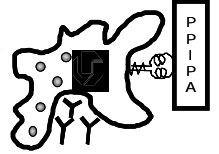




UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas



**“Reatividade de IgE específica a
Dermatophagoides pteronyssinus (Acari:
Pyroglyphidae) e suas frações ligantes de
Concanavalina A no soro de pacientes com
alergia respiratória”**

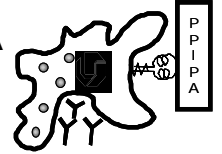
Dissertação apresentada ao Colegiado
do Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre

Rafael de Oliveira Resende

Uberlândia
2006



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



**“Reatividade de IgE específica a
Dermatophagoides pteronyssinus (Acari:
Pyroglyphidae) e suas frações ligantes de
Concanavalina A no soro de pacientes com
alergia respiratória”**

Dissertação apresentada ao Colegiado
do Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre.

Rafael de Oliveira Resende

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Co-orientadora: Profa. Dra. Margareth Leitão Gennari Cardoso

**Uberlândia
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

R433r Resende, Rafael de Oliveira, 1980-
“Reatividade de IgE específica a Dermatophagoides pteronyssinus
(Acari: Pyroglyphidae) e suas frações ligantes de Concanavalina A no
soro de pacientes com alergia respiratória / Rafael de Oliveira Resende. -
Uberlândia, 2006.
79f. : il.
Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
ma de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Alergia - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Universidade Fede-
ral de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasi-
tologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616-056.3

A TODOS os meus mestres, que
gradativamente me apresentaram o
que há de mais esplêndido no
campo intelectual...a CIÊNCIA

"Que cada um considere a si mesmo, não como um homem procurando satisfazer sua própria sede de conhecimento, mas como um mero colaborador em uma grande obra comum"

Hermann von Helmholtz¹

¹ *Hermann von Helmholtz* (1821-1894) era físico e fisiologista. Foi o autor da Lei da Conservação de Energia, dos conceitos de "Energia livre" e "Linhas de vórtice", além de inventor do oftalmômetro.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, pelos nobres ensinamentos e pela confiança depositada em meu trabalho;

À Profa. Dra. Margareth Leitão Gennari Cardoso, pelo compartilhamento de sua ilustre experiência durante as orientações;

À Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, que com uma dose de “maternidade científica” me acolheu durante toda a elaboração e execução deste estudo;

À Profa. Dra. Mônica Camargo Sopelete, pelos ensinamentos e pelo apoio incondicional que possibilitaram a finalização deste trabalho;

À Profa. Dra. Júlia Maria Costa Cruz e ao Prof. Dr. Nelson Figueiredo Mendes, pela composição da banca examinadora e, conseqüentemente, pela estimável contribuição na concretização deste trabalho;

Aos “Amigos da Alergia”: Ronaldo Alves, Priscila Ferreira, Karine Almeida, Sheila Marra, Caroline Morais, Cristiane Teixeira, Gesmar Rodrigues, Jorge Carísio, Meimei Queirós, Núbia Araújo, Fabiana Parreira e Juliana Miranda, pelo espírito de companheirismo e prestimosidade que nos tornou cada vez mais unidos;

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia: Fernando Reis, Janaina Lobato, Ana Cláudia Pajuaba, Samantha Bela, Gabriele Faria, Karine Rezende, Áurea Welter, Carolina Salomão, Cristina Rostkowska, Taísa Carrijo, Patrícia Soares, Belisa Barbosa e Celene Alves, pelos momentos de alegria;

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação: Idessânia Costa, Rosângela Rodrigues, Cristiane Brito, Lizandra Borges, Lourenço Faria, Jean Limongi, Camila Siqueira, Cecília Oliveira, Eneida Mastrantônio, Fernando Vinhal, Heliana Batista, Flávio Hercos, Cinara Knychala e Márcio Barros, pela harmoniosa convivência;

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia: Max Aor Marques, Maria Andréia Pereira Rodrigues e Antônio Thomaz de Oliveira Júnior, pelo auxílio proporcionado nos detalhes que, indubitavelmente, fizeram diferença;

Aos secretários do Programa de Pós-graduação: João Martins Neto e Lucileide Freitas Queiroz, pelo carisma e pela prestabilidade;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação: Dra. Janethe D.O.Pena, Dr. José Roberto Mineo, Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro, Dra. Maria Aparecida de Souza, Dr. Júlio Mendes, Dra. Márcia Cristina Cury, que fizeram com que meu encanto pela Imunologia e pela Parasitologia se esplandecesse;

Às professoras da ESEBA-UFU: Ms. Hosana Salette Curtt Silva, Ms. Selma Gonzaga Silva, Dra. Delma Faria Shimamoto, Ms. Maria das Graças Monte e Ms. Greice Ayra Franco Assis, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo apoio afetivo;

Aos pacientes alérgicos atendidos no HC-UFU que, com um insólito gesto de voluntarismo, doaram o material biológico necessário para a execução deste estudo;

A todos os funcionários do Ambulatório de Alergia do HC-UFU, pelo auxílio na etapa primordial neste estudo;

Aos professores Federico Montealegre, da Escola Médica de Ponce, Porto Rico, pela gentileza na doação dos ácaros em meio de cultura e Sun-Sang Joseph Sung, da Universidade de Virgínia, EUA, pela doação da resina de ConA-Sepharose e do eluente metil- α -D-manopiranosídeo;

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Spíndola, pela permissão para a utilização de seus equipamentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

E à todos que porventura não mencionei e tiveram uma colaboração, direta ou indireta, na elaboração e execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Carlos Humberto e Maria das Graças, e meus irmãos, Cícero e Juliano, pelo exemplo de trabalho e de idealismo;

À minha adorada avó Odete (in memoriam), pelo exemplo de luta e perseverança no curso de sua missão;

À minha noiva Paula, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo seu amor fortalecente;

Ao meu eterno amigo Leandro, pela solicitude e pela imensurável ajuda concedida durante todas as etapas deste estudo;

A DEUS, pela oportunidade de concretização deste sonho.

CONTEÚDO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Alergia	2
1.1.1. Conceito e manifestações clínicas	2
1.1.2. Fatores ambientais	3
1.2. Alérgenos	4
1.3. O sistema imune e a resposta alérgica	5
1.3.1. Imunoglobulina E (IgE)	5
1.3.2. Fisiopatologia da alergia	7
1.4. Ácaros da poeira domiciliar	8
1.4.1. Ecologia e morfofisiologia	8
1.4.2. <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	10
1.4.2.1. Características gerais	10
1.4.2.2. Alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i>	12
1.5. Gliconjugados na alergia	14
1.6. Lectinas	15
1.6.1. Características gerais	15
1.6.2. Concanavalina A (ConA)	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Procedimentos éticos	22
3.2. Local do estudo	22
3.3. Preparação do extrato antigênico	23
3.3.1. Extrato bruto de <i>D. pteronyssinus</i>	23
3.3.2. Extratos antigênicos de ácaros para teste cutâneo de puntura (TCP)	24
3.4. Cromatografia de afinidade	25
3.4.1. Preparação da coluna	25
3.4.2. Fracionamento do extrato Dp bruto	26
3.5. Métodos analíticos	27
3.5.1. Dosagem de proteínas	27
3.5.2. Dosagem de carboidratos	27
3.6. Teste cutâneo de puntura (TCP)	28
3.7. Recrutamento dos pacientes	28
3.8. Triagem de pacientes alérgicos e de indivíduos não-atópicos	29
3.9. Coleta de sangue	30
3.10. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	30
3.10.1. Detecção de IgE específica	30
3.10.2. Inibição competitiva	32
3.11. Eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	33

3.12.	<i>Immunoblotting</i> para detecção de componentes alergênicos ligantes de IgE	35
3.13.	Análise estatística	37
3.14.	Biossegurança	37
4.	RESULTADOS	38
4.1.	Obtenção das frações de <i>D. pteronyssinus</i> não ligantes e ligantes de ConA	39
4.2.	Dados clínicos e demográficos	40
4.3.	Teste cutâneo de puntura a extratos de ácaros da poeira domiciliar	43
4.4.	IgE específica ao extrato bruto de <i>D. pteronyssinus</i> e suas frações	43
4.4.1.	Níveis de IgE específica a Dp bruto, FNLCOnA e FLConA	44
4.4.2.	Correlação entre os níveis de IgE específica a Dp bruto e FNLCOnA/FLConA	46
4.5.	Reatividade cruzada entre antígenos de ácaros relacionados	47
4.6.	Perfil protéico do extrato Dp bruto a suas frações	49
4.7.	Componentes antigênicos de Dp bruto e FLConA reconhecidos por IgE ...	50
5.	DISCUSSÃO	53
6.	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
	ANEXOS	74
	ANEXO 1	75
	ANEXO 2	76
	ANEXO 3	77
	ANEXO 4	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
δ	Desvio-padrão
ε	Epsilon
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
χ^2	Qui-quadrado
+	Resultado de TCP positivo
-	Resultado de TCP negativo
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	<i>2,2'-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i> (Ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico])
Apud	Citado por
BBS	Solução salina tamponada com borato
Blot 5	Alérgeno principal de <i>Blomia tropicalis</i> do grupo 5
BSA	Soroalbumina bovina
Bt bruto	Extrato bruto total de <i>Blomia tropicalis</i>
C1q	Subunidade q do complexo protéico C1, do Sistema Complemento
CD	Marcador do tipo <i>Cluster of Differentiation</i>
Ca^{2+}	Íon cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm^2	Centímetro quadrado
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
ConA	Concanavalina A
D-manose	Dextro-manopirranose
DAB	3,3'-diaminobenzidina
Der f	Alérgeno de <i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Df bruto	Extrato bruto total de <i>Dermatophagoides farinae</i>
D.O.	Densidade óptica
DP+	Grupo de pacientes alérgicos a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Dp bruto	Extrato bruto 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)
et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
Fc ϵ RI	Receptor de IgE de alta afinidade do Tipo I
Fc ϵ RII	Receptor de IgE de baixa afinidade do Tipo II
FLConA	Fração de <i>D. pteronyssinus</i> ligante de Concanavalina A
FNLConA	Fração de <i>D. pteronyssinus</i> não ligante de Concanavalina A
g	Grama
G	Força relativa da gravidade

GST	Glutathione-S-transferase
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
HCl	Ácido clorídrico
I ₅₀	Concentração equivalente a 50% de inibição
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	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i> (Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância)
kDa	Kilodalton
km	Kilômetro
km ²	Kilômetro quadrado
L-lisina	Levo-lisina
LTC	Leucotrieno do tipo C
LTD	Leucotrieno do tipo D
LTE	Leucotrieno do tipo E
M	Molar
mA	Miliampére
M/F	Gêneros masculino e feminino
M.g.	Média geométrica
mg	Miligrama
MG	Estado de Minas Gerais
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mr	Massa molecular relativa
n	Número de indivíduos
n°	Número
NA	Grupo de pacientes não atópicos
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Não determinado
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
P	Probabilidade
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-L	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e leite em pó desnatado
P.C.	Ponto de corte da reação

PGD	Prostaglandina do tipo D
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl</i> (Fenilmetilsulfonyl)
r	Coeficiente de correlação
Rf	Mobilidade relativa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SUS	Sistema Único de Saúde
TCP	Teste cutâneo de puntura
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TBS	Solução salina tamponada com Tris
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Solução de Tris adicionada de HCl
TT	Toxóide tetânico
Tween 20	<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i> (monolaurato de polioxietileno sorbitano)
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

RESUMO

Introdução: Os ácaros da poeira domiciliar são descritos como importante fonte de alérgenos, os quais tem sido frequentemente caracterizados por ensaios bioquímicos. Alguns destes alérgenos são constituídos de glicoproteínas que podem apresentar afinidade com lectinas, dentre elas a Concanavalina A (ConA).

Material e métodos: FNLConA e FLConA foram obtidas do extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp bruto) após o fracionamento, por cromatografia de afinidade de ConA-Sepharose. Ambos os extratos foram avaliados, por ELISA e *Immunoblotting*, quanto ao reconhecimento pela IgE de 43 soros de pacientes com alergia a ácaros da poeira domiciliar e 41 indivíduos não atópicos, selecionados pelo teste cutâneo de puntura.

Resultados: A análise do teste cutâneo de puntura mostrou que todos os pacientes foram sensibilizados a *D. pteronyssinus* (DP+) e co-sensibilizados a *D. farinae* (100%) e *Blomia tropicalis* (86%). Bandas protéicas de baixa massa molecular foram visualizadas em FNLConA, entretanto, um amplo espectro de bandas (14-116 kDa) foi visualizado em Dp bruto e FLConA. A análise do ELISA mostrou que não houve diferença significativa entre os níveis de IgE específicos a Dp bruto e FNLConA nos pacientes do grupo DP+. Apesar disso, uma baixa reatividade a FLConA foi encontrada quando comparado a Dp bruto. Correlações positivas altas foram encontradas quando os níveis de IgE específicos a Dp bruto foram comparados à FNLConA e FLConA. O ELISA de inibição competitiva indicou uma reatividade cruzada entre *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, quando Dp bruto e FLConA foram aplicados na fase sólida. A análise por *Immunoblotting* revelou a presença de bandas protéicas a um espectro de 14 a 116 kDa em Dp bruto e de 22 a 116 kDa em FLConA, sendo presenciada uma heterogeneidade no reconhecimento dos componentes destas frações pela IgE dos pacientes.

Conclusões: Os componentes ligantes de Concanavalina A derivados de *D. pteronyssinus* se constituem de importantes componentes envolvidos na sensibilização alérgica a ácaros da poeira domiciliar.

Palavras-chave: Alergia respiratória; *Dermatophagoides pteronyssinus*; Concanavalina A; Alérgenos glicosilados; Fracionamento de alérgenos.

SUMMARY

Introduction: House dust mites have been reported as important allergen sources which have been characterized by biochemical assays. Some of these allergens are constituted by glycoconjugates that may show affinity with lectins, such as Concanavalin A (ConA).

Material and methods: FNLConA and FLConA components were obtained from *Dermatophagoides pteronyssinus* crude extract after fractionation on Con A-Sepharose affinity chromatography. Dp crude extract and its fractions were evaluated by ELISA and both Dp and FLConA were evaluated by Immunoblot for IgE in sera of 43 patients with allergy to house dust mites and 41 non-allergic subjects selected by skin prick test.

Results: Skin prick test analysis showed that all allergic patients were sensitized to *D. pteronyssinus* (DP+) and co-sensitized to *D. farinae* (100%) and *Blomia tropicalis* (86%). Low molecular weight protein bands were detected in FNLConA, however a broad spectrum of protein bands (14-116 kDa) was visualized in both Dp crude and FLConA extract. ELISA analysis showed absence of difference between IgE reactivity to FNLConA when compared to Dp crude among DP+ patients. On the other hand, a lower IgE reactivity between FLConA and Dp crude was observed. Positive correlations were found when Dp crude was compared to FNLConA and FLConA. Inhibition ELISA showed a partial cross-reactivity between *D. pteronyssinus* and *D. farinae* when both Dp crude and FLConA were applied on solid phase. Immunoblot analysis revealed several bands ranging from 14 to 116 kDa in Dp-crude and 22 to 116 kDa in FLConA, although there was heterogeneity among the patients.

