atópico foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças na frequência das bandas entre os grupos atópico e não atópico foram analisadas pelo teste exato de Fisher. As correlações entre os níveis de IgG1 e IgG4 nos grupos atópico e não atópico foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Spearman (R_s). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.14 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos, desde a coleta até o 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 Níveis de anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 específicos a *D. farinae*

As análises de anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 específicos a *D. farinae* realizadas por ELISA no soro de indivíduos atópicos e não atópicos estão apresentadas na Figura 3. Os níveis de IgE ao extrato Df bem como a soropositividade foram maiores nos atópicos (mediana IE = 5,5; 100%) em comparação aos não atópicos (mediana IE = 0,9; 0%) ($p < 0,0001$). Da mesma forma, os níveis de IgG4 anti-Df e a soropositividade foram maiores nos atópicos comparados aos não atópicos (mediana IE = 5,1; 93% vs mediana IE = 2,0; 57%; $p < 0,01$), mas a resposta IgG1 específica a Df não foi significantemente deferente entre os grupos (mediana IE = 2,2; 73% vs mediana IE = 2,7; 73%).

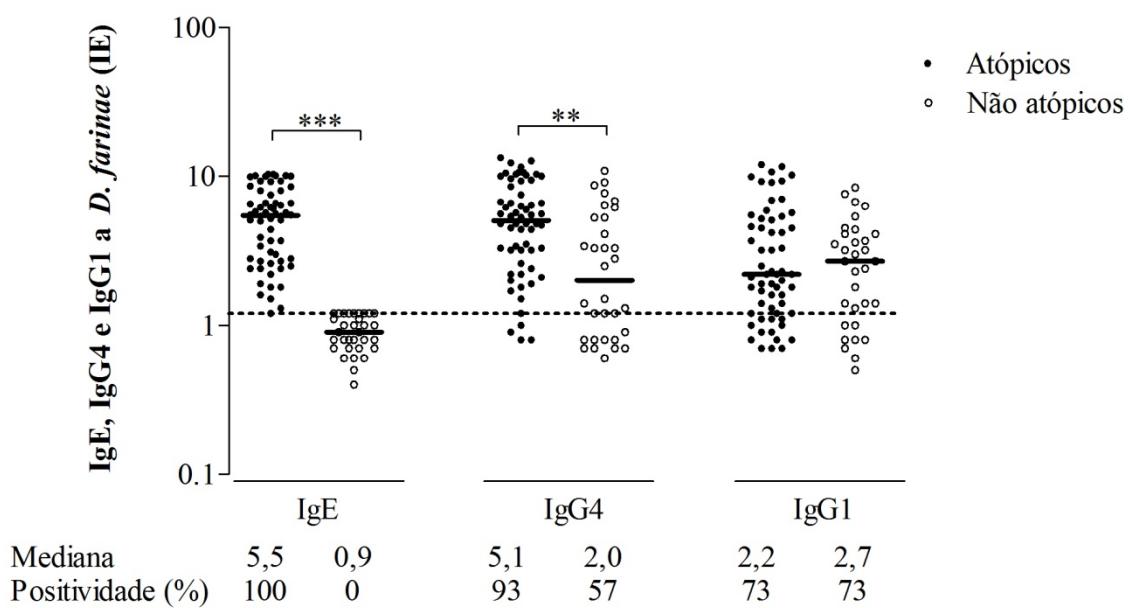


Figura 3. Níveis de IgE, IgG4 e IgG1 a *Dermatophagoides farinae* (Df) expressos em índice ELISA (IE) no soro de pacientes atópicos ($n = 60$) e indivíduos não atópicos ($n = 30$). A linha tracejada indica o limiar de positividade ($IE > 1,2$) e as barras horizontais indicam a mediana. Os valores de mediana e as porcentagens de positividade também estão indicados. *** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,05$ como determinado pelo teste de Mann-Whitney.

Quando os níveis dos isótipos de anticorpos foram correlacionados dentro de cada grupo, não houve correlação entre os níveis de IgE e IgG4 no grupo atópico, porém quase

todos os pacientes atópicos foram IgE⁺/IgG4⁺ (93%) (Fig. 4A). No entanto, foi encontrada uma baixa correlação positiva entre IgE e IgG1 ($r = 0,2557$; $p = 0,04$) (Fig. 4B) bem como entre IgG1 e IgG4 ($r = 0,2736$; $p = 0,03$) (Fig. 4 C), ambas em pacientes atópicos. No grupo não atópico, nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de IgG1 e IgG4 (Fig. 4D). Por outro lado, houve uma predominância na positividade única para IgG1 nos não atópicos (33%) (Fig. 4D) em relação aos atópicos (6%) (Fig. 4C) ($p < 0,01$). Embora a positividade única para IgG4 tenha sido maior nos atópicos do que nos não atópicos (25% vs 17%), esta diferença não foi estatisticamente significante ($p = 0,43$).

4.2 Perfil eletroforético e de *immunoblot* 1-D de *D. farinae*

O extrato foi separado em SDS-PAGE gradiente 9-17% e corado com Blue silver, mostrando ampla faixa de bandas variando entre 14 e 165 kDa (Fig. 5A). As bandas mais proeminentes migraram em 14, 24, 29, 46 e 101 kDa seguido por bandas menos acentuadas, como 16, 35, 52, 76 e 165 kDa (Fig. 5A). Um painel representativo da sororeatividade de IgE, IgG4 e IgG1 em pacientes atópicos, bem como da sororeatividade de IgG4 e IgG1 nos indivíduos não atópicos está ilustrada na Figura 5B.

As frequências dos componentes do extrato Df reconhecidos por anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 estão demonstradas na Figura 6. Bandas reativas aos componentes alergênicos de Df com $\geq 50\%$ de reconhecimento pelos soros foram consideradas imunodominantes, aquelas apresentando reconhecimento entre 25-50% foram consideradas bandas intermediárias e aquelas com reconhecimento $< 25\%$ foram consideradas bandas não imunodominantes.

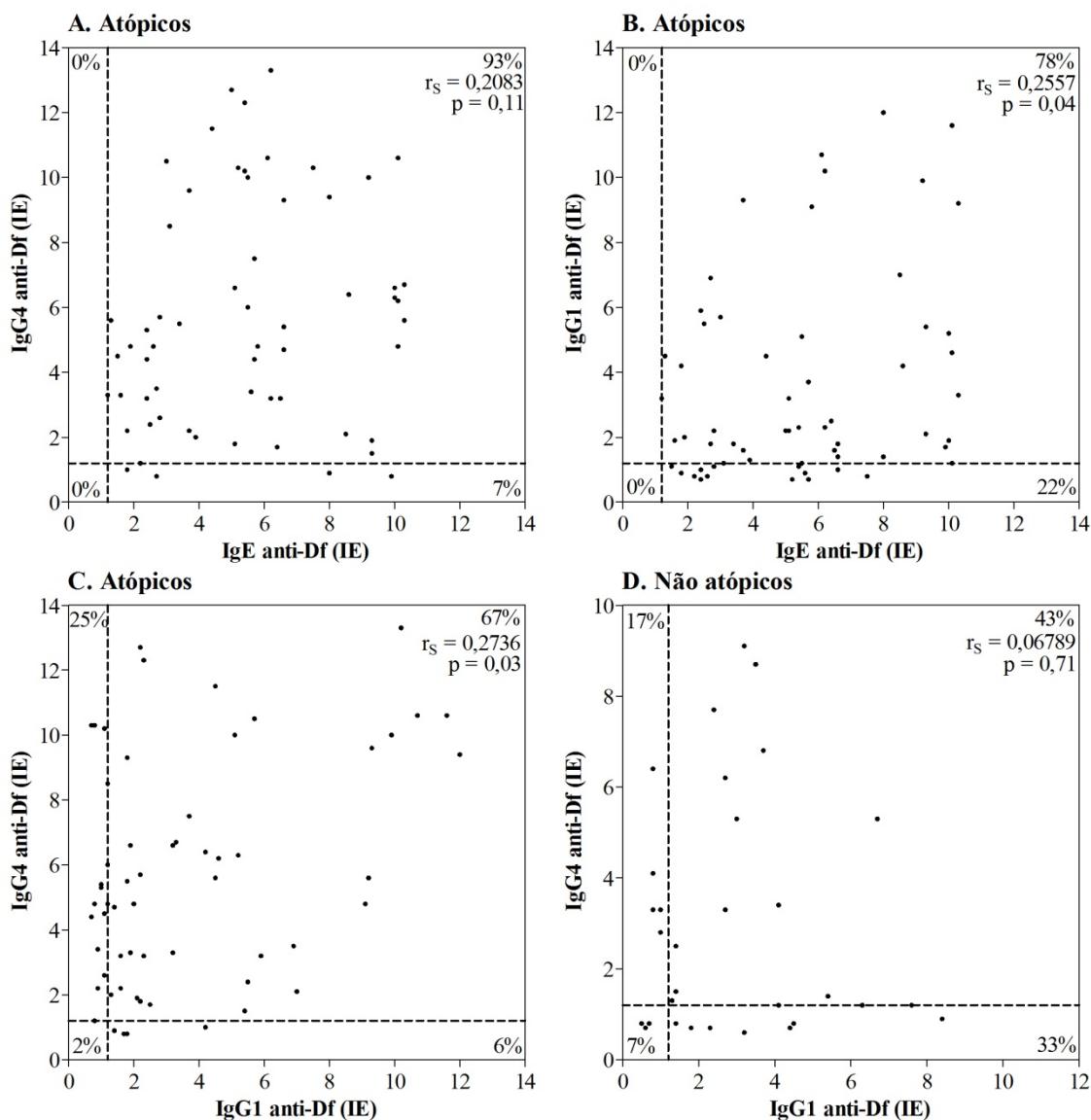


Figura 4. Correlação e associação entre os níveis de IgE, IgG4 e IgG1 específicos a *Dermatophagoides farinae* (DF) nos pacientes atópicos (**A, B e C**) e indivíduos não atópicos (**D**). A porcentagem de positivos duplos, negativos duplos e positivos únicos para os isótipos de anticorpos correlacionados estão indicadas no canto correspondente. Os coeficientes de correlação de Spearman (r_s) e valores de p estão também indicados.

A reatividade de IgE no grupo atópico (Fig. 6A) foi encontrada para as bandas imunodominantes de 14 kDa (97%), 101 kDa (60%), e 76 kDa (53%), além das bandas intermediárias de 16, 53 e 58 kDa (43%), 24 e 107 kDa (40%) e ≥ 165 kDa (27%). Os controles dos experimentos para o *immunoblot* com soros de indivíduos não atópicos não mostraram quaisquer bandas reconhecidas por IgE (dados não mostrados).

