



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



Identificação de isoformas de *Blomia tropicalis* (Acari: Echimyopodidae) ligantes de anticorpos IgE de pacientes sensibilizados a ácaros da poeira domiciliar

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

Área de concentração: Imunologia e
Parasitologia Aplicadas.

Karine Cristine de Almeida

**Uberlândia
2010**



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



Karine Cristine de Almeida

Identificação de isoformas de *Blomia tropicalis* (Acari: Echimyopodidae) ligantes de anticorpos IgE de pacientes sensibilizados a ácaros da poeira domiciliar


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


Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 22 de fevereiro de 2010.


Prof. Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo
UNIPAM


Prof. Dr. Nelson Figueiredo Mendes
USP/Marília


Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola
INGEB/UFU


Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva
ICBIM/UFU


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

Dedicatória

*Aos que me ensinaram que a educação é o
legado mais precioso...*

*Brandina e José,
meus pais.*

*Ao que torna minha vida mais feliz, que
faz um segundo virar uma
eternidade pela alegria
de estar ao seu lado,*

*Júlio,
meu esposo.*

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein (1879-1955)

Agradecimentos

À **Deus**, por permitir que o sol nasça a cada manhã nos mostrando que cada dia é um novo recomeço, pela alegria de viver e vencer.

Aos meus pais, **José e Brandina**, pelo desprendimento constante, por serem a base que sustenta toda uma família com filhos, netos e bisnetos.

À minha irmã **Lúcia**, que me ensina a cada dia que a capacidade de realizar está na força do caráter, que é rio a vencer obstáculos, que me incentivou a ler desde a mais tenra infância.

Ao meu esposo **Júlio**, pelo amor tão dedicado, por suportar a distância e se fazer presente sempre que preciso, pelo incentivo e pela paz que traz no olhar.

Aos meus irmãos, **Roberto e Edilamar**, minha cunhada **Márcia** e aos meus sobrinhos, **Júnior, Gabrielle, Michelle, Cássio, Yasmin, Gabriel e Isabella** por entenderem os momentos de ausência e se sentirem felizes pelas minhas conquistas.

Aos meus sogros **Alda e Jeová** e minhas cunhadas **Lucinéia e Juliana**, pela compreensão e apoio.

Ao Professor Dr. **Ernesto**, pela confiança demonstrada durante todo o meu processo de aprendizagem no meio científico.

À Dra. **Deise**, pela amizade, dedicação e carinho demonstrados durante a minha formação acadêmica.

Ao Professor Dr. **Jair Júnior**, pelas idéias fantásticas e pela empolgação com a realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. **Nelson**, Dr. **Gesmar**, Dr. **Foued** e Dr. **Cláudio**, por abdicarem de seu tempo para auxiliarem na concretização desse trabalho.

Ao Professor Dr. **Carlos Priminho e Luciana** pela disponibilidade na realização dos experimentos de espectrometria.

Ao Professor Dr. **Adriano**, pela generosidade ao permitir a utilização dos equipamentos do Laboratório de Imunopatologia.

Aos grandes amigos, **Priscila, Ronaldo, Leandro, Rafael e Juliana**, pelo apoio, desprendimento e provas de incontestável amizade.

Aos amigos dos laboratórios de Alergia e Imunoparasitologia: **Bia, Daniela, Laura, Jorge, Meimei, Cristiane, Ana Carolina, Isabella, Núbia, Lucas, Boscolli, Carolina, Cristina, Gabriele, Celene, Ana Cláudia, Hercílio, Silas, Mariana, Fernanda, ...**, pelos momentos de alegria e aprendizado.

*Aos funcionários do Programa de Pós-graduação e Laboratório de Imunologia: **Max, Luceleide, Lucélia, Zilda, Edilge e Marley**, pela solicitude nos momentos necessários.*

*Às amigas que vencem fronteiras imensuráveis, **Swânila e Kalyene**, por serem tão especiais e pela amizade que rompe o tempo.*

*Aos amigos do **Núcleo Servos Maria de Nazaré**, que tornam os dias sempre mais iluminados pelo trabalho cristão. Com carinho especial às queridas **Shyrlene e Gessi**, pelo amor que expressam em cada gesto, por me fazerem tão especial. Aos amigos **Kênia, Mariana, Franklin, Márcia, Célia, Idessânia, Railene, Janyer**, pela alegria compartilhada e apoio constante. Àqueles que tornam as palavras um guia seguro, **Dr. Bezerra, Joseph, Christopher, Chrystal, Skanay, Charles, Glacus, Cecília, José Grosso**, e todos mentores, por tudo que representam ao meu coração.*

Agradecimento especial

Aos mais de 191 milhões de BRASILEIROS, que contribuem com seus impostos para o bom andamento da pesquisa no país.

Aos pacientes e voluntários, pelo ato de altruísmo sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

Lista de abreviaturas e siglas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (<i>2,2'-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i>)
BBS	Solução salina tamponada com borato
Blo t	Alérgeno de <i>Blomia tropicalis</i>
BSA	Soroalbumina bovina
Bt	Extrato de <i>Blomia tropicalis</i>
C1q	Subunidade q do complexo C1 do Sistema Complemento
CD	Marcador do tipo <i>Cluster of Differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CRAC	Canal de Cálcio Ativo por Liberação de Cálcio (<i>Calcium-Release Activated Calcium</i>)
DAB	3,3'-diaminobenzidina
Der f	Alérgeno de <i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Df	Extrato bruto de <i>Dermatophagoides farinae</i>
D.O.	Densidade óptica
Dp	Extrato de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
EAACI	<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i> (Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica)
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
F	Feminino
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade do Tipo I
FcεRII	Receptor de IgE de baixa afinidade do Tipo II
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (<i>Human Leucocyte Antigen</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Índice ELISA
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgD	Imunoglobulina de classe D
IgE	Imunoglobulina de classe E
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
IL	Interleucina
ISAAC	Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância (<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>)
ITAM	Motivos de Ativação de Imunoreceptores compostos por Tirosina (<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs</i>)

I.U.IS	União Internacional das Sociedades de Imunologia (<i>International Union of Immunology Societies</i>)
L-lisina	Levo-lisina
M	Masculino
Mr	Massa molecular relativa
n	Número de indivíduos
ND	Não determinado
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	PBS adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	PBS adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-M	PBS adicionada de Tween 20 e leite em pó desnatado
PGD	Prostaglandina do tipo D
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl</i> (Fenilmetilsulfonil)
Rf	Mobilidade relativa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (<i>SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
STIM	Molécula de Interação Estromal (<i>Stromal Interaction Molecule</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TCP	Teste cutâneo de puntura
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina
TGF	Fator de transformação de crescimento (<i>Transforming Growth Factor</i>)
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
Treg	Linfócito T regulador
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Solução de Tris adicionada de HCl
TT	Toxóide tetânico
Tween 20	Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

Lista de tabelas

Tabela 1. Caracterização demográfica, clínica e sorológica de pacientes alérgicos a <i>Blomia tropicalis</i> .	60
Tabela 2. Identificação dos alérgenos de <i>Blomia tropicalis</i> por <i>immunoblot</i> bidimensional e espectrometria de massa.	69
Tabela 3. Percentagem de identidade entre os alérgenos <i>Blomia tropicalis</i> detectados por espectrometria de massa em relação aos alérgenos de <i>Dermatophagoides</i> spp.	76

Lista de figuras

- Figura 1.** *Blomia tropicalis*, ácaro da poeira domiciliar. 27
- Figura 2.** Posição taxonômica de *B. tropicalis* e outros ácaros da poeira domiciliar. 28
- Figura 3. (A)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE gradiente 8-18%) do extrato de *Blomia tropicalis* (Bt) em condições desnaturantes e redutoras, corado com Coomassie Brilliant Blue G-250. Os padrões de pesos moleculares (MW, kDa) estão indicados à esquerda e as massas moleculares relativas (Mr, kDa) dos componentes alergênicos estão representadas à direita. **(B)** *Immunoblot* unidimensional (1D) representativo dos componentes de *B. tropicalis* reconhecidos por anticorpos IgE no soro de pacientes alérgicos (IV, V, VIII, XI, XII). Em cada linha 20 µg de proteína do extrato Bt foram aplicados em gel SDS-PAGE 1D e transferido para membranas de nitrocelulose. Após incubação do soro, a ligação dos anticorpos IgE foi revelada pela adição de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). 62
- Figura 4.** Frequência (%) de componentes alergênicos do extrato de *Blomia tropicalis* reconhecidos por anticorpos IgE em soros de pacientes alérgicos (n = 23) por meio de *immunoblot*. As setas indicam as bandas imunodominantes (>50% de reconhecimento). 63
- Figura 5.** *Immunoblot* de inibição uni-dimensional representativo para avaliar a especificidade de IgE anti-*B. tropicalis* no soro de pacientes alérgicos. Soros pré-adsorvidos com os extratos inibidores de *Blomia tropicalis* (Bt), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df), toxóide tetânico (TT) ou sem inibidor (SI) estão apresentados acima de cada fita. A massa molecular relativa (Mr, kDa) dos componentes alergênicos está indicada à direita. 64
- Figura 6.** Percentagem (%) de inibição dos componentes alergênicos de *Blomia tropicalis* reconhecidos por anticorpos IgE em soros de pacientes alérgicos pré-adsorvidos com extratos inibidores dos ácaros *B. tropicalis* (Bt), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e *D. farinae* (Df) na concentração final de 400µg/mL. As setas indicam as bandas mais inibidas pelo extrato Bt (inibição homóloga). Os símbolos (ϕ) indicam as bandas imunodominantes menos inibidas e os símbolos (δ) indicam as bandas imunodominantes mais inibidas pelos extratos Dp e/ou Df (inibição heteróloga). 65
- Figura 7. (A)** Eletroforese bidimensional (2D) do extrato de *B. tropicalis* (Bt). Amostras (600µg de proteína) foram submetidas à focalização isoeletrica em fita com gradiente de pH imobilizado (ReadyStrip™ IPG, pH 3-10, 7cm). As fitas IPG foram submetidas à eletroforese bidimensional em SDS-PAGE 13% e coradas com Coomassie coloidal Brilliant Blue G-250. **(B)** *Immunoblot* 2D dos componentes de Bt reconhecidos por anticorpos IgE em soros de pacientes atópicos. Proteínas separadas por eletroforese 2D foram eletrotransferidas para 67

membrana de nitrocelulose e incubadas com o *pool* de seis soros de pacientes alérgicos. A ligação dos anticorpos IgE foi revelada por 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Padrão de peso molecular (MW, kDa) está indicado à esquerda. Os círculos numerados indicam os *spots* de Bt com reatividade a anticorpos IgE que foram analisados por espectrometria de massa.

Figura 8. Homologia das sequências entre os alérgenos Blo t 11, Der p 11 e Der f 11. As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa ClustalW2 e ajustadas manualmente. Sequências idênticas em relação a Blo t 11 estão destacadas em cinza. Resíduos de aminoácidos conservados foram destacados em negrito. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos no alinhamento.

72

Figura 9. Homologia das sequências entre os alérgenos Blo t ALDH e Der f Alt a 10. As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa ClustalW2 e ajustadas manualmente. Sequências idênticas entre os dois alérgenos estão destacadas em cinza. Resíduos de aminoácidos conservados foram destacados em negrito. Os peptídeos RLL e LVERDQ foram identificados por espectrometria de massa e estão marcados pela caixa em vermelho. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos no alinhamento.

73

Figura 10. Homologia das sequências entre os alérgenos Blo t 3, Der p 3 e Der f 3. Sequências idênticas em relação a Blo t 3 estão destacadas em cinza. Resíduos de aminoácidos conservados foram destacados em negrito. Os peptídeos destacados pela caixa em vermelho referem-se aos identificados por espectrometria de massa. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos no alinhamento.

74

Figura 11. Sequência de aminoácidos do alérgeno Blo t HEXM. A sequência do alérgeno foi identificada utilizando o programa Blastp. Os peptídeos destacados pela caixa em vermelho referem-se aos identificados por espectrometria de massa. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos.

74

Figura 12. Homologia das sequências entre os alérgenos Blo t 2, Der p 2 e Der f 2. As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa ClustalW2 e ajustadas manualmente. Sequências idênticas em relação a Blo t 2 estão destacadas em cinza. Resíduos de aminoácidos conservados foram destacados em negrito. Os peptídeos na caixa em vermelho referem-se aos identificados por espectrometria de massa. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos no alinhamento.

75

Figura 13. Homologia das sequências entre os alérgenos Blo t 2 e Blo t 5. As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa ClustalW2 e ajustadas manualmente. Sequências idênticas entre os dois alérgenos estão destacadas em cinza. Resíduos de aminoácidos conservados foram destacados em negrito. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos no

75

alinhamento.

Quadro 1. Listagem dos grupos de alérgenos de *Blomia tropicalis* de acordo com a identidade bioquímica.

Conteúdo

Lista de abreviaturas e siglas	8
Lista de tabelas	10
Lista de figuras	11
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 Introdução	18
1.1 Doenças alérgicas	19
1.2 Atopia e alergia	20
1.3 Alérgenos	22
1.3.1 Aeroalérgenos	24
1.4 Ácaros da poeira domiciliar	25
1.4.1 <i>Blomia tropicalis</i>	27
1.4.1.1 Classificação taxonômica	28
1.4.1.2 Alérgenos de <i>Blomia tropicalis</i>	28
1.5 O sistema imune e a resposta alérgica	29
1.5.1 Imunoglobulina E (IgE)	29
1.5.2 Fisiopatologia da alergia	31
1.6 Diagnóstico da alergia	36
1.7 Imunoterapia alérgeno-específica	37
1.8 Identificação de isoformas antigênicas para aplicações laboratoriais	39
2 Objetivos	41
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
3 Material e métodos	43
3.1 Aspectos éticos	44
3.2 Locais de estudo	44
3.3 Seleção dos pacientes	45
3.4 Teste cutâneo de punção	46
3.5 Coleta de sangue	47
3.6 Preparação de extratos alergênicos	47
3.7 Dosagem Protéica	48
3.8 ELISA para detecção de anticorpos IgE específicos a <i>B. tropicalis</i>	48
3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) ...	50

3.9.1 Eletroforese unidimensional (1D)	50
3.9.2 Eletroforese bidimensional (2D)	50
3.10 Immunoblot 1D e 2D para detecção de anticorpos IgE anti- <i>Blomia tropicalis</i>	53
3.11 Immunoblot 1D de inibição	54
3.12 Espectrometria de massa	55
3.12.1 Digestão de proteínas em gel 2D	56
3.12.2 Análise de MS	56
3.12.3 Pesquisa no banco de dados e identificação das proteínas - Análise <i>in silico</i> ...	57
3.13 Normas de biossegurança	58
4 Resultados	59
4.1 Características dos pacientes do estudo	60
4.2 Concentração protéica	61
4.3 Análise eletroforética unidimensional e reatividade de anticorpos IgE a componentes do extrato de <i>B. tropicalis</i>	61
4.4 Especificidade e reatividade cruzada de anticorpos IgE aos alérgenos de <i>B. tropicalis</i> e <i>Dermatophagoides</i> spp	63
4.5 Identificação proteômica de alérgenos de <i>B. tropicalis</i> reconhecidos por anticorpos IgE no soro de pacientes alérgicos	66
4.6 Homologia das sequências entre os alérgenos de <i>B. tropicalis</i> e <i>Dermatophagoides</i> spp	68
5 Discussão	77
6 Conclusões	85
Referências Bibliográficas	87
Anexos	104
Anexo A	105
Anexo B	106
Anexo C	107
Anexo D	109

RESUMO

Blomia tropicalis (Bt) é um ácaro da poeira domiciliar comum em regiões tropicais e importante fonte de alérgenos para a indução de doenças alérgicas respiratórias. Até o momento, a maioria dos alérgenos de Bt identificados mostrou homologia de sequência com outros alérgenos de ácaros da poeira, como *Dermatophagoides* spp. O objetivo deste estudo foi investigar os principais alérgenos com reatividade a anticorpos IgE no soro de pacientes alérgicos.

Métodos: O extrato Bt foi submetido à eletroforese bidimensional (2D) e soros de pacientes sensibilizados a ácaros com teste cutâneo positivo a Bt, foram selecionados por ELISA para a presença de anticorpos IgE específicos e utilizados em ensaios de *immunoblot* uni- e bidimensional. *Immunoblot* de inibição 1D foi realizado para avaliar a reatividade cruzada com *Dermatophagoides* spp. *Spots* visualizados no gel 2D que apresentaram reatividade a IgE do soro de pacientes alérgicos foram excisados e identificados por espectrometria de massa.

Resultados: Alérgenos de Bt com baixo (14-16 e 25 kDa) e alto peso molecular (54-134 kDa) apresentaram mais de 50% de reatividade a anticorpos IgE no soro de pacientes alérgicos e foram considerados imunodominantes. Uma alta taxa de inibição homóloga (> 80%) foi observada para todas as bandas imunodominantes. Quase todos os componentes imunodominantes de alto peso molecular mostraram uma taxa expressiva de inibição heteróloga. No entanto, a menor inibição heteróloga foi encontrada para os compostos imunodominantes de baixo peso molecular (25 e 14 kDa). Mais de 50 *spots* foram identificados pelo gel 2D, dos quais 15 alérgenos apresentaram reatividade IgE no *immunoblot* 2D. Isoformas do alérgeno Blo t 3, já conhecido com a função molecular enzimática da tripsina, foram identificadas por espectrometria de massa. Blo t 11 foi considerado um alérgeno hipotético. Outras isoformas ligantes de IgE, tais como as enzimas aldeído desidrogenase (Blo t ALDH) e hexosaminidase (Blo t HEXM), e uma isoforma com função desconhecida (Blo t 2), também foram identificadas.

Conclusões: Os alérgenos Blo t 11, Blo t 3, Blo t 2 e possivelmente Blo t ALDH e Blo t HEXM demonstraram ser alérgenos imunodominantes em pacientes sensibilizados a ácaros da poeira domiciliar de nossa região.

Palavras-chave: rinite alérgica; *Blomia tropicalis*; reatividade cruzada; ácaros da poeira domiciliar, IgE.

ABSTRACT

Background: *Blomia tropicalis* (Bt) is a common house dust mite in tropical regions and important source of allergens for the induction of respiratory allergic diseases. Most Bt allergens identified so far, however, have shown sequence homology to other dust mite allergens, such as *Dermatophagoides* spp. The aim of this study was to investigate major IgE-binding isoforms for screening Bt allergens.

Methods: We used two-dimensional (2D)-gel electrophoresis of crude Bt extract and sera from mite-sensitized patients with positive skin prick test to Bt that were screened for specific IgE antibodies in ELISA, followed by one-dimensional (1D-) and 2D-immunoblots. Inhibition 1D-immunoblot was performed to visualize the crossreactivity with *Dermatophagoides* spp. From 2D gels, corresponding IgE-binding spots were excised and identified by mass spectrometry.

Results: IgE-binding Bt allergens with low molecular weight (LMW, 14-16 and 25 kDa) and high molecular weight (HMW, 54-134 kDa) showed >50% recognition and were considered immunodominant bands. A high homologous inhibition rate (>80%) was demonstrated with all immunodominant bands. Nearly all HMW immunodominant components showed an expressive rate of heterologous inhibition. However, the low heterologous inhibition was found to LMW immunodominant compounds (25 and 14 kDa). More than 50 spots were identified by stained 2D gel of Bt extract, from which 15 allergens showed IgE reactivity in 2D-immunoblot. Blo t 3 isoforms with enzymatic molecular function of trypsin were identified by mass spectrometry. Blo t 11 was considered as a hypothetical allergen. Other IgE-binding isoforms, such as the enzymes aldehyde dehydrogenase (Blo t ALDH), hexosaminidase (Blo t HEXM), and unknown function (Blo t 2) were also identified.

Conclusions: The results indicate several isoforms (Blo t 11, Blo t 3, Blo t 2 and probably Blo t ALDH and Blo t HEXM) from *B. tropicalis* recognized by IgE antibodies in Brazilian mite-allergic patients as potential candidates for diagnosis and allergen-specific immunotherapy of allergic diseases.

Key words: allergic rhinitis; *Blomia tropicalis*; cross-reactivity; house dust mite allergens; IgE.

1 Introdução

1.1 Doenças alérgicas

As doenças alérgicas são há muito conhecidas, descritas na China antiga e também na literatura grega (SIMONS, 1994). Na sociedade moderna, especialmente nas últimas décadas têm assumido papel importante não apenas pelo expressivo aumento na incidência, mas também pelo impacto que provocam tanto na qualidade de vida, devido à cronicidade que as mesmas apresentam, bem como no âmbito socioeconômico, devido aos custos na assistência médica e perdas pelas faltas no trabalho e escola (WOOLCOCK, 2000; MASOLI et al., 2004).

Em países desenvolvidos alcançam níveis epidêmicos, sendo a principal causa das doenças crônicas, afetando aproximadamente um terço da população mundial (ONO, 2000).

Muito se tem conjecturado a respeito das condições de exposição aos alérgenos no desencadeamento das respostas alérgicas e como determinados alérgenos tem a propriedade de levar a estas respostas em determinado período e não a uma resposta imunológica dentro da normalidade ou mesmo tolerogênica (TRAIDL-HOFFMANN 2009).

Pesquisas têm demonstrado que exposição a alérgenos potenciais na primeira infância ou mesmo durante a gravidez tem um papel central no desenvolvimento de doenças alérgicas (HOLGATE; POLOSA, 2008). Contrário a isto, uma ação protetora tem sido mostrada por diferentes estudos que sugerem fortemente que a exposição a agentes microbianos durante a primeira infância protege contra doenças alérgicas (STRACHAN, 1989; BRAUN-FAHRLANDER et al., 2002). Desta forma, várias pesquisas têm sido realizadas visando desvendar os possíveis mecanismos que levem à proteção. Tem-se demonstrado que agentes microbianos ativam receptores da imunidade inata nas células apresentadoras de antígenos durante exposição concomitante aos alérgenos e induzem respostas alérgeno-específicas Th1 ou via células T regulatórias (Tregs) como fator adjuvante para proteger o hospedeiro da

sensibilização alérgica e desenvolvimento de doenças alérgicas (KAISHO, AKIRA, 2002).

Sabe-se que o microambiente e o estilo de vida contemporâneo contribuem significativamente para o desenvolvimento destas doenças, uma vez que a permanência das pessoas por várias horas em ambientes domésticos, escolares ou ocupacionais, nos quais está presente a maioria dos potenciais alérgenos implica em maior sensibilização dos indivíduos (PLATTS-MILLS et al., 1997; PERFETTI et al., 2004; HESSELMAR et al., 2005).

Assim, destaca-se uma série de fatores que levam ao desenvolvimento e ao aumento da prevalência de doenças alérgicas, resultado de uma interação de predisposição genética e exposição aos alérgenos, e também a provável associação de alguns cofatores como influência psico-social, diminuição da estimulação do sistema imune (hipótese da higiene), poluição ambiental dentre outros, os quais podem contribuir de maneira relevante no desencadeamento das respostas alérgicas (RING et al., 2001; BARNES; MARSH, 1998).

1.2 Atopia e alergia

O termo atopia tem origem grega significando “*placelessness*” e 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). Representa uma predisposição genética a doenças alérgicas devido a uma maior susceptibilidade de desenvolver respostas exacerbadas de anticorpos IgE a alérgenos ambientais comuns, frequentemente proteínas. Os indivíduos que respondem a estímulos

provocados pela exposição aos diferentes alérgenos, por meio da produção de altos níveis de IgE são designados atópicos (JOHANSSON et al., 2004).

O termo alergia foi empregado primeiramente por Clemens von Pirquet juntamente com Béla Schick em 1906, os quais estudaram a doença do soro. Von Pirquet sugeriu o termo alergia de “*allos*” significando “outro” ou uma derivação do estado original (SIMONS, 1994). Empregado como sinônimo de hipersensibilidade imediata, é utilizado para designar uma reação desencadeada por mecanismos imunológicos mediados por anticorpos, particularmente o isotipo IgE, e por células responsáveis pelas manifestações clínicas devido à exposição a um determinado estímulo em dose tolerada por indivíduos saudáveis (JOHANSSON et al., 2004).

As manifestações clínicas das doenças alérgicas podem ser listadas como dermatite atópica, eczema, rinite, asma dentre outras, sendo que as doenças respiratórias como a asma e a rinite se destacam devido ao considerável aumento da prevalência nos últimos 20-30 anos com taxas variando de 5% a 30% em países industrializados (ISAAC, 1998; SLY, 1999; WOOLCOCK, 2000; ASHER et al., 2006; HOLGATE; POLOSA, 2008).

A asma alérgica é caracterizada por reação imunológica, sob a forma de inflamação das vias aéreas inferiores, induzindo a quadro de hiperreatividade brônquica e, conseqüentemente, episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse (LEMANSKE-JUNIOR; BUSSE, 2003).