Conclusions: Concanavalin-A bound components from *D. pteronyssinus* constitute important glycoconjugate antigens which are involved in mite sensitization.

Key words: Respiratory allergy; *Dermatophagoides pteronyssinus*; Concanavalin A; Glycosylated allergen; Allergen fractionation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alergia

1.1.1. Conceito e manifestações clínicas

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

Algumas manifestações clínicas da alergia ocorrem sob a forma de asma e rinite. A asma alérgica é caracterizada por reação imunológica, sob a forma de inflamação do sistema respiratório inferior, induzindo a quadro de hiperreatividade brônquica e, conseqüentemente, episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse (LEMANSKE-JUNIOR; BUSSE, 2003).

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

em estruturas comuns ao nosso ambiente, como polens de plantas ou ácaros da poeira domiciliar.

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

1.1.2. Fatores ambientais

Sabe-se hoje que o microambiente exerce enorme influência na alergia. O estilo de vida contemporâneo, o qual as pessoas permanecem por várias horas em locais fechados faz com que a alergia se torne uma enfermidade com alto nível de importância (PLATTS-MILLS et al., 1997). Baseado nessa afirmação, alguns dados apontam para maior atenção a este problema. Em recente estudo realizado na Itália, por Perfetti et al. (2004), foram encontrados níveis elevados de alérgenos de ácaros da poeira em móveis estofados situados no ambiente de trabalho. Em outra investigação, Hesselmar et al. (2005) indicaram que o modelo de construção de uma casa pode influenciar na exposição a alérgenos e no desenvolvimento de doenças alérgicas, ao verificar que crianças que moravam em casas com ventilação mecânica apresentaram mais sintomas respiratórios característicos de alergia. A utilização de janelas e estruturas que permitiriam ventilação natural nas residências seria um fator reducional para o problema.

Outro ambiente que também é alvo de pesquisas envolvendo a exposição alérgica é a escola. Em alguns lugares, as crianças podem passar a maior parte do dia neste local e isso faz com que as chances de serem expostas a uma ampla variedade de alérgenos sejam aumentadas. Em locais como os Estados Unidos, sobretudo na Flórida (BATES; MAHAFFY, 1999) e Carolina do Norte (FOARDE; BERRY, 2004), níveis acima de 7 µg de alérgenos de ácaros por grama de poeira (µg/g) foram encontrados nas escolas. Dados muito semelhantes foram descritos na Inglaterra (CUSTOVIC; TAGGART; WOODCOCK, 1994), onde níveis de até 9,75 µg/g de poeira foram detectados. É importante ressaltar que, segundo o *Institute of Medicine* (2000), níveis de alérgenos com valores superiores a 2 µg/g são suficientes para que um indivíduo predisposto possa se sensibilizar.

Estes dados mostram que a presença de alérgenos nos ambientes domésticos, escolares e ocupacionais pode apresentar riscos no contexto da sensibilização de indivíduos com predisposição, além do surgimento dos sintomas e indução da inflamação em pacientes alérgicos.

1.2. Alérgenos

Antígenos causadores de doenças alérgicas são designados como alérgenos, segundo Johansson et al. (2004). Muitas vezes, estes são proteínas que podem conter uma cadeia lateral de carboidrato, outras vezes, esse sacáride pode ser o próprio alérgeno e em raros casos, compostos inorgânicos, que podem atuar como haptenos.

A atual nomenclatura oficial para os alérgenos foi proposta pela Organização Mundial de Saúde em 1994, como relatado por King et al. (1995). O nome é composto pelas três primeiras letras do gênero e a primeira letra (ou mesmo as duas primeiras, no caso de ambigüidade) da espécie a partir da qual o alérgeno é derivado, acrescido de um numeral arábico, que se refere ao grupo o qual pertence o alérgeno. Como exemplo: o alérgeno do grupo 5 derivado da espécie *Blomia tropicalis* é chamado, dessa forma, de Blo t 5.

Muitos alérgenos podem apresentar sítios glicosilados, o que parece ser um importante determinante para sua alergenicidade. Os oligossacarídeos aderem às proteínas, geralmente entre os aminoácidos asparagina e serina/treonina, antes ou após a síntese protéica. Isso pode 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 destas cadeias glicosiladas na sua apresentação a células do sistema imune e no desencadeamento da resposta alérgica.

1.3. O sistema imune e a resposta alérgica

1.3.1. 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; BROSTOFF; MALE, 2002) e são conhecidas, até o momento, cinco classes em mamíferos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

A IgE é o isotipo de anticorpo que contém a cadeia pesada epsilon (ϵ). Circula como um anticorpo bivalente e está normalmente presente no plasma em concentração inferior a 1 $\mu\text{g/mL}$. Em condições patológicas, tais como as infecções helmínticas e na alergia, esse nível pode subir para mais de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (ABBAS; LICHTMAN; 2003). Uma característica importante da IgE é sua capacidade de se ligar aos mastócitos e basófilos com alta afinidade, por meio de sua porção $\text{Fc}\epsilon$, como demonstrado por Ishizaka e Ishizaka (1966). 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 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$, apresentando constante de ligação de aproximadamente 10^{10} M^{-1} , o que protege a IgE da destruição pelas proteínas séricas. O outro receptor para IgE, $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ ou CD23, possui menor afinidade pela imunoglobulina e se apresenta em duas formas, $\text{Fc}\epsilon\text{RIIa}$ e $\text{Fc}\epsilon\text{RIIb}$, diferindo-se apenas pela composição da região citoplasmática N-terminal (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2002). 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 da IgE, bem como de qualquer anticorpo, ao antígeno se dá pela formação de múltiplas ligações não-covalentes entre o antígeno e os aminoácidos anticórpicos. 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; BROSTOFF; MALE, 2002).

1.3.2. Fisiopatologia da alergia

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

Nos mastócitos, o resultado desta ativação é a geração de mediadores lipídicos, como as prostaglandinas D2 (PGD_2) ou leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) e a exocitose de grânulos secretores. A exocitose de histamina e outros mediadores pré-formados promove aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema

e contração de músculos lisos, fenômenos esses responsáveis pelas manifestações clínicas preliminares das reações alérgicas, ocorrendo nos primeiros 30 minutos seguidos à exposição alergênica (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

Nas 12 (doze) horas que se sucedem, ocorre progressiva infiltração tecidual de células inflamatórias, desde neutrófilos a eosinófilos e células mononucleares, em resposta a mediadores químicos (TERR, 1997). Os principais mediadores da resposta tardia, segundo Galli e Lantz (1999), são as citocinas, sobretudo as interleucinas do tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13), os quimiotáticos celulares e as moléculas de adesão. Entretanto, recentemente, Devos et al. (2006) demonstraram o papel da IL-9 na correlação existente entre indução da produção de IgE e asma.

1.4. Ácaros da poeira domiciliar

1.4.1. Ecologia e morfofisiologia

Os ácaros são ecologicamente descritos como organismos diversificados que exploraram, ao longo da evolução, ambientes incomuns, como: cavidades nasais de pássaros, traquéia de insetos, além de folículos pilosos e pele de mamíferos. Além disso, um grande número de espécies também vive em meio à poeira presente nos ambientes residenciais ou ocupacionais, designados, então como ácaros da poeira domiciliar, ou simplesmente, ácaros domésticos (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001). Nestes locais, podem ser encontrados em móveis estofados, carpetes, cortinas, colchões, travesseiros, brinquedos de pelúcia, livros e outros (HART, 1998).

Os ácaros da poeira domiciliar geralmente medem entre 0,1 a 0,6 mm de comprimento e por serem vistos com dificuldades a olho nu, sua identificação usualmente requer um aumento óptico de pelo menos dez vezes. Possuem oito pernas articuláveis e corpo ovóide. Geralmente se apresentam sob a coloração creme, porém alguns são translúcidos (HART, 1998). Seu sistema respiratório é bastante simplificado e a troca gasosa é realizada ao longo de toda a sua superfície corpórea. A presença destes animais na poeira está intimamente relacionada ao seu hábito alimentar, que consiste de restos de pele humana e demais detritos orgânicos presentes no ambiente (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

O ciclo-de-vida dos ácaros da poeira começa com a fêmea depositando aproximadamente dois ovos por dia. A larva hexópoda que surge desses ovos permanece ativa por algum tempo até se tornar uma protoninfa octópoda inativa, subsequente à liberação do tegumento. De maneira similar, a protoninfa dá origem a uma tritoninfa, já ativa, que com a última liberação do tegumento, se torna um ácaro adulto. O período deste ciclo pode variar de acordo com a espécie, mas sabe-se que ele pode durar de duas a seis semanas. Além do mais, o número de ovos depositados pelas fêmeas pode atingir até uma centena em um período de seis semanas. Um ácaro adulto pode viver por até cinco meses e o crescimento populacional é influenciado pela temperatura e pela umidade relativa do ambiente (HART, 1998).

Apesar de serem representantes do Filo Arthropoda, que inclui animais com corpo segmentado e extremidades articuláveis (STORER, 1998), os ácaros da poeira domiciliar diferem muito dos insetos e demais representantes do grupo, quanto à morfologia e fisiologia. Por esta razão, várias medidas adotadas para

controlar insetos não são eficazes para o controle destes ácaros. Neste sentido, 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 cômodos com água quente, o encapamento de colchões e travesseiros com materiais não porosos e o uso de equipamentos que aumentam a ventilação no ambiente. Essas medidas devem ser adotadas preferencialmente em conjunto (HALLAS, 1991, HART, 1998, ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

Dentre os grupos de ácaros da poeira domiciliar, uma importância considerável é dada àqueles pertencentes à família Pyroglyphidae, sobretudo as espécies *Dermatophagoides pteronyssinus*, Trouessart 1897, e *Dermatophagoides farinae*, Hughes 1961, dois dos principais causadores da sensibilização em pacientes alérgicos, como relatado por Platts-Mills et al. (1997).

1.4.2. *Dermatophagoides pteronyssinus*

1.4.2.1. Características gerais

Caracterizada pelo zoologista francês Trouessart, em 1897, a espécie *D. pteronyssinus* é vulgarmente chamada de ácaro europeu. Apesar desta designação, sua importância em países de americanos tem se tornado evidente e hoje é considerado uma das principais fontes de alérgenos provenientes da poeira domiciliar (VOORHORST, 1977, ARLIAN; MORGAN; NEAL, 2002).

O ácaro europeu pode ser taxonomicamente classificado como (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001; PUERTA et al., 2005):

Filo: Arthropoda

Subfilo: Chelicerata

Classe: Arachnida

Ordem: Acari

Subordem: Astigmata

Superfamília: Pyroglyphoidea

Família: Pyroglyphidae

Subfamília: *Dermatophagoidinae*

Gênero: *Dermatophagoides*

Espécie: *D. pteronyssinus*

A poeira domiciliar é considerada seu habitat alternativo, uma vez que seu ambiente natural se constitui de ninho de pássaros e peles de pequenos mamíferos. O mecanismo de dispersão deste animal, incluindo a ocupação de seus habitats é favorecido pela sua morfologia, sendo por esse fator, considerados como “plânctons aéreos”. Além disso, adota uma estratégia de vida do tipo *r*, onde o reduzido tamanho e o investimento na reprodução em massa são características marcantes. Isso faz com que seu desenvolvimento seja precoce e sua sobrevivência esteja diretamente ligada às condições ambientais (LEBRUN et al., 1991; MACARTHUR e WILSON, 1967 apud QUEIROZ et al., 2001).

No Brasil, a prevalência desta espécie tem sido avaliada em diversos trabalhos. Arruda et al. (1991) realizaram um estudo sobre a sensibilização e a exposição à alérgenos de ácaros entre as crianças asmáticas na cidade de São Paulo-SP, onde foi verificado alta freqüência nos níveis de IgE específica a *D. pteronyssinus* na maioria das crianças estudadas (95%). Além disso, detectaram-se altos níveis de exposição aos dois principais alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2), por parte dos indivíduos estudados, em 90% das residências avaliadas. Seguindo linha semelhante de pesquisa, recentemente, um estudo realizado por Terra et al. (2004), revelou que *D. pteronyssinus* foi a espécie de maior freqüência (15,3%) na cidade de Uberaba-MG, seguida por *D. farinae* (12,3%), por meio de identificação morfológica.

1.4.2.2. Alérgenos de *D. pteronyssinus*

Grande parte dos alérgenos de *D. pteronyssinus* são elementos presentes no corpo ou na matéria fecal dos ácaros, como descrito por Tovey; Chapman; Platts-Mills (1981) e Arlian et al. (1987). Os alérgenos relacionados às fezes são originados do trato gastrintestinal do ácaro, e alguns desses também se encontram presentes em sua saliva. Outra provável fonte de alérgenos dessa espécie inclui enzimas associadas aos processos de mudanças de estágios.

Os alérgenos desta espécie, bem como das demais espécies de ácaros são divididos em grupos, de acordo com a composição bioquímica, homologia e massa molecular. Até o momento, foram descritos doze alérgenos de *D. pteronyssinus*, segundo a última atualização do portal www.allergen.org (ALLERGEN

NOMENCLATURE, 2006), sendo que algumas de suas principais características bioquímicas estão apresentadas no QUADRO 1.

Alérgeno	Identidade bioquímica ou homologia	Potenciais sítios de glicosilação	Massa molecular (kDa)	Frequência de ligação à IgE (%)
Der p 1	Cisteína protease; homologia com: papaína, actidina, catepsina B e H	1	25	80
Der p 2	Função desconhecida; homologia com a proteína putativa epididimal humana	-	14	80
Der p 3	Tripsina; homologia com Der p 6 e Der f 6, e outras tripsinas de mamíferos e invertebrados	-	28	16-100
Der p 4	Amilase; homologia com α -amilases de insetos e mamíferos	1	60	40-46
Der p 5	Função e sítios de clivagens desconhecidos	-	14	50-70
Der p 6	Quimiotripsina; homologia com Der p 3 e Der f 3, além de quimiotripsinas de mamíferos e invertebrados	-	25	40
Der p 7	Função e sítios de clivagem desconhecidos	1	22	50
Der p 8	Glutathiona-S-transferase (GST); homologia com outras GSTs	2	26	20-40
Der p 9	Serina protease colagenolítica	-	28	90
Der p 10	Tropomiosina; homologia com tropomiosinas de outros invertebrados	ND	36	50-95
Der p 11	Paramiosina; homologia com paramiosinas de outros invertebrados	4	103	80
Der p 14	Semelhante a apolipofirina; identidade com M-177	ND	177 (variável)	90

QUADRO 1. Propriedades bioquímicas dos alérgenos de *D. pteronyssinus*.