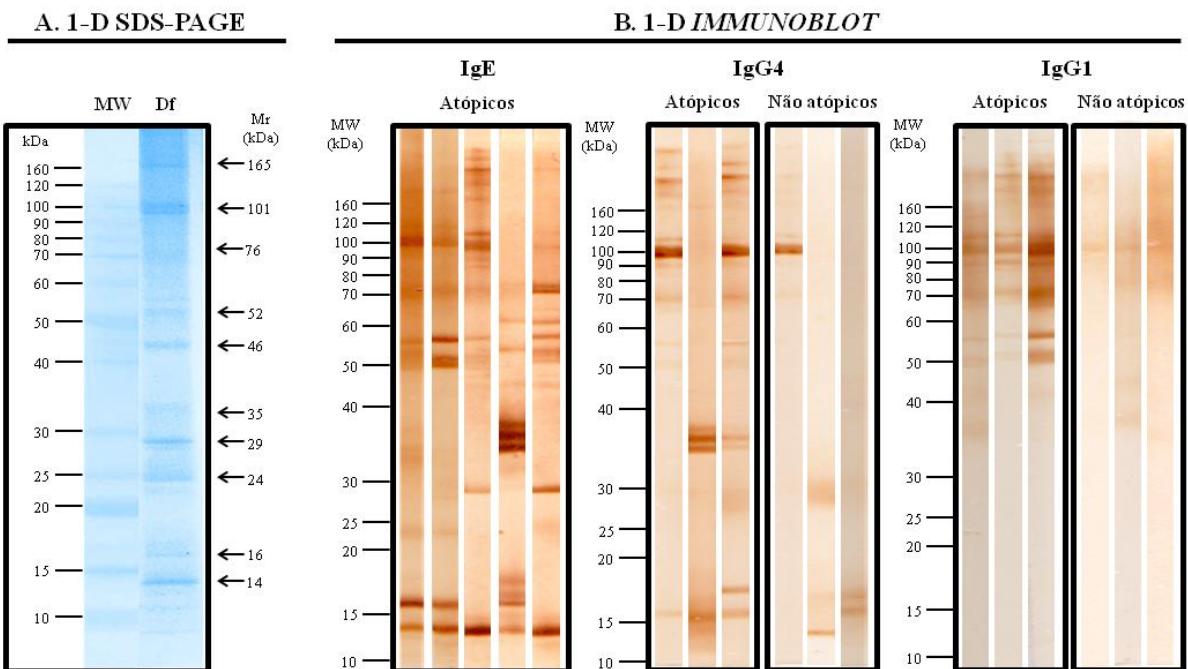


Figura 5. Eletroforese e *immunoblot* uni-dimensionais (1-D) do extrato de *Dermatophagoides farinae* (Df). (A) MW, marcadores de peso molecular em kiloDaltons (kDa) à esquerda; o extrato total de Df foi separado por SDS-PAGE gradiente 9-17% e corado por Blue silver. As bandas principais com suas massas moleculares relativas (Mr) em kDa estão indicadas à direita. (B) *Immunoblot* 1-D representativo de extrato de Df mostrando reatividade de IgE no soro de pacientes atópicos e reatividade de IgG4 e IgG1 no soro de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos.

A reatividade de IgG4 mostrou um amplo perfil no grupo atópico comparado a um perfil mais restrito de reatividade a bandas <30 kDa no grupo não atópico (Fig. 6B). A reatividade de IgG4 foi maior em atópicos do que nos não atópicos somente para a banda imunodominante de 16 kDa (73% vs 40%). Além disso, foi observada reatividade de IgG4 somente nos atópicos a algumas bandas não imunodominantes e às bandas intermediárias de >165 kDa (47%). Em contraste, a reatividade de IgG4 foi maior em não atópicos do que nos atópicos para duas bandas imunodominantes, 29 kDa (67% vs 20%; $p = 0,02$) e 14 kDa (53% vs 20%), e uma banda intermediária de 101 kDa que mostrou a mesma frequência entre os grupos (33%).

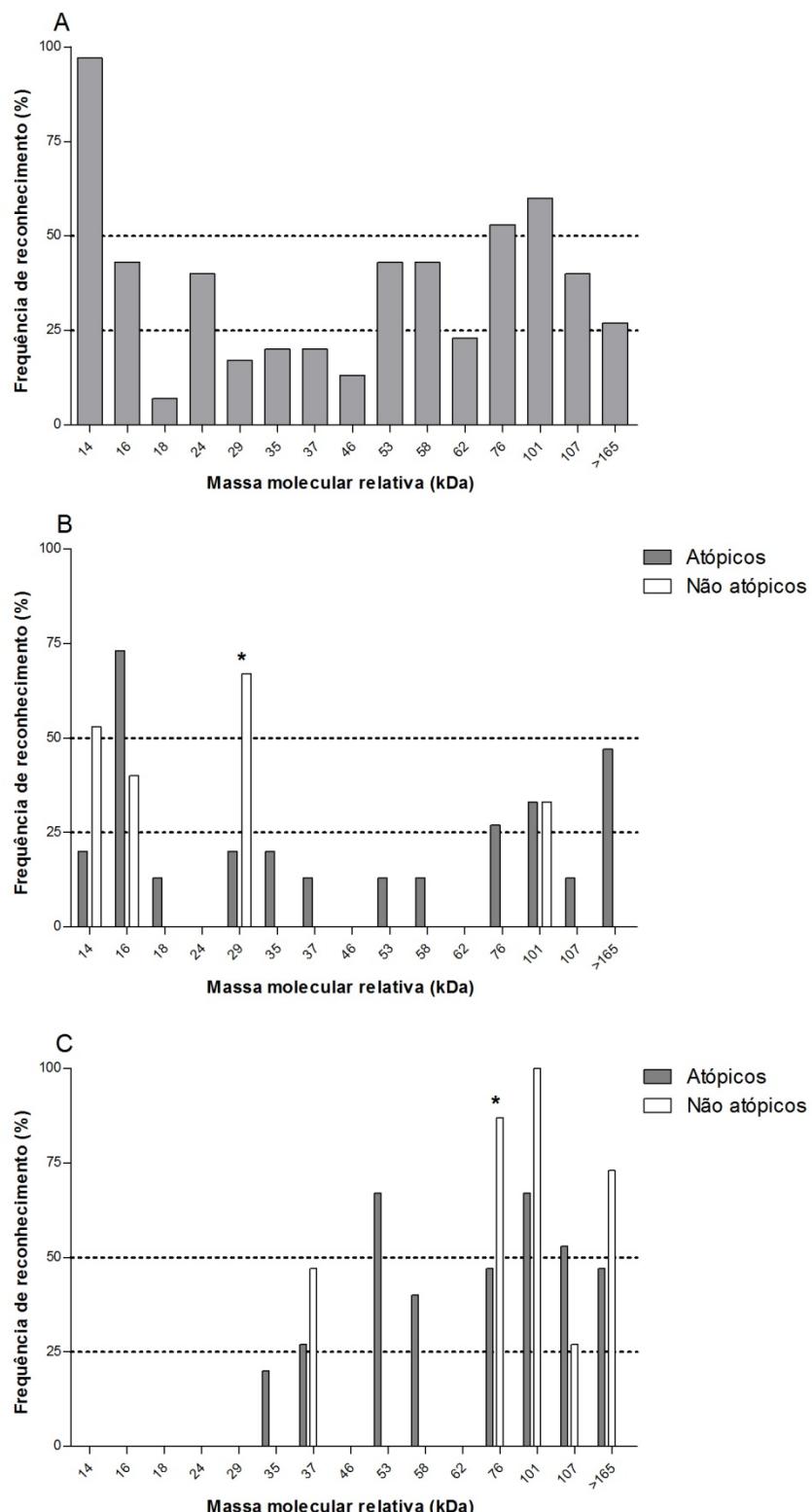


Figura 6. Frequências (%) dos componentes reconhecidos por anticorpos IgE(A), IgG4(B) e IgG1(C) específicos ao extrato de *Dermatophagoides farinae* (Df) em amostras de soros de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos por *immunoblot* 1-D. Um total de 30, 15 e 15 amostras de soros foram testadas para IgE, IgG4 e IgG1, respectivamente, no grupo atópico. Um total de 15 amostras de soros foram testadas para cada ensaio de IgG4 e IgG1 no grupo não atópico. As linhas tracejadas indicam 50% e 25% de reconhecimento. * $p < 0,05$ como determinado pelo teste exato de Fisher.

O perfil de reatividade de IgG1 aos componentes de Df mostrou um padrão de reconhecimento exclusivamente a bandas acima de 30 kDa tanto em atópicos quanto em não atópicos (Fig. 6C). A reatividade de IgG1 foi maior em atópicos do que em não atópicos somente para a banda imunodominante de 107 kDa (53% vs 27%), enquanto as bandas de 53 kDa (67%), 58 kDa (40%) e 35 kDa (20%) foram reativas apenas para IgG1 no grupo atópico. Entretanto, a reatividade de IgG1 foi maior em não atópicos do que atópicos para as bandas imunodominantes de 76 kDa (87% vs 47%; $p = 0,05$), 101 kDa (100% vs 67%; $p = 0,04$) e \geq 165 kDa (73% vs 47%), além da banda intermediária de 37 kDa (47% vs 27%).

4.3 Perfil eletroforético e de *immunoblot* 2-D de *D. fariniae*

O perfil eletroforético 2-D do extrato de Df mostrou uma resolução de 119 *spots* proteicos como determinado pelo programa *ImageMasterTM 2-D Platinum 7.0*, em uma faixa de separação de Mr variando de 10 a 220 kDa e pI de 4 a 7 (Fig. 7).

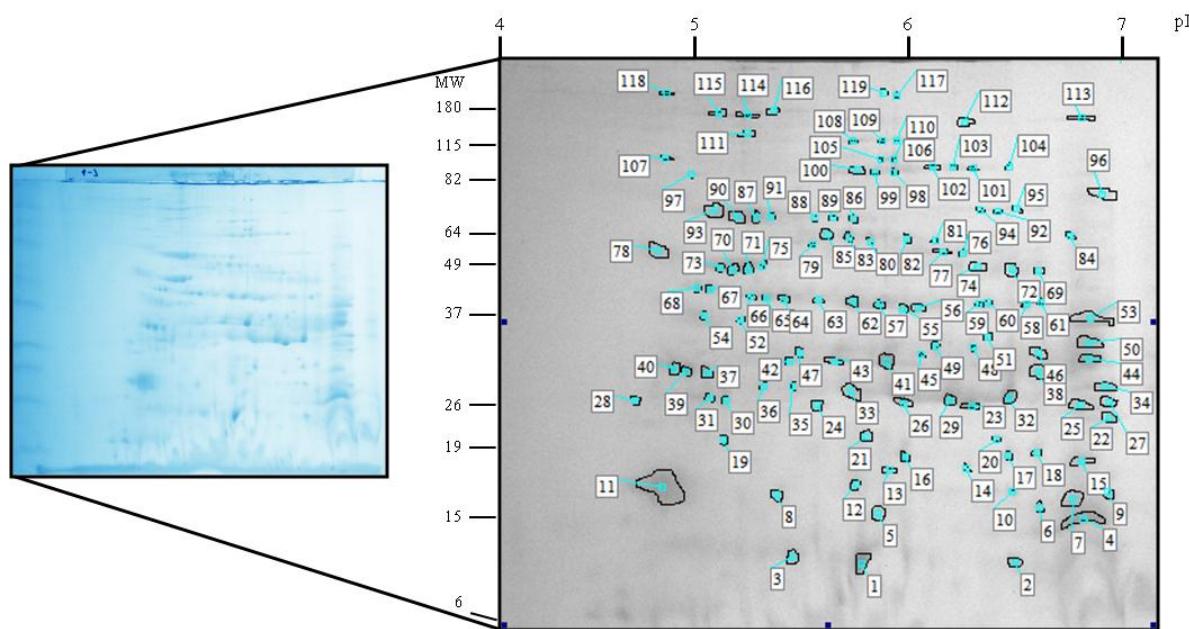


Figura 7. Perfil eletroforético 2-D do extrato de *D. farinæ*. O gel 2-D foi corado por *Blue silver* e os *spots* protéicos (indicados por números) foram analisados de acordo com o ponto isoelettrico (pI) e a massa molecular relativa (Mr) usando o programa ImageMasterTM 2-D Platinum 7.0.