A maioria dos genes inicialmente encontrados associados com a asma participam na síntese de anticorpos IgE, inflamação alérgica e/ou hiper-reatividade das células e órgãos evidenciando assim a importância do fator genético no desenvolvimento de doenças alérgicas (MARSH et al., 1994, OBER; HOFFJAN, 2006).

Apesar de apresentar perfil imunológico semelhante à asma, a rinite alérgica é definida clinicamente como uma doença sintomática das vias aéreas superiores induzida por inflamação mediada por IgE depois de exposição ao alérgeno, da mucosa nasal, com sintomas característicos de inflamações nasais, tais como:

aumento de secreção, obstrução da cavidade, espirros e prurido. Frequentemente é associada com sintomas oculares, como a conjuntivite alérgica, sintomas estes reversíveis espontaneamente ou sob tratamento, podendo ser subdividida em intermitente e persistente (BOUSQUET et al., 2001; JOHANSSON et al., 2004).

Ambas as doenças podem ser desencadeadas por elementos extrínsecos capazes de causar doença alérgica, presentes em componentes comuns ao nosso ambiente, como pólenes de plantas ou ácaros da poeira domiciliar. A rinite alérgica é muito comum em pacientes com asma, com uma alta concomitância. Gaugris, Sazonov-Kocevar e Thomas (2006), relacionando estudos publicados entre 1983 e 2004, observaram uma prevalência de rinite de 50 a 100% em adultos asmáticos na Europa e Estados Unidos. Além disso, Linneberg e colaboradores (2002) descrevem que 25 a 50% dos indivíduos com rinite apresentam sintomas de asma.

Esta coprevalência é possível, dentre outros fatores, pela íntima relação entre as mucosas da via respiratória superior e inferior, além da similaridade dos componentes e mecanismos inflamatórios envolvidos nestes distúrbios (JEFFERY et al., 2006).

1.3 Alérgenos

Os alérgenos são de origem protéica, glicoprotéica ou até mesmo carboidratos isolados, porém, raramente de baixo peso molecular (JOHANSSON et al., 2004; MEYER; CO MINH; DEMOLY, 2004). O conhecimento mais aprofundado das características estruturais de componentes alergênicos tem revelado algumas características, tais como glicosilação, atividade enzimática e resistência à proteólise, contudo mais estudos são necessários para definir outras propriedades estruturais presentes nos alérgenos de maneira geral (HUBY et al., 2000; BOUSQUET et al., 2001).

As regiões presentes na molécula antigênica que têm a propriedade de se ligarem às regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dos anticorpos específicos são conhecidas como epítomos ou determinantes antigênicos. O epítomo de um alérgeno é pequeno, geralmente formado por 5 a 7 resíduos de aminoácidos que combinam com a região variável do anticorpo e 8 a 15 aminoácidos que se ligam a células T e podem se apresentar na forma conformacional quando os aminoácidos estão separados na cadeia polipeptídica de forma que o dobramento possibilita espacialmente a ligação, ou também linearmente quando as sequências de aminoácidos estão contíguas (LAVER et al., 1990; SELA, 1969; ARLIAN, 2002; CRAMERI, 2003).

O uso de uma nomenclatura unificada é extremamente importante no estudo dos alérgenos, sobretudo no desenvolvimento de mecanismos de diagnóstico específico e de extratos imunoterápicos com alérgenos recombinantes (CHAPMAN et al., 2000; FERREIRA et al., 2004; JUTEL et al., 2005). No sentido de padronizar a referência dos diversos alérgenos descritos na literatura científica, o Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia (I.U.I.S.), em parceria com a Organização Mundial de Saúde (OMS), adotou uma regra sistemática de nomenclatura. Esta regra é resultado de um consenso entre trabalhos publicados nas décadas de 80 e 90 do século passado (MARSH et al., 1986; KING et al., 1994; KING et al., 1995), atrelada à nomenclatura taxonômica dos animais e plantas de Carolus Linnaeus.

Preconiza-se que o nome de um alérgeno não deve ser escrito de forma itálica e deve ser designado pelas três primeiras letras do gênero ao qual o organismo pertence juntamente com a primeira letra da espécie e o número correspondente à ordem cronológica de sua purificação: Blo t 5 (alérgeno do grupo 5 de *Blomia tropicalis*, por exemplo) (KING et al., 1995). A nomenclatura atual, segundo Chapman e colaboradores (2007), ainda contempla as diferentes formas moleculares do mesmo alérgeno, chamadas de isoformas, ou isoalérgenos. Estes têm sido bastante estudados, principalmente com o avanço da biologia molecular na caracterização do alérgeno e compartilham a reatividade de IgE por apresentarem alto percentual de

identidade na sequência de aminoácidos. Neste caso, o número correspondente à isoforma é acrescentado após o número do alérgeno: Blo t 5. 0101, por exemplo. Suspeita-se que as isoformas possam alterar o perfil de resposta de células T bem como os sítios de ligação dos anticorpos, devendo ser cuidadosamente analisadas para a elaboração de formulações de imunoterapia (SMITH et al., 2001a; SMITH et al., 2001b; PIBOONPOCANUN et al., 2006).

Para manter a integridade do sistema de nomenclatura, esta inclui apenas alérgenos com prevalência de reatividade de IgE acima de 5% ou com mérito comprovado por testes bioquímicos, moleculares e imunológicos que não permitam ambigüidade nos resultados. Se o alérgeno apresentar reatividade de IgE maior do que 50% dos pacientes contra uma determinada fonte alergênica, o alérgeno é denominado “principal”. Se a reatividade de IgE for menor do que este valor, o alérgeno é “minoritário” (LARSEN, LOWERSTEIN, 1996; CHAPMAN et al., 2007; THOMAS et al., 2007).

1.3.1 Aeroalérgenos

Aeroalérgenos, alérgenos transportados pelo ar, estão amplamente distribuídos no ambiente, uma vez que fazem parte da composição de diversos organismos, sejam eles pertencentes ao Reino das Plantas, dos Animais ou mesmo dos Fungos. 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, especialmente oriundos de gramíneas). São proteínas, relativamente pequenas, altamente solúveis em meio aquoso, o que permitem se dispersarem no muco e outros fluidos corporais (SAVOLAINEN; VIANDER; KOIVIKKO, 1990; CROMWELL, 1997; GALLI; LANTZ, 1999).

1.4 Ácaros da poeira domiciliar

A poeira domiciliar é constituída por diversas partículas em suspensão oriundas 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 microorganismos (bactérias, vírus e fungos) e macroorganismos (animais domésticos, insetos, aracnídeos) (SELTZER, 1994).

Os ácaros são descritos como organismos diversificados que exploraram, ao longo de seu processo evolutivo, ambientes incomuns, como: cavidades nasais de pássaros, traquéia de insetos, folículos pilosos e pele de mamíferos (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001). Com a ocupação do ambiente natural pelo homem, os ácaros invadiram o ambiente domiciliar e passaram a viver em meio à poeira presente nestes, designados então como ácaros da poeira domiciliar, habitando móveis estofados, carpetes, cortinas, colchões, travesseiros, brinquedos de pelúcia, livros e outros (HART, 1998) e encontrando nesses ambientes, alimentos necessários à sua sobrevivência, tais como restos de pele humana e demais detritos orgânicos (ARLIAN; MORGAN, 2003).

Geralmente medem entre 0,1 a 0,6 mm de comprimento, possuindo ciclo de vida com metamorfose completa (holometábolo) passando pelos estágios de ovo, larva, protoninfa, tritoinfa e adulto. O período de desenvolvimento de ovo a adulto pode sofrer variações de acordo com a espécie e também devido às condições abióticas, as quais influenciam fortemente na dinâmica da população sendo a umidade e a temperatura os fatores mais preponderantes (ARLIAN et al., 1990; DE BOER, 1998; PIKE et al., 2005).

Apesar de serem representantes do Filo Arthropoda, que inclui animais com exoesqueleto formado por α -quitina, corpo segmentado e extremidades articuláveis (RUPPERT; FOX; BARNES, 2004), os ácaros da poeira domiciliar diferem muito dos insetos e demais representantes do grupo, quanto à morfologia e fisiologia. Por esta razão, várias medidas adotadas para controlar insetos não são eficazes para o

controle de ácaros da poeira domiciliar. Neste sentido, várias medidas têm sido sugeridas para reduzir sua proliferação em ambientes domésticos, como por exemplo, o uso de acaricidas e aspiradores de pó, a lavagem dos ambientes com água quente, o encapamento de colchões e travesseiros com materiais não porosos e o uso de equipamentos que aumentam a ventilação no ambiente, medidas essas que devem ser adotadas preferencialmente em conjunto (HALLAS, 1991; HART, 1998; ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

Ácaros da poeira domiciliar são reconhecidos como uma das mais comuns causas de alergia em todo o mundo, afetando mais de 50% dos pacientes alérgicos (TOVEY; CHAPMAN; PLATTS-MILLS, 1981; PLATTS-MILLS; WECK, 1989; BOULET et al. 1997; ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001;). Dentre as famílias destacam-se Glycyphagidae, Acaridae, Pyroglyphidae e Echimyopodidae (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001; ARLIAN; MORGAN, 2003).

Sabe-se que *Dermatophagoides* spp. (família Pyroglyphidae) constituem a fauna predominante na poeira domiciliar do mundo todo (PLATTS-MILLS et al., 1992; ARRUDA; CHAPMAN, 1992). Entretanto, a vigilância americana revelou em 1992 que, além de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, as espécies mais comuns de ácaros na fauna da poeira domiciliar eram *Blomia tropicalis* e *Euroglyplus maynei*.

Em regiões tropicais e subtropicais, alérgenos produzidos por *B. tropicalis* são encontrados concomitantemente com alérgenos oriundos de *D. pteronyssinus* e/ou *D. farinae*, tendo alta prevalência em Singapura, Malásia, Brasil, Colômbia, Venezuela e Porto Rico (CHEW et al., 1999a; CHEW et al., 1999a; MARIANA et al., 2000; BAQUEIRO et al., 2006; FERNANDEZ-CALDAS et al., 1993a; MONTEALEGRE et al., 1997), prevalência esta que está fortemente associada à presença de doenças alérgicas nesses países (CHEW et al., 1999b; FERNANDEZ-CALDAS et al., 1993b).

1.4.1 *Blomia tropicalis*

Blomia tropicalis é um ácaro pequeno, medindo 230 a 465 µm, de forma globular e distingue-se facilmente dos outros ácaros da poeira domiciliar por apresentar longas antenas saindo de seu corpo, o que lhe confere um aspecto semelhante ao porco espinho (Figura 1). Foi descrita pela primeira vez em 1973 por Van Bronswijk, De Cock e Oshima, sendo inicialmente registrado como ácaro de estocagem.

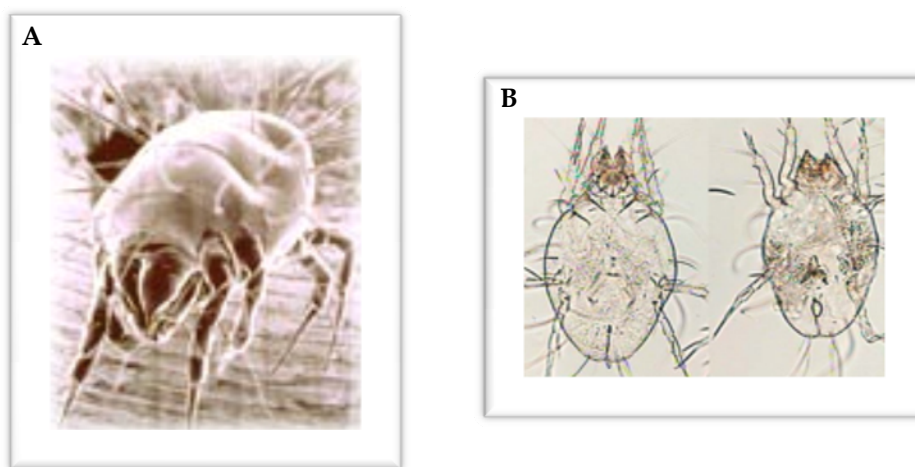


Figura 1. *Blomia tropicalis*, ácaro da poeira domiciliar (A). Vista ventral (B).

Fontes: <http://www.sub-way.es/duovac/images/acaro1.jpg>

http://www.immunocapinvitrosight.com/upload/33830/Blomia_tropicalis.jpg

1.4.1.1 Classificação taxonômica

A classificação taxonômica resumida de *B. tropicalis*, segundo Colloff (1998) é:

Reino: Metazoa

Filo: Artropode

Classe: Arachnida

Ordem: Astigmata

Família: Echimyopodidae

Gênero: *Blomia*

Espécie: *B. tropicalis*

Segundo Arlian e Platts-Mills (2001), De Jong e colaboradores (2004) e Puerta e colaboradores (2005), *B. tropicalis* ocupa uma posição taxonômica próxima aos demais ácaros da poeira domiciliar, conforme a Figura 2.

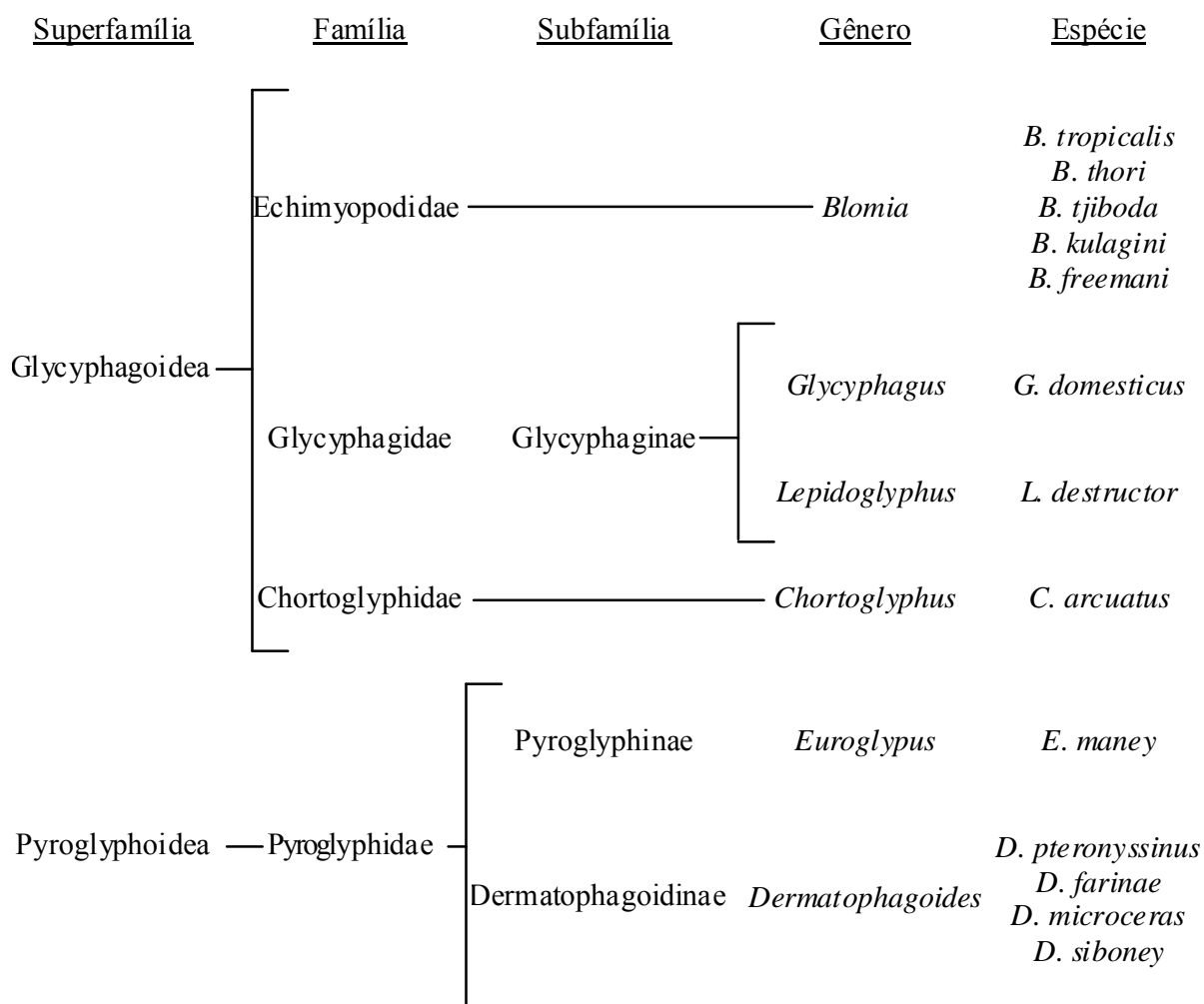


Figura 2. Posição taxonômica de *B. tropicalis* e outros ácaros da poeira domiciliar.

Adaptado de: Arlian; Platts-Mills (2001), de Jong et al. (2004) e Puerta et al. (2005).

1.4.1.2 Alérgenos de *Blomia tropicalis*

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

Até o presente momento, aproximadamente 25 proteínas de *B. tropicalis* com reatividade a anticorpos IgE foram identificadas por *immunoblot*, ELISA-IgE ou teste

cutâneo de puntura. Oficialmente, 12 alérgenos foram descritos segundo o Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia (ALLERGEN NOMENCLATURE, 2010), portal Allergome (ALLERGOME, 2010) e Chua e colaboradores (2007), sendo que algumas de suas características bioquímicas estão apresentadas no Quadro 1.

1.5 O sistema imune e a resposta alérgica

1.5.1 Imunoglobulina E (IgE)

As imunoglobulinas constituem um grupo de glicoproteínas presentes no soro e fluidos teciduais de todos os mamíferos. São bifuncionais, sendo que uma região da molécula é responsável pela ligação ao antígeno e a outra promove as chamadas funções efetoras, que incluem a fixação das imunoglobulinas ao tecido do hospedeiro, às várias células do sistema imune - incluindo as células fagocitárias - e ao elemento C1q da via clássica do sistema complemento. A estrutura básica de todas as imunoglobulinas consiste de uma unidade com duas cadeias polipeptídicas leves idênticas, e duas pesadas, unidas por pontes dissulfeto. As classes e subclasses de uma molécula de imunoglobulina são determinadas por suas cadeias pesadas (ROITT et al., 2006) e são conhecidas, até o momento, cinco classes em mamíferos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

Dentre estas imunoglobulinas, a IgE exerce um papel substancial na resposta alérgica. Indivíduos com alergia apresentam níveis de IgE total que podem estar ou não elevados, mas os níveis de IgE específica a um ou mais alérgenos se encontram efetivamente elevados (CORRY; KHERADMAND, 1999). Antagonicamente, os níveis de IgE específica estão reduzidos ou ausentes nos indivíduos não alérgicos (GOULD et al., 2003).

Alérgeno	Isoformas	Massa molecular relativa (kDa)	Identidade bioquímica	Reatividade de anticorpos IgE	Referências
Blo t 1	Blo t 1.0101 Blo t 1.0102	26	Cisteína protease	62-90%	Cheong et al., 2003 Ramos et al., 2004 Fonseca et al., 2003 Mora et al., 2003
Blo t 2	Blo t 2.0101- Blo t 2.0104	14	ND	63%	Kuay et al., 2002
Blo t 3	Blo t 3.0101	25	Tripsina	50-57%	Cheong et al., 2003 Yang et al., 2003
Blo t 4	Blo t 4.0101	56	Alfa amilase	<15%	Cheong N, Lee BW, Chua KY, não publicado
Blo t 5	Blo t 5.0101	14	ND	42-92%	Arruda et al., 1997 Yeoh et al., 2003 Kuo et al., 2003 Caraballo et al., 1998 Arruda et al., 1995 Caraballo et al., 1996 Tsai et al., 2003 Yi et al., 2004 Lim et al., 2004
Blo t 6	Blo t 6.0101	25	Quimiotripsina	<10%	Cheong N, Lee BW, Chua KY, não publicado
Blo t 10	Blo t 10.0101	33	Tropomiosina	29%	Yi et al., 2002
Blo t 11	Blo t 11.0101	110	Paramiosina	12-52%	Ramos et al., 2001 Ramos et al., 2003 Ramos et al., 2003
Blo t 12	Blo t 12.0101	14	ND	50%	Puerta et al., 1996
Blo t 13	Blo t 13.0101	15	Proteína ligante de ácido graxo	11%	Caraballo et al., 1997
Blo t 19	Blo t 19.0101	7.2	Peptídeo anti-microbiano	3%	Thomas et al., 2002
Blo t 21	Blo t 21.0101	15	ND	93%	Gao et al., 2007

Quadro 1. Listagem dos grupos de alérgenos de *Blomia tropicalis* de acordo com a identidade bioquímica.

Adaptado: Subcomitê de Nomenclatura dos alérgenos I.U.I.S (www.allergen.org), Allergome (www.allergome.com), Chua e colaboradores (2007).

ND, não determinado.

A IgE é o isotipo de anticorpo que contém a cadeia pesada *épsilon* (ϵ). O domínio C ϵ 3 é responsável pela ligação da molécula aos seus receptores (ISHIZAKA; ISHIZAKA, 1966). Circula como um anticorpo bivalente e está normalmente presente no plasma em concentração inferior a 1 μ g/mL. Em condições patológicas, tais como as infecções helmínticas e na alergia, esse nível pode subir para mais de 1.000 μ g/mL (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Embora sua meia vida no soro seja de alguns

dias, os mastócitos podem permanecer sensibilizados pela IgE por muitos meses como resultado da ligação de alta afinidade aos receptores FcεRI, o que protege a IgE da destruição pelas proteínas séricas. O outro receptor para IgE, FcεRII ou CD23, possui menor afinidade pela imunoglobulina e se apresenta em duas formas, FcεRIIa e FcεRIIb, diferindo-se apenas pela composição da região citoplasmática amino-terminal. Como os demais receptores ativadores de imunoglobulinas, a porção intracitoplasmática dos receptores para IgE é constituída por domínios ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) (GILFILLAN; TKACZYK, 2006). Em estudo realizado por Saini e McGlashan (2002), foram apresentados quatro aspectos da biologia do receptor de IgE que possuem influência significativa no mecanismo da resposta imune, são elas: a) capacidade da imunoglobulina em regular a expressão de FcεRI; b) capacidade de induzir a sobrevivência; c) presença de receptores em outros tipo celulares, criando uma possível ativação por parte da imunoglobulina e; d) o papel que as subunidades do FcεRI desempenham na determinação do sinal da IgE nas células onde são expressos.

A ligação do anticorpo ao antígeno se dá pela formação de múltiplas ligações não-covalentes entre o antígeno e os aminoácidos dos anticórpas. Embora as forças de atração (especialmente, pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas, ligações de Van der Waals e hidrofóbicas) envolvidas nestas uniões sejam individualmente fracas em comparação com as ligações covalentes, a multiplicidade das ligações resulta em uma energia de ligação suficientemente forte (ROITT et al., 2006).

1.5.2 Fisiopatologia da alergia

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 o alérgeno da mucosa. Os componentes alergênicos remanescentes são capturados pelas células dendríticas imaturas ou pelas células B, designadas de Células Apresentadoras de Antígenos - CAA (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 T-*helper* tipo 2, ou Th2. Nesse contexto, estudo realizado por Weidinger e colaboradores (2008) demonstrou que os polimorfismos do gene RAD50, localizado no cromossomo 5q31 está associado ao aumento do risco de desenvolvimento de alergia e que um *locus* gênico relacionado aos níveis de IgE total é o FCER1A.

Trabalhos demonstram que a apresentação do alérgeno às CAA ocorre via HLA de classe II. Isso pode ser demonstrado pela associação positiva entre genes alelos deste complexo e a presença de IgE específica ou resposta de célula T contra alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, incluindo HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB5, HLA-DQA1 e HLA-DPB1 (YSSEL et al., 1992; JOOST VAN NEERVEN et al., 1993; HIGGINS et al., 1994; O'BRIEN et al., 1995; TSITOURA et al., 1996; MATSUOKA et al., 1997; O'BRIEN et al., 1999; HU et al., 2000; MOFFATT et al., 2001; KIM et al., 2002b). Recentemente, Nathan e colaboradores (2009) demonstraram que alérgenos de ácaros da poeira domiciliar pode ser reconhecido pelo epitélio da via respiratória de modo específico e que a ligação de β -glicana aos receptores epiteliais resulta na liberação de quimiocinas atrativas de células dendríticas, como CCL20.

Apesar de uma grande variedade de células efetoras serem responsáveis pela inflamação alérgica, a cronicidade da doença é atribuída aos linfócitos CD4⁺ de perfil Th2, por meio da produção de citocinas do tipo interleucinas, tais como: IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Estas são responsáveis pelo desencadeamento dos efeitos patológicos das células envolvidas no contexto alérgico, incluindo eosinófilos, mastócitos e basófilos.