FONTE: Kawamoto et al. (2002); Stewart e Thompson (1996); Thomas, Smith e Hales (2004); Allergen nomenclature (2005). - ausente; ND não determinado.

1.5. Gliconjugados na alergia

Várias moléculas podem ser reconhecidas pela sua propriedade de induzir a liberação de mediadores envolvidos na resposta alérgica. A valência destas moléculas é um dos fatores essenciais para a iniciação desse processo, no qual antígenos polivalentes usualmente exercem um melhor desempenho frente aos monovalentes, que são incapazes de promoverem a ligação cruzada da IgE aos seus receptores.

Sabe-se que a natureza dos epítopos relacionados a esses antígenos não é necessariamente de origem peptídica, pois alguns deles podem apresentar origem glicosídica, como comprovaram os estudos realizados por Elgavish e Shaanan (1998) e Varghese et al. (1992). Esses últimos são representados pelas glicoproteínas.

As glicoproteínas são proteínas que apresentam cadeias de carboidrato em sua composição. Essas cadeias, que podem apresentar tamanho variável, são responsáveis por importantes características, como por exemplo, a determinação da hidrofobicidade e resistência a choques térmicos (HELENIUS; AEBI, 2001; TROMBETTA; PARODI, 2001).

Vários estudos apontam para a importância dos carboidratos no reconhecimento pela IgE (FÖTISH; VIETHS, 2001). No entanto, seu significado clínico no contexto de alergia não está muito bem elucidado (VAN REE, 2002). Em um estudo de sensibilização envolvendo reatividade cruzada, Ebo et al. (2004) investigaram a prevalência de sensibilização a determinantes de carboidratos em pacientes alérgicos a ácaros da poeira domiciliar, animais domésticos e polens. Foi demonstrado que pacientes exclusivamente com polinose apresentaram níveis de

IgE positivos a venenos de abelha e que esta reatividade cruzada está ligada aos carboidratos determinantes de reatividade cruzada. Anteriormente, Prenner et al. (1992) e Wilson et al. (1998) também haviam relatado situação semelhante entre glicoproteínas de veneno de abelha e de rabanete.

Sabe-se hoje, que a característica do marcador CD1 em apresentar moléculas que contenham carboidratos, essencialmente glicolipídios, é um paradigma na apresentação de antígenos (MOODY et al., 2000) e seu papel na linha de defesa contra patógenos e na hipersensibilidade foi discutido recentemente por Bilenki et al. (2005), quando mostraram que a estimulação de células NKT, que apresentam marcadores CD1 com α -galactosilceramida resultou em maior produção de IL-4 e IgE e que camundongos nocauteados para o gene codificador de CD1 apresentaram menor efeito patológico à infecção por *Chlamydia tracomatis*. Contudo, o mecanismo de apresentação e de indução *in vivo* de IgE ainda não foi descrito, o que remete para a execução de vários estudos nesse sentido.

1.6. Lectinas

1.6.1. Características gerais

As lectinas (do latim *lectus*, participio de *legere*; selecionar, escolher) são conhecidas pela propriedade de interagirem com açúcares, o que as tornam excelentes ferramentas na purificação de glicoproteínas solúveis e de membranas, tais como: hormônios, proteínas do plasma, antígenos, anticorpos ou mesmo organelas e células como um todo (SCRIBA, 2004). Tal atributo tem feito com que

as lectinas se tornassem paradigma no que diz respeito ao reconhecimento entre proteína e carboidrato, desta forma, seu uso na imunologia e na glicobiologia tem se tornado ferramenta essencial.

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

1.6.2. Concanavalina A (ConA)

Uma das lectinas com maior aplicação em técnicas de glicobiologia é a Concanavalina A (ConA). Originada do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), uma planta leguminosa da família Phaseoleae, a ConA foi a primeira lectina de leguminosa a ser isolada (SUMNER; HOWELL, 1936), seqüenciada (CUNNINGHAM; WANG; WAXDAL, 1975) e analisada quanto à estrutura tridimensional por cristalografia (EDELMAN et al., 1972).

Vários carboidratos podem apresentar sítios de ligação com a ConA, dentre eles: metil- α -D-manopiranosídeo, metil- α -D-glucopiranosídeo, 4'-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo, 4'-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo, 4'-metillumeliferil- α -D-glucopiranosídeo, arabinose e Man α 1-3[Man α 1-6]Man α 1Me. Nesta interação, a ligação de hidrogênio ocorre essencialmente em três resíduos de aminoácidos lectínicos: um aspartato (Asp208), uma asparagina (Asn14) e uma arginina (Arg228). Tal ligação é também complementada por uma interação de van der Waals entre resíduos aromáticos da lectina (tirosinas, leucinas e cisteínas) e as porções cíclicas

dos açúcares. Todas essas interações são dependentes, direta ou indiretamente, de cálcio. (NAISMITH et al., 1994).

A ConA tem sido frequentemente utilizada como ferramenta no isolamento de glicoconjugados (NILSEN et al., 1990; GUPTA et al., 1996; NIGAM; GHOSH; SARMA, 2003) e a reatividade da IgE a estes componentes isolados também constitui um alvo em pesquisas envolvendo doenças alérgicas (GUPTA et al., 2004). Entretanto, poucos estudos foram conduzidos, até o momento, relacionando estes epítomos glicosilados à alergia a ácaros da poeira domiciliar. Os primeiros alérgenos glicosilados de *D. farinae* foram isolados por cromatografia de afinidade de ConA-Sepharose (BALDO; UHLENBRUCK, 1977) e, mais tarde, esta lectina também foi utilizada no isolamento de um antígeno de alta massa molecular, identificado como Dpt 4, de *D. pteronyssinus* (STEWART; TURNER, 1980). Apesar disso, nenhum destes estudos demonstrou um perfil de proteínas ligantes de ConA reconhecidas pela IgE de pacientes alérgicos, bem como a reatividade cruzada destes componentes com alérgenos de outras espécies de ácaros de importância clínica.

Neste sentido, um estudo das frações ligantes de ConA derivadas do extrato bruto de *D. pteronyssinus* poderá esclarecer aspectos importantes dos alérgenos desta espécie envolvidos na sensibilização e na imunoterapia alérgica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de reatividade dos alérgenos de extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* e suas frações ligantes de ConA à IgE de pacientes com alergia respiratória.

2.2. Objetivos específicos

- Extrair, fracionar e identificar os componentes derivados do extrato bruto de *D. pteronyssinus*, por cromatografia de afinidade de ConA-Sepharose e eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio;

- Avaliar a reatividade do extrato bruto de *D. pteronyssinus* e de suas frações não ligantes e ligantes de ConA à IgE de pacientes com alergia respiratória, pelo ensaio imunoenzimático;

- Verificar a presença de reatividade cruzada entre alérgenos derivados do extrato bruto de *D. pteronyssinus* e suas frações ligantes de ConA com o extrato bruto de *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides farinae*, por ensaio imunoenzimático de inibição competitiva;

- Identificar os componentes alergênicos do extrato bruto de *D. pteronyssinus* e suas frações ligantes de ConA reconhecidos pela IgE de pacientes com alergia respiratória, por *Immunoblotting*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedimentos éticos

O projeto de pesquisa foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), órgão do Conselho Nacional de Saúde (CNS), e aprovado, sem restrições, sob processo nº 039/2002 (Anexo 1).

Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento (Anexo 2), pelo qual foram informados sobre todos os procedimentos adotados, segundo as normas da Resolução CNS 196/96, que regulamenta a ética em pesquisa envolvendo seres humanos. Neste documento, o nome da pesquisa foi informado, bem como seus objetivos.

Em seguida, responderam a um questionário clínico (Anexo 3), segundo os critérios adotados pelo ISAAC - *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (1998), para auxiliar na avaliação clínica inicial de cada paciente, supervisionado pelo médico alergologista responsável.

Qualquer indivíduo teria o direito de se retirar do estudo, em qualquer momento, sem necessidade de explicação.

3.2. Local do estudo

Todas as etapas do estudo foram realizadas em Uberlândia. O município se localiza no estado de Minas Gerais, na região conhecida como Triângulo Mineiro, a uma distância de 563 km da capital, Belo Horizonte. Apresenta uma população residente total de 585.262 habitantes, distribuídos em uma área de 4.115,85 km²,

segundo o último senso, divulgado em 01 de julho de 2005 (IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2006).

A seleção e o atendimento aos pacientes foram realizados no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). O HC-UFU está fisicamente inserido no Campus Umuarama e é um dos 59 estabelecimentos que prestam serviço junto ao Sistema Único de Saúde (SUS) no município, segundo o IBGE (2006).

Todas as demais técnicas adotadas neste estudo foram executadas no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU, Instituto de Ciências Biomédicas, bloco 4C, Campus Umuarama.

3.3. Preparação do extrato antigênico

3.3.1. Extrato bruto de *D. pteronyssinus*

A extração de antígenos de *D. pteronyssinus* foi procedida de acordo com o método adotado por Pereira et al. (2005). Inicialmente, foram pesados 200 g do ácaro em meio de cultura, gentilmente cedido pelo Prof. Federico Montealegre (Laboratório de Imunoquímica, Escola de Medicina de Ponce - Porto Rico, EUA) e peneirados (Peneiras Granutest-Telastem, ABNT 35, - TYLER 32) para separar, por retenção, o material de cultura dos corpos e fezes dos ácaros. O material acarológico, constituído de corpos e fezes, (10 g) foi diluído em solução de 50 mL de salina tamponada com borato (BBS) 5 mM, pH 8,0, contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF - ICN Biomedicals, Inc., Aurora, EUA) 1 mM, Benzamidina

(Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) 1 mM, aprotinina (Sigma) 0,2% e leupeptina (Sigma) 1 μ M, como inibidores de proteases. A exaustiva maceração, na presença de nitrogênio líquido, e a subsequente transferência do material para tubos cônicos precederam a incubação deste em agitador orbital, por um período de 18 horas.

Na etapa seguinte, o sobrenadante final resultante de duas pré-centrifugações a 3.000 x G, por 15 minutos e uma centrifugação a 30.000 x G, por 45 minutos, foi submetido à diálise em sistema Amicon (W.R. Grace & Co., Beverly, EUA), com membrana porosa YM-10 (Whatman International Ltd., Maidstone, Inglaterra) em 500 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM, pH 7,2.

Todos os procedimentos acima descritos, exceto a peneiração e a maceração, foram realizados à temperatura de 4°C.

O conteúdo não transpassado pela membrana porosa foi definido como o extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto), armazenado a -20°C em microtubos de polipropileno (Eppendorf), sob a forma de alíquotas de 500 μ L, até dosagem protéica de seu conteúdo, a preparação dos extratos para TCP e a realização dos testes sorológicos.

3.3.2. Extratos antigênicos de ácaros para teste cutâneo de puntura (TCP)

Para a preparação do reagente utilizado nos testes cutâneos, o extrato Dp bruto foi diluído em PBS contendo fenol a 0,4% e glicerina a 50% (Bayer Corporation, Spokane, EUA) em uma concentração protéica final de 2 mg/mL. Esta

solução foi armazenada em frascos de vidro do tipo âmbar com conta-gotas, a 4°C, até a realização dos testes cutâneos.

Os extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis*, utilizados no teste cutâneo, foram preparados de maneira semelhante à descrita para *D. pteronyssinus*.

3.4. Cromatografia de afinidade

3.4.1. Preparação da coluna

Para obtenção das frações ligantes e não ligantes de Concanavalina A (ConA), a resina de ConA-*Sepharose* 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) foi aplicada em uma coluna de cromatografia e assentada através de fluxo lento e contínuo de solução Tris (Hidroximetil-aminometano – Merck, Darmstadt, Alemanha) 200 mM, contendo HCl (Quimibrás Indústrias Químicas, S.A., Rio de Janeiro, Brasil) (Tris-HCl), contendo NaCl 500 mM, pH 7,4, até atingir um volume de 5 mL de resina.

Para evitar uma possível clivagem da ligação entre a ConA e a matriz *Sepharose*, foi realizada uma ligação cruzada com glutaraldeído, consoante o protocolo descrito por Scher; Resneck; Bloch (1989), com pequenas modificações. Para tal, a resina foi lavada com 250 mL de PBS contendo L-lisina (Sigma) a 200 mM, pH 8,3 e subsequentemente com 100 mL de PBS acrescido de L-lisina a 200 mM e D-manose (D-manopiranosose – Sigma), pH 8,3. Em seguida, 15 µL de glutaraldeído a 25% (Merck) foi adicionado e a resina foi incubada à temperatura ambiente, em agitação orbital por 1 hora. O excesso do composto orgânico foi

removido pela lavagem da resina com 25 mL de solução tampão constituída de Glicina (Quimibrás), Tris-HCl a 100 mM, contendo D-Manose a 200 mM, pH 9,2. A coluna foi novamente incubada em agitação orbital, por 10 minutos e, finalmente lavada com 50 mL de PBS.

Todas as lavagens foram realizadas a 25°C e em fluxo lento e contínuo.

3.4.2. Fracionamento do extrato Dp bruto

Um total de 1 mL de extrato Dp, a 15 mg de massa protéica, foi aplicado à ConA-Sepharose e mantido em repouso por 2 horas, a 4°C, para a ligação dos glicoconjugados à lectina. A coluna foi então lavada com solução PBS e as frações não ligantes de ConA foram coletadas, em volumes aproximados de 2 mL e monitoradas quanto à densidade óptica (D.O.), por espectrofotometria (Espectrofotômetro Micronal, São Paulo, Brasil), a 280 nm. No momento em que os valores de D.O. atingiram valores próximos de zero, a eluição foi interrompida pela adição de metil- α -D-manopiranosídeo (Ferro Pfanstiehl Laboratories, Inc., Walkegan, EUA) a 100 mM, com ulterior eluição das frações ligantes de ConA. Ao atingir novamente valores basais de D.O., a coluna foi finalmente lavada com PBS, contendo NaCl a 500 mM.

As frações que apresentaram os maiores valores de D.O., eluídas pela adição de PBS ou de metil- α -D-manopiranosídeo, foram agrupadas, concentradas e dialisadas contra PBS em sistema Amicon, constituindo dois *pools* de frações: um ligante de ConA (FLConA) e outro não ligante de ConA (FNLConA).

3.5. Métodos analíticos

3.5.1. Dosagem de proteínas

As concentrações protéicas do extrato Dp bruto e das frações obtidas por cromatografia de afinidade (FNLConA e FLConA) foram determinadas segundo metodologia descrita por Lowry et al. (1951).

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com os valores de D.O. da curva de calibração, na qual foi utilizada a soroalbumina bovina (BSA - Sigma) em diluições seriadas de 500 a 15,6 $\mu\text{g/mL}$. Estes valores foram então transformados em mg/mL , e a concentração protéica final calculada através do programa computacional Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA).