Para facilitar a análise imunoproteômica e identificar os *spots* antigênicos com reatividade diferencial entre os isótipos de anticorpos nos grupos atópico e não atópico, os *spots* reativos foram distribuídos arbitrariamente em duas grandes áreas de acordo com um valor limiar de Mr como segue: (I) Mr <37 kDa e (II) Mr >37 kDa. Os *spots* foram então relacionados aos alérgenos hipotéticos conhecidos com base no banco de dados UniProtKB/TrEMBL (Tabelas 3 e 4).

Um amplo perfil de *spots* foi reconhecido pelos três isótipos de anticorpos no grupo atópico, com Mr variando entre 10 e 217 kDa e pI de 4,8 a 6,9 (Fig. 8). *Immunoblots* representativos para cada isótipo de anticorpo estão ilustrados na figura 8A. Foi observado que 14 *spots* foram reconhecidos apenas por IgE e, de forma interessante, todos estes *spots* migraram abaixo de 37 kDa (área I) (Fig. 8B). Dentre eles, os *spots* 6 e 10 foram relacionados ao alérgeno hipotético Der f 2; o *spot* 11 ao Der f 21; os *spots* 23 e 29 ao Der f 8; o *spot* 26 ao Der f 9; o *spot* 32 à glutationa transferase; os *spots* 41, 43, 45 e 49 ao Der f 6; e alguns *spots* (1,16 e 53) não puderam ser relacionados a alérgenos já descritos como demonstrado pelo diagrama de Venn (Fig. 9) e Tabela 3. Da mesma forma, 11 *spots* foram reconhecidos por ambos os anticorpos IgE e IgG4, mas não por IgG1 no grupo atópico, e migraram exclusivamente abaixo de 37 kDa na área I (Fig. 8B). Dentre eles, o *spot* 2 foi relacionado à proteína hipotética NADH desidrogenase; o *spot* 4 ao Der f 2; o *spot* 46 ao Der f 6; e dois conjuntos de *spots* (17/18/20 e 30/31/37/39/40) não puderam ser relacionados aos alérgenos hipotéticos conhecidos (Fig. 9, Tabela 3). Diferentemente, 19 *spots* foram reconhecidos por ambos os anticorpos IgE e IgG1, mas não por IgG4, e migraram acima de 37 kDa na área II (Fig. 8B). Foram identificados dois conjuntos de *spots* (64-68/70/71/73/75 e 98-106) e um *spot* isolado (113). Todos eles não puderam ser relacionados aos alérgenos hipotéticos conhecidos (Fig. 9, Tabela 4).

Tabela 3. Lista das proteínas hipotéticas de *Dermatophagoïdes farinæ* reconhecidas por anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos após análise imunoproteômica (área I do gel 2-D).

Spot ID [#]	Mr (Da) [£]	pI [£]	Atópicos			Não atópicos		Alérgeno hipotético [§]	Provável função molecular		
			IgE	IgG4	IgG1	IgG4	IgG1				
Área I	1	10680	5,76	x				?	?		
	2	10765	6,49	x	x	x		NADH desidrogenase subunidade 4L	?		
	4	15283	6,82	x	x	x		Der f 2	família das NPC2		
	6	15913	6,61	x				Der f 2	família das NPC2		
	10	16830	6,48	x				Der f 2	família das NPC2		
	11	17093	4,81	x				Der f 21	?		
	16	18941	5,97	x				?	?		
	17	19000	6,46	x	x			?	?		
	18	19447	6,60	x	x			?	?		
	20	21217	6,40	x	x			?	?		
	23	26088	6,28	x				Der f 8	glutationa transferase		
	26	26445	5,96	x				Der f 9	serina endopeptidase		
	29	26625	6,18	x				Der f 8	glutationa transferase		
	30	26715	5,11	x	x			?	?		
	31	26989	5,04	x	x			?	?		
	32	26989	6,47	x			glutationa transferase classe delta		transferase		
	37	29577	5,02	x	x			?	?		
	39	29779	4,92	x	x			?	?		
	40	29982	4,86	x	x			?	?		
	41	30806	5,88	x				Der f 6	cisteína endopeptidase		
	43	30911	5,63	x				Der f 6	cisteína endopeptidase		
	44	31227	6,85	x	x	x		?	?		
	45	31654	6,05	x				Der f 6	serina endopeptidase		
	46	31869	6,60	x	x	x		Der f 6	serina endopeptidase		
	49	32857	6,11	x				Der f 6	serina endopeptidase		
	50	33194	6,84	x	x	x		?	?		
	52	36132	5,18	x	x	x		Der f 10	tropomiosina		
	53	36378	6,85	x				?	?		
	54	36750	5,01	x	x	x		Der f 10	tropomiosina		

Spot ID correspondentes aos spots mapeados na Fig.8B.

[£]Dados experimentais calculados pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.

[§] Alérgenos hipotéticos encontrados no banco de dados <http://ca.expasy.org/tools/tagident.html> UniProtKB/TrEMBL.

Mr, Massa molecular relativa em kiloDaltons (kDa); pI (ponto isoelétrico); ? Indefinido.

Reatividade a diferentes isótipos de anticorpos é representada por marcas coloridas (x), com as colunas de reatividade para IgE, IgG4 e IgG1 nos atópicos correspondendo aos spots indicados por números coloridos na Fig. 8B, e as colunas de reatividade para IgG4 e IgG1 nos não atópicos correspondendo aos spots indicados por números coloridos na Fig. 10B.

Tabela 4. Lista das proteínas hipotéticas de *Dermatophagoides farinae* reconhecidas por anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos após análise imunoproteômica 2-D (área II do gel 2-D).

Spot ID [#]	Mr (Da) [€]	pI [€]	Atópicos			Não atópicos		Alérgeno hipotético [§]	Provável função molecular
			IgE	IgG4	IgG1	IgG4	IgG1		
55	38022	5,96	x	x	x		x	Der f 1	cisteína endopeptidase
56	38230	6,03	x	x	x		x	Der f 1	cisteína endopeptidase
57	39073	5,85	x	x	x		x	Der f 1	cisteína endopeptidase
58	39073	6,55	x	x	x	x	x	Der f 20	arginina quinase
59	39286	6,32	x	x	x	x	x	Der f 20	arginina quinase
60	39501	6,37	x	x	x	x	x	Der f 20	arginina quinase
61	39717	6,62	x	x	x	x	x	Der f 20	arginina quinase
62	39934	5,72	x	x	x		x	Der f 1	cisteína endopeptidase
64	40372	5,39	x			x		?	?
65	40592	5,30	x			x		?	?
66	41037	5,23	x			x		?	?
67	42866	5,04	x			x		?	?
68	43101	4,97	x			x		?	?
70	48065	5,14	x			x		?	?
71	48065	5,22	x			x		?	?
Área II	72	48328	6,48	*	*	x	x	NADH-ubiquinona oxidoreduzase (cadeia 4)	NADH desidrogenase (ubiquinona)
	73	48592	5,08	x		x		?	?
	74	49124	6,31	*	*	x	x	NADH-ubiquinona oxidoreduzase (cadeia 4)	NADH desidrogenase (ubiquinona)
	75	49393	5,29	x		x		?	?
	76	53309	6,24	*	*	x	x	NADH-ubiquinona oxidoreduzase (cadeia 4)	NADH desidrogenase (ubiquinona)
	77	53894	6,15	*	*	x	x	NADH-ubiquinona oxidoreduzase (cadeia 4)	NADH desidrogenase (ubiquinona)
	79	55990	5,52	x	x	x	x	Citocromo c oxidase (subunidade 1)	citocromo c oxidase
	80	57224	5,80	x	x	x	x	Citocromo c oxidase (subunidade 1)	citocromo c oxidase
	81	57537	6,11	x	x	x	x	Citocromo c oxidase (subunidade 1)	citocromo c oxidase
	82	58167	5,98	x	x	x	x	Citocromo c oxidase (subunidade 1)	citocromo c oxidase
	83	58485	5,70	x	x	x	x	Citocromo c oxidase (subunidade 1)	citocromo c oxidase
	85	59774	5,59	x	x	x	x	Citocromo c oxidase (subunidade 1)	citocromo c oxidase

Tabela 4. Continuação...

Spot ID [#]	Mr (Da) ^f	pI ^f	Atópicos			Não atópicos		Alérgeno hipotético ^g	Provável função molecular	
			IgE	IgG4	IgG1	IgG4	IgG1			
90	66297	5,17	x	x	x	x	x	Der f 15	quitinase	
91	66297	5,33	x	x	x	x	x	Der f 15	quitinase	
93	68875	5,06	x	x	x	x	x	Der f 15	quitinase	
96	76391	6,91	x	x	x	x		?	?	
98	88552	5,92	x		x	x	x	?	?	
99	89235	5,83	x		x	x	x	?	?	
100	90617	5,74	x		x	x	x	?	?	
101	92021	6,29	x		x	x	x	?	?	
102	92731	6,10	x		x	x	x	?	?	
103	92731	6,20	x		x	x	x	?	?	
104	93447	6,47	x		x	x	x	?	?	
Área II	105	98613	5,85	x		x	x	x	?	?
	106	98613	5,92	x		x	x	x	?	?
	108	116364	5,72	*	*		x	alérgeno HMW	atividade motora	
	109	116364	5,86	*	*		x	alérgeno HMW	atividade motora	
	110	117744	5,93	*	*		x	alérgeno HMW	atividade motora	
	111	127874	5,21	x	x	x	x	?	?	
	113	158106	6,81	x		x	x	?	?	
	114	163798	5,21	x	x	x	x	?	?	
	115	167707	5,08	x	x	x	x	?	?	
	116	173745	5,34	x	x	x	x	?	?	
	117	209815	5,93		*			?	?	
	118	217370	4,83	x	x	x		?	?	
	119	219948	5,86		*			?	?	

Spot ID correspondentes aos *spots* mapeados na Fig.8B.

^f Dados experimentais calculados pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.

^g Alérgenos hipotéticos encontrados no banco de dados <http://ca.expasy.org/tools/tagident.html> UniProtKB/TrEMBL.

M_r, Massa molecular relativa em kiloDaltons (kDa); pI (ponto isoelétrico); ? Indefinido.

Reatividade a diferentes isótipos de anticorpos é representada por marcas coloridas (x), com as colunas de reatividade para IgE, IgG4 e IgG1 nos atópicos correspondendo aos *spots* indicados por números coloridos na Fig. 8B, e as colunas de reatividade para IgG4 e IgG1 nos não atópicos correspondendo aos *spots* indicados por números coloridos na Fig. 10B.

A reatividade concomitante para IgE, IgG4 e IgG1 nos pacientes atópicos foi observada em 28 *spots*, dos quais somente dois pares de *spots* (52/54 e 44/50) foram detectados na área I (Fig. 8B). O primeiro par foi relacionado ao Der f 10 e o último par não pode ser relacionado a nenhum alérgeno hipotético conhecido (Fig. 9, Tabela 3). Os demais *spots* reconhecidos pelos três isótipos de anticorpos foram encontrados na área II (Fig. 8B). Dentre eles, *spots* 55-57 e 62 foram relacionados ao Der f 1; *spots* 58-61 ao Der f 20; *spots* 79-83 e 85 ao citocromo c oxidase; *spots* 87, 90, 91, e 93 ao Der f 15; e alguns *spots* (96, 111, 114-116, e 118) não puderam ser relacionados a nenhum alérgeno hipotético conhecido (Fig. 9, Tabela 4).