Nos indivíduos alérgicos, subseqüentes exposições ao alérgeno induz a uma resposta de mastócitos dirigida pela IgE. A quantidade destas células se encontra elevada e se caracterizam pela significativa expressão do receptor Fc ϵ RI (YING et al., 1998). A ligação cruzada deste receptor com a IgE ligada ao alérgeno resulta na ativação da proteína quinase Lyn, que participa da fosforilação dos *motifs* ITAMs do

receptor e da ativação das quinases Syk e Fyn, que juntas fosforilam o adaptador Gab2, ativando a via fosfatidilinositol-3-OH-quinase. A fosfolipase-C- γ hidroliza fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, formando inositol-1,4,5-trifosfato e diacilglicerol, que participam da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e consequentemente da ativação de STIM1, que aumenta o influxo deste íon por meio de CRACs (canais ativos de liberação de cálcio), culminando na efetiva ativação dos mastócitos (SCHARENBERG et al., 1995; KINET, 1999; TURNER; KINET, 1999; KALESNIKOFF; GALLI, 2008). Esta ativação induz à formação de mediadores esfingosina-1-fosfato 1 e 2 (S1P₁ e S1P₂), que promovem o rearranjo do citoesqueleto e, em poucos minutos, a exocitose de grânulos de histamina, serina-proteases e proteoglicanas - responsáveis pelos sintomas alérgicos imediatos, tais como: espirros, coriza e broncoespasmos nas vias respiratórias inferiores. Ocorre, também, a liberação de mediadores neoformados, que incluem prostaglandinas e leucotrienos (particularmente leucotrieno C₄). Este evento, aliado à liberação de citocinas, resulta no aumento da permeabilidade vascular e do recrutamento de células efetoras (KAY et al., 1997; SAMPSON, 2000; MARSHALL, 2004; KALESNIKOFF; GALLI, 2008)

Dependendo da dose do alérgeno e do nível de sensibilidade do indivíduo, uma segunda fase de inflamação pode ocorrer de 6 a 12h após a exposição. Neste evento, mediado por células T, eosinófilos, neutrófilos e basófilos, ocorre aumento dos sintomas de hiperreatividade brônquica, que pode persistir por vários dias (COCKCROFT, 1983; COOKSON et al., 1989; GAGA et al., 1991; TSICOPOULOS et al., 1994; ILIOPOULOS et al., 1992; MARUYAMA et al., 1994; IRANI et al., 1998; NOURI-ARIA et al., 2001).

Uma teoria que tenta explicar o aumento da prevalência de doenças alérgicas é a “Hipótese da Higiene”, proposta por Strachan (1989), na qual se acredita que a melhoria nas condições de vida poderia estar associada à manutenção da resposta imune no contexto Th₂, influenciada pela diminuição de alérgenos ambientais, poluentes, infecções naturais, e utilização de vacinas e antibióticos. Nesse contexto, sabe-se que o recém nascido apresenta um discreto predomínio de componentes Th₂, porém com o crescimento, ocorre um amadurecimento e consequente equilíbrio da

resposta Th1/Th2. Esse processo é genotipicamente determinado, entretanto, sofre influência de vários fatores como aleitamento materno, exposição à infecções e o ambiente onde o indivíduo vive (GARN; RENZ, 2007).

Apesar de ser uma teoria defendida por grande parte da comunidade científica, Platts-Mills e colaboradores (2001a; 2001b) propuseram um modelo de resposta Th2 modificada, com a interação de linfócitos T reguladores (Treg) que, por ação da IL-10, secretam e induzem maior produção de IgG4, em resposta à inibição da síntese de IgE. A polarização de células T para o perfil Th2 foi, por muitos anos, um paradigma no campo das doenças alérgicas. Entretanto, a discussão a respeito do mecanismo de ação de citocinas anteriormente associadas ao perfil Th1, tal como IL-23, e de famílias de IL-17, levou ao delineamento de um novo perfil, denominado Th17.

Sabe-se, até o momento, que Th17 é caracterizado pela liberação de citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22, além de IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) (BETTELLI et al., 2008). A identificação do fator de transcrição ROR γ t como controlador da diferenciação destas células reforça a idéia de que as células produtoras de IL-17 representam um perfil complementar de células T *helper* (IVANOV et al., 2006). Um estudo realizado por Kolls, Kanaly e Ramsay (2003) mostra que os níveis de IL-17A se encontram elevados no lavado broncoalveolar, escarro e tecidos pulmonares de pacientes asmáticos. Verificou-se também que a gravidade da doença está diretamente relacionada ao aumento desta citocina. Ademais, Lindén, Laan e Anderson (2005) demonstraram que IL-17A e/ou IL-17F podem liderar uma inflamação local, por meio da indução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , G-CSF e IL-6, além da produção de quimiocinas CXCL1/Gro- α , CXCL2 e CXCL8/IL-8 pelos fibroblastos de brônquios, epitélios e músculos lisos de órgãos e vasos *in vitro*.

A interleucina 25 (IL-25) é uma citocina da família de IL-17 (IL-17F), secretada por basófilos e eosinófilos em pacientes alérgicos e relacionada ao aumento da produção de IgE bem como mudanças no perfil histológico em vários tecidos

humanos e murinos (FORT et al., 2001; KIM et al., 2002a; HURST et al., 2002; IKEDA et al., 2003; ANGKASEKWINAI et al., 2007; WANG et al., 2007). De acordo com o recente modelo proposto por Wang e Liu (2008), sobre o papel do perfil Th17 no processo alérgico, o reconhecimento do alérgeno pelo epitélio leva à diferenciação de células T produtoras de IL-17, produzindo IL-17A, IL-17F e IL-22, que por sua vez, induzem células estruturais e infiltrados de células da imunidade inata a liberarem citocinas inflamatórias e quimiocinas, como IL-18, Gro- α , TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que aumentam a resposta inflamatória na fase aguda. Na fase crônica, eosinófilos, basófilos e mastócitos produzem IL-25, que potencializa a produção de citocinas do perfil Th2, tais como IL-5 e IL-13.

A indução de tolerância nas células T periféricas representa um passo essencial na resposta imune normal frente aos alérgenos (KARAMLOO et al., 2005). Esta tolerância, observada em indivíduos saudáveis e durante processo de imunoterapia com alérgenos é caracterizada pela indução de células Treg tipo 1 e no aumento da capacidade supressora das células CD4+CD25+ (AKDIS et al., 1998; JUTEL et al., 2003; LING et al., 2004). Tal evento é seguido pelo aumento de IgG4 e/ou IgA e diminuição de IgE na fase tardia do tratamento, além da redução de IgE induzida por IL-4, que mostrou ser também efetivo no *switch* para IgG4, por meio da indução da expressão do fator de transcrição $\gamma 4$ (AALBERSE et al., 1993; JEANNIN et al., 1998; JUTEL et al., 2003; ROSSI et al., 2007). Em suma, acredita-se que Treg contribui para controlar a resposta imune inflamatória alérgica de vários modos: supressão de células apresentadoras de antígenos indutoras de células T efetoras; supressão de células Th2 e Th1; supressão de mastócitos, basófilos e eosinófilos; supressão da síntese de anticorpos IgE e indução de anticorpos IgG4 (AKDIS; AKDIS, 2007; MEILER et al., 2008; NANDAKUMAR; MILLER; KUMARAGURU, 2009).

Tais estudos demonstram que o processo inflamatório alérgico é resultado de um complexo sistema de liberação de mediadores, cujo sincronismo está diretamente relacionado ao equilíbrio entre as atividades dos diferentes perfis de células T CD4+.

1.6 Diagnóstico da alergia

O diagnóstico da alergia é baseado na história típica de sintomas alérgicos associado aos testes diagnósticos. Testes estes que podem ser *in vivo* (testes cutâneos de puntura – TCP ou intradérmico) e/ou *in vitro*, ambos direcionados à detecção de IgE circulante ou ligada às células, e são de grande relevância pois possibilita a identificação da sensibilização de pacientes a um painel de alérgenos, constituindo assim ferramentas importantes na rotina clínica (BOUSQUET et al., 2001).

Dentre os testes cutâneos, o teste de pele baseado na hipersensibilidade imediata, conhecido como teste cutâneo de puntura (TCP) é amplamente empregado, uma vez que demonstra a reação alérgica mediada por IgE, sendo por isto a principal ferramenta diagnóstica utilizada na prática clínica. É um método simples, de rápida execução e seguro devido às pequenas quantidades de alérgeno necessárias para o teste, quando comparado a outros testes cutâneos como o intradérmico (TURKELTAPUCB; ERGENP, 1989; DREBORG, 1989; BOUSQUET et al., 2001). O TCP apresenta a vantagem de ser mais econômico quando comparado a testes *in vitro*, nos quais é realizada a determinação da IgE sérica. Apesar do TCP não diagnosticar a doença alérgica, apenas determinar a presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos importantes na patogênese da doença alérgica, há um alto grau de relação entre os sintomas e o desafio provocativo utilizado no TCP (OWNBY, 1988).

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

Os testes *in vitro* são preferencialmente utilizados quando os pacientes não podem ser submetidos ao teste cutâneo em virtude da presença de lesões cutâneas, ingestão de medicamentos ou história de possível anafilaxia. Um resultado positivo, assim como nos testes cutâneos, não é suficiente para o diagnóstico, é necessário ter associação com a clínica do paciente.

Contudo, é sabido que tanto doenças alérgicas quanto parasitárias dentre outros fatores levam ao aumento dos níveis de IgE total no soro. Diante disto, a mensuração de IgE total não é um bom valor preditivo como ferramenta diagnóstica da alergia, sendo assim relevante determinar os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos, o que é importante no diagnóstico de pacientes atópicos (BERNSTEIN; STORMS, 1995; MASTRANDREA et al., 1997; SILVA et al., 2001; DYKEWICZ; FINEMAN, 1998).

Outras classes de anticorpos também têm sido investigadas na alergia, como os anticorpos IgG, particularmente as subclasses IgG1 e IgG4. Anticorpos IgG específicos a alérgenos podem ser detectados tanto em indivíduos atópicos e não atópicos (SALLUSTO et al., 1993). No entanto, pacientes atópicos exibem altos níveis de IgG com predomínio de IgG4, enquanto indivíduos não-atópicos exibem maiores níveis de IgG1 (HAMMARSTRÖM; SMITH, 1987).

1.7 Imunoterapia alérgeno-específica

Os tratamentos das doenças alérgicas visam amenizar os sintomas desencadeados por respostas exacerbadas do organismo frente aos alérgenos. Ações que visam à diminuição destes sintomas são indicadas de modo a abrandá-los ou até mesmo cessá-los. Para tanto, além do tratamento medicamentoso disponível há esforços na tentativa de desenvolver estratégias antiácaros da poeira por meio do controle ambiental utilizando acaricidas, capas protetoras de colchões, aspiração, aumento da ventilação interna dentre outras que podem contribuir na atenuação da sensibilização dos indivíduos alérgicos (SCHEI; HESSEN; LUND, 2002).

No entanto, para alguns indivíduos tanto o tratamento quanto o controle ambiental não surtem resultados satisfatórios na qualidade de vida dos mesmos. No intuito de suprir novas intervenções clínicas, a imunoterapia surge como possível terapêutica no sentido de induzir a tolerância aos componentes antigênicos clinicamente relevantes no desencadeamento de respostas exacerbadas pelo pacientes. Diversos estudos têm corroborado a ação efetiva da imunoterapia alérgeno-específica na melhoria dos sintomas das doenças alérgicas, sobretudo rinite (JUTEL et al., 2005).

A prática imunoterápica foi introduzida em 1911 por Noon e Freeman no tratamento da polinose, que é uma rinite alérgica provocada por grãos de pólen (NOON, 1911). A imunoterapia consiste basicamente na administração de doses gradualmente crescentes de um determinado alérgeno a indivíduos alérgicos até alcançar uma dose máxima, a qual é mantida e administrada repetidas vezes em um período de manutenção que pode variar de indivíduo para indivíduo, a fim de amenizar os sintomas provocados por exposições subsequentes ao agente sensibilizador em questão (ROLLAND et al., 2000, BOUSQUET et al., 2001). Tal prática é aconselhada a pacientes que apresentam sintomas de rinite alérgica quando expostos a determinados alérgenos, de forma que alguns fatores devem ser considerados na inclusão destes indivíduos em procedimentos imunoterápicos como a gravidade e duração dos sintomas apresentados, efeitos adversos provocados pelo uso de medicamentos, falta de responsividade a outras formas de terapia, redução do risco de desenvolver asma dentre outros fatores (WALLACE et al., 2008). Entretanto algumas limitações são feitas principalmente para pacientes com asma moderada a grave, e também a não recomendação quanto à utilização de extratos não fracionados de potentes alérgenos, uma vez que há alto risco de efeitos sistêmicos adversos (ROLLAND et al., 2000).

A imunoterapia alérgeno-específica tem como fundamento principal a indução de um estado tolerante nas células T periféricas, demonstrado principalmente pela geração de células Tregs alérgeno-específicas e supressão dos efeitos proliferativos celulares bem como das respostas de citocinas contra os principais alérgenos desencadeantes de uma resposta imunológica exacerbada (AKDIS et al., 1996).

A tolerância apresentada por pacientes sob imunoterapia e também por indivíduos saudáveis pode ser caracterizada pela ação de subpopulações de Tregs, denominadas Treg do tipo I (Tr 1) e Treg CD4⁺CD25⁺. Estas subpopulações celulares possuem a capacidade de agir não só nas células T levando-as a um estado anérgico, mas também nas células B por meio da produção de IL-10 que induz uma diminuição do *switch* de IgE induzido por IL-4 e aumento da expressão do transcrito $\gamma 4$ resultando em aumento dos níveis de IgG4 específica no soro no decorrer no processo imunoterápico (MEILER et al., 2008).

Aparentemente as células Tregs contribuem para o controle da resposta imune específica de várias formas: supressão das células apresentadoras de antígenos, supressão das células Th1 e Th2, dos mastócitos, basófilos e eosinófilos, interação com células teciduais residentes, além disso, a supressão de IgE e a indução de isotipos de anticorpos não inflamatórios como IgG4 por Tr1 e por células Treg CD4⁺CD25⁺.

Desta forma, podemos perceber a importância de vários fatores sejam eles celulares ou não no controle da resposta aos alérgenos, o que reforça a relevância de um conhecimento mais aprofundado sobre os mesmos utilizados nas vacinas imunoterápicas para permitir uma ampla utilização desta terapêutica na prática clínica.

1.8 Identificação de isoformas antigênicas para aplicações laboratoriais

Nos últimos anos, particularmente nesta década o crescente esforço no aprimoramento de técnicas e mesmo na criação de outras tecnologias para análises proteômicas tem sido notado nos trabalhos científicos, esforços estes que têm como finalidade identificar e caracterizar um maior número de proteínas expressas por diferentes organismos.

A identificação e caracterização de um repertório mais amplo de alérgenos e suas isoformas têm sido de relevância no contexto da alergia, uma vez que estas isoformas podem apresentar diferentes antigenicidades frente a soros de pacientes

alérgicos. A presença de diversas isoformas pertencentes ao mesmo grupo de alérgenos pode ser devido a diferentes fatores ligados à variabilidade molecular, com destaque para o polimorfismo alélico, modificações pós-traducionais e *splicing* alternativo do mRNA (DE CANIO et al., 2009).

Neste sentido, dentre as técnicas proteômicas a eletroforese bidimensional tem sido utilizada como uma poderosa ferramenta no mapeamento protéico de complexas fontes alergênicas. Corroborando isto, pesquisas realizadas por MAO e colaboradores (1998) utilizando a eletroforese bidimensional com o ácaro *D. farinae* possibilitou a identificação de novos alérgenos e isoformas alergênicas que constituíam múltiplos isoalérgenos, uma vez que uma pequena mudança na sequência dos aminoácidos pode induzir modificações no reconhecimento dos epítomos pelas células B (BREITENEDER et al., 1993). Benndorf e colaboradores (2008) também identificaram isoformas alergênicas de esporos de *Aspergillus versicolor* por meio da eletroforese e *immunoblotting* bidimensional, assim com Luengo e colaboradores (2008) que investigaram os alérgenos do pólen de *Senecio jacobea* com o objetivo de determinar as características imunológicas e a relevância clínica dos alérgenos identificados.

Diante disto, metodologias como a eletroforese e o *immunoblotting* bidimensional podem contribuir para a identificação de novas proteínas alergênicas e suas possíveis isoformas oriundas de fontes de alérgenos inaláveis como os ácaros da poeira doméstica, dentre eles *B. tropicalis* que apresentam evidente padrão de reconhecimento pelo soro de pacientes alérgicos, viabilizando assim o emprego de tais alérgenos em técnicas sorológicas que quantificam anticorpos específicos presentes nos indivíduos com alergias respiratórias, e também no acompanhamento laboratorial de indivíduos que apresentam alergia respiratória que estejam sob imunoterapia.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Identificar alérgenos imunodominantes de *B. tropicalis* com potencial aplicação para o diagnóstico de alergia e, emprego e/ou monitoramento da imunoterapia alérgeno-específica em pacientes com doenças alérgicas respiratórias.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os principais componentes alergênicos do extrato de *Blomia tropicalis* reconhecidos por anticorpos IgE no soro de pacientes alérgicos por *Immunoblot*;
- Avaliar a presença de reatividade cruzada de anticorpos IgE entre componentes alergênicos derivados de extratos de *B. tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae* por *immunoblot* de inibição competitiva;
- Determinar por meio de eletroforese bidimensional, possíveis isoformas dos componentes alergênicos de *B. tropicalis* identificados previamente por *immunoblot*;
- Identificar possíveis proteínas alergênicas derivadas de *B. tropicalis* por *immunoblot* bidimensional e espectrometria de massa com potencial aplicação no diagnóstico da alergia respiratória e também para possível emprego e/ou monitoramento em imunoterapia alérgeno-específica em pacientes alérgicos.

3 Material e métodos

3.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa deste estudo foi submetido e aprovado sem restrições junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Conselho Nacional de Saúde (CNS), Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos (Anexos A).

A concordância em participar da pesquisa foi confirmada pela assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B) pelo indivíduo participante da pesquisa, de acordo com as normas da Resolução CNS 196/96. No termo de consentimento consta o nome da pesquisa, seu objetivo, os procedimentos a serem realizados, como coleta de sangue e teste cutâneo de leitura imediata, e a possibilidade de saída do estudo sem necessidade de explicação prévia ou prejuízo ao atendimento atual ou futuro dos indivíduos da pesquisa.

Em seguida, os indivíduos responderam a uma breve ficha de identificação e a um questionário clínico elaborado segundo o *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC, 1998), com algumas modificações, que foi aplicado com a presença de um médico alergologista para maior conhecimento da sua história clínica (Anexo C).

3.2 Locais de estudo

A seleção dos pacientes foi realizada no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

Os procedimentos técnicos foram desenvolvidos no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, contando com a colaboração do Laboratório de

Proteômica do Centro de Genética e Biotecnologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, para os experimentos de espectrometria de massa.

3.3 Seleção dos pacientes

Foram selecionados 23 pacientes, de ambos os gêneros e idade entre 18 e 60 anos, apresentando rinite alérgica perene com ou sem asma (intermitente ou persistente, leve ou moderada), teste cutâneo de puntura positivo ao extrato de *B. tropicalis* e reatividade IgE específica por ELISA (índice ELISA > 1,2).

O diagnóstico clínico de rinite alérgica foi estabelecido com base na presença de manifestações de espirros, rinorréia e/ou obstrução nasal intermitentes, relacionadas à exposição aos alérgenos inaláveis e na história pessoal e/ou familiar de doenças atópicas (NORMAN, 1985). O diagnóstico clínico de asma foi estabelecido considerando a presença de episódios de dispnéia e sibilância, obedecendo aos critérios estabelecidos pelo *National Asthma Education Program Coordinating Committee* (SLY, 1997).

Os critérios de exclusão para o teste e admissão no estudo foram:

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

- Recusa em participar do estudo.

3.4 Teste cutâneo de puntura

A hipersensibilidade imediata foi determinada por meio de teste cutâneo de puntura (TCP), como descrito por Ownby (1988), utilizando os seguintes extratos alergênicos glicerizados padronizados (2 mg/mL):

- Ácaros: *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (IPI/ASAC, São Paulo, SP, Brasil);
- Cão: *Canis familiaris* (FDA Allergenic, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Gato: *Felis domesticus* (FDA Allergenic);
- Baratas: *Periplaneta americana* e *Blattella germanica* (FDA Allergenic);
- Fungo: *Alternaria alternata* (FDA Allergenic).

Após anti-sepsia da face interna do antebraço com álcool etílico 70%, um volume de 10 µL de cada extrato foi depositado a uma distância de 3 cm um do outro, realizando-se em seguida a puntura com auxílio de uma lanceta de metal estéril (Puntores Aiko, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Como controle positivo, foi utilizado cloridrato de histamina a 10 mg/mL (Bayer Corporation, Spokane, EUA) em solução salina fisiológica contendo glicerol a 50%, diluente que foi utilizado como controle negativo da reação (SQUILLACE et al., 1997).

Após 15 minutos foram medidos os diâmetros ortogonais das pápulas formadas com régua graduada em milímetros (Morrow Brown Disposable/Skin Test Needle Aller Guard®, Topeka, KS, EUA). Os testes que apresentaram pápulas com média aritmética dos diâmetros maior ou igual a 3 mm em relação ao controle negativo, foram considerados positivos.

3.5 Coleta de sangue

Paralelamente ao TCP, amostras de sangue (10 mL) foram coletadas de cada indivíduo, utilizando tubos de coleta a vácuo (Vacutainer® - Precision Glide/Becton Dickson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, EUA) e agulhas 21G1 (Becton Dickson) para punção venosa na região do antebraço. Após serem mantidos em repouso por 30 minutos, os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 10 minutos. Os soros obtidos foram distribuídos em alíquotas e armazenados em microtubos de polipropileno a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.6 Preparação de extratos alergênicos

A extração dos alérgenos de *B. tropicalis* (Bt), *D. pteronyssinus* (Dp) e *D. farinae* (Df) foi realizada de acordo com o protocolo anteriormente descrito (PEREIRA et al., 2005). Foram pesados 200 g de material seco de cultivo dos ácaros, gentilmente cedido pelo Dr. Federico Montealegre (Laboratório de Imunoquímica, Escola de Ponce, Porto Rico, EUA) e peneirados (Granutest-Telastem Peneiras para Análise LTDA, ABNT 35, abertura em mm = 0,50, TYLER 32) para separar corpos e fezes dos ácaros do restante do material de cultivo. Em seguida, 5 g do material peneirado foram misturados a 50 mL de solução salina tamponada com borato a 5 mM, pH 8,0, contendo inibidores de proteases: Leupeptina 1 µM (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM (Sigma), Benzamidina 1 mM (Sigma) e Aprotinina 10 µg/mL (Sigma). Esta mistura foi macerada em nitrogênio líquido, com gral e pistilo, para o rompimento do exoesqueleto dos ácaros e melhor solubilização dos alérgenos. O material foi então transferido para tubos cônicos de 50 mL e incubado durante 18 horas a 4°C em agitação orbital lenta.

Posteriormente, o material foi centrifugado a 3.000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante novamente centrifugado a 20.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante final (extrato total) foi concentrado e dializado em sistema Amicon

(W.R. Grace & Co., Beverly, EUA) com membrana YM-10 (*cut off* de 10 kDa, Whatman International Ltd, Maidstone, Inglaterra) contra solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01 M, pH 7,2, sob agitação suave. Para eliminar agregados produzidos durante o processo de concentração e diálise, foi realizada uma nova centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C. Os extratos alergênicos foram distribuídos em alíquotas de 500 µL em microtubos de polipropileno e armazenados a -20°C para posterior utilização nos demais procedimentos.

3.7 Dosagem Protéica

As concentrações protéicas dos extratos alergênicos totais (Bt, Dp e Df) foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

Para a curva de calibração da dosagem protéica foi utilizado soroalbumina bovina (BSA, Sigma) em diluições duplas seriadas de 500 a 8 µg/mL em PBS. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, SP, Brasil) a 660 nm. Os valores de densidade óptica obtidos foram convertidos em µg/mL com base na curva padrão, utilizando o programa *Microplate Manager* 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

3.8 ELISA para detecção de anticorpos IgE específicos a *B. tropicalis*

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para a detecção de anticorpos IgE anti-*B. tropicalis* em amostras de soros de pacientes, segundo técnica descrita por Silva e colaboradores (2001), com algumas modificações.

Placas de microtitulação de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), com 96 poços, foram sensibilizadas com o extrato Bt na concentração protéica de 20 µg/mL (50 µL/poço) diluídos em tampão carbonato (0,06 M, pH 9,6), por 18 horas a 4°C.

As placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (monolaurato de polioxietileno sorbitano, Sigma) (PBS-T) por três vezes e os sítios ativos dos poços foram bloqueados (100 µL/poço) com PBS-T acrescido de 1% de BSA (PBS-T-BSA) por uma hora à temperatura ambiente.