3.5.2. Dosagem de carboidratos

A quantidade de carboidratos presentes nas amostras foi determinada segundo o protocolo descrito por Yemm e Willis (1954), utilizando D-Manose (Sigma) como padrão na curva de calibração, em diluições seriadas de 1.000 a 61,5 $\mu\text{g/mL}$. A transformação dos valores de D.O. em concentração de carboidratos foi realizada de maneira similar ao procedimento descrito para dosagem de proteínas.

3.6. Teste cutâneo de puntura (TCP)

A hipersensibilidade imediata foi avaliada pelo método de puntura, como descrito por Ownby (1988). Para a realização do teste, foram utilizados extratos brutos dos ácaros *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*, todos a 2 mg/mL, preparados na Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica da UFU. Solução de histamina, a 10 mg/mL (IPI/ASAC Brasil, São Paulo, Brasil) e solução salina fisiológica em fenol 0,4% e glicerina 50% (IPI/ASAC) foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente (ANEXO 4).

Um volume de aproximadamente 10 µL de cada extrato foi depositado na região antebraquial anterior (CTA – COMISSÃO DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA, 2001), após anti-sepsia do local com álcool 70%. Uma puntura cutânea (Puntores Aiko, Rio de Janeiro, Brasil) foi feita no local de depósito da gota e depois de 15 minutos foram medidos os diâmetros ortogonais das pápulas formadas, com régua milimetrada. As pápulas que apresentaram média aritmética dos diâmetros maiores ou iguais a 3 mm, em relação ao valor do controle negativo, foram consideradas positivas ao teste.

3.7. Recrutamento dos pacientes

Um total de 86 indivíduos, oriundos de Uberlândia-MG, de ambos os sexos, com idade entre 18 a 57 anos, foram selecionados e atendidos clinicamente, por meio de marcação de consulta, durante o período de março de 2004 a junho de 2005. A submissão destes à anamnese, ao TCP a extratos de ácaros da poeira domiciliar (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*) e à coleta de sangue foi

realizada pelo Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, que, também, quando necessário, prescreveu medicação aos indivíduos.

3.8. Triagem de pacientes alérgicos e de indivíduos não-atópicos

Dois grupos foram criados para distribuir os participantes do estudo, de acordo com seus históricos clínicos de asma e/ou rinite e reatividade ao TCP, sendo eles:

1. Grupo DP+ (n = 43) – Pacientes com histórico clínico de asma e/ou rinite alérgica, com TCP positivo ao extrato alergênico de *D. pteronyssinus*;
2. Grupo NA (n = 41) – Indivíduos não atópicos, ou seja, sem histórico clínico de asma e/ou rinite alérgica e não reativos ao TCP a quaisquer alérgenos testados.

Foram excluídos do estudo indivíduos:

- a) Com idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos;
- b) Que apresentaram lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;
- c) Em tratamento com drogas antiinflamatórias esteroidais e/ou anti-histamínicos de primeira ou segunda geração;
- d) Que foram submetidos à prévia imunoterapia com extratos de ácaros da poeira domiciliar;

- e) Que não apresentaram sintomas clínicos para rinite e/ou asma alérgica, mas foram positivos ao TCP para pelo menos um dos extratos testados;

3.9. Coleta de sangue

Por meio de punção venosa na fossa cubital (COMISSÃO DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA, 2001), foram coletados 10 mL de sangue de cada indivíduo, com a utilização de tubos a vácuo (Vacutainer - Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA) e agulhas 21G1 (Vacutainer). Estas amostras foram então submetidas à centrifugação (Centrífuga Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 4°C durante 10 minutos a 2.000 x G. Os soros obtidos foram aliquotados em microtubos de polipropileno (Eppendorf) e armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.10. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

3.10.1. Detecção de IgE específica

Para detecção e quantificação de anticorpos IgE reativos a Dp bruto, FNLConA e FLConA no soro dos indivíduos participantes do estudo, foi utilizado o ensaio imunoenzimático ELISA, conforme descrito por Pereira et al. (2005), com modificações.

As placas de alta afinidade (Costar, Corning Inc., Corning, EUA) contendo 96 poços foram sensibilizadas com Dp bruto, FNLConA e FLConA, diluídos em tampão

carbonato 60 mM, pH 9,6, na concentração protéica de 20 µg/mL em um volume de 50 µL/poço, por 18 horas, a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo monolaurato de polioxietileno sorbitano (Tween 20 - Sigma) a 0,05% (PBS-T). Os sítios ativos dos poços foram então bloqueados, em volume de 100 µL/poço, com solução PBS-T contendo BSA (Sigma) a 1% (PBS-T-BSA), por 1 hora, à temperatura ambiente, sendo que essa última solução foi utilizada como diluente dos reagentes utilizados nas etapas posteriores.

Os soros, diluídos na proporção de 1:2, foram adicionados, em duplicata, em volumes de 50 µL/poço, após três lavagens prévias com PBS-T. Como controles de cada reação, foram utilizados soros de pacientes do grupo NA. Após incubação, a 37°C por 2 horas, as placas foram lavadas por seis vezes com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-IgE humana biotinizado (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EUA) diluído a 1:1000, em volume de 50 µL/poço, durante 1 hora, a 37°C.

Após novo ciclo de seis lavagens com PBS-T, adicionou-se o conjugado Estreptavidina-peroxidase (Sigma), diluído a 1:500 em PBS-T/BSA, em volume de 50 µL/poço e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A revelação da reação foi feita com substrato enzimático peróxido de hidrogênio (Sigma) a 0,03%, acrescido de ácido 2,2'-diazino-bis-3-etil-benzotiazol (ABTS - Sigma), diluídos em tampão citrato-fosfato 70 mM, pH 4,2.

As densidades ópticas foram determinadas pelo leitor de placas ELISA *Titertek Multiskan Plus* MKII (Flow Laboratories, McLean, EUA), utilizando filtro de 405 nm, tomadas em tempos variáveis.

Os níveis de anticorpos foram expressos em Índice ELISA (IE), calculados através da fórmula abaixo, conforme descrito por Rodrigues et al. (2004), com modificações:

$$IE = \frac{D.O.amostra}{P.C.},$$

onde:

D.O.amostra = densidade óptica média da amostra teste;

P.C. = ponto de corte da reação, obtido através da fórmula:

$$P.C. = D.O.NA + (3 \times \delta),$$

onde:

D.O.NA = densidade óptica média de três amostras de soros de indivíduos do grupo NA;

δ = desvio-padrão das densidades ópticas das amostras de soros de indivíduos do grupo NA.

Valores de IE acima de 1,2 foram considerados positivos.

3.10.2. Inibição competitiva

Para avaliação da reatividade cruzada entre extratos de ácaros relacionados, o ensaio imunoenzimático de inibição competitiva foi realizado, conforme descrito por Pereira et al. (2005). Para as curvas de inibição, foram realizadas diluições

decimais seriadas de 10^2 a 10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ dos de Dp bruto, FLConA, extrato bruto *D. farinae* (Df bruto) e extrato bruto de *B. tropicalis* (Bt bruto), em PBS-T-BSA. Toxóide tetânico (TT - Sigma) e ConA (Sigma) foram utilizados como antígenos irrelevantes, nas mesmas diluições acima citadas. Tais extratos foram incubados, por 18 horas, a 4°C , com uma mistura de seis soros positivos, diluídos a 1:2,5, em PBS-T-BSA. A mistura de soro incubada somente com o diluente foi utilizada como controle positivo da reação.

Os demais procedimentos, desde a aplicação do anticorpo secundário anti-IgE à revelação, foram conduzidos de maneira semelhante à descrita anteriormente. Os resultados foram expressos em porcentagens de inibição em relação à ausência do antígeno inibidor e calculados segundo a fórmula:

$$\text{Inibição(\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{D.O.amostra}}{\text{D.O.controle}} \right) \right] \times 100,$$

onde:

D.O.amostra = densidade óptica média da amostra inibidora em teste

D.O.controle = densidade óptica média do controle positivo da reação

3.11. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil protéico de Dp bruto, FNLCOnA e FLConA foi analisado por SDS-PAGE, a 12%, em condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com Laemmli (1970).

Antes da aplicação no gel, o extrato e as frações foram diluídos em tampão de amostra, contendo Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% e glicerol a 20%, e então submetidos a um aquecimento de 95°C (Aquecedor Termobath ALB64 – Finemould Precision Ind., Co., Seul, Coréia do Sul), por 5 minutos. O padrão de peso molecular *Wide Range* (Sigma) foi utilizado como recurso para o cálculo das massas moleculares relativas das bandas protéicas presentes nas amostras.

O gel foi acoplado, entre duas placas de vidro, no sistema de mini-gel SE 215 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA), conectado a um gerador *Electroforesis Power Supply* EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e então submetido a uma corrente constante de 20 mA, por aproximadamente 1 hora 30 minutos, para a migração das proteínas.

A coloração do gel foi realizada de acordo com a técnica previamente descrita por Friedman (1982), utilizando nitrato de prata.

O programa computacional KODAK 1D (Eastman Kodak Co., Rochester, EUA) foi adotado para se obter os valores de massas moleculares das bandas visualizadas no gel, baseado nos valores de mobilidade relativa (Rf), calculados pelo próprio programa.

A documentação do gel foi realizada, após a sua dessecação em folhas de papel celofane, por digitalização com aparelho *scanner* (HP2200 LTX, Hewlett Packard, Co., EUA).

3.12. *Immunoblotting* para detecção de componentes alergênicos ligantes de IgE

Para verificar a presença de bandas protéicas e/ou glicoprotéicas ligantes de IgE, os extratos Dp e FLConA foram submetidos ao *Immunoblotting* de acordo com a técnica descrita por Towbin; Stslehelin; Gordon (1979). Dez soros do grupo DP+ que apresentaram altos níveis de IgE específica a Dp e FLConA, dosados por ELISA, foram selecionados. No grupo NA, a triagem foi feita utilizando dez soros com baixos valores de IE.

Os componentes protéicos separados por SDS-PAGE foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond-C Pure, Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), imersa em tampão de transferência composto de glicina 40 mM, Tris 50 mM, SDS 0,04% e metanol a 20%. Tal procedimento foi conduzido em sistema semi-úmido Multiphor II Electrophoresis Unit (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia) à corrente de 0,8 mA por cm² de gel, por 2 horas.

Após a transferência, os géis foram descartados e as membranas foram imersas em solução de Ponceau S (Merck) a 0,5%, para visualização momentânea das bandas e assim confirmar o sucesso da transferência.

Efetuada a secagem à temperatura ambiente, as membranas foram cortadas em tiras verticais de 3 mm de largura e acondicionadas em placas para *Immunoblotting*, onde foram bloqueadas com 800 µL de PBS-T, acrescido de 5% de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil), por 4 horas, à temperatura ambiente.

As amostras de soro (10 soros de pacientes do grupo DP+ e 10 soros de indivíduos do grupo NA) foram aplicadas em volume de 500 μ L, diluídas em PBS-T acrescido de 1% de leite desnatado (PBS-T-L) a 1:2, após 3 lavagens com PBS-T. A incubação do soro foi procedida por 18 horas, à temperatura ambiente e seguida de seis ciclos de lavagens com PBS-T.

Posteriormente, as tiras foram incubadas com 500 μ L de solução de IgG de cabra anti-IgE humana biotinizada (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) diluída em PBS-T-L, a 1:250 (nas tiras contendo o extrato Dp bruto) e 1:100 (nas tiras contendo FLConA), por duas horas, seguidas de seis ciclos de lavagens com PBS-T.

Na fase seguinte, procedeu-se a adição do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC/HRP, Dako Corp., Carpinteria, CA, EUA), diluído a 1:200 (Dp bruto) e 1:100 (FLConA), por duas horas, seguidas de seis ciclos de lavagens com PBS-T.

A revelação da reação foi procedida com 3,3'-diaminobenzidina (DAB - Sigma), diluído em 15 mL de solução salina tamponada com Tris (Merk) (TBS) a 20 mM, pH 7,2 até a visualização das bandas.

Toda a reação foi conduzida mediante agitação lenta e constante, à temperatura ambiente.

Para documentação, as tiras foram dessecadas em papel de filtro e digitalizadas conforme descrito anteriormente.

3.13. Análise estatística

As diferenças entre as porcentagens de positividade entre grupos e entre extratos, realizadas pelo TCP e pelo ELISA, foram analisadas pelo teste do χ^2 ou pelo teste exato de Fisher, quando devidamente aplicáveis.

As diferenças entre as médias geométricas de IE para os diferentes extratos antigênicos (Dp bruto, FLConA e FNLCOnA), nos grupos estudados, foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, com o sub-teste de comparação múltipla de Dunn, após serem submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.

A correlação entre os níveis médios de IgE específicos aos diferentes extratos foi avaliada pelo teste de correlação de Spearman.

Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Todos os cálculos estatísticos e gráficos foram realizados utilizando os programas computacionais GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA) e Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, EUA).

3.14. Biossegurança

Todos os procedimentos citados, incluindo coleta e manuseio de materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos citados acima foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Chaves-Borges e Mineo (1997).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção das frações de *D. pteronyssinus* não ligantes e ligantes de ConA

O ensaio de cromatografia de afinidade utilizando ConA-*Sepharose* foi utilizado para dividir o extrato Dp bruto em duas frações distintas: uma não ligante de ConA (FNLConA) e uma ligante de ConA (FLConA).

A FIGURA 1 representa o cromatograma referente ao ensaio realizado. Cada tubo coletor conteve aproximadamente 2 mL de amostra fracionada pela coluna, sendo estes monitorados por espectrofotometria, a 280 nm.

Um total de 15 mg de proteínas, em volume de 1 mL, foi aplicado na coluna de ConA-*Sepharose*, onde a eluição com PBS, a 10 mM, resultou em um pico formado pelas frações de 1 a 12. Estas foram misturadas, concentradas e após diálise, constituíram a FNLConA.

No momento em que a D.O. atingiu um nível basal, com valores próximos de zero, uma solução de metil- α -D-manopiranosídeo 100 mM foi adicionada e dois picos foram formados (frações entre 41 a 48 e entre 65 a 70), com valores de D.O. acima de 0,3. Este picos indicaram a eluição das frações ligantes de ConA.

A análise em SDS-PAGE mostrou um perfil protéico semelhante entre o primeiro e o segundo pico e, por esse fato, as frações que os constituíram foram misturadas, concentradas e dialisadas, originando FLConA.

A quantidade de proteínas presente no extrato Dp, na FNLConA e FLConA, após a concentração foi de 15 mg/mL, 1,3 mg/mL e 0,5 mg/mL, respectivamente. A dosagem de carboidratos no extrato e frações foi de 12,5 mg/mL, 1,7 mg/mL e 9 mg/mL, respectivamente.