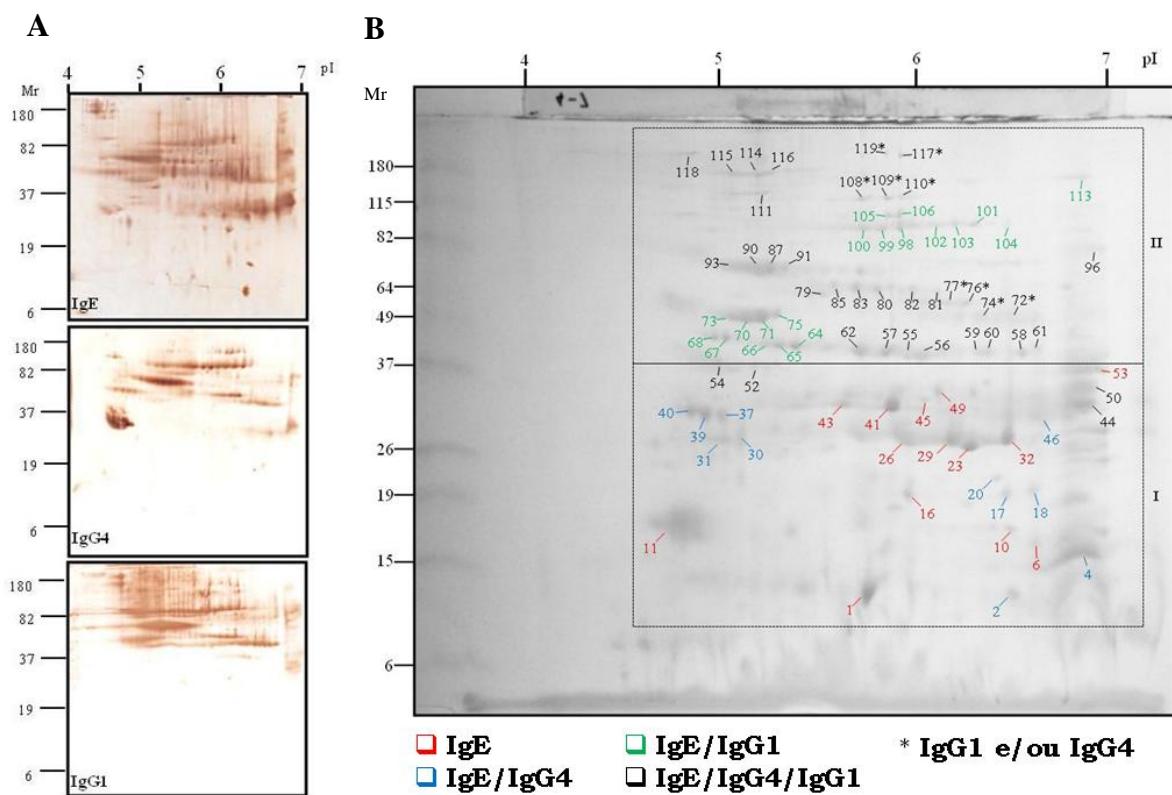


Figura 8. Perfis de *immunoblot* 2-D do extrato de *D. farinae* para a reatividade de IgE, IgG4 e IgG1 no soro de pacientes atópicos (A) com um *blot* representativo para cada isótipo de anticorpo. (B) Gel 2-D corado por Blue silver mostrando *spots* proteicos que foram reativos a IgE, IgG4 e/ou IgG1 após *matching* com o *immunoblot* 2-D correspondente. As áreas retangulares foram arbitrariamente traçadas para auxiliar na comparação dos *spots* reativos em *immunoblots*, de acordo com os valores de Mr como segue: (I) <37 kDa e (II) >37 kDa. Os *spots* indicados por números coloridos representam alvos que foram reconhecidos somente por IgE (vermelho), IgE e IgG4 (azul), IgE e IgG1 (verde), e IgE, IgG4, e IgG1 (preto). *Spots* indicados por (*) representam reatividade a IgG4 e/ou IgG1, mas não a IgE.

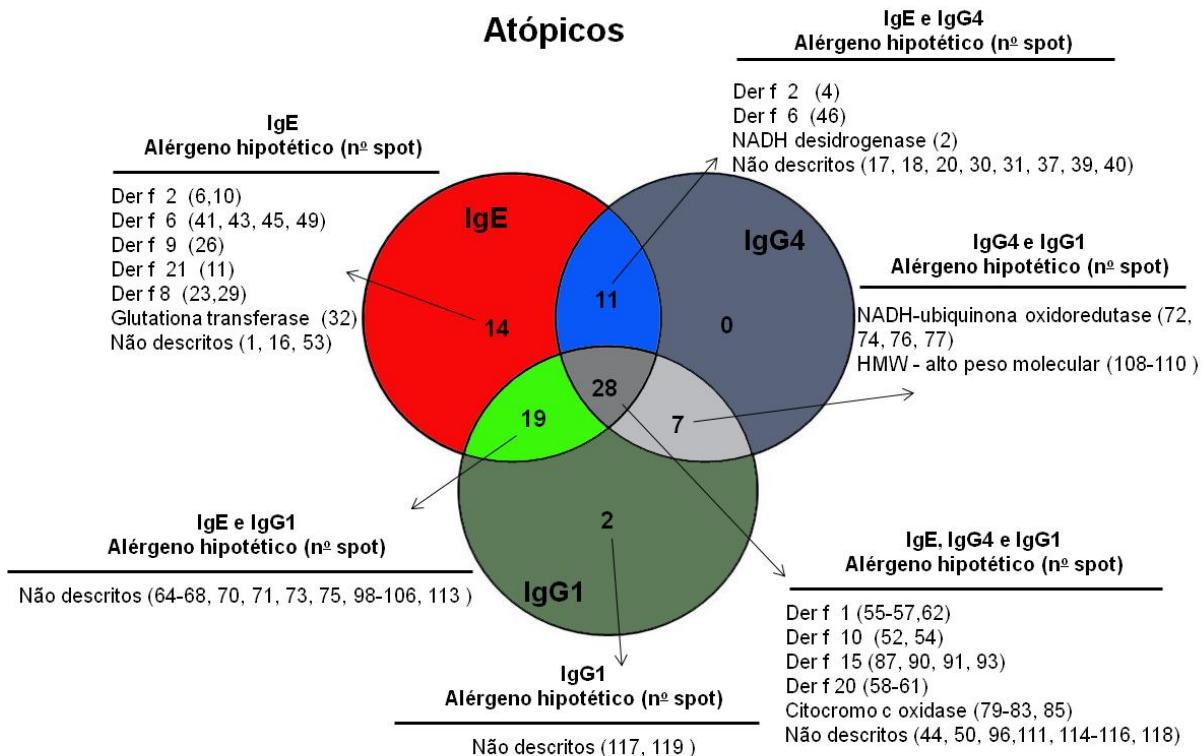


Figura 9. Diagrama de Venn mostrando o número de *spots* antigenicos exclusivos e compartilhados entre os isótipos de anticorpos (IgE, IgG1 e IgG4) específicos a *D. farinae* que foram reconhecidos por anticorpos de indivíduos atópicos em *immunoblot* 2D. Os *spots* foram relacionados com alérgenos hipotéticos já descritos no banco de dados UniProtKB/TrEMBL.

Além disso, 7 *spots* foram reativos a ambos IgG4 e IgG1, mas não para IgE no grupo atópico e foram encontrados somente na área II (Fig. 8B). Dentre eles, os *spots* 72, 74, 76 e 77 foram relacionados à proteína hipotética NADH-ubiquinona oxidoreductase e os *spots* 108-110 foram relacionados aos alérgenos de alto peso molecular (HMW). Por outro lado, foram detectados 2 *spots* (117 e 119) reativos somente para IgG1 que não puderam ser relacionados a nenhum alérgeno hipotético conhecido (Fig. 9, Tabela 4). E vale ressaltar a ausência de *spots* reativos exclusivos para IgG4 no grupo de pacientes atópicos.

No grupo dos não atópicos, *spots* reconhecidos por IgG4 e/ou IgG1 foram predominantemente detectados na área II (>37 kDa) com Mr entre 11 e 174 kDa e pI de 5,1 a 6,9 (Fig. 10). *Immunoblots* representativos para cada isótipo de anticorpo estão ilustrados na

figura 10A. Foi observado que 13 *spots* foram reconhecidos somente por IgG4 e migraram em ambas as áreas I e II. Na área I, três *spots* isolados (2, 4 e 46) foram relacionados à proteína hipotética NADH desidrogenase, Der f 2 e Der f 6, respectivamente, e um par de *spots* (44/50) não pode ser relacionado a nenhum alérgeno hipotético conhecido (Fig. 11, Tabela 3). Na área II, um conjunto de *spots* (79-83/85) foi relacionado ao citocromo c oxidase e dois *spots* isolados (96 e 113) não puderam ser relacionados a nenhum alérgeno hipotético conhecido (Fig. 11, Tabela 4).

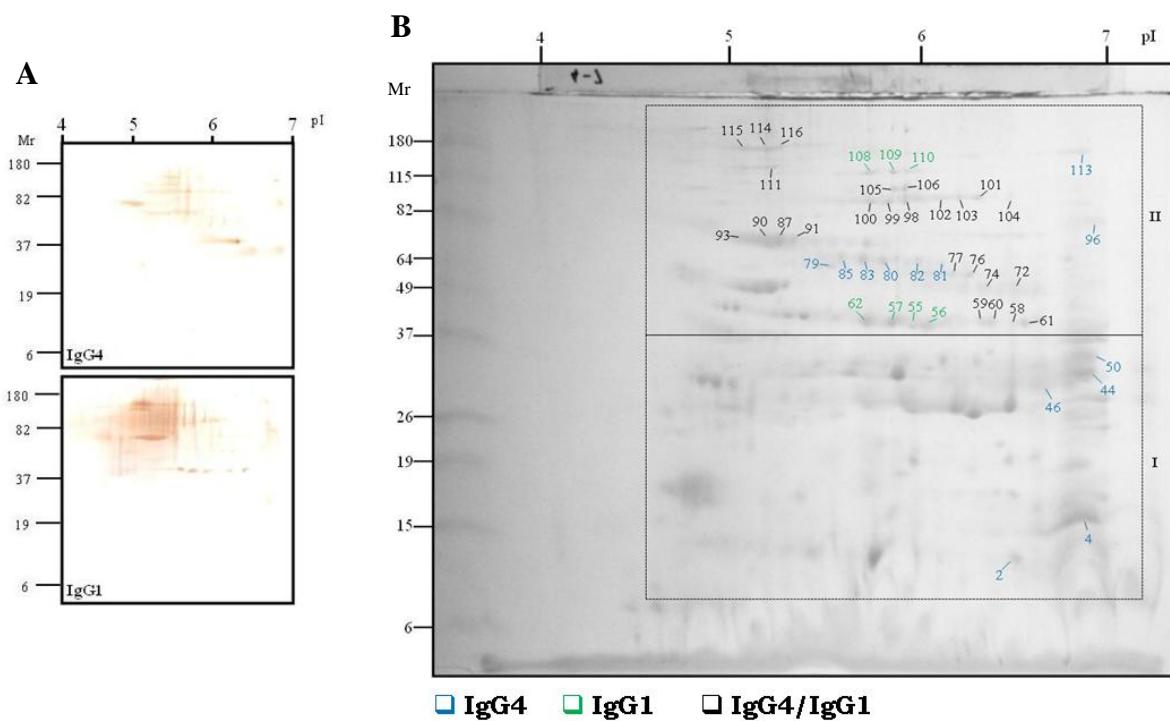


Figura 10. Perfis de *immunoblot* 2-D do extrato de *D. farinae* para a reatividade de IgG4 e IgG1 no soro de indivíduos não atópicos (A), com um *blot* representativo para cada isótipo de anticorpo. (B) Gel 2-D corado por *Blue silver* mostrando *spots* proteicos que foram reativos a IgG4 e/ou IgG1 após *matching* com o *immunoblot* 2-D correspondente. As áreas retangulares foram arbitrariamente traçadas para auxiliar na comparação dos *spots* reativos em *immunoblots*, de acordo com os valores de Mr como segue: (I) <37 kDa e (II) >37 kDa. Os *spots* indicados por números coloridos representam alvos que foram reconhecidos somente por IgG4 (azul), somente IgG1 (verde) e ambos IgG4 e IgG1 (preto).