As amostras de soros foram diluídas a 1:2 em PBS-T-BSA, adicionadas (50 µL/poço) em duplicata e incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Em cada placa, foram utilizados três soros controles negativos de indivíduos não atópicos e o diluente PBS-T-BSA como controle dos soros. As placas foram submetidas a novo ciclo de lavagens com PBS-T por seis vezes e, subsequente, foi adicionado (50 µL/poço) o anticorpo secundário biotilado anti-IgE humana (Kirkegaard e Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, EUA) na diluição de 1:500 em PBS-T-BSA. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e lavadas novamente por seis vezes com PBS-T. Em seguida, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (50 µL/poço) (Sigma) na diluição de 1:500 em PBS-T-BSA e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após um novo ciclo de lavagens, a reação foi visualizada por meio da adição do substrato enzimático consistindo de solução de 2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid (ABTS, Sigma) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M (pH 4,2) contendo 0,03% de H₂O₂ (Sigma).

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA) a 405 nm. O limiar de positividade (*cut off*) da reação foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Os níveis de anticorpos IgE foram arbitrariamente expressos por índice ELISA (IE) calculado segundo a fórmula: $IE = \frac{DO_{amostra}}{cut\ off}$, onde:

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

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

Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos.

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

3.9.1 Eletroforese unidimensional (1D)

Os componentes protéicos do extrato Bt foram separados por meio de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em gradiente de concentração de 8-18% sob condições desnaturantes e redutoras (LAEMMLI, 1970).

O gel de separação foi preparado utilizando Tris-HCl 0,373 M, pH 8,8 (Sigma), dodecil sulfato de sódio (SDS, Bio-Rad) a 0,1%, solução de acrilamida a 30% e bis-acrilamida a 0,8% (Pharmacia-LKB, Produtos AB, Bromma, Suécia), TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamino, Pharmacia-LKB) a 0,125%, PSA (Persulfato de amônio, Pharmacia-LKB) a 0,125% e glicerol a 5,85%.

Para o gel de empilhamento utilizou-se Tris-HCl 0,122 M, pH 6,8, SDS a 0,1%, solução acrilamida/bis-acrilamida a 3%, TEMED a 0,125%, PSA a 0,125% e azul de bromofenol. O tampão de corrida (pH 8,3) consistiu de glicina (Sigma) a 0,19 M, Tris base a 0,025 M e SDS 0,1%.

Antes da aplicação no gel, as amostras foram centrifugadas (20.000 x g por 5 minutos), o sobrenadante diluído em tampão de amostra 10x (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% e glicerol a 20%), contendo 5% de β -mercaptoenanol e aquecido a 96°C, em banho seco (Termobath ALB64 – Finemould Precision Ind., Co., Seul, Coréia do Sul), por 5 minutos.

Foram aplicados 20 μ g de proteína, em volume de 20 μ L, em cada poço do gel para o procedimento de coloração, ou 270 μ g de proteína, em um volume de 250 μ L

para posterior transferência para membrana de nitrocelulose. Em paralelo, utilizou-se padrão de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) como referência para o cálculo das massas moleculares relativas.

O processo de eletroforese foi realizado em sistema para mini-gel (Mini-vertical gel electrophoresis unit SE 260, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra), a corrente constante de 20 mA, por 1 hora e 30 minutos.

O perfil polipeptídico foi visualizado utilizando a coloração por Coomassie coloidal (*Coomassie Brilliant Blue G-250*, Sigma) descrita por Neuhoff e colaboradores (1988), sob agitação pendular, por 18 horas à temperatura ambiente.

O *software* ImageQuant 300 versão 1.0.3 (General Electric Company - GE Healthcare, Uppsala, Sweden) foi utilizado para determinar as massas moleculares das bandas visualizadas no gel, baseado nos valores de mobilidade relativa (R_f). A documentação do gel foi realizada por digitalização de imagem (Scanjet3800, Hewlett Packard, Co., EUA), em resolução de 300 dpi.

3.9.2 Eletroforese bidimensional (2D)

As proteínas do extrato Bt (600 µg) foram precipitadas com 10% de ácido tricloroacético (TCA) a 50% durante 10 minutos em banho de gelo. Após centrifugação (23.000 x g, 10 minutos, 4°C), seguiu-se um ciclo de lavagens do precipitado visando toda a retirada do TCA, incubando o precipitado (sob agitação vigorosa) uma vez com etanol 100% gelado, durante 3 minutos e 3 vezes com acetona 100% gelada durante 2 minutos. Após cada incubação, a solução foi centrifugada (23.000 x g, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante descartado.

O precipitado final foi solubilizado em 40 µL de solução de lise [Uréia 8 M, Triton X-100 a 2%, Tris base 0,04 M, Ditiotretol (DTT) 0,04M, Benzamidina 0,001 M,

EDTA 0,001 M, anfólitos IPG (3-10) a 2% (todos reagentes da Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA)] e incubado sob agitação lenta por 30 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação (20.000 x g, 30 minutos, 23°C), o sobrenadante foi incubado (sob agitação lenta) com 85 µL de solução de reidratação [Uréia 8M, Triton X-100 a 2%, azul de bromofenol a 0,0025%, DTT 0,04 M, anfólitos IPG (3-10) a 2%] por 30 minutos, e novamente centrifugado (20.000 x g, 30 minutos, 23°C) para remover o precipitado.

Para a focalização isoeletrica foram usadas fitas de 7 centímetros com gradiente de pH imobilizado (ReadyStrip™ IPG strips, pH 3-10) segundo orientações do fabricante (Bio-Rad). As fitas IPG foram colocadas sobre a solução contendo a amostra para serem reidratadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e focalizadas isoeletricamente usando o aparelho Protean IEF Cell (Bio-Rad), como segue: Reidratação passiva por 4 horas a 20°C; 50 V por 12 horas; 500 V por 30 minutos; 1.000 V por 3 horas; 4.000 V por 1 hora; 4.000 V até 10.000 V/hora.

Após a focalização isoeletrica as fitas foram equilibradas em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,8, uréia 6 M, glicerol a 30%, SDS a 2%, azul de bromofenol a 0,001%, DTT 0,04 M) por 10 minutos à temperatura ambiente e posicionadas na superfície de um gel de separação SDS-PAGE a 13% (LAEMMLI, 1970). Antes da corrida, as fitas IPG, assim como o padrão de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder) que foi colocado em paralelo, foram vedados com agarose a 0,5% contendo azul de bromofenol a 0,003%.

O processo de eletroforese foi realizado no sistema Mini-Protean Cell (Bio-Rad), a corrente constante de 15 mA por 15 minutos e 20 mA por 1 hora e 15 minutos.

Após a corrida, os géis foram submetidos à coloração por *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (Sigma), sob agitação pendular lenta, durante 18 horas à temperatura ambiente.

Os *spots* foram analisados usando o *software* ImageMaster 2D Platinum, versão 7.0 (General Electric Company – GE Healthcare) para determinar os valores de ponto isoelétrico (pI) e as massas moleculares.

A documentação do gel foi realizada por digitalização de imagem (Scanjet3800, Hewlett Packard, Co., EUA), em resolução de 300 dpi.

3.10 Immunoblot 1D e 2D para detecção de anticorpos IgE anti-*Blomia tropicalis*

Imediatamente após a separação eletroforética por SDS-PAGE unidimensional ou bidimensional, os componentes polipeptídicos do extrato Bt foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Trans-Blot Transfer Medium, 0,45 µm, Bio-Rad) embebidas em tampão de transferência (Glicina 0,04 M, Tris 0,05 M, SDS a 0,04% e álcool metílico a 20%).

Um sistema de transferência semi-úmido (Multiphor II Electrophoresis Unit, Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia) foi utilizado conforme técnica descrita por Towbin, Stsehelin e Gordon (1979). A corrente utilizada foi de 0,8 mA por cm² do gel durante duas horas.

Após a transferência, o gel foi devidamente descartado e a membrana de nitrocelulose foi imersa em solução de Ponceau S (0,5% de Ponceau em 0,25% de TCA) durante dois minutos, para visualização das bandas ou *spots*, confirmando o sucesso da transferência.

Após secagem em temperatura ambiente, as tiras de nitrocelulose cortadas em 3 mm de largura (1D) ou membranas (2D) foram acondicionadas em canaletas apropriadas e bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) por duas horas à temperatura ambiente.

Amostras de soros individuais (1D) aplicadas em volume final de 500 µL/canaleta ou um *pool* de seis soros (2D) em volume final de 6 mL/canaleta, foram diluídas (1:2) em PBS-T contendo 1% de leite desnatado (PBS-T-M) e incubadas sobre as tiras ou membranas de nitrocelulose previamente lavadas com PBS-T-M após o período de bloqueio por 18 horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta.

Posteriormente, após seis ciclos de lavagem com PBS-T por 5 minutos, adicionou-se às tiras (500 µL) ou membranas (10 mL) de anticorpo secundário anti-IgE humana biotinizada (1:500), diluído em PBS-T-M e incubado por 4 horas à temperatura ambiente.

Após novas lavagens como anteriormente descrito, as tiras ou membranas foram incubadas com 500 µL ou 10 mL, respectivamente, do conjugado Estreptavidina/Peroxidase (Sigma) diluído a 1:1000 em PBS-T-M durante duas horas à temperatura ambiente.

Posteriormente ao ciclo final de lavagem, a revelação da reação foi procedida com a adição de 10 mg de tetra-hidrocloreto 3'3-diaminobenzidina (DAB, Sigma) diluído em 10 mL de solução salina tamponada com Tris (0,02 mM, pH 7,4) acrescido de 10 µL de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida pela adição de água destilada após a visualização das bandas ou *spots*.

As membranas foram digitalizadas e as massas moleculares e pontos isoelétricos foram estimados conforme descritos para SDS-PAGE.

3.11 Immunoblot 1D de inibição

Com o intuito de avaliar a capacidade de inibição homóloga de anticorpos IgE aos componentes alergênicos de *B. tropicalis* e verificar a reatividade cruzada

(inibição heteróloga) com componentes alergênicos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, foi realizado o ensaio de *immunoblot* de inibição.

Soros individuais, não diluídos, provenientes de seis pacientes co-sensibilizados aos três alérgenos de ácaros foram pré-absorvidos (2 horas, a 37°C, banho-Maria) com 800 µg/mL (v/v) de alérgenos inibidores (extratos de Bt, Dp ou Df), ou toxóide tetânico (TT, Sigma), como controle não alergênico, ou PBS-TM a 1%, como controle irrelevante. Paralelamente à incubação dos soros com os agentes inibidores, as tiras de nitrocelulose foram bloqueadas com PBS-TM 5% por 2 horas à temperatura ambiente.

Os soros pré-adsorvidos foram centrifugados (10.000 x g, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante adicionado às tiras e incubados por 18 horas à temperatura ambiente, sob agitação pendular lenta.

As demais etapas da reação, desde a incubação com anticorpos secundários anti-IgE humana até a revelação, foram conduzidas da mesma maneira que a descrita para o *immunoblot* convencional.

O *software* Image Quant foi utilizado para analisar a mobilidade relativa, as massas moleculares aparentes e para calcular a intensidade das bandas (vol. bandas) determinadas em pixels. Os resultados foram expressos em porcentagens de inibição em relação à ausência do antígeno inibidor e calculadas segundo a fórmula:

$$1 - \left(\frac{\text{vol. bandas com inibidor}}{\text{vol. bandas sem inibidor}} \right) \times 100$$

3.12 Espectrometria de massa

A identificação das proteínas de Bt por espectrometria de massa (MS) foi realizada conforme descrito por Shevchenko e colaboradores (1996). Os *spots* de interesse foram excisados manualmente do gel SDS-PAGE 2D corados por Coomassie coloidal, em capela de fluxo laminar, acondicionados em microtubos de

polipropileno, previamente lavados com álcool metílico absoluto, e enviados para análise no Laboratório de Proteômica do Centro de Genética e Biotecnologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA.

3.12.1 Digestão de proteínas em gel 2D

Os *spots* de interesse foram lavados 3 vezes com 200 μ L de solução de bicarbonato de amônio (25 mM, pH 8), sob homogeneização em *vortex* durante 10 minutos, seguindo um novo ciclo de lavagens com água deionizada. Posteriormente, as amostras foram incubadas com 100 μ L de acetonitrila (ACN) 100% durante 5 minutos à temperatura ambiente, descartando o excesso de ACN e secando-as em centrífuga Speed-vac (Eppendorf).

Para a digestão enzimática, as amostras foram reidratadas com 5-7 μ g/mL de tripsina de porco *Gold* (Promega, Madison, WI, EUA), solubilizada em solução de bicarbonato de amônio, por 10 minutos a 4°C e incubadas com solução de bicarbonato de amônio a 37°C por 16 horas em banho-Maria. Após incubação, a solução contendo os digestos trípticos de interesse foi colocada em novos microtubos e adicionados 25–50 μ L de solução contendo ACN a 50% e ácido fórmico a 5%. O material ficou sob agitação suave por 30 minutos, sendo então o sobrenadante transferido para novo microtubo e o procedimento de extração repetido mais duas vezes.

A solução final contendo apenas os digestos trípticos foi reduzida em centrífuga Speed-Vac para o volume de 10-15 μ L.

3.12.2 Análise de MS

Após extração, os peptídeos foram analisados pela técnica de nanocromatografia aplicada ao espectrômetro de massa (nanoLC/MS/MS)

utilizando o sistema de cromatografia UPLC nanoAcquity (Waters, Milford, MA, EUA) acoplado ao espectrômetro ortogonal Micromass Q-TOFmicro (Waters).

Duas fases móveis foram utilizadas para as análises cromatográficas. Fase móvel A: 100% água ultra pura e a fase B: 100% acetonitrila, ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. Os digestos trípticos foram dessalinizados utilizando uma pré-coluna Symmetry (Waters) C18, com 180 µm de diâmetro interno x 20 mm de comprimento e separados em uma coluna analítica de 1,7 µm BEH300-C18 100 µm x 100 mm.

A eluição sequencial dos peptídeos foi realizada utilizando gradiente de 1-50% de ACN por 23 minutos, chegando até 85% com 27 minutos. A corrida para cada *spot* foi de 30 minutos com um fluxo de 0,6 µL/min. Os peptídeos foram introduzidos ao quadrupolo do espectrômetro de massas Q-TOFmicro (Waters) após ionização pela sonda de *eletrospray*. As análises no espectrômetro foram feitas através do *software* Masslynx V4.1, e os íons mais abundantes, observados no espectro de MS, escolhidos automaticamente para a fragmentação induzida por colisão (CID), gerando os espectros de MS/MS. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação, e argônio como gás de colisão. O equipamento foi operado no modo íon positivo com voltagem do capilar de 3000 V e voltagem do cone de 35 V.

3.12.3 Pesquisa no banco de dados e identificação das proteínas - Análise *in silico*

Os espectros gerados foram processados pelo algoritmo MaxEnt3 do *software* Masslynx V4.1, resultando uma lista de massas que foi analisada pelo *software* ProteinLynx Global Server (PLGS) V2.3 (Waters) e posteriormente pesquisada contra os bancos de dados Swissprot (<http://ca.expasy.org/sprot/>) e NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os critérios de busca utilizados pelo *software* foram massas moleculares, perda do sítio de clivagem, pontos isoeletrônicos, cisteínas modificadas por carboxamidometilação e as possíveis modificações, como oxidação de metionina. Os resultados das identificações foram observados pelo *software* Proteinlynx Global Server 2.3, sendo consideradas identificações confiáveis apenas as que apresentaram probabilidade entre 80-100%.

Após identificação dos peptídeos de Bt extraídos do gel bidimensional, realizou-se uma busca pela sequência completa dos alérgenos nos bancos de dados UniProtKb/TrEMBL disponível no Swissprot (<http://www.expasy.org/tools/tagident.html>) e BLASTP (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) delimitando a procura ao organismo *B. tropicalis*. A procura pelos alérgenos de Bt com homologia com Dp e/ou Df foi realizada delimitando a procura ao gênero *Dermatophagoides*. O alinhamento das sequências peptídicas encontradas dos alérgenos de interesse foi realizada pelo programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

3.13 Normas de biossegurança

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

4 Resultados

4.1 Características dos pacientes do estudo

As características demográficas, clínicas e sorológicas dos 23 pacientes atópicos, com diagnóstico clínico de rinite alérgica com ou sem asma, positividade no teste cutâneo de puntura (TCP) ao extrato Bt e em ELISA-IgE específica a Bt (IE>1,2), que foram selecionados para os experimentos de eletroforese quantitativa (1D) e qualitativa (2D), estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização demográfica, clínica e sorológica de pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis*.

Número do paciente	Gênero	Idade (anos)	Diagnóstico	<i>B. tropicalis</i>		Co-sensibilizações
				TCP pápula (mm)	ELISA-IgE índice ELISA (IE)	
I	m	22	r	7	2,2	Der p, Der f
II	m	23	as,r	12	6,1	Der p, Der f, Per a, Bla g
III	m	21	r	9	4,4	Der p, Der f, Can f, Bla g, Alt a
IV	f	22	r	7	6,0	Der p, Der f, Can f, Bla g
V	m	20	as,r	8	3,1	Der p, Der f, Can f, Bla g, Alt a
VI	m	49	r	6	3,1	Der p, Der f, Bla g
VII	f	19	r	7	3,5	Der p, Der f, Fel d, Bla g
VIII	f	19	as,r	5	7,6	Der p, Der f, Fel d
IX	m	32	r	8	4,3	Der p, Per a, Per a, Bla g
X	f	20	r	8	8,8	Der p, Der f, Can f, Fel d, Bla g
XI	f	21	r	11	11,2	Der p, Der f, Can f, Fel d, Bla g, Alt a
XII	f	19	r	4	3,5	Der p, Der f, Can f, Fel d, Per a, Bla g
XIII	f	22	r	11	6,7	Der p, Der f, Can f, Per a, Bla g
XIV	m	18	r	4	1,6	
XV	f	24	r	17	4,8	Der p, Der f, Fel d, , Per a,
XVI	f	37	as,r	5	2,1	Der p, Der f, Can f, Fel d, Bla g
XVII	m	19	r	5	5,4	Der p, Der f, Can f, Alt a
XVIII	f	20	r	3	2,5	Der p, Der f, Per a,
XIX	f	37	r	9	2,3	Der p, Der f, Per a, Alt a
XX	f	26	as,r	8	8,3	
XXI	f	18	r	8	2,3	Der p, Der f, Alt a
XXII	m	22	r	4	2,8	Der p, Der f, Per a
XXIII	f	24	r	11	2,2	Der p, Der f, Bla g

TCP, teste cutâneo de puntura; as, asma; r, rinite; Der p, *Dermatophagoides pteronyssinus*; Der f, *Dermatophagoides farinae*; Can f, *Canis familiaris*; Fel d, *Felis domesticus*; Bla g, *Blattella germanica*; Per a, *Periplaneta americana*; Alt a, *Alternaria alternata*.

4.2 Concentração protéica

As concentrações protéicas dos extratos alergênicos obtidos foram: Bt = 3.900 µg/mL; Dp = 3.400 µg/mL e Df = 3.500 µg/mL (após concentração e diálise em PBS).

4.3 Análise eletroforética unidimensional e reatividade de anticorpos IgE a componentes do extrato de *B. tropicalis*

Os componentes polipeptídicos do extrato Bt, separados por SDS-PAGE em gradiente de concentração 8-18%, sob condições desnaturantes e redutoras e corados por *Coomassie* coloidal estão ilustrados na Figura 3A.

O extrato Bt apresentou amplo espectro de bandas polipeptídicas, com massas moleculares relativas variando de 9 a 134 kDa (9, 11, 13, 14-16, 21, 25, 27, 31, 35, 38, 48, 54, 61, 81, 110 e 134 kDa). Adicionalmente, as bandas de 14-16, 25, 27 e 31 kDa foram as mais proeminentes.

A capacidade de reconhecimento das bandas polipeptídicas presentes no extrato Bt foram avaliadas por *immunoblot* para detecção de anticorpos IgE no soro de 23 pacientes atópicos.

Cinco amostras de soros representativas do *immunoblot* 1D para IgE estão ilustradas na Figura 3B. Treze componentes alergênicos do extrato Bt, com massa molecular variando de 14 a 134 kDa (14-16, 21, 25, 27, 31, 35, 38, 48, 54, 61, 81, 110 e 134 kDa), foram reconhecidos por anticorpos IgE específicos.

Todos os 23 pacientes alérgicos a *B. tropicalis* reconheceram pelo menos uma banda alergênica (Figura 4), sendo os componentes alergênicos que apresentaram reatividade de IgE maior que 50% foram considerados imunodominantes. Assim, os principais componentes reconhecidos por anticorpos IgE foram as bandas de 25 kDa (87%), 14-16 kDa (83%), 110 e 134 kDa (74%), 61 kDa (65%), 54 kDa (61%) e 81 kDa

(57%). Além disso, outros componentes alergênicos foram reconhecidos em menor frequência, tais como as bandas 38 kDa (35%), 31 kDa (30%), 27 kDa (26%), 48 kDa (17%), 35 kDa (13%) e 21 kDa (4%).

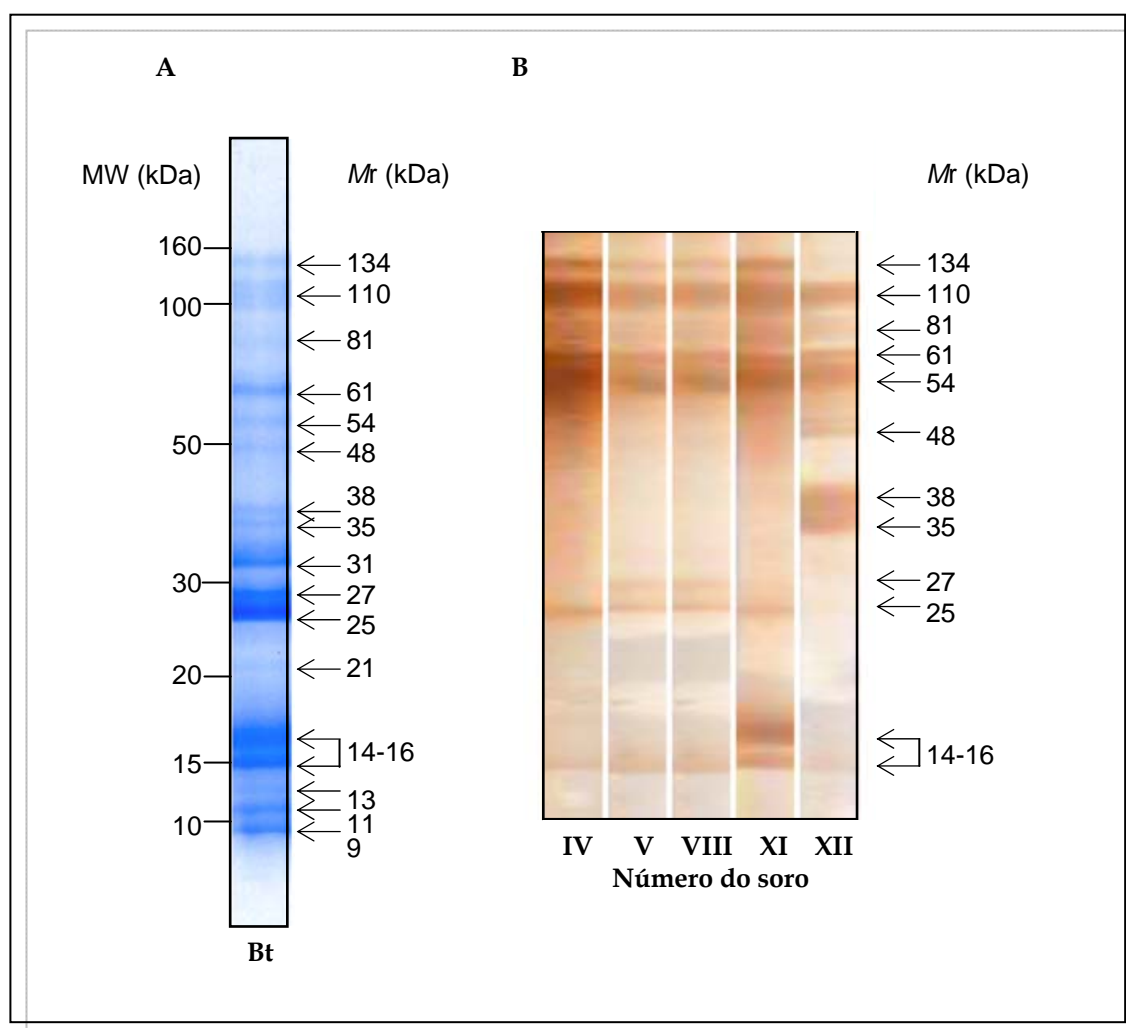


Figura 3. (A) Perfil eletroforético (SDS-PAGE gradiente 8-18%) do extrato de *Blomia tropicalis* (Bt) em condições desnaturantes e redutoras, corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Os padrões de pesos moleculares (MW, kDa) estão indicados à esquerda e as massas moleculares relativas (Mr, kDa) dos componentes alergênicos estão representadas à direita. **(B)** *Immunoblot* unidimensional (1D) representativo dos componentes de *B. tropicalis* reconhecidos por anticorpos IgE no soro de pacientes alérgicos (IV, V, VIII, XI, XII). Em cada linha 20 µg de proteína do extrato Bt foram aplicados em gel SDS-PAGE 1D e transferido para membranas de nitrocelulose. Após incubação do soro, a ligação dos anticorpos IgE foi revelada pela adição de 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

Reações utilizando soro de indivíduos não atópicos, bem como excluindo o soro e os conjugados foram realizadas como controles negativos e não apresentaram nenhum componente com reatividade a anticorpos IgE (dados não demonstrados).