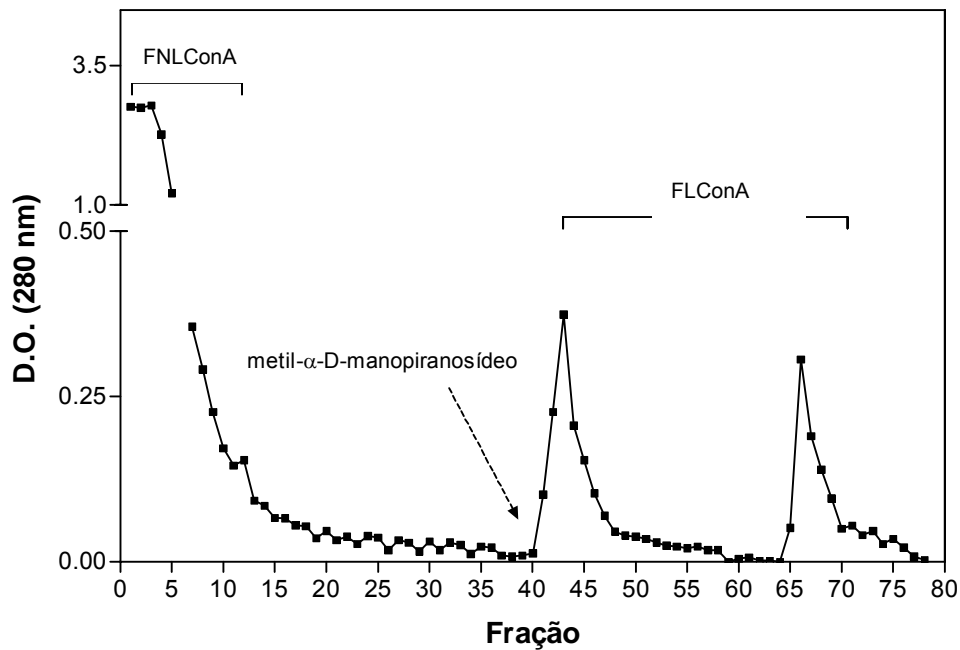


FIGURA 1. Eluição do extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto) em coluna de afinidade de ConA-Sepharose. O primeiro pico representa as frações não ligantes de ConA, eluídas com PBS 10 mM e o segundo pico representa as frações ligantes de ConA, eluídas com metil α -D-manopiranosídeo 100 mM. Ambas as frações foram misturadas, de acordo com os valores de densidade óptica, constituindo, respectivamente, FNL-ConA e FL-ConA.

4.2. Dados clínicos e demográficos

Oitenta e quatro indivíduos foram selecionados para o estudo. Um questionário clínico, elaborado pelo ISAAC (1998), foi utilizado para determinação do quadro de alergia entre os sujeitos desse estudo. As perguntas foram elaboradas para que os indivíduos as respondessem de forma concisa. A aplicação do questionário foi realizada pelo médico alergologista, e qualquer observação adicional foi precisamente anotada. Nenhum caso de rejeição de resposta ao questionário foi notificado.

Dentre os indivíduos do estudo, 43 (51,2%) apresentaram sintomas característicos de asma e/ou rinite alérgica. Estes indivíduos também apresentaram

positividade ao TCP para o extrato de *D. pteronyssinus*, e por isso, foram agrupados (grupo DP+). Deste número, somente 4 (9,3%) apresentaram sintomas sugestivos de asma de origem alérgica, apresentando quadro de sibilos, dispnéias ou tosse seca de origem não gripal. Todos estes pacientes asmáticos (100%) também apresentaram sintomas sugestivos de rinite alérgica, como espirros, coriza e/ou lacrimejamento nos olhos. No entanto, os demais pacientes sintomáticos (90,7%) relataram somente sintomas indicativos de rinite.

Os indivíduos que não apresentaram sintomas de doença alérgica e foram negativos ao TCP, para todos os alérgenos testados, foram devidamente agrupados (grupo NA).

Os dados referentes à faixa etária dos pacientes e indivíduos agrupados, segundo critérios previamente estabelecidos, estão reportados na TABELA 1. De acordo com o critério de seleção adotado, não seria permitido o recrutamento de indivíduos com idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos, desta forma, a faixa etária dos recrutados para o estudo foi entre 18 e 57 anos. A idade média dos pacientes do grupo DP+ foi de $24,6 \pm 6,8$ anos (média \pm desvio padrão) e dos indivíduos do grupo NA foi de $29,5 \pm 12,7$ anos.

A quantidade de indivíduos recrutados do sexo feminino (73,8%) foi superior ($P < 0,001$) à do sexo masculino (26,2%), o que foi resultado da diferença encontrada nos grupos, pois o grupo DP+ foi composto de 72% de mulheres e 28% de homens e o grupo NA, de 75% de mulheres e 25% de homens.

TABELA 1

Distribuição por idade, sexo, história clínica e resultado de TCP (diâmetro médio de pápula e positividade) de pacientes alérgicos e TCP positivo a extrato bruto de *D. pteronyssinus* (DP+) e de indivíduos não alérgicos (NA). Ao TCP um resultado positivo foi determinado a partir do diâmetro médio de duas medidas perpendiculares da pápula formada e definido como ≥ 3 mm em relação ao controle negativo da reação.

Características	Grupos	
	DP+	NA
Número de indivíduos	43	41
Idade média \pm desvio-padrão (ano)	24,6 \pm 6.8	29,5 \pm 12.7
Gênero (M/F)	12/31	10/31
Positividade ao TCP (tamanho médio da pápula, mm)		
<i>D. pteronyssinus</i>	9,9 \pm 3,0 ^a	–
<i>D. farinae</i>	7,9 \pm 2,5 ^b	–
<i>B. tropicalis</i>	6,2 \pm 3,5 ^b	–
Co-reatividade frente ao extrato de <i>D. pteronyssinus</i> , pelo TCP (n, %)		
<i>D. pteronyssinus</i> (+) / <i>D. farinae</i> (+)	43 (100%) ^a	–
<i>D. pteronyssinus</i> (+) / <i>D. farinae</i> (-)	0	–
<i>D. pteronyssinus</i> (+) / <i>B. tropicalis</i> (+)	37 (86%) ^b	–
<i>D. pteronyssinus</i> (+) / <i>B. tropicalis</i> (-)	6 (14%) ^c	–

(+) positivo; (-) negativo. – ausente. ^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os extratos ($P < 0,05$).

4.3. Teste cutâneo de puntura a extratos de ácaros da poeira domiciliar

O teste cutâneo de puntura (TCP) foi utilizado como ensaio *in vivo* para verificar a reatividade dos indivíduos frente aos extratos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*.

Um resultado de TCP positivo foi dado pelo tamanho ortogonal médio da pápula acima de 3 mm em relação ao controle negativo. O tamanho da pápula para o extrato de *D. pteronyssinus*, no grupo DP+ foi superior ao extrato de *D. farinae* (9,9 versus 7,9 mm; $P < 0,05$) e ao extrato de *B. tropicalis* (9,9 versus 6,2 mm; $P < 0,001$). Todavia, não houve diferença entre os tamanhos médios das pápulas formadas pelos extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis* (7,9 versus 6,2 mm), como indicado na TABELA 1.

Como parte do processo de agrupamento dos indivíduos participantes do estudo, todos os pacientes (100%) do grupo DP+ apresentaram positividade ao extrato de *D. pteronyssinus*. Uma absoluta concomitância (100%) de reatividade entre *D. pteronyssinus* e o extrato de *D. farinae* foi observada. Entretanto, a percentagem de pacientes positivos ao extrato de *B. tropicalis* foi menor, comparado ao extrato de *D. pteronyssinus* (86%; $P < 0,05$), como observado na TABELA 1.

Nenhum indivíduo do grupo NA apresentou positividade ao TCP.

4.4. IgE específica ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* e suas frações

4.4.1. Níveis de IgE específica a Dp bruto, FNLCOnA e FLCOnA

O ensaio imunoenzimático ELISA foi utilizado para determinar os níveis de IgE específica ao extrato Dp bruto e suas frações. Esses anticorpos foram dosados nos soros de pacientes com TCP positivo a *D. pteronyssinus* (grupo DP+) e de indivíduos não alérgicos (grupo NA). Assim, a FIGURA 2 representa os níveis de IgE específica aos diferentes extratos e frações, nos diferentes grupos estudados.

As médias geométricas dos níveis de IgE específica a Dp bruto (6,0 IE), FNLCOnA (6,6 IE) e FLCOnA (2,1 IE) foram significativamente maiores em pacientes do grupo DP+, quando comparadas ao grupo NA (0,8; 0,7 e 0,9 IE, respectivamente; $P < 0.001$).

O limiar de positividade no teste ELISA para detecção de IgE específica a alérgenos de *D. pteronyssinus* presente no extrato Dp bruto e em suas frações ligante e não ligante de ConA foi considerado 1,2 IE, com o objetivo de excluir valores próximos a 1,0 IE, possíveis de ocorrer quando a D.O da amostra é igual ao limiar de positividade da reação. Desta forma, todos pacientes (100%) do grupo DP+ apresentaram níveis de IgE específica a Dp bruto iguais ou acima desse valor, ao passo que 40 (93%) e 33 (77%) amostras de soros testadas de pacientes desse grupo foram positivos a FNLCOnA e FLCOnA, respectivamente.

Diferenças significativas foram observadas entre os níveis médios de IgE específica a Dp bruto e a FLCOnA, nos pacientes do grupo DP+ (6,0 *versus* 2,1 IE; $P < 0,001$). Diferença semelhante foi encontrada quando os níveis médios de IgE específica a FNLCOnA e FLCOnA foram comparados nesse mesmo grupo de pacientes (6,6 *versus* 2,1 IE; $P < 0,001$).

Não houve diferença entre os níveis de IgE específica a Dp bruto e FNLConA no grupo DP+, bem como a nenhum dos extratos e frações testadas no grupo NA.

Nenhuma das amostras de soro de indivíduos do grupo NA apresentou níveis acima do limiar de positividade ao extrato e às frações testadas.

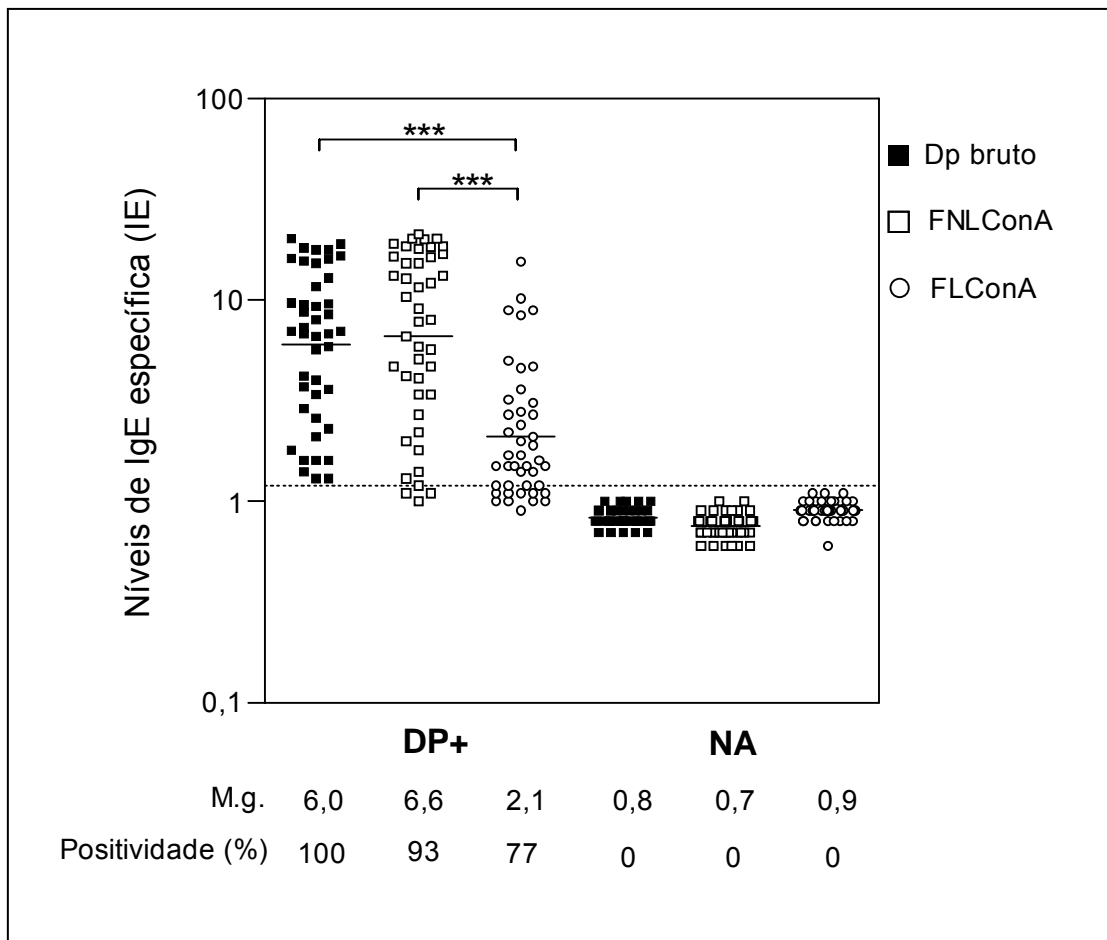


FIGURA 2. Níveis de IgE sérica específica ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto) e suas frações não ligante e ligante de Concanavalina A (FNLConA e FLConA, respectivamente), expressos em Índice ELISA (IE), no soro de 43 pacientes com TCP positivo a *D. pteronyssinus* (DP+) e 41 indivíduos não alérgicos (NA). As barras horizontais indicam as médias geométricas (M.g.), cujos valores estão também indicados. A linha pontilhada representa o limiar de positividade (IE = 1,2). As porcentagens de positividade (IE \geq 1,2) estão reportadas na parte inferior. *** P < 0,001

4.4.2. Correlação entre os níveis de IgE específica a Dp bruto e FNLConA/FLConA

Uma correlação positiva alta entre os níveis de IgE específica no grupo DP+ a Dp bruto e FNLConA foi observada ($r = 0,929$; $P < 0,001$). Analogamente, os níveis de IgE específica a Dp bruto e FLConA também se correlacionam ($r = 0,869$; $p < 0,001$), como representado na FIGURA 3.