Por outro lado, 7 *spots* foram reativos somente para IgG1 e foram encontrados exclusivamente na área II, com dois conjuntos de *spots* (55-57/62 e 108-110) que foram relacionados ao alérgeno hipotético Der f 1 e aos alérgenos de alto peso molecular (HMW),

respectivamente (Fig. 11 e Tabela 4). Da mesma forma, 25 *spots* foram reconhecidos por ambos os anticorpos IgG1 e IgG4 e foram detectados somente na área II, com vários conjuntos de *spots* relacionados à Der f 20 (58-61), NADH-ubiquinona oxidoreduktase (72/74/76/77), Der f 15 (87/90/91/93), e outros que não puderam ser relacionados a nenhum alérgeno hipotético conhecido (98-106, 111, 114-116) (Tabela 4).

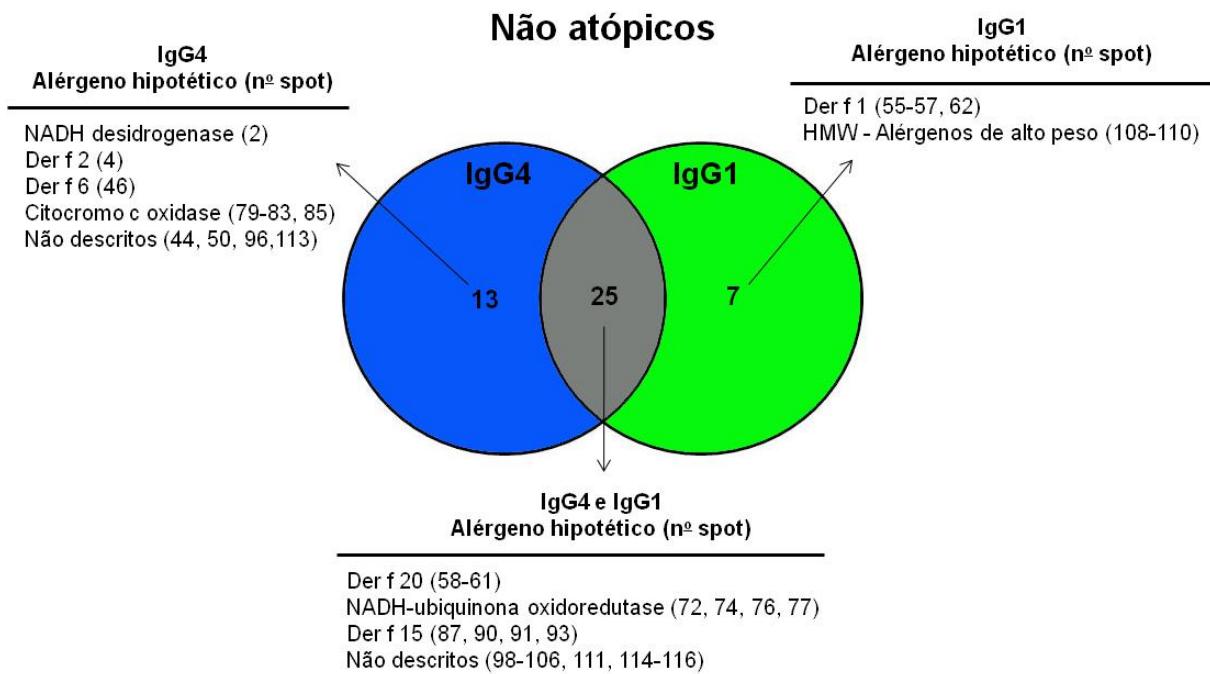


Figura 11. Diagrama de Venn mostrando o número de *spots* antigênicos exclusivos e compartilhados entre os isótipos de anticorpos (IgG4 e IgG1) específicos a *D. farinae* que foram reconhecidos por anticorpos de indivíduos não atópicos em *immunoblot* 2D. Os *spots* foram relacionados com alérgenos hipotéticos já descritos no banco de dados UniProtKB/TrEMBL.

5 Discussão



Os extratos brutos de ácaro são considerados uma mistura diversa de diferentes proteínas e outras macromoléculas derivadas do corpo das formas adultas, ninfas, bolotas fecais, ovos e também do meio de cultura em que foram cultivados. A reatividade de IgE a alérgenos de ácaros tem sido extensivamente estudados e caracterizados, uma vez que as proteínas reconhecidas por IgE são particularmente importantes para identificar o perfil de sororeatividade em pacientes atópicos e para caracterizar moléculas candidatas úteis para o diagnóstico de alergia e para o monitoramento da imunoterapia específica com alérgenos (THOMAS et al., 2002). Por outro lado, as proteínas reconhecidas por IgG1 e IgG4 estão especialmente ligadas a estudos de imunoterapia devido ao papel bloqueador desses anticorpos da subclasse IgG (HALES et al., 2006; JAMES et al., 2011). Entretanto, a identificação dessas proteínas tem sido pouco investigada tanto em pacientes atópicos quanto em indivíduos não atópicos, uma vez que a maioria dos estudos tem mostrado um perfil de sororeatividade das subclasses IgG para os extratos totais de ácaros. No presente estudo, foi demonstrado um extenso repertório de proteínas do extrato de *D. farinae* que foram reconhecidas diferencialmente pelos anticorpos específicos IgE, IgG1 e IgG4 em paciente atópicos e indivíduos não atópicos com base em ensaios imunoproteômicos.

Inicialmente, todas as amostras séricas foram selecionadas por ELISA para identificar aquelas que eram positivas para cada classe e subclasse de anticorpo. Como esperado, todos os pacientes atópicos mostraram reatividade de IgE à *D. farinae* enquanto que resultados de IgE negativos foram visualizados no grupo não atópico. Quando analisando as subclasses de IgG, altos níveis de IgG4 predominaram nos pacientes atópicos, demonstrando alta copositividade com IgE (93%), embora não tenha correlacionado significantemente. Estes achados podem estar relacionados ao desenvolvimento da resposta alérgica, na qual a geração de IgE é amplamente dependente de citocinas Th2 que coparticipam com as células Treg na indução da produção de IgG4 pela síntese de IL-10 (NIRULA et al., 2011). Diferentemente, a

reatividade de IgG1 foi similar entre o grupo atópico e não atópico, mostrando alta copositividade com IgE (78%) e IgG4 (67%) no grupo atópico, mas com uma baixa correlação positiva. A presença de IgG1 e IgG4 no soro dos atópicos poderia explicar porque alguns indivíduos possuem sintomas alérgicos leves enquanto outros apresentam sintomas moderados ou graves da doença. Ensaios de competição têm demonstrado que a força de ligação de IgG1 e IgG4 é similar ou maior do que de IgE, dessa forma poderiam competir com a IgE pelo sitio de ligação ao alérgeno (HALES et al., 2006). Assim, JAKOBSEN et al., (2005) tem demonstrado que pacientes com IgG1 e IgG4 de alta afinidade apresentam sintomas de menor intensidade quando comparado a pacientes com estes anticorpos de baixa afinidade.

Nos indivíduos não atópicos, entretanto, a copositividade entre IgG1 e IgG4 foi moderada (43%) sem se correlacionarem, embora tenha sido notável que o positivo somente para IgG1 predominou nos não atópicos, enquanto que para IgG4 foi levemente maior nos atópicos. Neste contexto, os componentes do extrato Df são capazes de provocar uma resposta anticórica considerável mesmo em indivíduos não atópicos, uma vez que a ignorância antigênica (resposta negativa para todos os três anticorpos) foi encontrada em baixa percentagem (7%) dentre os indivíduos não atópicos. Considerando que os indivíduos do estudo estão altamente expostos a *D. farinae*, verificado pela alta frequência deste ácaro na poeira das casas dessa região (SOPELETE et al., 2000), é esperado que indivíduos não atópicos produzam anticorpo IgG1 contra este ácaro. Assim, indivíduos normais poderiam reconhecer抗ígenos de ácaro pela ativação de células B estimuladas por células Th1 produtoras de IFN- γ .

Para investigar os perfis de reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes antigênicos de Df, o *immunoblot* 1-D foi realizado nas amostras selecionadas de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos. Apesar do amplo perfil encontrado para a

reatividade de IgE, somente três bandas mostraram frequências maiores que 50%, das quais a banda de 14 kDa foi reconhecida pela IgE de 97% dos pacientes atópicos. Dentre os alérgenos de Df, o alérgeno principal Der f 2 foi caracterizado como uma proteína de 129 resíduos e com um MW de 14 kDa e nenhum sitio de glicosilação (TRUDINGER; CHUA; THOMAS, 1991). Esses achados demonstram que a maioria dos pacientes atópicos produzem anticorpo IgE predominantemente ao alérgeno Der f 2, corroborando com estudos prévios que mostram frequências de reconhecimento ao grupo 2 por IgE em humanos acima de 80% (LIND, 1985; YASUEDA et al., 1986; ABE; ISHII, 1987; HEYMANN et al., 1989). Outra banda encontrada com frequência acima de 50% de reconhecimento de IgE, 101 kDa (60%), poderia estar relacionada à quitinase ou à paramiosina, que são alérgenos de ácaro de alto peso molecular (HMW) com frequências entre 70 e 80% de reconhecimento de IgE humana (MCCALL et al., 2001; THOMAS et al., 2002). A quitinase é relacionada ao alérgeno do grupo 15, considerado um alérgeno principal de cães e gatos sendo reconhecido em altas frequências pela IgE, e altamente glicosilado, consistindo de aproximadamente 50% de carboidratos. Este alérgeno corresponde a bandas de 98-105 kDa no *immunoblot* dos extratos de ácaro, mas quando considerada apenas cadeia polipeptídica, a mesma corresponde a 63 kDa. Já a paramiosina é uma proteína estrutural do músculo de invertebrados e foi descrita em *D. farinae* como alérgeno do grupo 11 (98 kDa), mostrando alta frequência de reconhecimento de IgE (80%) (TSAI et al., 1999). Dados similares foram encontrados também em outros estudos antes de sua caracterização, com altas frequências de IgE dirigida contra a banda de aproximadamente 100 kDa (NAKANISHI; SHIMOKATA, 1990; LIN; WANG; HSIEH, 1991), o qual poderia estar relacionados à paramiosina. Por outro lado, a frequência de IgE que reconheceu a banda de 25 kDa, que poderia estar relacionado ao alérgeno do grupo 1, foi menor que 50% no grupo atópico, diferentemente de estudos prévios que relataram altas frequências de IgE (80-100%) a este alérgeno (THOMAS et al., 2002).

Estes resultados indicam que a maioria dos pacientes desse estudo estão sensibilizados aos alérgenos do grupo 2, seguido pelo grupo 11 e 15. Porém, a sensibilização ao outro alérgeno principal, Der f 1, não deve ser descartada, pois a desnaturação pelo calor em solução contendo SDS pode interferir na reatividade a este alérgeno, como já observado em outros estudos (LOMBARDERO et al., 1990; LE MAO et al., 1998).