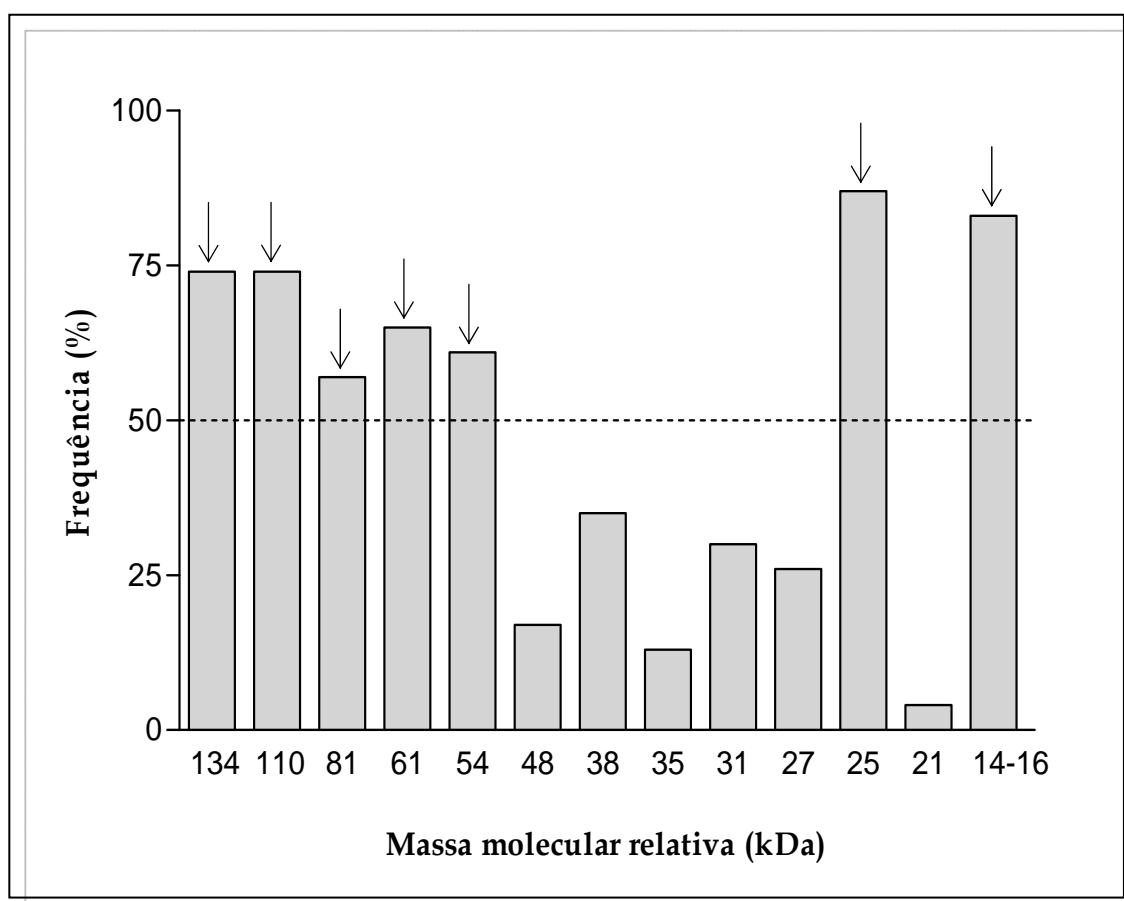


Figura 4. Frequência (%) de componentes alergênicos do extrato de *Blomia tropicalis* reconhecidos por anticorpos IgE em soros de pacientes alérgicos (n = 23) por meio de *immunoblot*. As setas indicam as bandas imunodominantes (>50% de reconhecimento).

4.4 Especificidade e reatividade cruzada de anticorpos IgE aos alérgenos de *B. tropicalis* e *Dermatophagoides* spp

A especificidade e a reatividade cruzada de anticorpos IgE aos componentes alergênicos dos extratos de *B. tropicalis* e/ou *D. pteronyssinus* e/ou *D. farinae* foram determinadas por ensaios de *immunoblot* de inibição competitiva, em seis soros de

pacientes co-sensibilizados aos três alérgenos de ácaros. Imagens das reações de *immunoblot* representativas de três soros de pacientes com os diferentes inibidores estão ilustradas na Figura 5.

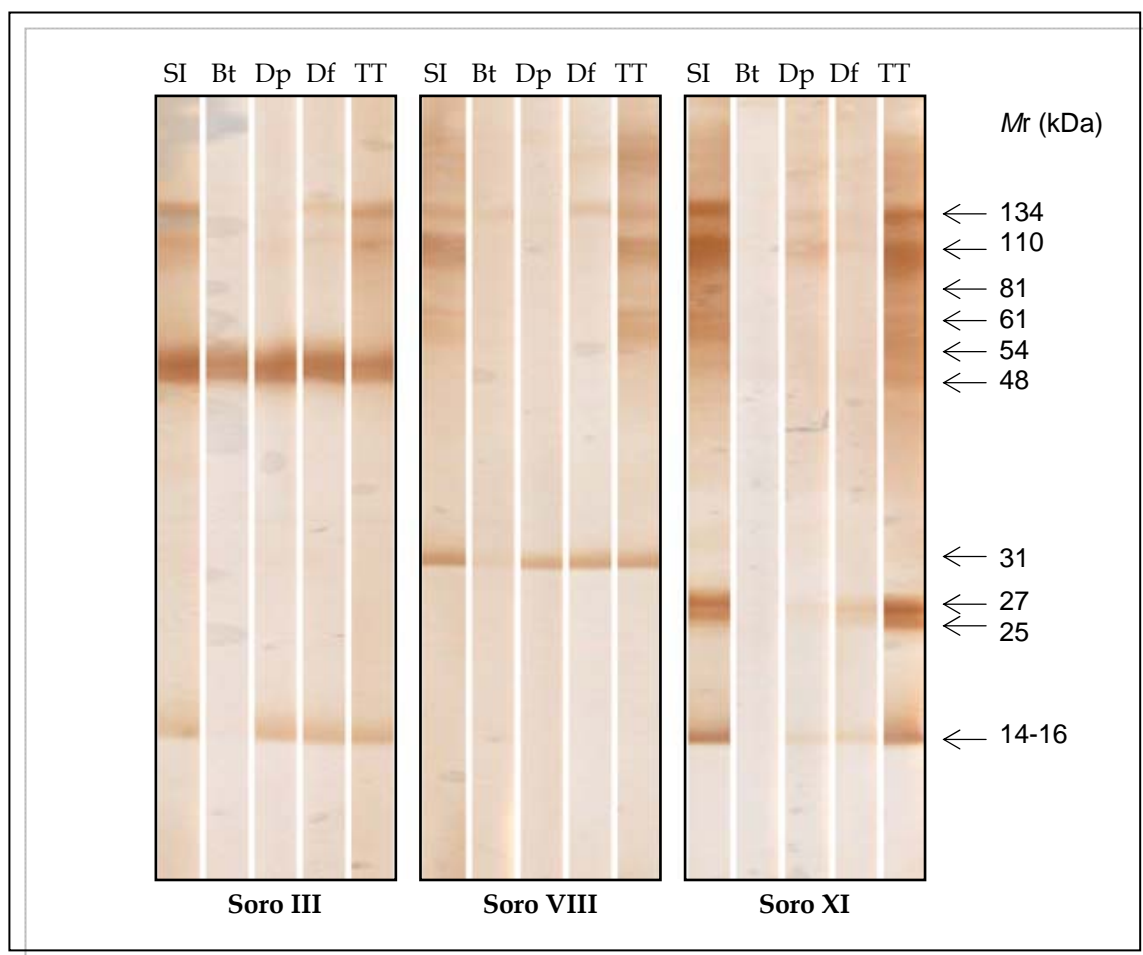


Figura 5. *Immunoblot* de inibição uni-dimensional representativo para avaliar a especificidade de IgE anti-*B. tropicalis* no soro de pacientes alérgicos. Soros pré-incubados com os extratos inibidores de *Blomia tropicalis* (Bt), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df), toxóide tetânico (TT) ou sem inibidor (SI) estão apresentados acima de cada fita. A massa molecular relativa (M_r , kDa) dos componentes alergênicos está indicada à direita.

Uma alta percentagem de inibição homóloga (79-100%) foi observada para nove componentes alergênicos, como 14-16 kDa (79%), 31 e 54 kDa (88%), 134 kDa (92%), 25 kDa (97%) e 38, 61, 81, e 110 kDa (100%) (Figura 6). Considerando as inibições heterólogas realizadas pelos extratos Dp e Df, duas (14-16 e 25 kDa) e três (14-16, 25 e

134 kDa) bandas imunodominantes, respectivamente, apresentaram menos de 50% de inibição. As bandas imunodominantes de 54 e 61 kDa foram os componente de Bt que apresentaram maior reatividade cruzada com Dp e Df concomitantemente (>85% de inibição), e a banda de 81 kDa foi o componente que mostrou maior reatividade cruzada entre Bt e Dp, sendo completamente inibido pelo extrato Dp. Duas bandas não-imunodominantes (31 e 38 kDa) apresentaram mais de 75% de inibição com inibidores homólogos e heterólogos, apresentando alta reatividade cruzada de anticorpos IgE aos três extratos de ácaros testados.

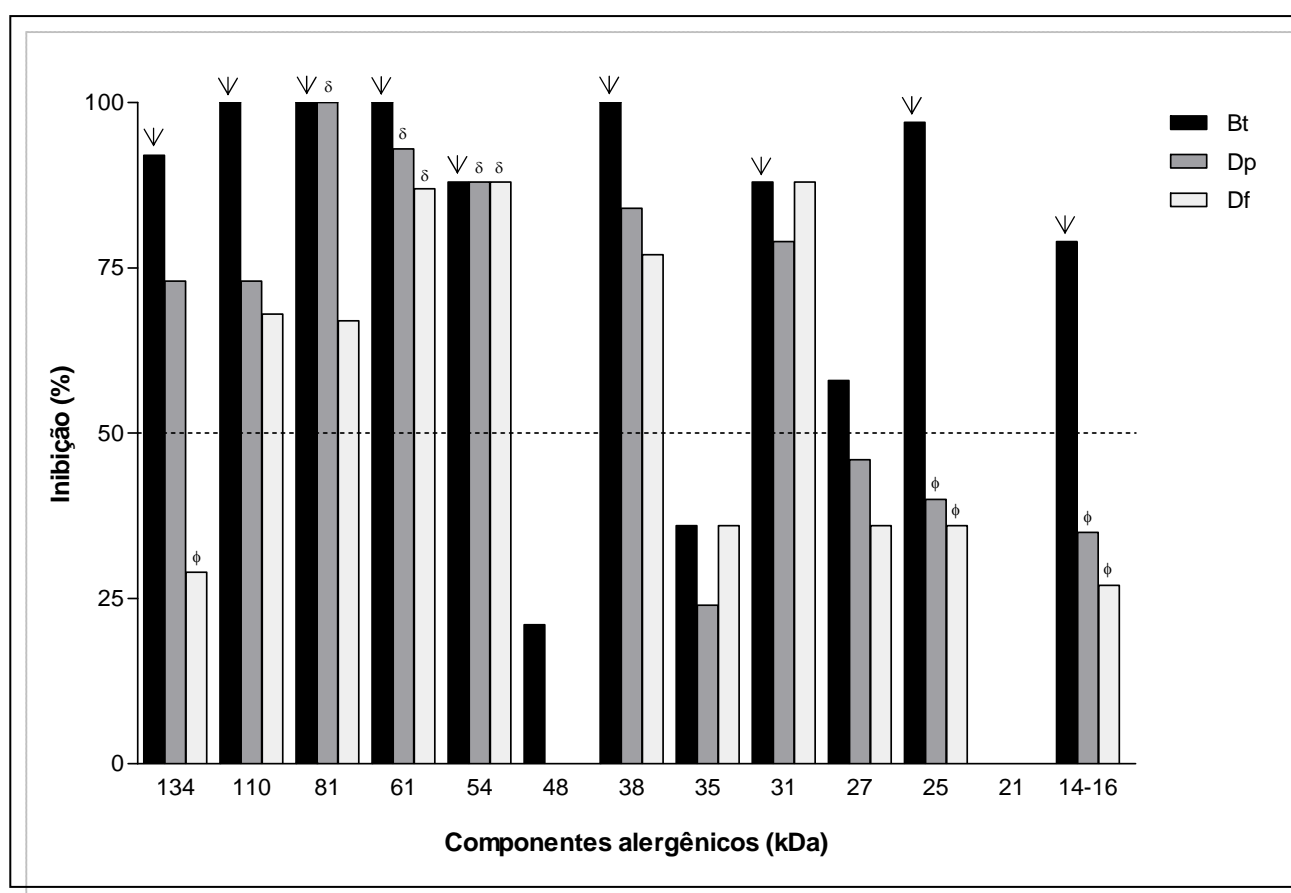


Figura 6. Percentagem (%) de inibição dos componentes alergênicos de *Blomia tropicalis* reconhecidos por anticorpos IgE em soros de pacientes alérgicos pré-adsorvidos com extratos inibidores dos ácaros *B. tropicalis* (Bt), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e *D. farinae* (Df) na concentração final de 400µg/mL. As setas indicam as bandas mais inibidas pelo extrato Bt (inibição homóloga). Os símbolos (φ) indicam as bandas imunodominantes menos inibidas e os símbolos (δ) indicam as bandas imunodominantes mais inibidas pelos extratos Dp e/ou Df (inibição heteróloga).

Os componentes de Bt não apresentaram inibição na reatividade de anticorpos IgE quando utilizou-se toxóide tetânico como neutralizador não alergênico (dados não demonstrados).

4.5 Identificação proteômica de alérgenos de *B. tropicalis* reconhecidos por anticorpos IgE no soro de pacientes alérgicos

O perfil protéico do extrato de *B. tropicalis* foi avaliado por eletroforese bidimensional como apresentado na Figura 7. A coloração com Coomassie coloidal revelou aproximadamente 50 *spots* distribuídos por toda a extensão do gel de separação, variando entre pI de 4-10 e massa molecular relativa (Mr) de 14-110 kDa (Figura 7A).

Para identificar os alérgenos de *B. tropicalis* reconhecidos por anticorpos IgE foi realizado o *immunoblot* bidimensional (2D) utilizando um *pool* de seis soros de pacientes alérgicos que foram previamente selecionados com base nos perfis de reatividade similar por *immunoblot* unidimensional (1D). Como mostrado na Figura 7B, quinze *spots* (1-15), variando de 14 a 110 kDa e pI entre 5,1 e 7,6, foram reconhecidos por anticorpos IgE de soros de pacientes alérgicos, indicando que estes 15 *spots* foram os alérgenos imunodominantes de *B. tropicalis*.

Para identificar as proteínas e as isoformas potenciais, 14 *spots* (visualmente identificados pela coloração do gel com Coomassie coloidal) foram excisados do gel e analisados por espectrometria de massa, sendo a identificação dos peptídeos realizada com o auxílio do programa Blastp. Os dados da identificação das proteínas de Bt ligantes de IgE, com as respectivas massas moleculares relativas (Mr, kDa), os valores de pI, a sequência peptídica, a nomenclatura do alérgeno e a função molecular estão resumidos na Tabela 2.

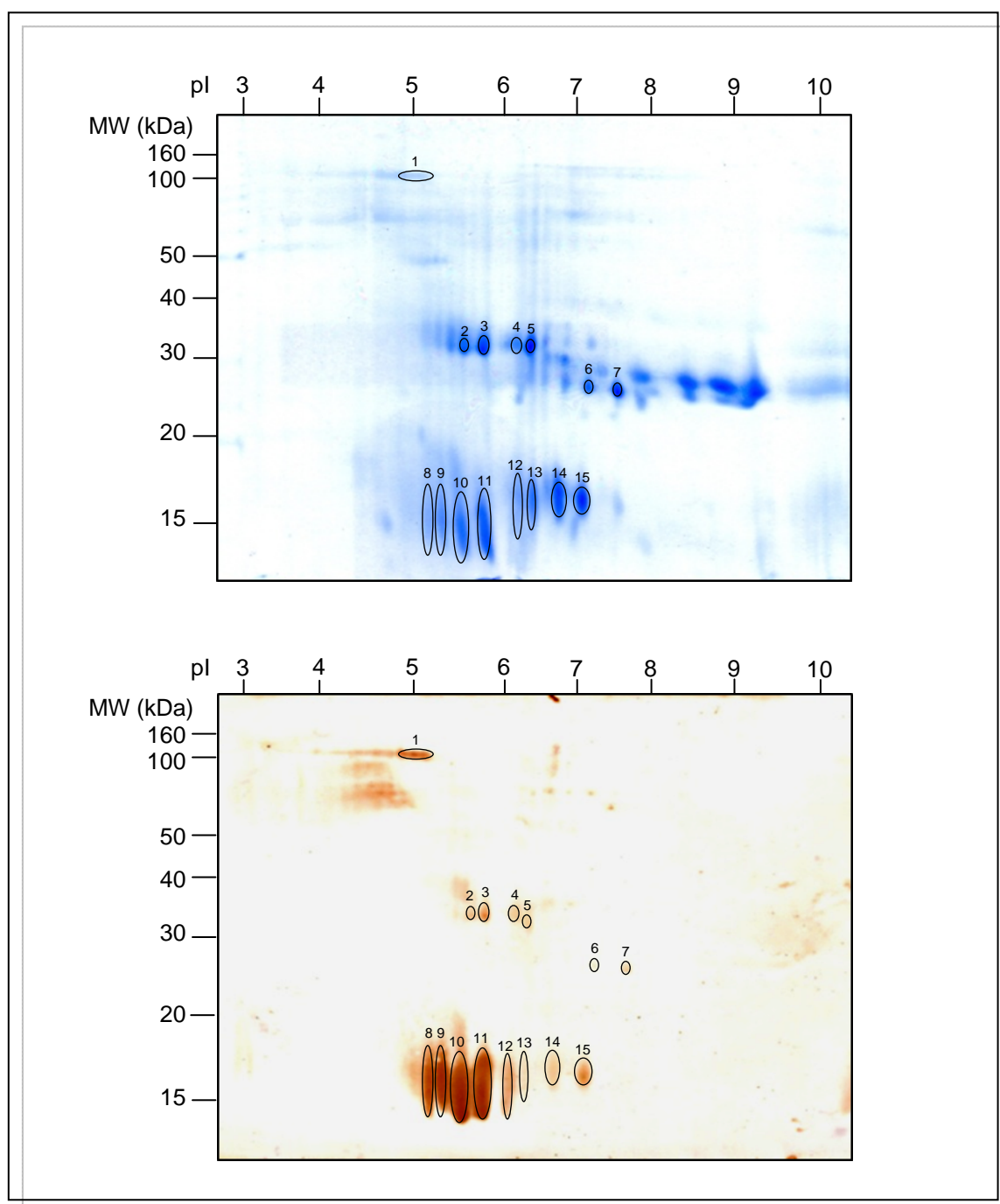


Figura 7. (A) Eletroforese bidimensional (2D) do extrato de *B. tropicalis* (Bt). Amostras (600µg de proteína) foram submetidas à focalização isoeétrica em fita com gradiente de pH imobilizado (ReadyStrip™ IPG, pH 3-10, 7cm). As fitas IPG foram submetidas à eletroforese bidimensional em SDS-PAGE 13% e coradas com Coomassie coloidal *Brilliant Blue G-250*. **(B)** *Immunoblot* 2D dos componentes de Bt reconhecidos por anticorpos IgE em soros de pacientes atópicos. Proteínas separadas por eletroforese 2D foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com o *pool* de seis soros de pacientes alérgicos. A ligação dos anticorpos IgE foi revelada por 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Padrão de peso molecular (MW, kDa) está indicado à esquerda. Os círculos numerados indicam os *spots* de Bt com reatividade a anticorpos IgE que foram analisados por espectrometria de massa.

Dois *spots* (2 e 3) foram identificados com aproximadamente 33 kDa e valores de pI entre 5,69 e 5,83, correspondendo aos alérgenos Blo t ALDH (aldeído desidrogenase). Duas isoformas de Blo t 3 (tripsina, *spots* 4 e 5) foram encontradas com aproximadamente 33 kDa e pI entre 6,18-6,43 e outras duas isoformas (tripsina, *spots* 6 e 7) foram encontradas com aproximadamente 26 kDa e pI entre 7,16-7,53.

Três isoformas de Blo t HEXM (hexosaminidase, *spots* 9-11) foram identificados por espectrometria de massa, com peso molecular de 15,2 a 15,7 kDa e pI de 5,40 a 5,83. O *spot* 8 não foi possível de ser identificado por espectrometria de massa. Em alternativa, foi utilizado o banco de dados UniProtKB/TrEMBL (<http://www.expasy.org/tools/tagident.html>), com base no seu peso molecular de 15,9 kDa e pI 5,17, resultando no alérgeno hipotético Blo t HEXM (hexosaminidase).

Os *spots* 12-15 corresponderam ao alérgeno Blo t 2, com peso molecular variando de 16,1-17,6 kDa e pI de 6,13-7,06. O *spot* 1 também não foi possível ser identificado por MS/MS e, com base no seu peso molecular de 110 kDa e valor de pI 5,11, a análise do banco de dados identificou o alérgeno hipotético Blo t 11 (paramiosina) de *B. tropicalis*.

4.6 Homologia das sequências entre os alérgenos de *B. tropicalis* e *Dermatophagoides* spp

O alinhamento múltiplo realizado pelo programa ClustalW2 determinou a porcentagem de identidade entre sequências polipeptídicas dos alérgenos de *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (Figura 8-12).

A Tabela 3 sumariza as análises de identidade entre os alérgenos de Bt, Dp e Df, sendo apresentados os respectivos números de acesso, a função molecular e a percentagem de identidade entre alérgenos analisados.

Tabela 2. Identificação dos alérgenos de *Blomia tropicalis* por *immunoblot* bidimensional e espectrometria de massa.

#Spot	2D ^δ		Peptídeo MS/MS [¥]	Alérgeno	Função molecular
	Mr (kDa)	pI			
1	110,8	5,11	Nd	Blo t 11 ^Φ	paramiosina
2	32,8	5,69	RLL	Blo t ALDH	aldeído desidrogenase
3	32,9	5,83	LVRDQ RLL	Blo t ALDH	aldeído desidrogenase
4	33,3	6,18	LRHN VRA PKAS PTE	Blo t 3	tripsina
5	32,7	6,43	YDSNTIDNDIALIQTASKM VGNYISWIK CNGDSGGP	Blo t 3	tripsina
6	26,5	7,16	VSL YDSNTIDNDIALIQTASKM KMSTGTTNAQAIK VGNYISWI	Blo t 3	tripsina
7	26,2	7,53	RYNSL	Blo t 3	tripsina
8	15,9	5,17	nd	Blo t HEXM ^Φ	hexosaminidase
9	15,7	5,40	VSFD	Blo t HEXM	hexosaminidase
10	15,3	5,60	SFDGVD	Blo t HEXM	hexosaminidase
11	15,2	5,83	VSFD VSFNC VSFNC	Blo t HEXM	Hexosaminidase
12	17,6	6,13	KTFFIANQDSEKL KISAIMNNEVPVPGVDKD	Blo t 2	Desconhecida
13	17,4	6,46	KTFFIANQDSEKL KISAIMNNEVPVPGVDKD	Blo t 2	Desconhecida
14	16,3	6,70	KTFFIANQDSEKLEIKI KISAIMNNEVPVPGVDKD	Blo t 2	Desconhecida
15	16,1	7,06	KTFFIANQDSEKLEIKI KISAIMNNEVPVPGVDKD KYELDYSLIPTILPNLKT	Blo t 2	Desconhecida

#, Números dos *spots* correspondem aos *spots* indicados por círculos na Figura 7.

^δ, Dados experimentais calculados pelo *software* ImageMaster 2D Platinum.

Mr, Massa molecular relativa em kiloDaltons (kDa).

[¥], Os peptídeos dos alérgenos foram submetidos à análise no banco de dados NCBI Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

nd, peptídeo não determinado.

^Φ, Alérgeno hipotético. Mr e o pI do alérgeno foram submetidos no banco de dados UniProtKB/TrEMBL (<http://www.expasy.org/tools/tagident.html>).