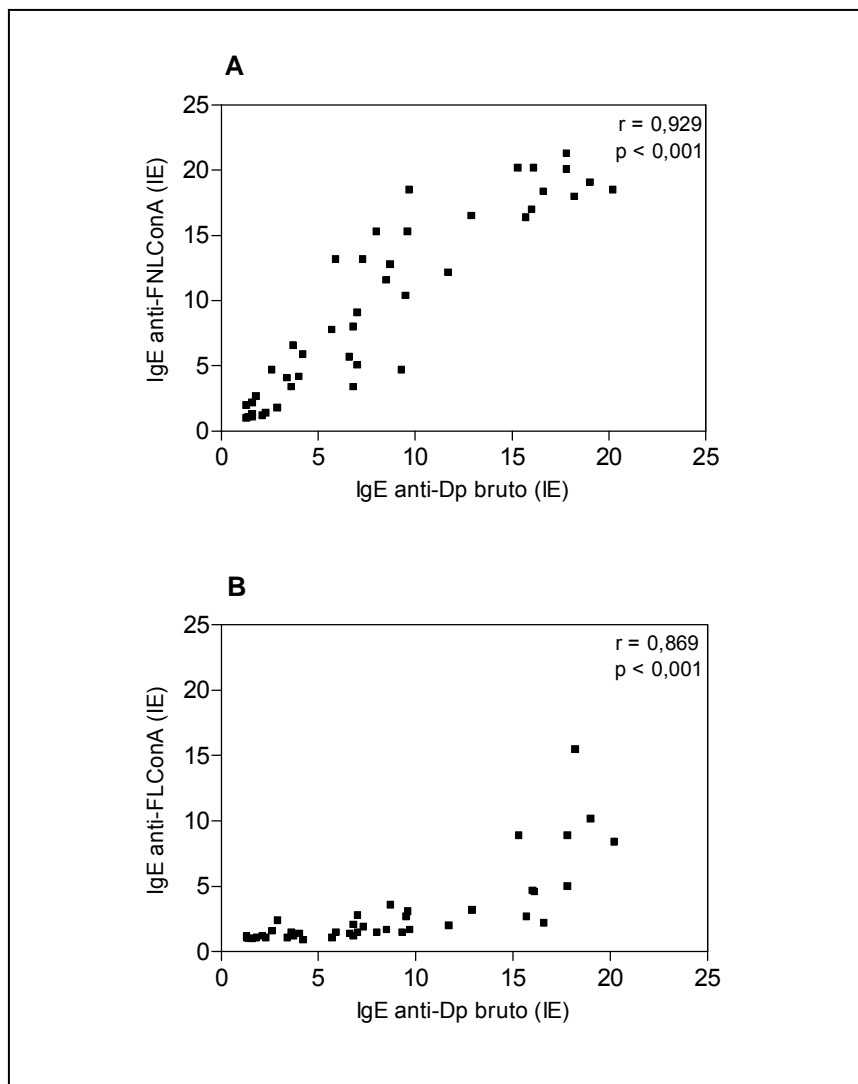


FIGURA 3. Correlação entre os níveis de IgE específica ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (anti-Dp bruto) e (A) frações não ligante (anti-FNLConA) e (B) ligante (FLConA) de Concanavalina A. O coeficiente de correlação foi calculado pelo teste de correlação de Spearman.

4.5. Reatividade cruzada entre antígenos de ácaros relacionados

A especificidade antigênica dos ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgE específica a alérgenos do extrato Dp bruto e FLConA foi avaliada através de imunoensaio de inibição competitiva, empregando como inibidores, extratos Dp, Df e Bt brutos e antígenos irrelevantes, como Concanavalina A (ConA) e toxóide tetânico (TT). A porcentagem de inibição indicou a presença de reatividade cruzada entre o extrato Dp bruto e FLConA frente aos extratos homólogos e heterólogos e a antígenos irrelevantes.

Assim, todos os componentes utilizados como inibidores apresentaram curvas dose-dependentes, em concentrações crescentes de Dp bruto, FLConA, Df bruto, Bt bruto e antígenos irrelevantes (TT e ConA) (FIGURA 4).

Quando o extrato Dp bruto foi aplicado à fase sólida da placa (FIGURA 4A), uma alta porcentagem de inibição foi observada pelos componentes homólogos (94% por Dp bruto e 93% por FLConA), que assim o fizeram em concentrações máximas de 100 µg/mL. As concentrações destes componentes, onde a metade da inibição foi alcançada (I_{50}), foram de 0,3 e 11 µg/mL, respectivamente. Em relação à inibição heteróloga, uma curva dose-dependente similar foi observada entre os extratos Dp bruto e Df bruto, cujo valor de I_{50} foi de 0,9 µg/mL.

Altas porcentagens de inibição homóloga foram observadas quando FLConA foi aplicado à fase sólida (FIGURA 4B). Os valores de 86% e 76% de inibição por Dp bruto e FLConA (I_{50} = 0,3 e 0,9 µg/mL, respectivamente) alcançados se contrastaram com os valores de inibição heteróloga, onde 64% de inibição foi alcançado por Df bruto (I_{50} = 0,8 µg/mL).

Com relação ao extrato Bt bruto, valores negligíveis de inibição da ligação da IgE ao Dp bruto (8% de inibição) e a FLConA (9% de inibição) por parte deste componente foram observados. De maneira análoga, não houve inibição por parte dos antígenos irrelevantes (ConA e TT) nas reações em que Dp bruto e FLConA foram aplicados à fase sólida.

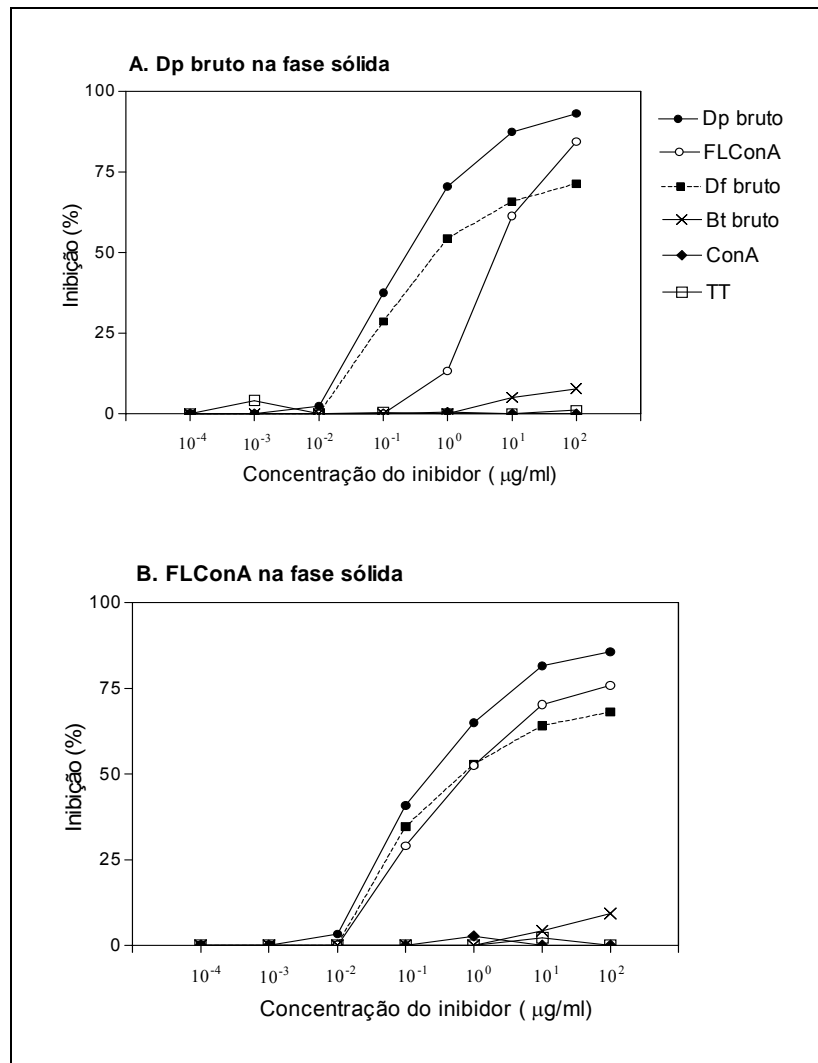


FIGURA 4. Curvas de inibição de ELISA utilizando (A) o extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto) e (B) fração ligante de Concanavalina A (FLConA) na fase sólida. Os extratos Dp bruto, FLConA, Df bruto e Bt bruto foram submetidos a diluições decimais seriadas de 10² a 10⁻⁴ µg/mL em solução diluente de PBS-T-BSA e incubados em uma mistura de seis soros de pacientes do grupo DP+. Toxóide tetânico (TT) e Concanavalina A (ConA) foram utilizados como antígenos irrelevantes.

4.6. Perfil protéico do extrato Dp bruto e suas frações

O extrato Dp bruto, bem como FNLCOnA e FLCOnA foram submetidos a SDS-PAGE, a 12%, para análise do perfil protéico dos mesmos.

A FIGURA 5 ilustra o perfil eletroforético do extrato Dp bruto e suas frações, após coloração com nitrato de prata.

Foram visualizados componentes protéicos de Dp bruto por toda extensão do gel (FIGURA 5, faixa 1), com massas moleculares variando de 14 a 125 kDa, porém, com predominância de bandas protéicas de 22 kDa, 25 kDa, 26 kDa, 74 kDa, 81 kDa, 102 kDa, 103 kDa e 116 kDa. Algumas bandas não individualizadas, entre 14 e 17 kDa, também foram observadas no extrato Dp bruto e na FNLCOnA.

Um perfil diferente foi apresentado na FNLCOnA (FIGURA 5, faixa 2), no qual apenas bandas protéicas de massa molecular baixa (abaixo de 26 kDa) foram detectadas. Entretanto, não foi possível a individualização destas bandas, apenas uma forte coloração de dois grupos de bandas, um entre 14 e 17 kDa e outro entre 24 e 26 kDa.

Um amplo perfil de bandas protéicas foi detectado na FLCOnA, cujas massas moleculares aparentes encontradas foram entre 22 e 116 kDa (FIGURA 5, coluna 3), com destaques para 22 kDa, 25 kDa, 26 kDa, 32 kDa, 36 kDa, 47 kDa, 57 kDa, 74 kDa, 81 kDa, 103 kDa e 116 kDa. Uma complementaridade do perfil protéico de FLCOnA foi observada, caracterizada pela presença de bandas protéicas de massa molecular alta que estavam presentes em Dp bruto, porém, não em FNLCOnA. Algumas destas bandas apresentaram massa molecular aparente de 36 kDa, 74 kDa, 81 kDa e 103 kDa.

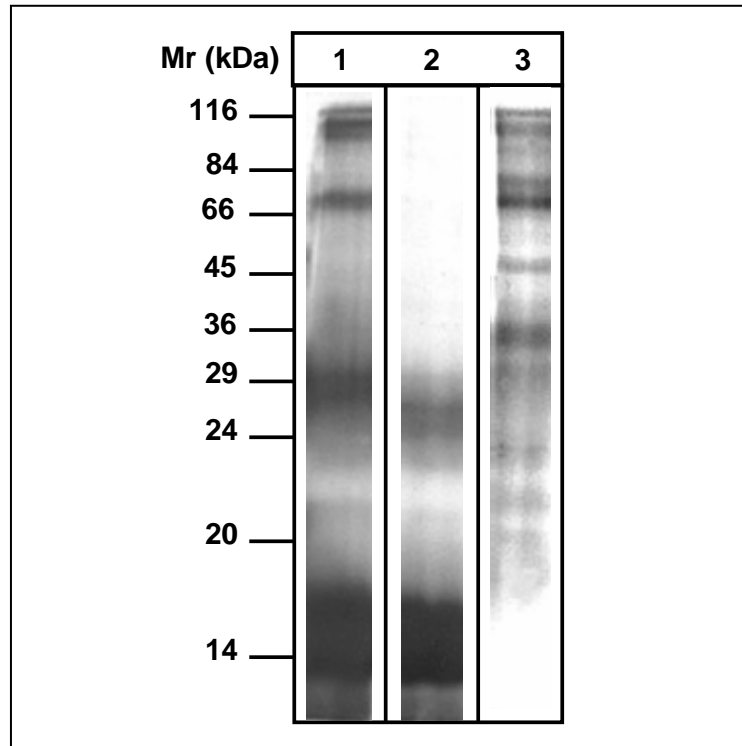


FIGURA 5. Perfil eletroforético do extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto, faixa 1), fração não ligante de ConA (FNLConA, faixa 2) e fração ligante de ConA (FLConA, faixa 3) em SDS-PAGE a 12%, corado por nitrato de prata. Mr: massa molecular de referência, em kilodaltons (kDa).

4.7. Componentes antigênicos de Dp bruto e FLConA reconhecidos por IgE

A capacidade de reconhecimento dos componentes presentes no extrato Dp bruto e FLConA pela IgE foi avaliada, por *Immunoblotting*, em dez soros de pacientes do grupo DP+ e dez soros de indivíduos do grupo NA.

Três soros representativos do grupo DP+, para o extrato Dp e sua fração FLConA estão representados na FIGURA 6A, faixas 1 a 6). As colunas 7 e 8 ilustram soros de indivíduos do grupo NA, testados com o extrato Dp e FLConA, respectivamente.

Todos os soros do grupo DP+ (100%) testados foram reativos a pelo menos um componente alergênico do extrato Dp bruto e de FLConA.

A IgE sérica de pacientes do grupo DP+ reconheceu, em Dp bruto, sobretudo componentes com massas moleculares aparentes de 14 a 17 kDa, 24 a 26 kDa, 55 a 62 kDa, 66 kDa, 71 kDa, 103 kDa, and 116 kDa.

A frequência percentual relacionada ao reconhecimento destes componentes por parte da IgE dos pacientes alérgicos apresentou valores variáveis. No grupo DP+, uma ampla percentagem IgE sérica dos pacientes (90%) reconheceu componentes com massas moleculares entre 14 e 17 kDa, além disso, 80% dos soros apresentaram um reconhecimento de bandas entre 22 a 26 kDa e 60% reconheceram o componente de 103 kDa. Opostamente, nenhum dos soros dos indivíduos do grupo NA apresentaram reconhecimento de componentes do extrato Dp bruto.

Em FLConA, observou-se uma predominância no reconhecimento de componentes da massas moleculares altas, sendo que aqueles que apresentaram valores iguais a 66 KDa, 81 kDa e 116 kDa foram os mais reconhecidos (86%, 71% e 71%, respectivamente). Ao contrário de Dp bruto, os componentes de FLConA com valores de 14 a 17 kDa, 35 kDa e 95 kDa não foram reconhecidos por nenhum soro dentre os pacientes alérgicos. Do mesmo modo, não houve reconhecimento de quaisquer componentes desta fração por parte da IgE proveniente do soro de indivíduos do grupo NA.

A FIGURA 6B reporta a frequência percentual de componentes reconhecidos pela IgE de pacientes do grupo DP+.