Analizando os componentes que foram reconhecidos por IgG4 e IgG1, notou-se um perfil de reatividade divergente entre ambos anticorpos, particularmente no grupo não atópico, com reconhecimento de IgG4 predominantemente a bandas menores que 30 kDa e de IgG1 exclusivamente a bandas maiores que 30 kDa. Nos pacientes atópicos o perfil de reconhecimento de IgG4 foi amplo como para IgE, com apenas uma banda >50%, 16 kDa (73%) que poderia estar relacionada com isoformas do alérgeno do grupo 2. Interessantemente, bandas de alto peso molecular (>165 kDa) mostraram aproximadamente 50% de reconhecimento de IgG4 somente no grupo atópico, sugerindo um importante papel de alérgenos de alto peso em estudo de imunoterapia. Estudo recente tem mostrado que o alérgeno do grupo 14 é composto por proteínas homólogas à apolipoforina com peso molecular de 177-190 kDa, incluindo o alérgeno Mag 3 que foi encontrado apenas no extrato de Df, mas não em *D. pteronyssinus* (ASMAN et al., 2010). Ao contrário, nos indivíduos não atópicos, o reconhecimento de IgG4 foi predominante para bandas menores que 30 kDa, particularmente a banda de 29 kDa (67%) que poderia estar relacionada ao alérgeno do grupo 6 e a banda de 14 kDa (53%) relacionando-se com variantes do alérgeno do grupo 2 (THOMAS et al., 2002). Curiosamente, a reatividade de IgG1 mostrou uma predominância a bandas maiores que 30 kDa nos atópicos e particularmente a alérgenos de alto peso nos não atópicos. No grupo atópico, é notável uma reatividade de IgG1 exclusiva às bandas de 53 e 58 kDa que poderiam estar associadas com os alérgenos de grupo 16 (gelsolina) ou grupo 18 (quitinase) (THOMAS et al., 2002). Já nos não atópicos, entretanto, os alérgenos de alto peso

(76, 101 e >165 kDa) foram mais reconhecidos por IgG1, suportando o papel desses alérgenos em promover uma resposta com anticorpos bloqueadores. Neste contexto, a IgG1 poderia estar competindo com a IgE pelos epítópos de alérgenos de alto peso enquanto que para bandas <30 kDa esta competição possa estar ocorrendo entre IgE e IgG4. Este fato pode também estar relacionado com uma menor quantidade e gravidade de sintomas que alguns pacientes atópicos apresentam como já mencionado anteriormente (JAKOBSEN et al., 2005). Considerando que todos os indivíduos do estudo nunca foram submetidos a nenhum tratamento imunoterápico, estes resultados reforçam a importância da resposta individual e a especificidade dos alérgenos que deveriam ser levados em consideração no tratamento das alergias, como já foram apontados em estudos prévios (TAKETOMI EA et al., 2006).

A identificação dos componentes do extrato Df reconhecidos por IgE, IgG4 e IgG1 foi realizado por ensaios de imunoproteômica usando amostras representativas de pacientes atópicos e indivíduos não atópicos. Primeiro, uma alta resolução foi observada no perfil de eletroforese 2-D, com um total de 119 *spots* proteicos distribuídos em uma ampla faixa de Mr (10 a 220 kDa) e uma faixa estreita de pI (4,8 a 6,9). Um grande número de proteínas (67%) foi reconhecido por pelo menos um dos três anticorpos analisados no *immunoblot* 2-D. Distintos perfis de reatividade foram observados para cada isotipo de anticorpo em ambos os grupos e os *spots* antigênicos foram analisados baseados no perfil de reconhecimento de anticorpos em cada grupo. Nos pacientes atópicos, o conjunto mais interessante de *spots* foram aqueles reconhecidos apenas por IgE, e curiosamente todos eles foram detectados abaixo de 37 kDa. Esses *spots* foram relacionados aos alérgenos Der f 2, Der f 6, Der f 8, Der f 9, Der f 21, glutationa transferase e outros que não puderam ser relacionados a nenhum alérgeno hipotético conhecido. Da mesma forma, os *spots* reconhecidos por IgE e IgG4, mas não por IgG1 foram encontrados somente na área I, com três *spots* isolados sendo relacionados a Der f 2, Der f 6 e NADH desidrogenase, apesar da maioria deles não terem

sido relacionados com alérgenos hipotéticos. Embora os alérgenos Der f 2 e Der f 6 terem sido reconhecidos tanto por IgE quanto por IgG4, aparentemente esses *spots* podem estar representando isoformas de um mesmo alérgeno, com pequenas diferenças em seus valores de Mr e pI. Esses achados corroboram com os resultados de *immunoblot* 1-D que não mostra nenhuma reatividade de IgG1 a bandas menores que 30 kDa e indicam que esses alérgenos exercem uma importante função nas respostas alérgicas e estão associadas com o perfil de resposta Th2 com a produção de IL-4 e a síntese de IgE bem como a participação de células Treg induzindo IL-10 para síntese de IgG4 como anticorpo bloqueador (JAKOBSEN et al., 2005). Além disso, os *spots* reconhecidos somente por IgE poderiam ser candidatos para caracterização por espectrometria de massas e para utilização no diagnóstico de sensibilização ao ácaro e de doenças alérgicas.

Interessantemente, *spots* reconhecidos por IgE e IgG1, mas não por IgG4 foram encontrados apenas na área II e eles migraram como dois grandes aglomerados, os quais não puderam ser relacionados com nenhum alérgeno hipotético. Outro perfil encontrado somente na área II foram aqueles *spots* reconhecido por IgG1 e IgG4, mas não por IgE, e foram relacionados com NADH-ubiquinona oxidoredutase e alérgenos HMW.

Finalmente, alguns que *spots* reagiram aos três anticorpos foram predominantemente observados na área II, alguns deles foram relacionados com Der f 1, Der f 10, Der f 15, Der f 20 e citocromo c oxidase. Portanto, esses *spots* predominantemente encontrados na área II que foram reconhecidos por IgE e/ou IgG1/IgG4 de pacientes atópicos são candidatos potenciais para caracterização por espectrometria de massas e úteis nos procedimentos imunoterapêuticos.

Comparando os grupos atópico e não atópico, foi interessante notar que os *spots* reconhecidos somente por IgE no grupo atópico, como aqueles relacionados a Der f 2, Der f 6,

Der f 8, Der f 9 e Der f 21, também não foram reconhecidos por IgG1 nem IgG4 de indivíduos não atópicos, indicando que esses alérgenos ou suas isoformas são mais importantes na sensibilização de indivíduos geneticamente predispostos e representam fortes candidatos para serem usados na confirmação etiológica do diagnóstico de alergia. Embora, alguns *spots* reconhecidos por IgE e IgG4 do grupo atópico, particularmente Der f 2 e Der f 6, também foram reconhecidos por IgG4 do grupo não atópico, reforçando a possível ocorrência de isoformas. Nesse contexto, isoalérgenos de Der p 2 foram relatados com diferentes alergenicidades, suportando a presença de polimorfismos na sequência de aminoácidos que podem influenciar o reconhecimento dos epítópos por IgE e bem como por células T de pacientes alérgicos (SMITH et al., 2001; PARK et al., 2002).

Analizando a reatividade de IgG1, é digno de nota que esse anticorpo reconheceu predominantemente *spots* >37 kDa em ambos os grupos. Um interessante perfil encontrado foram daqueles *spots* reconhecidos somente por IgG1 em indivíduos não atópicos, os quais foram relacionados aos alérgenos Der f 1 e HMW. Contudo, quando comparando com o grupo atópico, os alérgenos HMW não foram reconhecidos por IgE. Estes achados podem ser úteis para excluir esses alérgenos como candidatos para imunoterapia, uma vez que eles não foram reconhecidos por IgE. Isso também é válido para outros *spots* que foram reativos para IgG1 e/ou IgG4, mas não para IgE e que não foram relacionados com alérgenos hipotéticos. Diferentemente, o alérgeno Der f 10 foi reconhecido pelos três isotipos de anticorpos apenas por pacientes atópicos, indicando que pode ser considerado importante na sensibilização de indivíduos predispostos uma vez que foi ignorado por indivíduos não atópicos. Por último, Der f 1 e outros *spots* reconhecidos por IgG1 de indivíduos não atópicos, como Der f 15 e Der f 20 poderiam ser candidatos para caracterização por espectrometria de massas e úteis na em procedimentos imunoterápicos. Dessa forma, podemos concluir que o conhecimento da imunoreatividade dos抗ígenos derivados do ácaro *D. farinae* pode ser útil para o

sorodiagnóstico e abre oportunidades para o desenvolvimento de imunoterapia personalizada para pacientes com doenças alérgicas.

6 Conclusões



- ❖ Foi encontrado um grande número de componentes de *D. farinae* reativos a IgE, IgG1 e IgG4 por ensaios imunoprôteomicos em ambos os grupos, atópico e não atópico, e a maioria deles puderam ser relacionadas à alérgenos já descritos.

- ❖ O perfil diferencial de anticorpos detectado será importante para selecionar moléculas candidatas para a confirmação do diagnóstico etiológico bem como no monitoramento de imunoterapia alérgeno-específica.

- ❖ A caracterização por espectrometria de massas deve ser realizada para confirmar os alérgenos hipotéticos e identificar a possibilidade da existência de novos epítópos imunodominantes reconhecidos pelos pacientes desse estudo.

7 *Referências Bibliográficas*¹



¹ SILVA, A. M.; PINHEIRO, M. S.; FREITAS, N. E. **Guia para normatização de trabalhos técnicos-científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses.** 4. ed. Uberlândia: EDUFU, 2002. 157p.

AALBERSE, R. C.; STAPEL, S. O.; SCHUURMAN, J.; RISPENS, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. **Clinical and Experimental Allergy**, v.39, p. 469-477, 2009.

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

ABE, T.; ISHII, A. Comparison of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens from culture medium extract and whole body extract by using the same probe of pooled human serum. **Allergy**, v. 42, p. 352-358, 1987.

AKDIS, M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 738-744, 2006.

AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.123, p. 735-746, 2009.

AKDIS, M.; VERHAGEN, J.; TAYLOR, A.; KARAMLOO, F.; KARAGIANNIDIS, C.; CRAMERI, R.; THUNBERG, S.; DENIZ, G.; et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, p. 1567-1575, 2004.

ALLERGEN NOMENCLATURE. Disponível em: <<http://www.allergen.org/Allergen.aspx>>. Acesso em: 19 Jul. 2011.

ALLERGOME. Disponível em: <http://www.allergome.org/script/dettaglio.php?id_molecule=1803>. Acesso em: 19 jul. 2011.

ARLIAN, L. G.; PLATTS-MILLS, T. A. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, p. 406-413, 2001.

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

ARSHAD, S. H. Does Exposure to Indoor Allergens Contribute to the Development of Asthma and Allergy? **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 10, p. 49–55, 2010.

ASMAN, M.; SOLARZ, K.; SZILMAN, E.; SZILMAN, P. Analysis of expression and amino acid sequence of the allergen Mag 3 in two species of house dust mites- *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Astigmata: Pyroglyphidae). **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 17, p. 45-48, 2010.

BAGGIO, D.; AMBROZIO, J. L. C.; ANTILA, M. Ácaros ambientais e as manifestações alérgicas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 12, p. 56-58, 1989.

BATARD, T.; BASUYAUX, B.; LAROZE, A.; LAMBIN, P.; BREMARD-OURY, C.; AUCOUTURIER, P.; HAMILTON, R. G.; DAVID, B.; PELTRE, G. Isotypic analysis of grass-pollen-specific immunoglobulins in human plasma. 2. Quantification of the IgE, IgM, IgA class and the IgG subclass antibodies. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 102, p. 279-287, 1993.