Conforme demonstrado na Figura 8 e Tabela 3, o alérgeno Blo t 11 possui 89% de identidade com o alérgeno Der p 11 e 90% com o alérgeno Der f 11, com alta homologia observada em toda extensão da sequência de aminoácidos de Bt. A molécula de Derf11 é ligeiramente menor e apresenta alta homologia com Blot 11 entre os aminoácidos 86 a 778. Os três alérgenos do grupo 11 identificados possuem a função de paramiosina.

O alérgeno Blo t ALDH, um membro da família da aldeído desidrogenase, não possui homologia com nenhum alérgeno conhecido de *D. pteronyssinus*, entretanto, possui 67% de identidade com o alérgeno Der f Alt a 10 (Tabela 3). Der f Alt a 10 apresenta uma porção C-terminal com 64 aminoácidos adicionais em comparação a Blo t ALDH (Figura 9). Os peptídeos RLL e LVERDQ identificados por meio de espectrometria foram alinhados aos aminoácidos 75-77 e 83-88 de Blo t ALDH, respectivamente.

Blo t 3 é um alérgeno pertencente a família da tripsina e apresenta uma baixa identidade com Der p 3 e com Der f 3, sendo de 48% e 47% respectivamente. As regiões com maior homologia entre Derp 3 e Der f 3 são observadas entre as posições de aminoácidos 36 a 53, 69 a 124, 210 a 224 e 230 a 263. Como visualizado na Figura 10, vários peptídeos foram identificados por espectrometria de massa, tais como YDSNTIDNDIALIQTASKM, KMSTGTTNAQAIK e VGNYISWI que foram alinhados aos aminoácidos 112 a 130, 128 a 141 e 252 a 260 de Blo t 3, respectivamente.

Blo t HEXM, com função molecular de hexosaminidase, não apresenta identidade com nenhum alérgeno de *Dermatophagoides* conhecido. As sequências de peptídeos, VSFDC e SFDGTD, obtidas por meio de espectrometria alinharam-se com os aminoácidos de 133 a 137 e 250 a 255 de Blo t HEXM (Figura 11).

O alérgeno de *B. tropicalis*, Blo t 2, até o presente momento, não possui função molecular conhecida apresentando baixa homologia com os alérgenos pertencentes a família NPC2 de *Dermatophagoides* spp (Figura 12) e também com o alérgeno Blo t 5, que possui peso molecular similar a Blo t 2 (Figura 13). Como demonstrado na Tabela

3, a percentagem de identidade de Blo t 2 em comparação a Der p 2 foi de 38% e com Der f 2 de 37%, sendo mais relevantes nas posições de aminoácidos 43 a 58, 93 a 106 e 126 a 134. Os peptídeos KTFFIANQDSEKLEIKI, KISAIMNNIEVPVPGVDKD e KYELDYSLIPTILPNLKT encontram-se alinhados nas posições 54 a 71, 69 a 87 e 101 a 120 de Blo t 2, respectivamente. A percentagem de identidade de Blo t 2 em comparação a Blo t 5 foi de 4%.

Blot11	MAARSAKMYQSSRAGHGDISIEYGTDLGALTRLEDKIRLLS ED LESERELRQ R VEREK	60
Derp11	MSARTAKMYRSGAGASGDISVEYGTDLGALTRLEDKIRLLS DD LESEREMRQ R IEREK	60
Derf11	-----	
Blot11	SD ITVQ LM NLTERLEETEGSSSESVTEMNKKRDE ELAKLRKLL EDV HME SEETAHHLRQKH	120
Derp11	AELQIQVMSL SERLEEAEGSSSESVTEMNKKRDE ELAKLRKLL EDV HME SEETAHHLRQKH	120
Derf11	-----MNKKRDE ELAKLRKLL EDV HME SEETAHHLRQKH	34
Blot11	QAAIQEMQDQLDQ VQ KAKNKSDKEKQKFQAEVFEL LAQ ETANK DKL VAKTVEKLEYTV	180
Derp11	QAAVHEMQDQLDQ Q KAKNKSDKEKQKFQAEVFEL LSQ ETANK EKL TALKSVEKLEYTV	180
Derf11	QAAIQEMQDQLDQ Q KAKNKSDKEKQKFQAEVFEL LAQ ETANK EKL TALKNVEKLEYTV	94
Blot11	HEINIKIEEINRTV VEVTA HRQRLSQENSELIKEVHEYKISLDNANHLKGQIAQ Q LEDTR	240
Derp11	HEINIKIEEINRTV IELTSH KQRLTQENTELIKEVHEVKQLDNANHLKQ QIAQ LEDTR	240
Derf11	HEINIKIEEINRTV IELTSH KQRLSQENTELIKEVHEVKQLDNANHLKT QIAQ LEDTR	154
Blot11	HRLEDEERKRSSLENHAHTLEVELESLKVQ LEEE SEARLELERQLTKANGDAASWKS K YE	300
Derp11	HRLEDEERKRSSLENHAHTLEVELESLKVQ LDDE SEARLELERQLTKANGDAASWKS K YE	300
Derf11	HRLEDEERKR AS LENHAHTLEVELESLKVQ LDDE SEARLELERQLTKANGDAASWKS K YE	214
Blot11	AELQAHVDEVEELRRKMAQKISEYGEQLEALLNKCS ALEKQKAR LQSEVEVLIMDLEKAT	360
Derp11	AELQAHVDEVEELRRKMAQKISEYEEQLEALLNKCS SLEKQKSRL QSEVEVLIMDLEKAA	360
Derf11	AELQAHVDEVEELRRKMAQKISEYEEQLEALLNKCS SLEKQKSRL QSEVEVLIMDLEKAT	274
Blot11	AHAQALEKRV SQ LEKINLDLKSKEEVS MLLE QTKDLRVK IA DLQKLQHEYEK LRDQKE	420
Derp11	AHAQALEKRV QA LEKINLDLKDKEEV TMLMEQAQKEL RIK IGEL QKLQHEYEK VRDQRD	420
Derf11	RHAQALEKRV QA LEKINLDLKNKEEV TMLMEQAQKEL RVK IAEL QKLQHEYEK LRDQRD	334
Blot11	ALARENKKL ADD LAEAKSQLNDAHRR IHEQEIEIKRLENER EELAAAYKEAETLRKQEEA	480
Derp11	QLARENKKL TDD LAEAKSQLNDAHRR IHEQEIEIKRLENER DELSAAYKEAETLRKQEEA	480
Derf11	QLARENKKL TDD LAEAKSQLNDAHRR IHEQEIEIKRLENER DELSAAYKEAETLRKQEEA	394
Blot11	KNQRLTAELAQTRHDYKRLAQKEEIEALRKQYQIEIEQLNMRLAEAEAKLKTE VARLK	540
Derp11	KNQRLIAELAQVRHDYKRLAQKDEEIEALRKQYQIEIEQLNMRLAEAEAKLKTE IARLK	540
Derf11	KNQRLIAELAQVRHDYKRLAQKDEEIEALRKQYQIEIEQLNMRLAEAEAKLKTE IARLK	454
Blot11	KKYQAQITELELSLDAANKANIDLQKTIKKQALQITGLQAHYDEVHRQLQ Q AVDQLGV TQ	600
Derp11	KKYQAQITELELSLDAANKANIDLQKTIKKQALQITELQAHYDEVHRQLQ Q AVDQLGV TQ	600
Derf11	KKYQAQITELELSLDAANKANIDLQKTIKKQALQITELQAHYDEVHRQLQ Q AVDQLGV TQ	514
Blot11	RRCQALTAELEEMRVNLEQALRAKRAAEQ MHEE AVVRVNELTTINVNLASAKSKLE TEFS	660
Derp11	RRCQALQAELEEMRIA LE QASRAKRAEQ LHEE AVVRVNELTTINVNLASAKSKLE SEFS	660
Derf11	RRCQALQAELEEMRIA LE QANRAKRAEQ LHEE AVVRVNELTTINVNLASAKSKLE SEFS	574
Blot11	ALQNDYDEVHKELRISDERVQKLTIE VKSTKDL LESETERVTKLET IKKS LETEVRN LQI	720
Derp11	ALQADYDEVHKELRISDERVQKLTIE ELKSTKDL LIEQERLVKLET VKKS LEQEVRTL HV	720
Derf11	ALQADYDEVHKELRISDERVQKLTIE ELKSTKDL LIEQERLVKLET VKKS LEQEVRTL HV	634
Blot11	RIEEVEANALAGGRVIAKLESRIRDVEIEVEEERRRHAET EKMLRKKDHRV KELL LQNE	780
Derp11	RIEEVEANALAGGRVIAKLESRIRDVEIEVEEERRRHAET EKMLRKKDHRV KELL LQNE	780
Derf11	RIEEVEANALAGGRVIAKLESRIRDVEIEVEEERRRHAET DKMLRKKDHRV KELL LQ--	692
Blot11	EDHKQIQLLQEMS DK LNEKVVKYKRQMQEQEGMSQONLTVRRFQRELEAAEDRADQAES	840
Derp11	EDHKQIQLLQEM TD KLNEKVVKYKRQMQEQEGMSQONLTVRRFQRELEAAEDRADQAES	840
Derf11	-----	
Blot11	NLSFIRAKHRSWVTTSQVPGGTRQVF TEQESSNF	875
Derp11	NLSFIRAKHRSWVTTSQVPGGTRQVF TQEETTN	875
Derf11	-----	

Figura 8. Homologia das sequências entre os alérgenos Blo t 11, Der p 11 e Der f 11. As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa ClustalW2 e ajustadas manualmente. Sequências idênticas em relação a Blo t 11 estão destacadas em cinza. Resíduos de aminoácidos conservados foram destacados em negrito. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos no alinhamento.

BlotALDH	--MVQVKYTKIFINNEWHDSLSGKTFFTINPSTEEKIADIQAGEKADVDKAVEAAVKAFK	58
DerfAlta10	MAQVEVKYTQIFINNEWHDSLISGKTFFETINPFTEEKLANVQEGDKADIDRAVVAAVDAFR	60
BlotALDH	IGSEWRKMDASARCRLLINKLAELVERDQKYLAELETLDNKGKPLPMAMNDIHAAIRGFEYY	118
DerfAlta10	FDSFWRQMDASQRGHLLYRLADLIERDQDYIASLESMDNGKPKTMALFDVDLAIKVFYY	120
BlotALDH	AGWADKIHGKTIPADGNVCSFTKIEPVGVCGQIIPWNFPLVMLAWKWAPALATGCTTVLK	178
DerfAlta10	AGYADKIHGKTIPADGKVFATRIEPVGICQIVPWNFPFLMASWKFPGALCAGNTTVLK	180
BlotALDH	PAEQTPLTALYMGSLIEAGFPPGVVNIYPGYGPTAGAALVDNPLVDKIAFTGSTEVGKL	238
DerfAlta10	PAEQTPLSALYLASLTKEGGFPPGVVNVVPFGGETAGAALVDNPKVDKIAFTGSTEIGKL	240
BlotALDH	ISKNASATLKRVSLELGKSPILVVTEN-FDVTMAAEIASAGCMVNQGACCAATRTFVHE	297
DerfAlta10	IMRNGSHSMKRITLELGKSPILVVTENVEDIAQAARTAQDSCFLNMGQCCAGTRTFVHE	300
BlotALDH	SIYDEFVKQSALIAQRVVGCPFEAATVQGPQIDATQTEKILELIESGKKQGARLVTTGS	357
DerfAlta10	SIYDEFVKHSVEYCQSHVFGNPFDSKTAFGPQVDKIQMRILEMIESGKQEGARCVAGGN	360
BlotALDH	RMKQKGYFIEPTVFADVDDSMRIAKEEIFGPVQQLFKYKTLDEAIERSNATEY-----	410
DerfAlta10	RMDKRGYFVEPTVFADVDTGMRIAREEIFGPVQQILKYKTLDEVIERCNDINYGLGSAIL	420
BlotALDH	-----VWLPAF-----	416
DerfAlta10	TNDINEAMKFSRSIRAGSVWVNIPIYMPVSVQTPFGGFKESGVGRELGEDGLRGYGEIKT	480
BlotALDH	-----	
DerfAlta10	VVIMDREKKM	490

Figura 9. Homologia das sequências entre os alérgenos Blo t ALDH e Der f Alt a 10. As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa ClustalW2 e ajustadas manualmente. Sequências idênticas entre os dois alérgenos estão destacadas em cinza. Resíduos de aminoácidos conservados foram destacados em negrito. Os peptídeos RLL e LVERDQ foram identificados por espectrometria de massa e estão marcados pela caixa em vermelho. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos no alinhamento.

Blot3	MK VL VLFCLVSLAAAGPLKDALNKAQVDAFYAEGYIVGGSNAADGDAPYQVSLQRTSHFC	60
Derp3	- MI YNIILVLLIAINTLANPIL ASP NAT-----IVGGE K ALAGECPYQ I SLQSSSHFC	54
Derf3	- MM IL-- TI VVLLAANILATPIL PSS PAT-----IVGGV K AQAGDCPYQ I SLQSSSHFC	52
Blot3	GG S IIADNYILTAAHCIQGL S ASSLTTRYNT LR HN S GG L V K A SRIIGHE K YDSNTIDND	120
Derp3	GG T ILDE Y WILTAAHCVAGQ T ASKLSIRYNS L KHSLGGE K ISV A KIFAHE K YDSYQIDND	114
Derf3	GG S ILDE Y WILTAAHCVNGQ S AKKLSIRYNT L KHASGGE K IQV A EIYQH E NYDSMTIDND	112
Blot3	I AL I Q T AS K M S TGTTNA Q A K I P E Q GSD P K A S E VLITGWGTLSSGASS L P T K L Q KVTVP	180
Derp3	I AL I K L K S PMKLNQKNA K AVGL P AKGSDVKVGD Q VR V SGWGYLEGSYSL P S E L RRVD I A	174
Derf3	V AL I K L K T PMTL D QTN A K P V L PA Q GS D VKVGD K IR V SGWGYL Q EGSYSL P S E L Q R VD I D	172
Blot3	I VDR K TCNANYGAVGA E ITDN M FCAGILNVGGK D A C Q G DSGG F VA--ANGVLVGA V SWGY	238
Derp3	V VS R KEC N ELYSKANA E VTDN M ICGGDVANGGK D SCQ G DSGG P VVDVKNQ V GIVSWGY	234
Derf3	V VS R EQ C DQLYSKAGAD V SEN M ICGGDVANGGV D SCQ G DSGG P VVDVATKQ I VGIVSWGY	232
Blot3	GCA Q AKYPGVYTRV G NY I SW I K G KGV P V	266
Derp3	GC A R K GYPGVYTRV G N F DW I E S KRSQ-	261
Derf3	GC A R K GYPGVYTRV G N F DW I E S KRSQ-	259

Figura10. Homologia das seqüências entre os alérgenos Blo t 3 , Der p 3 e Der f 3. Seqüências idênticas em relação a Blo t 3 estão destacadas em cinza. Resíduos de aminoácidos conservados foram destacados em negrito. Os peptídeos destacados pela caixa em vermelho referem-se aos identificados por espectrometria de massa. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos no alinhamento.

BlotHEXM	MEMNKLNVLHWHIVDDESFPPFESETFPELSRKGSYDPQYHVYRDEVDNAILEYARQRAIR	60
BlotHEXM	VVEFDSPGHTWSWGLGQPGLLTPCYGPNGQPNGIFGPIDPTKPNNFKFIRNLFTIASR	120
BlotHEXM	FKDQYIHLGGDE V S F D Q WATNPSIREFMEQHGYGNDYTRLESYYVQKLVNIVKQLNRSYV	180
BlotHEXM	VWQEVFDHNVTLKSDTVVHVWIGNDTSSTWSTELSKVTEAGYQALLSSPWYLDLISYGPD	240
BlotHEXM	WRKYESEP S F D G T TE Q KRLILGGEAAVWAEYINGANMISRTFPRVNAVAERLWSSQRL	300
BlotHEXM	AKANRAVGRFR T QACRM I KLGIRIQPIDGPGWCECDYALTD	341

Figura 11. Seqüência de aminoácidos do alérgeno Blo t HEXM. A seqüência do alérgeno foi identificada utilizando o programa Blastp. Os peptídeos destacados pela caixa em vermelho referem-se aos identificados por espectrometria de massa. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos.

Blot2	-MFKFICL L ALLPFW S RAAAGDVKFTDCA H GEVTS L DL S GC S G-DHCII H K G KSFTL K TFF	58
Derp2	MMYKILCL S LL-- V AAVARDQVDVKDCAN H EIKKVLVP G CHGS E PCII H R G KPFQ L EAVF	58
Derf2	----- S LL-- V AAVADQVDVKDCAN E IKK V MVD G CHGS D PCII H R G KPF L EALF	50
Blot2	IANQ D SEK L EIKISAIMN N IEVPVPGVD K DGCKHTTCPLK G Q K YELDYS L IIP T IL P N-	117
Derp2	EANQ N TK T AK I EIKASIDGLEVDVPGID P NACHYMKCPLVK G Q Q Y D IKYTWNVPKI A PK S	118
Derf2	DANQ N TK T AK I EIKASLDGLEIDVPGID T NACHFVKCPLVK G Q Q Y D IKYTWNVPKI A PK S	110
Blot2	L KTVTTAS L VGDHG V VACGKVNT E VVD-	144
Derp2	ENVVTVK V MGD D GV L ACAIATHAK I R D	146
Derf2	ENVVTVK L IGD N GV L ACAIATHG K I R D	138

Figura 12. Homologia das sequências entre os alérgenos Blo t 2, Der p 2 e Der f 2. As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa ClustalW2 e ajustadas manualmente. Sequências idênticas em relação a Blo t 2 estão destacadas em cinza. Resíduos de aminoácidos conservados foram destacados em negrito. Os peptídeos na caixa em vermelho referem-se aos identificados por espectrometria de massa. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos no alinhamento.

Blot2	MFKFICL L ALLPFW S RAAAGDVKFT-DCA H GEVTS L DL S GC S GDHCII H K G KSFTL K TFF I	59
Blot5	-MKFAIV L IACFA A SVLA Q E H KPKK D FRNEFDHLL I EQAN-- H A E K G EHQ L LYL L QH Q L	57
Blot2	IANQ D SEK L EIKISAIMN N IEVPVPGVD K DGCKHTTCPL K G Q KYELDYS L IIP T IL P N L K	119
Blot5	DE L NEN K SK E L Q E K I I RE L D V VCAM I EG-----AQ G AL E R- E L K RTDLN I L E R F N Y E E A Q	111
Blot2	T VTTAS L VGDHG V VACGKVNT E VVD	144
Blot5	T L S -K I L L K D L K ET E Q K V K D I Q T Q-	134

Figura 13. Homologia das sequências entre os alérgenos Blo t 2 e Blo t 5. As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa ClustalW2 e ajustadas manualmente. Sequências idênticas entre os dois alérgenos estão destacadas em cinza. Resíduos de aminoácidos conservados foram destacados em negrito. Números à direita referem-se à posição dos aminoácidos no alinhamento.

Tabela 3. Percentagem de identidade entre os alérgenos *Blomia tropicalis* detectados por espectrometria de massa em relação aos alérgenos de *Dermatophagoides* spp.

Alérgeno	Função Molecular	Identidade (%)	
		<i>D. pteronyssinus</i>	<i>D. farinae</i>
Blo t 11 (Q8MUF6)	Paramiosina	89% Der p 11 (Q6Y2F9)	90% Der f 11 (Q967Z0)
Blo t ALDH (A1KXJ0)	Aldeído desidrogenase	–	67% Der f Alt a 10 (A1KXH7)
Blo t 3 (Q8I916)	Tripsina	48% Der p 3 (P39675)	47% Der f 3 (P49275)
Blo t HEXM (AAQ24551)	Hexosaminidase	–	–
Blo t 2 (Q1M2P1)	Desconhecida	38% Der p 2 (P49278)	37% Der f 2 (Q00855)

Em parênteses, número de acesso no UniProt.

5 Discussão

Ácaros da poeira domiciliar representam uma complexa fonte de alérgenos capazes de induzir a síntese de anticorpos IgE em indivíduos geneticamente predispostos (WEGHOFER et al., 2005), sendo importantes agentes sensibilizantes, particularmente em doenças alérgicas respiratórias como asma e rinite alérgica. Em regiões de clima temperado, ácaros das espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae* são predominantes e de maior importância clínica na asma (PLATTS-MILLS et al., 1992), enquanto, aliado a eles, *B. tropicalis* é importante fonte alergênica em países de clima tropical e subtropical (ARRUDA et al., 1991; GELLER; ESCH; FERNANDEZ-CALDAS, 1993). Vários estudos anteriores têm demonstrado a importância desses ácaros na sensibilização de pacientes atópicos no Brasil (ARRUDA et al., 1991; GELLER; ESCH; FERNANDEZ-CALDAS, 1993; RIZZO et al., 1993; SARINHO et al., 1996; PEREIRA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006; SOARES et al., 2007; ALVES et al., 2008).

Estudos envolvendo a identificação de isoformas ligantes de IgE para determinação dos alérgenos de *B. tropicalis* são importantes para classificar os alérgenos segundo a família bioquímica e podem auxiliar na distinção entre a reatividade cruzada e a polisensibilização (WEGHOFER et al., 2005).

No presente estudo, a resposta de anticorpos IgE específicos a componentes alergênicos presentes no extrato de *B. tropicalis* foi avaliada em soros de pacientes com rinite alérgica e sensibilizados a ácaros da poeira domiciliar por *immunoblot* uni- e bidimensional seguido de análises por espectrometria de massa e *in silico*. Neste trabalho também avaliamos a reatividade cruzada entre os anticorpos IgE ligantes a componentes alergênicos de *B. tropicalis* e *Dermatophagoides* spp por *immunoblot* de inibição unidimensional.

A seleção dos pacientes foi feita por meio de avaliação clínica, positividade no teste cutâneo de puntura ao extrato Bt e em ELISA-IgE específica a Bt. Com relação ao diagnóstico clínico, a maioria dos pacientes selecionados apresentou sintomas característicos de rinite alérgica sem associação com asma (78,3%), enfatizando que

rinite é a doença alérgica mais freqüente nesta população, assim como observado por outros estudos (SOPELETE et al., 2000; BERGER, 2003; PEREIRA et al., 2005; SOARES et al., 2007; ALMEIDA et al., 2006; ALVES et al., 2008).

Pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* apresentaram alta co-sensibilização com alérgenos de ácaros do gênero *Dermatophagoides*. Estes resultados reforçam os nossos achados anteriores obtidos em outro grupo de pacientes com rinite dessa mesma região (PEREIRA et al., 2005, ALMEIDA et al., 2006), confirmando que a alta proporção desta sensibilização concomitante tem certamente dificultado a avaliação do papel de *B. tropicalis* na indução dos fenômenos atópicos para estes pacientes, particularmente em regiões tropicais e subtropicais onde ambas espécies de ácaros coexistem.

Embora não haja relatos sobre a prevalência do ácaro *B. tropicalis* em nossa região, alta freqüência deste ácaro tem sido encontrada em amostras de poeira domiciliar das áreas urbana e rural de Salvador, BA (MEDEIROS Jr. et al., 2002), contrastando aos níveis baixíssimos ou até mesmo não detectáveis do seu alérgeno principal Blo t 5 quando determinado por ELISA *sandwich* (LUCZYNSKA et al., 1989). Este fato sugere que outros componentes alergênicos importantes derivados do extrato de *B. tropicalis* poderiam estar presentes e ser reconhecidos por soros de pacientes atópicos, ou ainda que a sensibilidade do ELISA para mensurar o alérgeno Blo t 5 deva ser melhor avaliada em ensaios futuros (MEDEIROS Jr. et al., 2002).

Os resultados apresentados neste estudo caracterizaram alérgenos principais de *B. tropicalis* com papel importante na indução de anticorpos IgE em pacientes sensibilizados a ácaros desta região. Ensaios de *immunoblot* 1D com o extrato Bt, utilizando substrato cromógeno, revelaram pelo menos treze componentes polipeptídicos, com bandas imunodominantes (>50%) de baixo (14-16 e 25kDa) e alto peso molecular (54 a 134kDa) que mostraram reconhecimento por anticorpos IgE em 23 soros de pacientes sensibilizados a *B. tropicalis*. Estes resultados confirmam os nossos achados anteriores de que o perfil alergênico de Bt demonstra reatividade de

anticorpos IgE a espectro similar de componentes em pacientes da nossa região (PEREIRA et al., 2005).

Tsai e colaboradores (1998) relataram 14 proteínas de *B. tropicalis* reconhecidas por IgE e detectadas por *immunoblot*, utilizando também sistema de revelação cromogênico. Por outro lado, outros pesquisadores identificaram 21 diferentes proteínas reconhecidas por IgE detectadas por meio de radioimunoeletroforese cruzada (ARLIAN; VYSZENSKI-MORBER; FERNANDEZ-CALDAS, 1993) e 25 antígenos detectados por *immunoblot* utilizando análise de autoradiografia (CARABALLO et al., 1994) no extrato total de *B. tropicalis*. Desta forma, um amplo espectro de bandas polipeptídicas com reatividade a IgE tem sido observado, não apenas o alérgeno principal Blo t 5 (14kDa), mas também alérgenos de alto peso molecular como Blo t 11 (110kDa) (RAMOS et al., 2001; RAMOS et al., 2003).