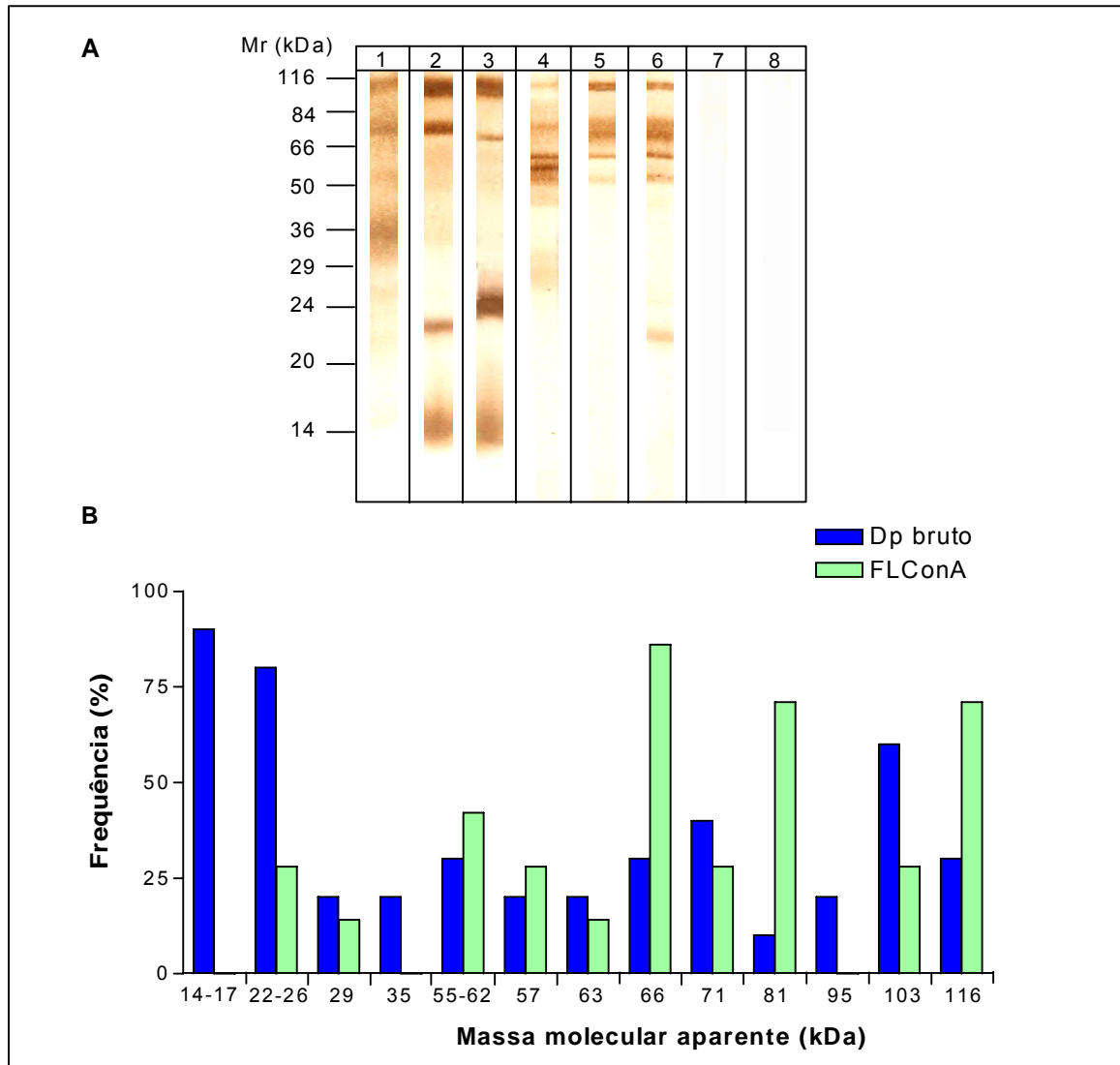


FIGURA 6. (A) Componentes do extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto, faixas 1 a 3) e fração ligante de Concanavalina A (FLConA, faixas 4 a 6) reconhecidos por três soros de pacientes do grupo DP+ por meio de *Immunoblotting*. O soro de um indivíduo do grupo NA foi reagido com Dp bruto (faixa 7) e FLConA (faixa 8). As massas moleculares de referência estão indicadas, em kilodaltons. A frequência percentual (B) das bandas reconhecidas pelos pacientes do grupo DP+ também estão reportadas.

5. DISCUSSÃO

Alérgenos geralmente são constituídos por um grande número de proteínas, dentre elas, incluindo glicoproteínas. Alguns epítomos destes alérgenos consistem de cadeias de carboidratos (STEWART; THOMPSON, 1996), constituindo sítios imunogênicos - epítomos de células T - ou sítios de ligação de IgE - epítomos de células B -, que variam em tamanho e quantidade. A diversidade de reatividade dessas glicoproteínas está intimamente ligada a esses fatores (MALANDAIN, 2005).

Devido à sua afinidade por componentes que contenham carboidratos, as lectinas são freqüentemente utilizadas na obtenção de extratos glicosilados (GUPTA et al., 1996; VAN DIE et al., 2000) e a ConA é uma destas. Ela é uma lectina vegetal que geralmente apresenta sítios de ligação aos açúcares comuns α -D-manose e β -D-glicose, além de resíduos estereoquimicamente relacionados a estes (SCRIBA, 2004). Devido a esse fato, ensaios imunológicos e bioquímicos, utilizando a ConA, têm sido desenvolvidos com a finalidade de isolar esses componentes e determinar suas funções biológicas (GUPTA et al., 2004).

No presente estudo, frações não ligantes (FNLConA) e ligantes (FLConA) dessa lectina foram obtidas do extrato bruto de *D. pteronyssinus*, por cromatografia de afinidade de ConA-*Sepharose*. Essas frações foram visualizadas por SDS-PAGE, que revelou um perfil de componentes complementar ao extrato Dp bruto, no qual bandas protéicas que estavam presentes em Dp bruto antes do fracionamento foram também visualizadas em uma das frações.

Na FNLConA, os componentes protéicos apresentaram massa molecular aparente na faixa de 14 a 30 kDa, possivelmente constituídos por proteínas, ou mesmo glicoproteínas não constituídos de resíduos de carboidratos com afinidade à

ConA, como por exemplo, derivados de α -D-manose e β -D-glicose, anteriormente mencionados.

Por outro lado, o perfil eletroforético revelou uma amplitude maior na FLConA, quanto à presença de componentes. Várias bandas protéicas, com massas moleculares aparentes de 22 a 116 kDa, foram visualizadas e uma similaridade, na faixa compreendida entre as bandas de 20 a 30 kDa, foi notada, quando comparadas à FNLCOnA. Esse fato não implica que estes componentes apresentam a mesma composição bioquímica, pois, possivelmente os elementos presentes na FLConA se constituem de moléculas que contenham cadeias de carboidratos ligantes de ConA. Opostamente, a FNLCOnA pode ser composta de proteínas simples ou de glicoproteínas não ligantes a essa lectina.

Até o momento, pelo menos dezenove grupos de alérgenos originados de ácaros do gênero *Dermatophagoides* já foram caracterizados e a maioria deles são descritos como proteínas de baixa massa molecular (em torno de 14 a 60 kDa) ou glicoproteínas com estruturas e propriedades bioquímicas diversificadas (THOMAS et al., 2002; STEWART; THOMPSON, 1996).

Estudos apontam que os alérgenos mais importantes do gênero *Dermatophagoides* estão incluídos no grupo 1 (aproximadamente 25 kDa) e no grupo 2 (aproximadamente 14 kDa), por serem reconhecidos por mais de 80% dos pacientes alérgicos a esses ácaros (HALES; SHEN; THOMAS, 2000; HALES et al., 2002).

Dentre os alérgenos de *D. pteronyssinus*, alguns podem apresentar potenciais sítios de glicosilação, como relatado por Kawamoto et al. (2002) e Thomas; Smith (1998). Essas moléculas apresentam massas moleculares aproximadas iguais a 22

kDa, 25 kDa, 26 kDa, 57 kDa e 103 kDa, que correspondem aos alérgenos dos grupos 7, 1, 8, 4 e 11, respectivamente. Alguns desses valores de massa molecular também foram encontrados no presente estudo, como demonstrado por SDS-PAGE, sugerindo que a cromatografia de afinidade de ConA-Sepharose isolou, de maneira efetiva, alguns glicoconjugados do extrato bruto de *D. pteronyssinus*.

Um componente com massa molecular aparente de 25 kDa foi visualizado em ambas as frações, bem como no próprio extrato Dp bruto. Uma possível explicação para esse fato se remete na descrição de antígenos diferentes e com massas moleculares semelhantes, além da presença (alérgenos do grupo 1) ou ausência (alérgenos dos grupos 3 e 6) de sítios de glicosilação, como descrito por Kawamoto et al. (2002). Desta forma, uma melhor compreensão deste achado poderá ser validada através de estudos detalhados sobre a estrutura molecular deste elemento.

As bandas protéicas com massas moleculares abaixo de 10 kDa presentes no extrato bruto de *D. pteronyssinus* podem atuar como haptenos (THOMAS; SMITH, 1998) . A diálise em sistema Amicon utilizado nesse estudo explica possivelmente a ausência dessas bandas protéicas, pois foram utilizadas membranas com ponto de corte igual a 10 kDa, implicando em perda de componentes protéicos menores a esse valor.

A seleção dos pacientes participantes desse estudo foi feita por meio de avaliação clínica e TCP. Com relação ao diagnóstico clínico, todos os pacientes alérgicos selecionados apresentaram sintomas característicos de rinite e uma pequena porcentagem relatou a presença de sintomas sugestivos de asma.

Voorhorst (1977) associou a presença de ácaros do gênero *Dermatophagoides* na poeira domiciliar à prevalência de distúrbios respiratórios,

incluindo rinite e asma. No presente estudo, todos os pacientes alérgicos foram positivos ao TCP para os extratos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, sendo que a alta frequência de positividade a este último, através do TCP, pode ser explicada pelos altos índices do alérgeno (Der f 1) desse ácaro encontrado no município de Uberlândia, por Sopelete et al. (2000), maiores inclusive que os de *D. pteronyssinus* (Der p 1), por meio de coleta de poeira domiciliar e dosagem *in vitro* desses alérgenos por ELISA.

A resposta de IgE a Dp bruto e sua fração ligante de ConA foi avaliada pelos ensaios ELISA e *Immunoblotting*. O ensaio imunoenzimático tem sido utilizado como uma das principais técnicas *in vitro* no diagnóstico de alergias, de forma complementar ao TCP. Sua adoção na dosagem de anticorpos reativos a antígenos presentes nas frações ligantes de ConA foi relatada em décadas passadas, por Baldo e Uhlenbruck (1977) e Stewart e Turner (1980), em extrato de *Dermatophagoides*, porém, o perfil de reconhecimento das bandas protéicas presentes na fração ligante de ConA derivada de *D. pteronyssinus*, pela IgE de pacientes alérgicos, por *Immunoblotting*, não foi avaliado até o momento.

A resposta anticórpica foi distinta entre os componentes testados, exceto entre Dp bruto e FNLConA. O índice de reatividade semelhante entre o extrato bruto e a fração que não apresentou afinidade com ConA e a diferença para com a fração ligante é explicada pela separação de epítopos. Nesse contexto, o fracionamento de Dp bruto, por cromatografia de afinidade de ConA-*Sepharose* foi responsável por isolar componentes antigênicos que foram reconhecidas pela IgE de alguns pacientes. Devido à diminuição na quantidade de componentes presentes em FLConA, pela seleção cromatográfica, alguns soros não reconhecem esses

epítomos, que certamente estariam na FNLCOnA. A presença de epítomos imunodominantes selecionados nessa fração seria um importante fator de reflexão sobre a utilização desse extrato em imunoterapia hipossensibilizante, uma vez que aumentaria sua especificidade e diminuiria a sensibilização dos pacientes a novos epítomos, pois a imunoterapia utilizando o extrato bruto expõe os pacientes a todas as proteínas presentes no extrato, mesmo àquelas que seus anticorpos antes não reconheciam. Para isto, será necessária uma exploração a respeito do mecanismo de resposta imune aos componentes presentes em FLConA no contexto de apresentação antigênica e ativação de células T.

A análise do perfil de bandas revelou que os soros dos pacientes do grupo DP+ reconheceram com maior frequência componentes de alta massa molecular, contrastando com um estudo de Hong; Lee; Oh (1991), onde a maior prevalência de reconhecimento pela IgE foi de bandas protéicas de baixa massa molecular.

Uma alta correlação positiva verificada entre os extratos é reflexo da existência de uma similar alergenicidade entre extrato Dp e frações ligantes e não ligantes de ConA. Entretanto, uma correlação discretamente alta foi observada entre Dp bruto e FNLCOnA, quando comparado à FLConA. Uma explicação para isso se deve aos alérgenos de grande importância na sensibilização, como por exemplo Der p 2 (THOMAS et al., 2002). Uma banda protéica com massa molecular aparente semelhante a este alérgeno foi encontrada em Dp bruto e FNLCOnA, o que pode sugerir a sua presença. Entretanto, somente a utilização de técnicas mais específicas poderá elucidar este fato.

A reatividade cruzada entre os ácaros é descrita como uma co-variação da sensibilização e a maioria dos pacientes alérgicos são co-sensibilizados a *D.*

pteronyssinus e *D. farinae*, devido aos 80% e 88% de homologia observados entre os alérgenos de 25 kDa (grupo 1) e 14 kDa (grupo 2), como discutido por Sidenius et al. (2001). Os resultados do presente estudo confirmam essa reatividade cruzada, uma vez que a suspeita desse fato, dado pela co-positividade entre esses ácaros, pelo TCP, foi confirmada pelo ELISA de inibição competitiva, onde uma inibição heteróloga de Dp bruto por Df bruto foi observada. Além disso, houve uma inibição homóloga tanto por Dp bruto quanto por FLConA, quando ambos foram aplicados na fase sólida.

Com relação ao extrato Bt bruto, o ensaio imunoenzimático realizado nas concentrações empregadas nesse estudo mostrou uma irrelevante reatividade cruzada entre *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*, contrariamente aos estudos publicados por Arruda et al. (1997), que justificaram a homologia entre os antígenos desses ácaros como uma causa de 33% de reatividade cruzada encontrada, por ELISA.

Estudos apontam que glicoconjugados são freqüentemente reconhecidos pela IgE humana e que os chamados carboidratos determinantes de reatividade cruzada são geralmente responsáveis pelas reatividades entre extratos alérgenos de espécies não relacionadas (MARI et al., 1999). Adicionalmente, para que estes conjugados possam exercer uma atividade biológica considerável, há a necessidade da presença de epítomos polivalentes de carboidratos, como mencionado por Fötish et al. (1999), e alguns desses já foram caracterizados em plantas. Em um estudo conduzido por Iacovacci et al. (2001), realizado em plantas, os epítomos glicoprotéicos de cipreste (*Cupressus amazonica*) reconhecidos pela IgE de pacientes alérgicos foram caracterizados quanto à resposta imune e um fato

interessante é que, além desses epítomos, os anticorpos dos pacientes reconheceram glicoproteínas de extratos de outros polens. Nesse sentido, a reatividade cruzada observada nesse estudo poderia estar intimamente relacionada aos carboidratos, uma vez que os extratos aplicados na fase sólida apresentavam quantidades consideráveis dessas biomoléculas.