BATARD, T.; HRABINA, A.; BI, X. Z.; CHABRE, H.; LEMOINE, P.; COURET, M.; FACCENDA, D.; VILLET, B.; HARZIC, P.; ANDRÉ, F.; GOH, S. Y.; ANDRÉ, C.; CHEW, F. T.; MOINGEON, P. Production and Proteomic Characterization of Pharmaceutical-Grade *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* Extracts for Allergy Vaccines. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 140, p. 295-305, 2006.

BATEMAN, E. D.; HURD, S. S.; BARNES, P. J.; BOUSQUET, J.; DRAZEN, J. M.; FITZGERALD, M.; GIBSON, P.; OHTA, K.; O'BRYNE, P.; PEDERSEN, S. E.; PIZZICHINI, E.; SULLIVAN, S. D.; WENZEL, S. E.; ZAR, H. J. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **European Respiratory Journal**, v. 31, p. 143-178, 2008.

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

BERGER, W. E. Overview of allergic rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v.90, p. 7-12, 2003.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, p. 235–238, 2006.

BLAISS, M. S. Allergic rhinoconjunctivitis: burden of disease. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 28, p. 393-397, 2007.

BOGDANOV, A. Deux àcariens, trouvés par M. Schyremetewsky sur l'homme. **Bulletin de la Société Imperiale des Naturalists de Moscou**, v. 37, p. 341-345, 1864.

BOLUDA, L.; CUADRA, B.; BERRENS, L. Binding affinities of allergens from pollen, mites, and house dust for specific IgG subclass antibodies. **Allergy**, v. 51, p. 706-711, 1996.

BOUSQUET, J.; KHALTAEV, N.; CRUZ, A. A.; DENBURG, J.; FOKKENS, W. J.; TOGIAS, A. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization and AllerGen). **Allergy**, v. 63, p. 8-160, 2008.

BUFE, A. The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 117, p. 215-219, 1998.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CHAPMAN, M. D. Allergen nomenclature. In: Lockey RF, Bukantz SC, Bousquet J, editors. **Allergens and allergen immunotherapy**. New York: Marcel Decker; 2003. p. 51-64.

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

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

CROMWELL, O. Biochemistry of allergens. In: KAY, A.B. **Allergy and allergic diseases**, Oxford: Blackwell Science Ltd., v.2, p. 797-810, 1997.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 67, p. 52-54, 1985.

DEMAIN, J. G.; MINAEI, A. A.; Tracy, J. M. Anaphylaxis and insect allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, p. 318-322, 2010.

DEVEY, M. E.; WILSON, D. V.; WHEELER, A. W. The IgG subclass of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensitization. **Clinical Allergy**, v. 6, p. 227-236, 1976.

DHARMAGE, S.; BAILEY, M.; RAVEN, J.; MITAKAKIS, T.; CHENG, A.; GUEST, D.; ROLLAND, J.; FORBES, A.; THIEN, F.; ABRAMSON, M.; WALTERS, E. H. Current indoor allergen levels of fungi and cats, but not house dust mites, influence allergy and asthma in adults with high dust mite exposure. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, p. 65–71, 2001.

DONG, C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. **Immunology Reviews**, v. 226, p. 80–86, 2008.

DUFF, A. L.; PLATTS-MILLS, T. A. Allergens and asthma. **Pediatric Clinics of North America**, v. 39, p. 1277-1291, 1992.

FLANAGAN, J. C.; RABBITTS, T. H. Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing gamma, epsilon and alpha genes. **Nature**, v. 300, p. 709-713, 1982.

FOKKENS, W. J. Antigen-presenting cells in nasal allergy. **Allergy**, v. 54, p. 1130-1141, 1999.

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**, v. 25, p. 2-9, 2002.

GEHRING, U.; HEINRICH, J.; JACOB, B.; RICHTER, K.; FAHLBUSCH, B.; SCHLENGVOIGT, G.; BISCHOF, W.; WICHMANN, H. E.; INGA STUDY GROUP. Respiratory symptoms in relation to indoor exposure to mite and cat allergens and endotoxins. Indoor Factors and Genetics in Asthma (INGA) Study Group. **The European Respiratory Journal**, v. 18, p. 555–563, 2001.

GOUNNI, A. S.; LAMKHOUED, B.; OCHIAI, K.; TANAKA, Y.; LAPORTE, E.; CAPRON, A.; KINET, J. P.; CAPRON, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. **Nature**, v. 367, p. 183-186, 1994.

GRI, G.; PICONESE, S.; FROSSI, B.; MANFROI, V.; MERLUZZI, S.; TRIPODO, C.; VIOLA, A.; et al. CD41CD251regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. **Immunity**, v. 29, p. 771-781, 2008.

HALES, B. J.; MARTIN, A. C.; PEARCE, L. J.; LAING, I. A.; HAYDEN, C. M.; GOLDBLATT, J.; LE SOUËF, P. N.; THOMAS, W. R. IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, p. 361-367, 2006.

HAMID, Q.; TULIC, M. Immunobiology of asthma. **Annual Review of Physiology**, v. 71, p. 489-507, 2009.

HARRINGTON, L. E.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; TURNER, H.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M.; WEAVER, C. T. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1123-1132, 2005.

HELLINGS, P. W.; KASRAN, A.; LIU, Z.; VANDEKERCKHOVE, P.; WUYTS, A.; OVERBERGH, L.; MATHIEU, C.; CEUPPENS, J. L. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. **The American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 28, p. 42-50, 2003.

HEYMANN, P. W.; CHAPMAN, M. D.; AALBERSE, R. C.; FOX, J. W.; PLATTS-MILLS, T. A. E. Antigenic and structural analysis of group II allergens (*Der f* II and *Der p* II) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 83, p. 1055-1067, 1989.

HURST, S. D.; MUCHAMUEL, T.; GORMAN, D. M.; GILBERT, J. M.; CLIFFORD, T.; KWAN, S.; MENON, S.; SEYMOUR, B.; JACKSON, C.; KUNG, T. T.; BRIELAND, J. K.; ZURAWSKI, S. M.; CHAPMAN, R. W.; ZURAWSKI, G.; COFFMAN, R. L. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 443-453, 2002.

INSTITUTE OF MEDICINE - NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Clearing the air: asthma and indoor air exposures. 1.ed. Washington: National Academy Press, 2000.

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

JACKOLA, D. R.; PIERSON-MULLANY, L. K.; LIEBELER, C. L.; BLUMENTHAL, M. N.; ROSENBERG, A. Variable binding affinities for allergen suggests a 'selective competition' among immunoglobulins in atopic and non-atopic humans. **Molecular Immunology**, v. 39, p.367-377, 2002.

JAKOBSEN, C. G.; BODTGER, U.; POULSEN, L. K.; ROGGEN, E. L. Vaccination for birch pollen allergy: comparison of the affinities of specific immunoglobulins E, G1 and G4 measured by surface plasmon resonance. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, p. 193-198, 2005.

JAMES, L. K.; SHAMJI, M. H.; WALKER, S. M.; WILSON, D. R.; WACHHOLZ, P. A.; FRANCIS, J. N.; JACOBSON, M. R.; KIMBER, I.; TILL, S. J.; DURHAM, S. R. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, p. 509-516, 2011.

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**, v. 56, p. 813-824, 2001.

JUTEL, M.; AKDIS, C. A. T-cell Subset Regulation in Atopy. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 11, p. 139-145, 2011.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; BUDAK, F.; AEBISCHER-CASAULTA, C.; WRZYSZCZ, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. **European Journal of Immunology**, v. 33, p. 1205-1214, 2003.

KALESNIKOFF, J.; GALLI, S. J. New developments in mast cell biology. **Nature Immunology**, v. 9, p. 1215-1223, 2008.

KEMP, A. S. Allergic rhinitis. **Pediatric Respiratory Reviews**, v. 10, p. 63-68, 2009.

KENEMY, D. M.; URBANEK, R.; EWAN, P.; MCHUGH, S.; RICHARDS, D.; PATEL, S.; LESSOF, M. H. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 19, n. 5, p. 545-549, 1989.

KINET, J. P. The high-affinity IgE receptor (Fc *epsilon* RI): from physiology to pathology. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 931-972, 1999.

KING, T. P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. **Allergy**, v. 9, p. 765-774, 1994.

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

LE MAO, J.; MAYER, C. E.; PELTRE, G.; DESVAUX, F. X.; DAVID, B.; WEYER, A.; SÉNÉCHAL, H. Mapping of *Dermatophagoides farinae* mite allergens by two-dimensional immunoblotting. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, p. 631-636, 1998.

LIN, K. L.; WANG, S. Y.; HSIEH, K. H. Analysis of house dust mite-specific IgE, IgG4, and IgG antibodies during immunotherapy in asthmatic children. **Annals of Allergy**, v. 67, p. 63-69, 1991.

LIND, P. Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 76, p. 753-761, 1985.

LOMBARDERO M, HEYMANN PW, PLATTS-MILLS TAE, FOX JW, CHAPMAN MD. Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II *Dermatophagoides spp.* allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies. **Journal of Immunology**, v. 144, p. 1353-1360, 1990.

MALLING HJ. Methods of skin testing: position paper. **Allergy**, v. 48, p. 55-56, 1993.

MCCALL, C.; HUNTER, S.; STEDMAN, K.; WEBER, E.; HILLIER, A.; BOZIC, C.; RIVOIRE, B.; OLIVRY, T. Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (*Der f 15*) for dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 78, p. 231-247, 2001.

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

MARSH, D. G.; GOODFRIEND, L.; KING, T. P.; LOWENSTEIN, H.; PLATTS-MILLS, T. A. E. Allergen nomenclature. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 64, p. 767-770, 1986.

MARSHALL, J. S. Mast-cell responses to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 787-799, Oct. 2004.

MAURER, A. D.; FIEBINGER, E.; EBNER, C.; REININGER, B.; FISCHER, G. F.; WICHLAS, S.; JOUVIN, M. H.; SCHIMMITT-EGENOLF, M.; KRAFT, D.; KINET, J. P.; STINGL, G. Peripheral blood dendritic cells express Fc ϵ RI as a complex composed of Fc ϵ RI-

a and FcεRIg-chains; and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.157, n. 2, p. 607-616, 1996.

MAURER D, FIEBIGER E, REININGER B, WOLFF-WINISKI B, JOUVIN MH, KILGUS O, KINET JP, STINGL G. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 745-750, 1994.

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

MILÍAN, E.; DÍAZ, A. M. Allergy to house dust mites and asthma. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 23, p. 47-57, 2004.

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

NAKANISHI, K.; SHIMOKATA, K. Immunoblot analysis of *Dermatophagoides farinae* antigen. **Annals of Allergy**, v. 64, p. 219-231, 1990.

NIRULA, A.; GLASER, S. M.; KALLED, S. L.; TAYLOR, F. R. What is IgG4? A review of the biology of a unique immunoglobulin subtype. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 23, p. 119-124, 2011.

NONAKA, M.; PAWANKAR, R.; FUKUMOTO, A.; YAGI, T. Heterogeneous response of nasal and lung fibroblasts to transforming growth factorbeta 1. **Clinical of Experimental Allergy**, v. 38, p. 812-821, 2008.

PALOMARES, O.; YAMAN, G.; AZKUR, A. K.; AKKOC, T.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 1232-1240, 2010.

PARK, J. W.; KIM, K. S.; JIN, H. S.; KIM, C. W.; KANG, D. B.; CHOI, S. Y.; YONG, T. S.; OH, S. H.; HONG, C. S. Der p 2 isoallergens have different allergenicity, and quantification with 2-site ELISA using monoclonal antibodies is influenced by the isoallergens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, p. 1042-1047, 2002.