Estudos anteriores demonstraram que amostras de soros de pacientes alérgicos e sensibilizados a *B. tropicalis* apresentaram reatividade IgE de 45 a 69% para Blo t 5, (ARRUDA et al. 1997), 57% para Blo t 3 (25/30kDa) (FLORES et al., 2003) e 56 a 59% para Blo t 11 (110kDa), dependendo da população estudada (RAMOS et al., 2001; RAMOS et al., 2003).

Visando analisar a especificidade e a reatividade cruzada de anticorpos IgE aos alérgenos de *B. tropicalis* e *Dermatophagoides* spp, técnicas de imunoabsorção foram realizadas por meio de *immunoblots* de inibição competitiva. Foi observada alta percentagem de inibição homóloga para os componentes alergênicos imunodominantes de Bt. Os extratos de Dp e Df inibiram mais de 50% dos componentes imunodominantes de Bt com alto peso molecular (54-134kDa), com exceção da banda de 134kDa quando foi utilizado o extrato Df como inibidor (inibição heteróloga). Entretanto, foi encontrada inibição inferior a 50% aos componentes imunodominantes de Bt com baixo peso molecular quando os extratos de Dp e Df foram utilizados como agentes inibidores. Portanto, nossos resultados indicam que há alta reatividade cruzada de IgE entre alérgenos de Bt com alto peso

molecular com os extratos de Dp e Df em comparação com alérgenos de Bt com baixo peso molecular, em pacientes sensibilizados na nossa região. Estes dados sugerem que os antígenos de baixo peso molecular de Bt, com baixa reatividade cruzada a alérgenos de *Dermatophagoides* spp, podem ser fontes promissoras de epítomos para estudos posteriores que enfoquem antígenos marcadores exclusivos deste ácaro em pacientes sensibilizados. Ainda assim, vários estudos demonstram que alérgenos de baixo peso molecular como Blo t 3 (25/30kDa) e Blo t 5 (14kDa) são alérgenos principais derivados de *B. tropicalis* e apresentam 49% de homologia com Der p 3 e 42% com Der p 5, respectivamente (CHUA et al., 2007).

Entre os componentes imunodominantes de alto peso molecular, as bandas de 54, 61 e 81kDa apresentaram-se altamente inibidas por extratos de Dp e Df (aproximadamente 80%), sugerindo que estes componentes alergênicos de Bt provavelmente estejam relacionados aos alérgenos do grupo 4 (54kDa), grupo 14 (81kDa) ou grupo indefinido (61kDa), representando importante reatividade cruzada entre os alérgenos derivados dessas espécies de ácaros.

Por outro lado, a alta inibição observada com os componentes não imunodominantes de Bt (31 e 38 kDa) utilizando os extratos inibidores de Dp e Df indicam que deve existir alta homologia entre os epítomos desses alérgenos devido à proximidade filogenética entre os ácaros da ordem Astigmata.

A análise proteômica de alérgenos de *B. tropicalis* revelou aproximadamente 50 *spots* visualizados após coloração por Coomassie coloidal do extrato de Bt. Quinze alérgenos protéicos foram reconhecidos por anticorpos IgE utilizando *pool* de soros de pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* por meio de *immunoblot* bidimensional. Assim, *immunoblot* 2D associado com análises de espectrometria de massa permitiram a identificação de alérgenos imunodominantes reconhecidos por anticorpos IgE presentes nos soros de pacientes alérgicos e sensibilizados desta região.

No presente estudo, foram identificadas quatro isoformas de Blo t 3 com função de tripsina (*Tripsin-like serine protease*), mostrando diferentes pesos moleculares e valores de ponto isoelétrico: duas isoformas com ~33kDa, pI 6,18-6,43 e outras duas isoformas com 26kDa, pI 7,16-7,53. Estas diferenças entre os pesos moleculares e faixas de pI para o mesmo alérgeno sugerem que Blo t 3 seja um alérgeno que sofra modificações pós-transducionais, incluindo glicosilação, justificado pelo aumento do seu peso molecular de algumas isoformas identificadas em eletroforese 2D. Entretanto, dados da literatura mostram que alérgenos do grupo 3 (Der p 3 e Der f 3) não apresentam sítios de glicosilação (KAWAMOTO et al., 2002; THOMAS; SMITH, 1998). Assim, nossos dados sugerem que Blo t 3 possa ter estes sítios exclusivos, aumentando o número de isoformas descritas até o momento para este alérgeno. Isto pode ser reforçado pela moderada identidade (48%) encontrada, no presente estudo, entre as sequências de aminoácidos de Blo t 3, Der p 3 e Der f 3.

Sabe-se que muitos alérgenos podem apresentar sítios glicosilados, o que parece ser um importante determinante para sua alergenicidade. Agnes, Tan e Jones (1998) reportaram que alérgenos glicosilados são até cem vezes mais imunogênicos que antígenos não glicosilados. Os oligossacarídeos ligam-se covalentemente às proteínas, geralmente entre os aminoácidos asparagina e serina/treonina após a síntese protéica, podendo influenciar em várias de suas propriedades, como estabilidade, solubilidade, hidrofobicidade e até mesmo sua carga elétrica (WEBER; SCHRODER; THALBERG, 1987; PETERSEN; SCHRAMM; SCHLAAK, 1998). Entretanto, pouco se sabe sobre alérgenos glicosilados, o que reforça a necessidade de estudos verificando a influência dessas cadeias glicosiladas na apresentação a células do sistema imune e no desencadeamento da resposta alérgica. Em nosso estudo prévio, foi avaliado a resposta de anticorpos IgE a frações glicosiladas enriquecidas de manose obtidas por cromatografia de afinidade do extrato Bt em resina de Concanavalina A (ALMEIDA 2005; ALMEIDA et al., 2006). Foi observado que os componentes glicosilados de Bt reativos para IgE tinham peso molecular acima de 27kDa, sugerindo que um destes componentes possa ser o alérgeno Blo t 3.

Quatro isoformas do alérgeno Blo t 2, com peso molecular variando de 16,1-17,6 kDa e pI de 6,13-7,06, foram identificadas por espectrometria de massa. Até o presente momento, Blo t 2 não foi totalmente caracterizado em nível molecular (CHUA et al., 2007), apenas uma comunicação livre tem sido relatada, demonstrando a reatividade de anticorpos IgE para rBlo t 2 em 63,3% dos 19 soros de pacientes alérgicos (KUAY et al., 2002). A sequência de aminoácidos do alérgeno Blo t 2 revela que este alérgeno é uma proteína de peso molecular semelhante a Blo t 5 com 14 kDa. Nossos resultados de *immunoblot* 1D demonstram que a banda de 14-16 kDa é imunodominante com 83% reatividade IgE nas amostras de soro testadas, apresentando baixa reatividade cruzada com os extratos de Dp (35%) e Df (27%). Na identificação de proteínas por espectrometria de massa, inesperadamente, não foi visualizada reatividade de anticorpos IgE contra o alérgeno principal Blo t 5 em contraste com outros estudos onde há o consenso da alta alergenicidade a esta proteína (ARRUDA et al., 1997; THOMAS et al., 2002). Tendo em vista a pequena percentagem de identidade (4%) encontrada entre as sequências de aminoácidos dos alérgenos Blo t 2 e Blo t 5, nossos dados sugerem que Blo t 2, e não Blo 5, deva ser um alérgeno principal na sensibilização de pacientes em nossa região.

O alérgeno Blo t ALDH (~33kDa, pI 5,69 e 5,83) e o alérgeno Blo t HEXM (~15,5kDa, pI 5,40 a 5,83) foram identificados por espectrometria de massa por uma pequena sequência de aminoácidos. Blo t ALDH apresentou percentagem de identidade de 67% com o alérgeno Der f Alt a 10 e Blo t HEXM não apresentou homologia com nenhum alérgeno conhecido de *Dermatophagoides*. Até o presente momento, não existem relatos na literatura sobre a reatividade desses alérgenos com anticorpos IgE. Apenas a sequência protéica e a caracterização molecular foram descritas em bancos de dados de proteínas. Desta forma, mais estudos devem ser realizados visando a busca de homologias e determinação da reatividade de anticorpos IgE a estes alérgenos em soros de pacientes sensibilizados a *B. tropicalis*.

Alérgenos podem ocorrer sob a forma de múltiplos isoalérgenos, que têm peso molecular semelhantes, diferindo em suas seqüências de aminoácidos e,

consequentemente, na sua alergenidade. Este fato pode ter um impacto importante sobre o diagnóstico e imunoterapia de alergia aos ácaros da poeira domiciliar (WEGHOFER et al., 2005). Neste contexto, usando abordagem proteômica, identificou-se neste estudo, diversas isoformas de alérgenos de *B. tropicalis* em nível molecular com potencial uso para o aperfeiçoamento do diagnóstico e, emprego e/ou monitoramento da imunoterapia alérgeno-específica em pacientes com doenças alérgicas respiratórias. Novos estudos devem ser realizados para determinar o mapeamento dos epítomos e desenvolvimento de alérgenos recombinantes para avaliar a frequência de reatividade de anticorpos IgE dirigidos contra epítomos imunodominantes.

6 Conclusões

-
- a) Treze componentes polipeptídicos (14 a 134kDa) do extrato Bt foram reconhecidos por anticorpos IgE em soros de pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* por *immunoblot* 1D, dos quais componentes de baixo peso molecular (14-16 e 25kDa) e alto peso molecular (>54kDa) foram considerados imunodominantes.
 - b) Alérgenos imunodominantes de alto peso molecular (>54 kDa) do extrato de *B. tropicalis* apresentaram maior reatividade cruzada com alérgenos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae* frente a anticorpos IgE de pacientes alérgicos.
 - c) Ensaio de eletroforese bidimensional identificaram aproximadamente 50 isoformas dos componentes alergênicos de *B. tropicalis* identificados previamente por *immunoblot*.
 - d) Os alérgenos Blo t 11, Blo t 3, Blo t 2 e possivelmente Blo t ALDH e Blo t HEXM demonstraram ser alérgenos imunodominantes em pacientes sensibilizados a ácaros da poeira domiciliar de nossa região.

Referências Bibliográficas

- AALBERSE, R. C.; VAN MILLIGEN, F.; TAN, K. Y.; STAPEL, S. O. Allergen-specific IgG4 in atopic disease. **Allergy**, v. 48, p. 559-569, 1993.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6 ed., 2008. 562 p.
- AGNES, M.C.; TAN, A.; JORDENS, R. Strongly increased efficiency of altered peptide ligands by mannosilation. **International Immunology**, v. 10, p. 1299, 1998.
- AKDIS, C. A.; AKDIS, M.; BLESKEN, T.; WYMAN, D.; ALKAN, S. S.; MULLER U.; et al. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, p. 1676-83, 1996.
- AKDIS, C. A.; BLESKEN, T.; AKDIS, M.; WUTHRICH, B.; BLASER, K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, p. 98-106, 1998.
- AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 780-791, 2007.
- AKDIS, M.; VERHAGEN, J.; TAYLOR, A.; KARAMLOO, F.; KARAGIANNIDIS, C.; CRAMERI, R.; THUNBERG, S.; DENIZ, G.; VALENTA, R.; FIEBIG, H.; KEGEL, C.; DISCH, R.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, p. 1567-1575, 2004.
- ALLERGEN NOMENCLATURE. Disponível em: <<http://www.allergen.org/Allergen.aspx>>. Acesso em: 10 fev. 2010.
- ALLERGOME . Disponível em: <http://www.allergome.org/script/dettaglio.php?>. Acesso em : 10 fev. 2010.
- ALMEIDA, K. C.; SILVA, D. A. O.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Responses of IgE, IgG1, and IgG4 to concanavalin A-binding *Blomia tropicalis* antigens in allergic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 1445-1454, 2006.
- ALMEIDA, K.C. **Resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes ligantes de Concanavalina A isolados de Blomia tropicalis (Acari: Echimyopodidae) em indivíduos alérgicos e não alérgicos**. Uberlândia, 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia.
- ALVES, R.; SILVA, D. A. O.; FERNANDES, J. F.; ALMEIDA, K. C.; YNOUE, L. H.; BERNARDES, C. T.; MOREIRA, P. F.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Humoral and cellular immune responses to *Blomia tropicalis* and concanavalin A-binding fractions in atopic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 773-781, 2008.
- ANGKASEKWINAI, P.; PARK, H.; WANG, Y. H.; WANG, Y. H.; CHANG, S. H.; CORRY, D. B.; LIU, Y. J.; ZHU, Z.; DONG, C. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 1509-1517, 2007.
- ARLIAN, L. G. Arthropod allergens and human health. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 395-433, 2002.
- ARLIAN, L. G., RAPP, C. M.; AHMED, S. G. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, p. 1035-1040, 1990.

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

ARLIAN, L. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, S406–S413, 2001.

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. s406-s413, 2001. Supplement 3.

ARLIAN, L. G.; VYSZENSKI-MOBER, D.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Allergenicity of the mite *Blomia tropicalis*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 91, p.1042-1050, 1993.

Arruda LK, Vailes LD, Platts-Mills TA, Fernandez-Caldas E, Montealegre F, Lin KL, et al. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 155, p. 343-350, 1997.

ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D. A review of recent immunochemical studies of *Blomia tropicalis* and *Euroglyphus maynei* allergens. **Experimental & Applied Acarology**, v. 6, p. 129-140, 1992.

ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; FERNÁNDEZ-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.

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

ASHER, M.I.; MONTEFORT, S.; BJORKSTEN, B. ; LAI, C. K. ; STRACHAN, D. P. ; WEILAND, S. K. ET AL. ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC phases one and three repeat multicountry cross-sectional surveys. **Lancet**, v. 368, p. 733-743, 2006.

BAQUEIRO, T.; CARVALHO, F. M.; RIOS, C. F.; DOS SANTOS, N. M.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; MEDICAL STUDENT GROUP. Dust mite species and allergen concentrations in beds of individuals belonging to different urban socioeconomic groups in Brazil. **Journal of Asthma**, v. 43, p. 101-105, 2006.

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

BENNDORF, D.; MÜLLER, A.; BOCK, K.; MANUWALD, O.; HERBARTH, O.; VON BERGEN, M. Identification of spore allergens from the indoor mould *Aspergillus versicolor*. **Allergy**, v. 63, p. 454-460, 2008.

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

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

- BERNSTEIN, I. L.; STORMS, W. W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint task force on practice parameters for the diagnosis and treatment of asthma. The American College of Allergy, Asthma and Immunology. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 75, p. 543-625, 1995.
- BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. **Nature**, v. 453, p. 1051-1057, 2008.
- BOULET, L. P.; TURCOTTE, H.; LAPRISE, C.; LAVERTU, C.; BEDARD, P. M.; LAVOIE, A.; HÉBET, J. Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 27, p. 52-59, 1997.
- BOUSQUET, J.; van CAUWENBERGE P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its Impact on Asthma: Aria Workshop Report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, S147-S270, 2001.
- BRAUN-FAHRLANDER, C.; RIEDLER, J.; HERZ, U.; EDER, W.; WASER, M.; GRIZE, L.; MAISCH, S.; CARR, D.; GERLACH, F.; BUFE, A.; LAUENER, R. P.; SCHIERL, R.; RENZ, H.; NOWAK, D.; VON MUTIUS, E. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. **The New England journal of medicine**, v. 347, p. 869-877, 2002.
- BREITENEDER, H.; FERREIRA, F.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; EBNER, C.; BREITENBACH, M.; RUMPOLD, H.; KRAFT, D.; SCHEINER, O. Four recombinant isoforms of Cor a i, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 212, p. 355-362, 1993.
- CARABALLO, L.; AVJIOGLU, A.; MARRUGO, J.; PUERTA, L.; MARSH, D. Cloning and expression of complementary DNA coding for an allergen with common antibody-binding specificities with three allergens of the house dust mite *Blomia tropicalis*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 98, p. 573-579, 1996.
- CARABALLO, L.; MERCADO, D.; JIMENEZ, S.; MORENO, L.; PUERTA, L.; CHUA, K.Y. Analysis of the cross-reactivity between BtM and Der p 5, two group 5 recombinant allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 117, p. 38-45, 1998.
- CARABALLO, L.; PUERTA, L.; JIMENEZ, S.; MARTINEZ, B.; MERCADO, D.; AVJIOGLU, A.; MARSH, D. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 112, p. 341-347, 1997.
- CARABALLO, L.; PUERTA, L.; MARTINEZ, B.; MORENO, L. Identification of allergens from *Blomia tropicalis*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 24, p. 1056-1060, 1994.
- CHAPMAN, M. D.; POMÉS, A.; BREITENEDER, H.; FERREIRA, F. Nomenclature and structural biology of allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 414-420, 2007.
- CHAPMAN, M. D.; SMITH, A. M.; VAILES, L. D.; ARRUDA, K.; DHANARAJ, V.; POMÉS, A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 409-418, 2000.
- CHEONG, N.; SOON, S. C.; RAMOS, J. D.; KUO, I. C.; KOLATKAR, P. R.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blo t 1 and Der p 1. **Allergy**, v. 58, p. 912-920, 2003.

- CHEONG, N.; YANG, L.; LEE, B. W.; CHUA, K.Y. Cloning of a group 3 allergen from *Blomia tropicalis* mites. **Allergy**, v. 58, p. 352-356, 2003.
- CHEW, F. T.; ZHANG, L.; HO, T. M.; LEE, B. W. House dust mite fauna of tropical Singapore. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, p. 201-206, 1999a.
- CHEW, F. T.; LIM, S. H.; GOH, D. Y.; LEE, B. W. Sensitization to local dust-mite fauna in Singapore. **Allergy**, v. 54, p. 1150-1159., 1999b.
- CHUA, K. Y.; CHEONG, N.; KUO, I. C.; LEE, B. W.; YI, F. C.; HUANG, C. H.; et al. The *Blomia tropicalis* allergens. **Protein and Peptide Letters**, v. 14, p. 325-333, 2007.
- COCKCROFT, D. W. Mechanism of perennial allergic asthma. **Lancet**, v. 2, p. 253-256, 1983.
- COLLOFF, M. J. Taxonomy and identification of dust mites. **Allergy**, v.53, p. 7-12, 1998.
- COOKSON, W. O.; CRADDOCK, C. F.; BENSON, M. K.; DURHAM, S. R. Falls in peripheral eosinophil counts parallel the late asthmatic response. **American review of respiratory disease**, v. 139, p. 458-462, 1989.
- CORRY, D. B.; KHERADMAND, F. Induction and regulation of the IgE response. **Nature**, v. 402, p. B18-23, 1999.
- CRAMERI, R. Correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. **Biochemical Journal**, v. 376, e1-e2, 2003.
- CROMWELL, O. Biochemistry of allergens. In: KAY, A.B. **Allergy and allergic diseases**, Oxford: Blackwell Science Ltd., v.2, p. 797-810, 1997.
- DE BOER, R. Reflections on the control of mites and mite allergens. **Allergy**, v. 53, p. 41-46, 1998.
- DE CANIO, M.; D'AGUANNO, S.; SACCHETTI, C.; PETRUCCI, F.; CAVAGNI, G.; NUCCETELLI M.; FEDERICI, G. Novel IgE Recognized Components of Lolium perenne Pollen Extract: Comparative Proteomics Evaluation of Allergic Patients Sensitization Profiles. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 4383-4391, 2009.
- DE JONG, N. W.; GROENEWOUD, G. C.; VAN REE, R.; VAN LEEUWEN, A.; VERMEULEN, A. M.; VAN TOORENENBERGEN, A. W.; DE GROOT, H.; VAN WIJK, R. G. Immunoblot and radioallergosorbent test inhibition studies of allergenic cross-reactivity of the predatory mite *Amblyseius cucumeris* with the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 93, p. 281-287, Sep. 2004.
- DREBORG, S. Skin tests used in type I allergy testing – Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. **Allergy** v. 44, p. 1-59, 1989.
- DYKEWICZ, M. S.; FINEMAN, S. Executive Summary of Joint Task Force Practice Parameters on Diagnosis and Management of Rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 81, p. 463-468, 1998.
- FERNANDEZ-CALDAS, E.; PUERTA, L.; MERCADO, D.; LOCKEY, R. F.; CARABALLO, L. R. Sensitization to *Chortoglyphus arcuatus* and *Aleuroglyphus ovatus* in *Dermatophagoides* spp. allergic individuals. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 23, p. 292-297, 1993.

FERNANDEZ-CALDAS, E.; PUERTAS, L.; MERCADO, D.; LOCKEY, R.; CARABALLO, L. Mite fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergen levels in a tropical environment. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 23, p. 292-297, 1993a.

FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAENA-CAGNANI, C. E.; LOPEZ, M.; PATINO, C.; NEFFEN, H. E.; SANCHEZ-MEDINA, M.; CARABALLO, L. R.; HUERTA LÓPEZ, J.; MALKAL, S.; NASPITZ, C. K.; et al. Cutaneous sensitivity to six mite species in asthmatic patients from five Latin American countries. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 3, p. 245-249, 1993b.

FERREIRA, F.; WALLNER, M.; THALHAMER, J. Customized antigens for desensitizing allergic patients. **Advances in Immunology**, v. 84, p. 79-129, 2004.

FLORES, I.; MORA, C.; RIVERA, E.; DONNELLY, R.; MONTEALEGRE, F. Cloning and molecular characterization of a cDNA from *Blomia tropicalis* homologous to dust mite group 3 allergens (trypsin-like proteases). **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 130, p. 12-16, 2003.

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

FONSECA, L.; DIAZ, A.M. IgE reactivity from serum of *Blomia tropicalis* allergic patients to the recombinant protein Blo t 1. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 22, p. 353-357, 2003.

FORT, M. M.; CHEUNG, J.; YEN, D.; LI, J.; ZURAWSKI, S. M.; LO, S.; MENON, S.; CLIFFORD, T.; HUNTE, B.; LESLEY, R.; MUCHAMUEL, T.; HURST, S. D.; ZURAWSKI, G.; LEACH, M. W.; GORMAN, D. M.; RENNICK, D. M. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. **Immunity**, v. 15, p. 985-995, 2001.

FOTOS *Blomia tropicalis*. Disponível em : < <http://www.sub-way.es/duovac/images/acaro1.jpg> > e < http://www.immunocapinvitrosight.com/upload/33830/Blomia_tropicalis.jpg>. Acesso em 01 fev. 2010.

GAGA, M.; FREW, A. J.; VARNEY, V. A.; KAY, A. B. Eosinophil activation and T lymphocyte infiltration in allergen-induced late phase skin reactions and classical delayed-type hypersensitivity. **Journal of Immunology**, v. 147, p. 816-822, 1991.

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

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

GARN, H.; RENZ, H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. **Immunobiology**, v. 212, p. 441-452, 2007.

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

GELLER, M.; ESCH, R. E.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Sensibilização acarina na atopia respiratória do Rio de Janeiro - considerações preliminares. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, v. 153, p.174-175, 1993.

GILFILLAN, A. M.; TKACZYK, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 218-230, 2006.

- GOULD, H. J.; SUTTON, B. J.; BEAVIL, A. J.; BEAVIL, R. L.; MCCLOSKEY, N.; COKER, H. A.; FEAR, D.; SMURTHWAITE, L. The biology of IgE and the basis of allergic disease. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 579-628, 2003.
- HALLAS, T. E. The biology of mites. **Allergy**, v. 46, p. s6-s9, 1991.
- HAMMARSTRÖM, L.; SMITH, C. I. E. Immunoglobulin subclass distribution of specific antibodies in allergic patients. **Allergy**, v. 42, p. 529-534, 1987.
- HART, B. J. Life cycle and reproduction of house-dust mites: environmental factors influencing mite populations. **Allergy**, v. 53, p. s13-s17, 1998.
- HESELMAR, B.; ABERG, B.; ERIKSSON, B.; BJORKSTÉN, B.; ABERG, N. Building characteristics affect the risk of allergy development. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 16, p. 126-131, 2005.
- HIGGINS, J. A.; THORPE, C. J.; HAYBALL, J. D.; O'HEHIR, R. E.; LAMB, J. R. Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of *Dermatophagoides* species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 93, p. 891-899, 1994.
- HOLGATE, S.T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 218-230, 2008.
- HU, C.; HSU, P. N.; LIN, R. H.; HSIEH, K. H.; CHUA, K. Y. HLA DPB1*0201 allele is negatively associated with immunoglobulin E responsiveness specific for house dust mite allergens in Taiwan. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 538-545, 2000.
- HUBY, R. D. J.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Why are some proteins allergens? **Toxicological Sciences**, v. 55, p. 235- 246, 2000.
- 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**, Baltimore , v. 169, p. 443-453, 2002.
- IKEDA, K.; NAKAJIMA, H.; SUZUKI, K.; KAGAMI, S.; HIROSE, K.; SUTO, A.; SAITO, Y.; IWAMOTO, I. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. **Blood**, v. 101, p. 3594-3596, 2003.
- ILIOPOULOS, O.; BAROODY, F. M.; NACLERIO, R. M.; BOCHNER, B. S.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L. M. Histamine-containing cells obtained from the nose hours after antigen challenge have functional and phenotypic characteristics of basophils. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 2223-2228, 1992.
- IRANI, A. M.; HUANG, C.; XIA, H. Z.; KEPLEY, C.; NAFIE, A.; FOUDA, E. D.; CRAIG, S.; ZWEIMAN, B.; SCHWARTZ, L. B. Immunohistochemical detection of human basophils in late-phase skin reactions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, p. 354-362, 1998.
- 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.

- ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. Physicochemical properties of reaginic antibody. 1. association of reaginic activity with an immunoglobulin other than gammaA- or gammaG- globulin. **Journal of Allergy**, v. 37, p. 169-185, 1966.
- IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J. J.; CUA, D. J.; LITTMAN, D. R. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, v. 126, p. 1121-1133, 2006.
- JEANNIN, P.; LECOANET, S.; DELNESTE, Y.; GAUCHAT, J. F.; BONNEFOY, J. Y. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 3555-3561, 1998.
- JEFFERY, P. K.; HAAHTELA, T. Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one airway condition. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 6, p. S5, 2006.
- 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.
- JOHANSSON, S. G.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S.; LANIER, B. Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; ORTEGA MARTELL, J. A.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; RING, J.; THIEN, F.; VAN CAUWENBERGE, P.; WILLIAMS, H. C. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, p. 832-836, 2004.
- JOOST VAN NEERVEN, R.; VAN T'HOF, W.; RINGROSE, J. H.; JANSEN, H. M.; AALBERSE, R. C.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. T cell epitopes of house dust mite major allergen Der p II. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 2326-2335, 1993.
- 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.
- JUTEL, M.; JAEGER, L.; SUCK, R.; MEYER, H.; FIEBIG, H.; CROMWELL, O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, p. 608-613, 2005.
- KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1589, p. 1-13, 2002.
- KALESNIKOFF, J.; GALLI, S. J. New developments in mast cell biology. **Nature Immunology**, v. 9, p. 1215-1223, 2008.
- KARAMLOO, F.; SCHMID-GRENDELMEIER, P.; KUSSEBI, F.; AKDIS, M.; SALAGIANNI, M.; VON BEUST, B. R.; REIMERS, A.; ZUMKEHR, J.; SOLDATOVA, L.; HOUSLEY-MARKOVIC, Z.; MÜLLER, U.; KÜNDIG, T.; KEMENY, D. M.; SPANGFORT, M. D.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Prevention of allergy by a recombinant multi-allergen vaccine with reduced IgE binding and preserved T cell epitopes. **European Journal of Immunology**, v. 35, p. 3268-3276, 2005.

- KAWAMOTO, S.; AKI, T.; YAMASHITA, M.; TATEGAKI, A.; FUJIMURA, T.; TSUBOI, S.; KATSUTANI, T.; SUZUKI, O.; SHIGETA, S.; MUROOKA, Y.; ONO, K. Toward elucidation of the full spectrum of mite allergens – state of the art. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 285-298, 2002.
- KAY, A. B.; BARATA, L.; MENG, Q.; DURHAM, S. R.; YING, S. Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 113, p. 196-199, 1997.
- KIM, M. R.; MANOUKIAN, R.; YEH, R.; SILBIGER, S. M.; DANILENKO, D. M.; SCULLY, S.; SUN, J.; DEROSE, M. L.; STOLINA, M.; CHANG, D.; VAN, G. Y.; CLARKIN, K.; NGUYEN, H. Q.; YU, Y. B.; JING, S.; SENALDI, G.; ELLIOTT, G.; MEDLOCK, E. S. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. **Blood**, v. 100, p. 2330-2340, 2002a.
- KIM, Y. K.; OH, S. Y.; OH, H. B.; LEE, B. J.; SON, J. W.; CHO, S. H.; KIM, Y. Y.; MIN, K. U. Positive association between HLA-DRB1*07 and specific IgE responses to purified major allergens of *D. pteronyssinus* (Der p 1 and Der p 2). **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 88, p. 170-174, 2002b.
- KINET, J. P. The high-affinity IgE receptor (Fc ϵ 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. 50, p. 765-774, 1995.
- KING, T. P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. R. Allergen nomenclature. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 105, p. 224-233, 1994.
- KOLLS, J. K.; KANALY, S. T.; RAMSAY, A. J. Interleukin-17: an emerging role in lung inflammation. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 28, p. 9-11, 2003.
- KUAY, K.; WANG, W.; SHANG, H.; LIM, S.; LEE, B.; CHEW, F. Molecular cloning and characterization of group 1 and 2 allergens from dust mite, *Blomia tropicalis*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, p. S162-S163, 2002.
- KUO, I. C.; CHEONG, N.; TRAKULTIVAKORN, M.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. An extensive study of human IgE cross-reactivity of Blo t 5 and Der p 5. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 603-609, 2003.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LARSEN, J. N.; LOWERSTEIN, H. Allergen nomenclature. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, p. 577-718, 1996.
- LAVER, W. G.; AIR, G. M.; WEBSTER, R. G.; SMITH-GILL, S. J. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. **Cell**, v. 61, p. 553-556, 1990.
- LEMANSKE-JUNIOR, R. F.; BUSSE, W. W. Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. s502-519, 2003.

- LIM, L. H.; LI, H. Y.; CHEONG, N.; LEE, B. W.; CHUA, K.Y. High-level expression of a codon optimized recombinant dust mite allergen, Blo t 5, in Chinese hamster ovary cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 316, p. 991-996, 2004.
- LINDÉN, A.; LAAN, M.; ANDERSON, G. P. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. **European Respiratory Journal**, v. 25, p. 159-172, 2005.
- LING, E. M.; SMITH, T.; NGUYEN, X. D.; PRIDGEON, C.; DALLMAN, M.; ARBERY, J.; CARR, V. A.; ROBINSON, D. S. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. **Lancet**, v. 363, p. 608-615, 2004.
- LINNEBERG, A.; HENRIK NIELSEN, N.; FROLUND, L.; MADSEN, F.; DIRKSEN, A.; JORGENSEN, T. The link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population-based study.: The Copenhagen Allergy Study. **Allergy**, v. 57, p. 1048-1052, 2002.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUCZYNSKA, C. M.; ARRUDA, L. K.; PLATTS-MILLIS T. A. E.; MILLER, J. D.; LOPEZ, M.; CHAPMAN, M. D. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, Der p I and Der f I. **Journal Immunological Methods**, v. 118, p. 278-235, 1989.
- LUENGO, O.; MOLLÁ, R.; GÁMEZ, C.; CARDONA, V.; LÓPEZ, E.; SASTRE, B.; WAISE, Y.; BELMONTE, J.; CADAHIA, Á.; LAHOZ, C.; DEL POZO, V. Allergenicity and cross-reactivity of *Senecio* pollen: identification of novel allergens using the immunoproteomics approach. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, p. 1048-1060, 2008.
- MAO, L. 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, n. 4, p. 631-636, 1998.
- MARIANA, A.; HO, T. M.; SOFIAN-AZIRUN, M.; WONG, A. L. House dust mite fauna in the Klang Valley, Malaysia. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 31, p. 712-721, 2000.
- 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.
- MARSH, D. G.; NEELY, J. D., BREAZEALE, D.R, GHOSH, B., FREIDHOFF, L. R., EHRLICH-KAUTZKY, E., et al. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. **Science**, v. 264, p. 1152-1156, 1994.
- MARSHALL, J. S. Mast-cell responses to pathogens. **Nature Reviews. Immunology**, v. 4, p. 787-799, 2004.
- MARUYAMA, N.; TAMURA, G.; AIZAWA, T.; OHRUI, T.; SHIMURA, S.; SHIRATO, K.; TAKISHIMA, T. Accumulation of basophils and their chemotactic activity in the airways during natural airway narrowing in asthmatic individuals. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 150, p. 1086-1093, 1994.
- MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, v. 59, p. 469-478, 2004.

- MASTRANDREA, F.; SERIO, G.; MINARDI, A.; CORADDUZZA, G.; ROSSI, N.; SCARCIA, G.; MAIETTA, G.; IACOBELLI, A.; LAMANNA, C.; TURSI, A. IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy. **Allergy**, v. 52, p. 1115-1119, 1997.
- MATSUOKA, T.; KOHROGI, H.; ANDO, M.; NISHIMURA, Y.; MATSUSHITA, S. *Dermatophagoides farinae*-1-derived peptides and HLA molecules recognized by T cells from atopic individuals. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 112, p. 365-370, 1997.
- MEDEIROS, M. JR.; TAKETOMI, E.A.; SILVA, D. A. O.; TERRA, A. S.; FIGUEIREDO, J. P.; ALMEIDA, M. C.; AMORIM, W. W.; PINHO, R. S.; ARAÚJO, M. I.; CARVALHO, E. M. Association between mite allergen (Der p I, Der f I, Blo t 5) levels and microscopic identification on skin prick test among asthmatic subjects. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 129, p. 237-41, 2002.
- MEILER, F.; KLUNKER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. **Allergy**, v. 63, p. 1455-1463, 2008.
- MEYER, P.; CO MINH, H. B.; DEMOLY, P. Nomenclature révisée des termes d'allergologie. **Archives de pédiatrie**, v. 11, p. 1131-1134, 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.
- MOFFATT, M. F.; SCHOU, C.; FAUX, J. A.; ABECASIS, G. R.; JAMES, A.; MUSK, A. W.; COOKSON, W. O. Association between quantitative traits underlying asthma and the HLA-DRB1 locus in a family-based population sample. **European Journal of Human Genetics**, v. 9, p. 341-346, 2001.
- MONTEALEGRE, F.; QUIÑONES, C.; TORRES, N.; GOTH, K. Detection of serine proteases in extracts of the domestic mite *Blomia tropicalis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 24, p. 87-100, 2002.
- MORA, C.; FLORES, I.; MONTEALEGRE, F.; DÍAZ, A. Cloning and expression of Blo t 1, a novel allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*, homologous to cysteine proteases. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 28-34, 2003.
- NANDAKUMAR, S.; MILLER, C. W.; KUMARAGURU, U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 7, p. 5, 2009.
- NATHAN, A. T.; PETERSON, E. A.; CHAKIR, J.; WILLS-KARP, M. Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, p. 612-618, 2009.
- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectricfocusing gels with clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.
- NOON, L. Prophylactic inoculation against hayfever. **Lancet**, v. 1, p. 1572-1573, 1911.
- NORMAN, P.S.; Allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 75, p. 531-542, 1985.
- NOURI-ARIA, K. T; IRANI, A. M.; JACOBSON, M. R.; O'BRIEN, F.; VARGA, E. M.; TILL, S. J.; DURHAM, S. R.; SCHWARTZ, L. B. Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen-induced late asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, p. 205-211, 2001.

- O'BRIEN, R. M.; TAIT, B. D.; VARNEY, M. D.; THOMAS, W. R. HLA-DPB1 alleles in house dust mite allergic patients. **European Journal of Human Genetics**, v. 26, p. 281-284, 1999.
- O'BRIEN, R. M.; THOMAS, W. R.; NICHOLSON, I.; LAMB, J. R.; TAIT, B. D. An immunogenetic analysis of the T-cell recognition of the major house dust mite allergen Der p 2: identification of high- and low-responder HLA-DQ alleles and localization of T-cell epitopes. **Immunology**, v. 86, p. 176-182, 1995.
- OBER, C.; HOFFJAN, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. **Genes and immunity**, v. 7, p. 95-100, 2006.
- ONO, S. J. Molecular genetics of allergic diseases. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 347-366, 2000.
- OWNBY, D. R. Allergy testing: in vitro versus in vivo. **Pediatric Clinics of North America**, v. 35, p. 995-1009, 1988.
- PEREIRA, E. A. L.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ALMEIDA, K. C.; ALVES, R.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy**, v. 60, p. 401-406, 2005.
- PERFETTI, L.; FERRARI, M.; GALDI, E.; POZZI, V.; COTTICA, D.; GRIGNANI, E.; MINOIA, C.; MOSCATO, G. House dust mites (Der p 1, Der f 1), cat (Fel d 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in indoor work-places (offices and archives). **Science of the Total Environment**, v. 328, p. 15-21, 2004.
- PETERSEN, A.; SCHRAMM, G.; SCHLAAK, M. Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 28, p. 315-321, 1998.
- PIBOONPOCANUN, S.; MALINUAL, N.; JIRAPONGSANANURUK, J.; VICHYANOND, P.; THOMAS, W. R. Genetic polymorphisms of major house dust mite allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 510-516, 2006.
- PIKE, A. J.; CUNNINGHAM, M. J.; LESTER, P. J. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) at constant and simultaneously fluctuating temperature and humidity conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 266-269, 2005.
- PIPKORN, U.; HAMMARLUND, A.; ENERBACK, L. Prolonged treatment with topical corticosteroids results in an inhibition of the allergen-induced wheal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 19, p. 19-25, 1989.
- PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; VERVLOET, D.; CHAPMAN, M. D. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 89, p. 1046-1060, 1992.
- PLATTS-MILLS, T. A. E.; VAUGHAN, J.; SQUILLACE, S.; WOODFOLK, J.; SPORIK, R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. **Lancet**, v. 357, p. 752-756, 2001a.
- PLATTS-MILLS, T. A. E.; VAUGHAN, J. W.; BLUMENTHAL, K.; POLLART SQUILLACE, S.; SPORIK, R. B. Serum IgG and IgG4 antibodies to Fel d 1 among children exposed to 20 microg Fel d 1 at home: relevance of a nonallergic modified Th2 response. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 124, p. 126-129, 2001b.

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

PLATTSMILLS, 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.

PLATTSMILLS, 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.

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

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

RAMOS, J. D. A.; CHEONG, N.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. Peptide mapping of immunoglobulin E and immunoglobulin G immunodominant epitopes of an allergenic *Blomia tropicalis* paramyosin, Blo t 11. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 511-517, 2003.

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

RAMOS, J. D., CHEONG, N., LEE, B. W.; CHUA, K. Y. Peptide mapping of immunoglobulin E and immunoglobulin G immunodominant epitopes of an allergenic *Blomia tropicalis* paramyosin, Blo t 11. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 511-517.

RAMOS, J. D.; CHEONG, N.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. cDNA cloning and expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 126, p. 286-293, 2001.

RAMOS, J. D.; CHEONG, N.; TEO, A. S.; KUO, I. C.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. Production of monoclonal antibodies for immunoaffinity purification and quantitation of Blo t 1 allergen in mite and dust extracts. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, p. 604-610, 2004.

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

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

RIZZO, M. C.; ARRUDA, L.K.; CHAPMAN, M.D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTSMILLS, T.A.E.; NASPITZ, C.K. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. **Annals of Allergy**, Mc Lean, v. 71, n. 2, p. 152-158, 1993.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D.; ROTH, D. **Immunology**. 7.ed., Baltimore: Mosby, 2006. 544 p.

ROLLAND, J. M.; DOUGLASS, J.; O'HEHIR, R. E. Allergen immunotherapy: current and new therapeutic strategies. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 3, p. 515-527, 2000.

- ROSSI, R. E.; MONASTEROLO, G.; COCO, G.; SILVESTRO, L.; OPERTI, D. Evaluation of serum IgG4 antibodies specific to grass pollen allergen components in the follow up of allergic patients undergoing subcutaneous and sublingual immunotherapy. **Vaccine**, v. 25, p. 957-964, 2007.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Invertebrate Zoology**. 7. ed. Oxford: Brooks Cole. 2004, 1008 p.
- SAINI, S. S.; MCGLASHAN, D. How the IgE upregulates allergic response. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 694-697, 2002.
- SALLUSTO, F.; QUINTIERI, F.; PUGLIESE, O.; REALE, G.; PINI, C.; DIFELICE, G. T-cell and antibody response to *Parietaria judaica* allergenic fractions in atopic and nonatopic individuals. **Allergy**, v. 48, p. 37-44, 1993.
- SAMPSON, A. P. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 22-27, 2000.
- SARINHO, E.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; JUST, E.; SOLÉ, D. Ácaros da poeira domiciliar em residências de crianças asmáticas e controles da cidade do Recife – Pernambuco. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.19, p. 228-230, 1996.
- SAVOLAINEN, J.; VIANDER, M.; KOIVIKKO, A. IgE-, IgA- and IgG-antibody responses to carbohydrate and protein antigens of *Candida albicans* in asthmatic children. **Allergy**, v. 45, p. 54-63, 1990.
- SCHARENBERG AM, LIN S, CUENOD B, YAMAMURA H, KINET JP. Reconstitution of interactions between tyrosine kinases and the high affinity IgE receptor which are controlled by receptor clustering. **The EMBO Journal**, v. 14, p. 3385-3394, 1995.
- SCHEI, M. A., HESSEN, J. O., LUND, E. House-dust mites and mattresses. **Allergy**, v. 57, p. 538-542, 2002.
- SELA, M. Antigenicity: some molecular aspects. **Science**, v. 166, p. 1365-1374, 1969.
- SELTZER, J. Biological contaminants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.94, p.318-326, 1994.
- SHEVCHENKO A, JENSEN ON, PODTELEJNIKOV AV, SAGLIOCCO F, WILM M, VORM O, MORTENSEN P, SHEVCHENKO A, BOUCHERIE H, MANN M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 14440-14445, 1996.
- SILVA, D. A. O.; GERVÁSIO, A. M.; SOPELETE, M. C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; SUNG-SANG, J. S.; TAKETOMI, E. A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 86, p. 545-550, 2001.
- SIMONS, E. (Ed): *Ancestors of Allergy*. New York: New York Global Medical Communications Ltd.; 1994.
- SLOTT, R. I.; ZWEIMAN, B. A Controlled study of the effect of corticosteroids on immediate skin test reactivity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 54, p. 229-235, 1974.

SLY, R. M. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 82, p. 233-248, 1999.

SLY, R. M.; New guidelines for diagnosis and management of asthma. **Annals of Allergy**, v. 78, p. 427-437, 1997.

SMITH, A. S.; 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 Clinical Immunology**, v. 107, p. 977-984, 2001a.

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 Clinical Immunology**, v. 107, p. 985-992, 2001b.

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

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

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

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **British Medical Journal**, v. 299, p. 1259-1260, 1989.

THOMAS WR, SMITH WA, HALES BJ, MILLS KL, O'SBRIEN RM. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 129, p. 182-202, 1979.

THOMAS, W. R.; HEINRICH, T. K.; SMITH, W. A.; HALES, B. J. Pyroglyphid house dust mite allergens. **Protein and Peptide Letters**, v. 14, p. 943-953, 2007.

THOMAS, W. R.; SMITH, W. A.; HALES, B. J.; 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.

THOMAS, W. R.; SMITH, W. House-dust-mite allergens. **Allergy**, v. 53, p. 821-832, 1998.

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

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

- TOWBIN, H.; STSEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- TRAIDL-HOFFMANN, C.; JAKOB, T.; BEHRENDT, H. Determinants of allergenicity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, p. 558-566, 2009.
- TSAL, J.J., YI, F.C., CHUA, K.Y., LIU, Y.H., LEE, B.W.; CHEONG, N. Identification of the major allergenic components in *Blomia tropicalis* and the relevance of the specific IgE in asthmatic patients. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 91, p. 485-489, 2003.
- TSAL, J.-J.; WU, H. H.; SHEN, H.-D.; HSU, E.-L.; WANG, S.-R.; Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 115, p. 144-149, 1998.
- TSICOPOULOS, A.; HAMID, Q.; HACZKU, A.; JACOBSON, M. R.; DURHAM, S. R.; NORTH, J.; BARKANS, J.; CORRIGAN, C. J.; MENG, Q.; MOQBEL, R.; KAY, A. B. Kinetics of cell infiltration and cytokine messenger RNA expression after intradermal challenge with allergen and tuberculin in the same atopic individuals. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 94, p. 764-772, 1994.
- TSITOURA, D. C.; VERHOEF, A.; GELDER, C. M.; O'HEHIR, R. E.; LAMB, J. R. Altered T cell ligands derived from a major house dust mite allergen enhance IFN-gamma but not IL-4 production by human CD4+ T cells. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 2160-2165, 1996.
- TURKELTAPUCB, G.; ERGENP, J. The risk of adverse reactions from percutaneous prick-puncture allergen skin testing, venepuncture, and body measurements: data from the Second National Health and Nutrition Examination Survey 1976-80 (NHANES 11). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 84, p. 886-901, 1989.
- TURNER, H.; KINET, J. P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. **Nature**, v. 402, Supplement 6760, p. 24-30, 1999.
- VAN BRONSWIJK, J. E. M. H.; DE COCK, A. W. A. M.; OSHIMA, S. The genus *Blomia Oudemans* (Acari: Glycyphagidae). I. Description of *Blomia tropicalis* sp. from house dust in tropical and subtropical regions. **Acarologia**, v. 15, p. 477-489, 1973.
- WALLACE, D. V., DYKEWICZ, M. S. The diagnosis and management of rhinitis: An updated practice parameter. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, p. S1-S84, 2008.
- WANG, Y. H.; ANGKASEKWINAL, P.; LU, N.; VOO, K. S.; ARIMA, K.; HANABUCHI, S.; HIPPE, A.; CORRIGAN, C. J.; DONG, C.; HOMEY, B.; YAO, Z.; YING, S.; HUSTON, D. P.; LIU, Y.J. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 1837-1847, 2007.
- WANG, Y. H.; LIU, Y. J. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 6, p. 697-702, 2008.
- WEBER, A.; SCHRODER, H.; THALBERG, K. Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. **Allergy**, v. 42, p. 464, 1987.
- WEGHOFFER, M.; THOMAS, W. R.; PITTNER, G.; HORAKZ, F.; VALENTA, R.; VRTALA, S. Comparison of purified *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens and extract by two-dimensional immunoblotting and quantitative immunoglobulin E inhibitions. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, p. 1384-1391, 2005.

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. 1000-1166, 2008.

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

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

YANG, L.; CHEONG, N.; WANG, D.Y.; LEE, B.W.; KUO, I.C.; HUANG, C.H. AND CHUA, K.Y. Generation of monoclonal antibodies against Blo t 3 using DNA immunization with in vivo electroporation. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 663-668, 2003.

YEOH, S.M.; KUO, I.C.; WANG, D.Y.; LIAM, C.K.; SAM, C.K.; DE BRUYNE, J.A.; LEE, B.W.; CHEONG, N. AND CHUA, K.Y. Sensitization profiles of Malaysian and Singaporean subjects to allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis*. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 132, p. 215-220, 2003.

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

YI, F.C.; CHUA, K.Y.; CHEONG, N.; SHEK, L.P. AND LEE, B.W. Immunoglobulin E reactivity of native Blo t 5, a major allergen of *Blomia tropicalis*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, p. 1762-1767, 2004.

YING, S.; BARATA, L. T.; MENG, Q.; GRANT, J. A.; BARKANS, J.; DURHAM, S. R.; KAY, A. B. High-affinity immunoglobulin E receptor (Fc epsilon RI)-bearing eosinophils, mast cells, macrophages and Langerhans' cells in allergen-induced late phase cutaneous reactions in atopic subjects. **Immunology**, v. 93, p. 281-288, 1998.

YSSEL, H.; JOHNSON, K. E.; SCHNEIDER, P. V.; WIDEMAN, J.; TERR, A.; KASTELEIN, R.; DE VRIES, J. E. T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-specific CD4+ T cell clones. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 738-745, 1992.

Anexos

Anexo A



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.

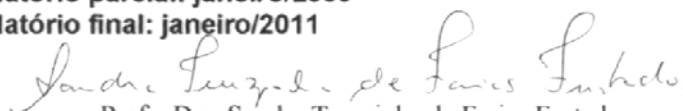
b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

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.


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 B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Nesta pesquisa, estamos buscando entender o perfil de anticorpos frente à diversas frações de proteínas de 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.

Serão coletados 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 pelo 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.: (34)3218-2398 / Telefax: (34) 3218-2333

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

Uberlândia, ____ de ____ de ____.

Assinatura

Anexo C



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
Av. Pará, 1720 – Campus Umuarama – Bloco 4C – CEP 38400-902 – Uberlândia – MG
Telefone: (34) 3218-2195 – Fax: (34) 3218-2333

Nome: _____ Prontuário HC-UFU: _____
Data do questionário: ____ / ____ / ____
Idade: _____ Data de nascimento: ____ / ____ / ____
Sexo: () masculino () feminino
Grau de escolaridade: () Ensino fundamental () Ensino Médio
() Ensino Superior e/ou pós-graduação

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 frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?
Nunca acordou com chiado ()
Menos de uma noite por semana ()
Uma ou mais noites por semana ()
- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?
() Sim () Não
- 6) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?
() Sim () Não
- 7) Nos 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

Anexo D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica

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

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

Teste Cutâneo de Puntura

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

*Valores de referência:

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

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

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Responsável técnico