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

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

PEREIRA, F. L.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite and cat allergen exposure in Brazilian public transport vehicles. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 93, p. 179-184, 2004.

PERZANOWSKI, M. S.; RÖNMARK, E.; PLATTS-MILLS, T. A.; LUNDBÄCK, B. Effect of cat and dog ownership on sensitization and development of asthma among preteenage children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, p. 696-702, 2002.

PIBOONPOCANUN, S.; MALINUAL, N.; JIRAPONGSANANURUK, J.; VICHYANOND, P.; THOMAS, W. R. Genetic polymorphisms of major house dust mite allergens. **Clinical of Experimental Allergy**, v. 36, p. 510-516, 2006.

PLATTS-MILLS, T. A. E. How environment affects patients with allergic disease: Indoor allergens and asthma. **Annals of Allergy**, McLean, v. 72, p. 381-384, 1994.

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

PLATTS-MILLS, T.A.E.; MITCHELL, E.B.; TOVEY, E.R. Airborne allergen exposure, allergen avoidance and bronchial hyperreactivity. In: KAY, A. B.; AUSTEN, K. F.; LICHTENSTEIN, L. M. **Asthma: Physiology, Immunopharmacology and Treatment**. London: Academic Press Inc., p 297-314, 1984.

PLATTS-MILLS, T.A.E.; SOLOMON, W.R. Aerobiology and inhalant allergens. In: MIDDLETON, E. et al. **Allergy: principles and practice**, St. Louis, USA: Mosby-Year Book, p. 469-528, 1993.

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

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

ROBINSON, C.; KALSHEKER, N. A.; SRINIVASAN, N.; KING, C. M.; GARROD, D. R.; THOMPSON, P. J.; STEWART, G. A. On the potential significance of the enzymatic activity of mite allergens to immunogenicity. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 27, p. 10-21, 1997.

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. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, p. 582-588, 2002.

SAMPSON, A. P. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 22-27, 2000.

SCHAEFER P. Urticaria: evaluation and treatment. **American Family Physician**, v. 83, p. 1078-1084, 2011.

SCHMIDT-WEBER, C. B.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. TH17 cells in the big picture of immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, p. 247-254, 2007.

SCHNYDER, B.; LIMA, C.; SCHNYDER-CANDRIAN, S. Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response. **Cytokine**, v. 50, p. 220-227, 2010.

SEARS, M.R.; HERVISON, G.P.; HOLDWAY, 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 Immunology**, v. 19, p. 419-424, 1989.

SECRIST, H.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. Interleukin 4 production by CD4+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen- presenting cell type. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, p. 1081-1089, 1995.

SELTZER, J. Biological contaminants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.94, p.318-326, 1994.

SERGEJEVA, S.; IVANOV, S.; LOTVALL, J.; LINDEN, A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 33, p. 248-253, 2005.

SIMPLICIO, E. C.; SILVA, D. A. O.; BRAGA, I. A.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite and pet allergen exposure in midwestern Brazilian hotels. **Indoor Air**, v. 17, p. 278-283, 2007.

SOUWER, Y.; SZEGEDI, K.; KAPSENBERG, M. L.; DE JONG, E. C. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 821-826, 2010.

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

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

SMITH, W. A.; HALES, B. J.; JARNICKI, A. G.; THOMAS, W. R. Allergens of wild house dust mites: environmental Der p 1 and Der p 2 sequence polymorphisms. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, p. 985-992, 2001.

SMITH, A. M.; YAMAGUCHI, H.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; FU, S. M. Prevalence of IgG anti Der p 2 antibodies in children from high and low antigen exposure groups: Relationship of IgG and subclass antibody responses exposure and allergic symptoms. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 86, p. 102-109, 1998.

SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; TAKETOMI, E. A. *Dermatophagoides farinae* (Der f 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der f 2) allergen exposure among subjects living in Uberlândia, Brazil. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 122, p. 257-263, 2000.

SPORIK, R.; HOLGATE, S. T.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; COGSWELL, J. J. Exposure to house-dust mite allergen (Der p1) and the development to asthma in childhood. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 502-507, 1990.

TAKAI, T.; YOKOTA, T.; YASUE, M.; NISHIYAMA, C.; YUUKI, T.; MORI, A.; OKUDAIRA, H.; OKUMURA, Y. Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 754-758, 1997.

TAKETOMI, E. A.; SILVA, D. A.; SOPELETE, M. C.; GERVÁSIO, A. M.; ALVES, R.; SUNG, S. J. Differential IgE reactivity to Der p 1 and Der p 2 allergens of *Dermatophagoides pteronyssinus* in mite-sensitized patients. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 16, p. 104-109, 2006.

TAXONOMY. Disponível em: <http://www.uniprot.org/taxonomy/6954>. Acesso em: 19 jul. 2011.

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

TERR, A. I. The atopic diseases. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLAW, T. G. **Medical Immunology**. 9.ed. Stamford: Appleton & Lange, p.389-408, 900p., 1997b.

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

TOWBIN, H.; STSEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRUDINGER, M.; CHUA, K. Y.; THOMAS, W. R. cDNA encoding the major mite allergen *Der f II*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 21, p. 33-37, 1991.

TSAI, L.; SUN, Y.; CHAO, P.; NG, H.; HUNG, M.; HSIEH, K.; LIAW, S.; CHUA, K. Sequence analysis and expression of a cDNA clone encoding a 98-kDa allergen in *Dermatophagoides farinae*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, p. 1583-1587, 1999.

TUNNICLIFFE, W. S.; FLETCHER, T. J.; HAMMOND, K.; ROBERTS, K.; CUSTOVIC, A.; SIMPSON, A.; WOODCOCK, A.; AYRES, J. G. Sensitivity and exposure to indoor allergens in adults with differing asthma severity. **The European Respiratory Journal**, v.13, p. 654-659, 1999.

TURNER, H.; KINET, J. P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. **Nature**, v. 402, p. 24–30, 1999. Supplement 6760.

VALOVIRTA, E.; MYRSETH, S. E.; PALKONEN, S. The voice of the patients: allergic rhinitis is not a trivial disease. **Current Opinion of Allergy and Clinical Immunology**, v. 8, p. 1-9, 2008.

WANG, B.; RIEGER, A.; KILGUS, O.; OCHIAI, K.; MAURER, D.; FODINGER, D.; KINET, J. P.; STINGL, G. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeris IgE via FcεRI. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, p. 1353-1365, 1992.

WEIDINGER, S.; GIEGER, C.; RODRIGUEZ, E.; BAURECHT, H.; MEMPEL, M.; KLOPP, N.; GOHLKE, H.; WAGENPFEIL, S.; OLLERT, M.; RING, J.; BEHRENDT, H.; HEINRICH, J.; NOVAK, N.; BIEBER, T.; KRÄMER, U.; BERDEL, D.; Von BERG, A.; BAUER, C. P.; HERBARTH, O.; KOLETZKO, S.; PROKISCH, H.; MEHTA, D.; MEITINGER, T.; DEPNER, M.; Von MUTIUS, E.; LIANG, L.; MOFFATT, M.; COOKSON, W.; KABESCH, M.; WICHMANN, H. E.; ILLIG, T. Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. **PLoS Genetics**, v. 4, p. e1000166, 2008.

WING, K.; ONISHI, Y.; PRIETO-MARTIN, P.; YAMAGUCHI, T.; MIYARA, M.; FEHERVARI, Z.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. **Science**, v. 322, p. 271–275, 2008.

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**, v. 75, p. 440-447, 1997.

WORTH, A.; SHEIKH, A. Food allergy and atopic eczema. **Current Opinion of Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, p. 226-230, 2010.

XING, J.; WU, Y.; NI, B. Th9: a new player in asthma pathogenesis? **Journal of Asthma**, v. 48, p. 115-125, 2011.

YASUEDA, H.; MITA, H.; YUI, Y.; SHIDA, T. Isolation and characterization of two allergens from *Dermatophagoides farinae*. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 81, p. 214-223, 1986.

Anexos



ANEXO 1



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 (34) 3239-4531

**ANÁLISE FINAL Nº 111/07 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O
 PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 056/07**

Projeto Pesquisa: "Análise do perfil anticórpico e de citocinas específicos a diferentes frações de ácaros da poeira domiciliar e produção de anticorpos monoclonais"

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

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

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

O CEP/UFU lembra que:

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

Data para entrega do Relatório parcial: janeiro/2009

Data para entrega do Relatório final: janeiro/2011

13 de abril de 2007.

Sandra Terezinha de Farias Furtado
 Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado

Coordenadora 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.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Laboratório de Imunologia

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Análise do perfil anticópico e de citocinas específicos a diferentes frações de ácaros da poeira domiciliar e produção de anticorpos monoclonais” sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Ernesto Akio Taketomi.

Nesta pesquisa, nós estamos buscando entender o mecanismo de indução *in vitro* de citocinas e a produção de anticorpos monoclonais pelas diferentes espécies de ácaros da poeira domiciliar. Para isso, você será submetido à realização de teste alérgico a aeroalérgenos para triagem dos pacientes e indivíduos saudáveis que participarão do estudo.

Será coletado 20mL de sangue para análise de anticorpos específicos aos aeroalérgenos. Se necessário, você será chamado posteriormente para coleta de mais 60mL de sangue para análise de citocinas específicas e proliferação celular.

Durante esta pesquisa, o atendimento médico será realizado no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e os exames de sangue serão realizados no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU, MG.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados desta pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será totalmente preservada.

Você não terá nenhum ônus e ganho financeiro por participar desta pesquisa.

Os riscos são mínimos, mas podem ocasionar as próprias crises alérgicas. Caso isso aconteça, você será imediatamente examinado por médicos assistentes e receberá tratamento adequado. Dentre os benefícios estão inseridos a possível descoberta, a longo prazo de uma terapia eficaz para o controle das alergias respiratórias.

Você é livre para abandonar sua participação da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você ou responsável do paciente.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com:

Dr. Ernesto A. Taketomi
 Avenida Pará, 1720 Bloco 4C, Campus Umuarama
 Universidade Federal de Uberlândia
 Uberlândia, MG
 Tel.: (034)3218-2195 / Telefax: (034) 3218-2333

Comitê de Ética em Pesquisa/UFU
 Tel.: (34) 3239-4531/4131

Uberlândia, MG _____ / _____ / _____

Assinatura do paciente

ANEXO 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Laboratório de Imunologia

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

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

Nome: _____ Prontuário HC: _____

Data do questionário: ____ / ____ / ____

Idade: _____ Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Sexo: () masculino () feminino

Grau de escolaridade: () Ensino fundamental () Ensino Médio

() Ensino Superior e/ou pós-graduação

Nível sócio-econômico (*renda familiar total*):

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| () 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 7.

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 freqüência 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) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?

- () Sim () Não

7) Nós últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?

() Sim () Não

8) Alguma vez na vida você teve asma?

() Sim () Não

Questionário 2 (Módulo Rinite)

Todas as perguntas deste módulo 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 resfriado ou gripado?

() 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 com resfriado?

() Sim () Não

3) Nos últimos 12 (doze) meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?

() Sim () Não

4) Em qual dos últimos 12 (doze) meses este problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu)

() Janeiro	() Maio	() Setembro
() Fevereiro	() Junho	() Outubro
() Março	() Julho	() Novembro
() Abril	() Agosto	() Dezembro

5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal?

Nada	()
Pouco	()
Moderado	()
Muito	()

6) Alguma vez na vida você teve rinite?

() Sim () Não