O ensaio de *immunoblotting* revelou que varias bandas protéicas foram reconhecidas simultaneamente por Dp bruto e FLConA. Algumas dessas bandas não estão descritas na literatura com os mesmos valores de massa molecular, no entanto, como um mesmo alérgeno pode se constituir de carboidratos ligantes e não ligantes de ConA, possivelmente o fracionamento do extrato Dp resultou na separação de glicoproteínas que apresentaram afinidade com a ConA, como por exemplo α -D-manose e β -D-glicose.

Portanto, uma investigação a respeito dos sítios glicosilados presentes na FLConA e reconhecidos pela IgE de pacientes alérgicos a *Dermatophagoides* precisará ser realizada, de modo a esclarecer o seu papel na resposta imune. De forma complementar, a utilização desta fração como uma potencial ferramenta em estudos de exposição, sensibilização e imunoterapia específica poderão ser também avaliadas.

6. CONCLUSÕES

- A cromatografia de afinidade de ConA-Sepharose é uma importante ferramenta envolvida no fracionamento de componentes glicosilados derivados de *Dermatophagoides pteronyssinus*;
- Frações não ligantes e ligantes de Concanavalina A (ConA) derivados de *D. pteronyssinus* se constituem de componentes capazes de induzir a síntese de IgE em pacientes alérgicos;
- Alérgenos presentes no extrato bruto de *D. pteronyssinus* e em suas frações ligantes de ConA podem apresentar uma reatividade cruzada homóloga entre si e heteróloga com alérgenos de *D. farinae*, frente a IgE de pacientes alérgicos;
- Componentes do extrato bruto de *D. pteronyssinus* e de suas frações ligantes de ConA apresentam perfis diferentes no reconhecimento por parte da IgE, sendo que estes anticorpos parecem reconhecer bandas protéicas de alta massa molecular na fração analisada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS²

² De acordo com:

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

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

ALLERGEN NOMENCLATURE. Disponível em: <www.allergen.org/list.htm>. Visitado em: 04 fev. 2006.

ARLIAN, L. G.; BERNSTEIN, I. L.; VYSZENSKI-MOHER, D. L.; GALLAGHER, J. S. Investigations of culture medium-free house dust mite. III: Antigens and allergens of body and fecal extract of *Dermatophagoides farinae*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 79, n. 3, p. 457-466, Mar. 1987.

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M.S.; NEAL, J.S. Dust mite allergens: ecology and distribution. **Current Allergy and Asthma Reports**, Philadelphia, v. 2, n. 5, p. 401-411, Sep. 2002.

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**, St. Louis, v. 107, p. s406-s413, Mar. 2001. Supplement 3.

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**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 433-439, Jul. 1991.

ARRUDA, L. K.; VAILES, L. D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; CHAPMAN, M. D.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; MONTEALEGRE, F.; LIN, K. L.; CHUA, K.Y.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 155, n. 1, p. 343-350, Jan. 1997.

BALDO, B. A.; UHLENBRUCK, G. Selective isolation of allergens. I. Reaction of house dust mite extracts with tridacnin and concanavalin A and examination of the allergenicity of the isolated components. **Clinical Allergy**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 429-443, Sep. 1977.

BATES, J. M.; MAHAFFY, D. J. Relationships of reported allergy symptoms, relative humidity, and airborne biologicals in thirteen Florida classrooms. In: **Indoor air**, Nagoia, Japan, 1999, p. 551-556.

BILENKI, L.; WANG S.; YANG J.; FAN, Y.; JOYEE, A.G.; YANG, X. NK T cell activation promotes *Chlamydia trachomatis* infection *in vivo*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.175, p.3197-206, 2005.

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

CTA - COMISSÃO DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANATOMIA. Terminologia anatômica. São Paulo: Manole, 2001. 248 p.

CUNNINGHAM, B. A.; WANG, J. L.; WAXDAL, M. J.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F3, **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, n. 4, p.1503-1512, Feb. 1975.

CUSTOVIC, A.; TAGGART, S. C. O.; WOODCOCK, A. House dust mite and cat allergens in different indoor environments. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1164-1168, Dec. 1994.

DEVOS, S.; CORMONT, F.; VRTALA, S.; HOOGHE-PETERS, E.; PIRSON, F.; SNICK, J. Allergen-induced interleukin-9 production *in vitro*: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 174-182, Feb. 2006.

EBO, D. G.; HAGENDORENS, M. M.; BRIDTS, C. H.; DE CLERCK, L. S.; STEVENS, W. J. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: mimickers of allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 137-144, Jan. 2004.

EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A.; REECKE, G. N.; BECKER, J. W.; WAXDAL, M. W.; WANG, J. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 69, n. 9, p. 2580-2584, Sep. 1972.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Structures of the *Erythrina corallodendron* lectin and of its complexes with mono and disaccharides. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 277, n. 4, p. 917-932, Apr. 1998.

FOARDE, K.; BERRY, M. Comparison of biocontaminant levels associated with hard vs. Carpet floors in nonproblem schools: results of a year long study. **Journal of**

Exposure Analysis and Environmental Epidemiology, Princetown, v. 14, p. s41-s48, 2004. Supplement 1.

FÖTISH, K.; ALTMANN, F.; HAUSTEIN, D.; VIETHS, S. Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 120, n. 1, p. 30-42, Sep. 1999.

FÖTISH, K.; VIETHS, S. N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. **Glycoconjugate Journal**, Boston, v.18, n. 5, p. 373-390, May 2001.

FRIEDMAN, R.D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 126, n. 2, p. 346-349, Nov. 1982.

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

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

GUPTA, N.; MARTIN, B. M.; METCALFE, D. D.; RAO, P. V. Identification of a novel hydroxyproline-rich glycoprotein as the major allergen in *Parthenium* pollen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 98, n. 5, p. 903-912, Nov. 1996.

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

HALES, B. J.; HAZELL, L. A.; SMITH, W.; THOMAS, W. R. Genetic variations of Der p 2 allergens: effects on T-cell responses and IgE binding. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 1461-1467, Oct. 2002.

HALES, B. J.; SHEN, H. D.; THOMAS, W. R. Cross-reactivity of T-cell responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*: studies with group 1 and 7 allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 30, n.7, p. 934-943, Jul. 2000.

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

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

HELENIUS, A.; AEBI, M. Intracellular functions of N-linked glycans. **Science**, Washington, v. 291, n. 5512, p. 2364-2369, Mar. 2001.

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

HONG, C. S.; LEE, M. K.; OH, S. H. Identification of major allergens from the house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*, by electroblotting. **Yonsei Medical Journal**, v. 32, n. 1, p. 24-32, Mar. 1991.

IACOVACCI, P.; PINI, C.; AFFERNI, C.; BARLETTA, B.; TINGHINO, R.; SCHININA, E.; FEDERICO, R.; MARI, A.; DI FELICE, G. A monoclonal antibody specific for a carbohydrate epitope recognizes an IgE-binding determinant shared by taxonomically unrelated allergenic pollens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 458-465, Mar. 2001.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>. Acesso em: 20 jan. 2006.

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

ISAAC. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. **Lancet**, London, v. 351, n. 9111, p. 1225-1323, Apr. 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**, St. Louis, v. 37, n. 3, p. 169-185, Mar. 1966.

JOHANSSON, S. G.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S.; LANIER, B. Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; ORTEGA-MARTELL, J. A.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; RING, J.; THIEN, F.; VAN CAUWENBERGE, P.; WILLIAMS, H. C. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review

Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 113, n. 5, p. 832-836, May 2004.

KAWAMOTO, S.; AKI, T.; YAMASHITA, M.; TATEGAKI, A.; FUJIMURA, T.; TSUBOI, S.; KATSUTANI, T.; SUZUKI, O.; SHIGETA, S.; MUROOKA, Y.; ONO, K. Toward elucidating the full spectrum of mite allergens – state of the art. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Tokyo, v. 94, n. 4, p. 285-298, Apr. 2002.

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

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

LEBRUN, P. H.; VAN IMPE, G.; GEORGES-GRIDELET, D. S.; WAUTHY, G.; ANDRE, H. M. The life strategies of mites. In: SCHUSTER, R.; MUROHY, P. W. **The acari: reproduction, development and life-history strategies**. London: Chapman & Hall, 1991, p.3-22.

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

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

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

MALANDAIN, H. IgE reactive carbohydrate epitopes – classification, cross-reactivity and clinical impact. **Allergie et Immunologie**, Paris, v. 37, n. 4, p. 122-128, Apr. 2005.

MARI, A.; IACOVACCI, P.; AFFERNI, C.; BARLETTA, B.; TINGHINO, R.; DI FELICE, G.; PINI, C. Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 103, n. 6, p. 1005-1011, Jun. 1999.

MOODY, D. B.; GUYB, M. R.; GRANTA, E.; CHENGA, T. Y.; BRENNERA, M. B.; BESRAB, G. S.; PORCELLIA, S. A. CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 192, n. 7, p. 965-976, Oct. 2000.

NAISMITH J. H.; EMMERICH, C.; HABASH, J.; HARROP, S. J.; HELLIWELL, J. R.; HUNTER, W. N.; RAFTERY, J.; KALB, A. J.; YARIV, J. Refined structure of concanavalin A complexed with methyl alpha-D-mannopyranoside at 2.0 Å resolution and comparison with the saccharide-free structure. **Acta Crystallographica**, Copenhagen, v. 50, n. 6, p. 847-858, Nov. 1994.

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

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

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

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

PERFETTI, L.; FERRARI, M.; GALDI, E.; POZZI, V.; COTTICA, D.; GRIGNANI, E.; MINOIA, C.; MOSCATO, G. House dust mites (Der p 1, Der f 1), cat (Fel d 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in indoor work-places (offices and archives). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 328, n.1-3, p.15-21, Jul. 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**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 315-321, Mar. 1998.

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

PRENNER, C.; MACH, L.; GLOSSL, J.; MARZ, L. The antigenicity of the carbohydrate moiety of an insect glycoprotein honey-bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. The role of alpha 1,3-fucosylation of the asparagines-bound N-acetylglucosamine. **Biochemical Journal**, London, v. 284, n. 2, p.377-380, Jun. 1992.

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

RODRIGUES, R. M.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 89-93, Feb. 2004.

QUEIROZ, R. M.; MARCON, G.; ANUNCIÇÃO-FILHO, C. J.; MATOS, V. P.; CISNEIROS, R. A. Estratégias adaptativas de populações de *Stylosanthes scabra* provenientes de três regiões ecogeográficas de Pernambuco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 5, n. 2, p. 320-325, Fev. 2001

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

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

SAINI, S. S.; MCGLASHAN, D. How the IgE upregulates allergic response. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 14, n. 6, p. 694-697, Dec. 2002.

SCRIBA, G. K. E. Affinity Chromatography. In: DINGERMAN, T.; STEINHILBER, D.; FOLKERS, G. **Molecular Biology in Medical Chemistry**, 1.ed, Washington: Wiley-VCH, 2004, p. 211-241.

SCHER, M. G.; RESNECK, W. G.; BLOCH, R. Stabilization of immobilized lectin columns by crosslinking with glutaraldehyde. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 177, n. 1, p. 168-171, Fev. 1989.

SIDENIUS, K. E.; HALLAS, T. E.; POULSEN, L. K.; MOSBECH, H. Allergen cross-reactivity between house-dust mites and other invertebrates. **Allergy**, Copenhagen, v. 56, n. 8, p. 723-733, Aug. 2001.

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**, Basel, v. 122, n. 4, p. 257-263, Aug. 2000.

STEWART, G. A.; THOMPSON, P. J. The biochemistry of common aeroallergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1020-1024, Sep. 1996.

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

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

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 227, Mar. 1936.

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

TERRA, S. A.; SILVA, D. A.; SOPELETE, M. C.; MENDES, J.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite allergen levels and acarologic analysis in house dust samples in Uberaba, Brazil. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 14, n. 3, p. 232-237, Sep. 2004.

THOMAS, W. R.; SMITH, W. House-dust-mite allergens. **Allergy**, Copenhagen, v. 53, n. 9, p. 821-832, Sep. 1998.

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

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

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

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, I. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4352, Sep. 1979.

TROMBETTA, E. S.; PARODI, A. J. N-glycan processing and glycoprotein folding. **Advances in Protein Chemistry**, New York, v. 59, p. 303-344, 2001.

VAN DIE, I.; CUMMINGS, R. D.; VAN TETERING, A.; HOKKE, C. H.; KOELEMAN, C. A.; VAN DEN EIJNDEN, D. H.; Identification of a novel UDP-Glc:GlcNAc beta1-4-glucosyltransferase in *Lymnaea stagnalis* that may be involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. **Glycobiology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 263-271, Mar. 2000.

VAN REE, R. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. **International Archives Allergy and Immunology**, Basel, v. 129, n. 3, p.189-197, Nov. 2002.

VARGHESE, J. N.; MCKIMM-BRESCHKIN, J. L.; CALDWELL, J. B.; KORTT, A. A.; COLMAN, P. M.; The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. **Proteins**, New york, v. 14, n. 3, p. 327-32, Nov. 1992.

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

VOORHORST, R. House dust mite and house dust allergy. **Annals of Allergy**, McLean, v. 38, n. 1, p. 71, Jan. 1977.

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

WILSON, I. B.; HARTHILL, J. E.; MULLIN, N. P.; ASHFORD, D. A.; ALTMANN, F. Core alpha-1,3-fucose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts. **Glycobiology**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 651-661, Jul. 1998.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, Jul. 1954.

ANEXOS

ANEXO 1

Universidade Federal de Uberlândia**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

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

Uberlândia, 02 de maio de 2002.

Processo n.º 039/2002

PROJETO DE PESQUISA: "Identificação de Frações Alergênicas e Avaliação da Resposta Imune Humoral a Dermatophagoides Pteronyssinus".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ernesto Akio Taketomi

PARECER:

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



Prof. Miguel Tanús Jorge
CEP/UFU

ANEXO 2

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

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado “**Identificação das frações alergênicas e avaliação da resposta imune humoral a *Dermatophagoides pteronyssinus***”, cujo principal objetivo é fracionar proteínas alergênicas do ácaro *D. pteronyssinus* e avaliar sua reatividade com os anticorpos de indivíduos alérgicos.

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

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

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação. Terei a liberdade de me retirar da pesquisa a qualquer momento em que desejar, sem a necessidade prévia de explicações.

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

Uberlândia, _____ de _____ de 200__.

ASSINATURA

TESTEMUNHA

ANEXO 3



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

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

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

Questionário 1 (Módulo Asma)

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

Se você respondeu não, passe para a questão número 7.

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

- 3) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?
 Nenhuma crise ()
 1 a 3 crises ()
 4 a 12 crises ()
 mais de 12 crises ()

- 4) Nos últimos 12 (doze) meses, com que 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 4



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

TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (Ácaros de poeira domiciliar)

Nº	Extrato	Tamanho da pápula (mm)	Tamanho do eritema (mm)
1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
2	<i>Dermatophagoides farinae</i>		
3	<i>Blomia tropicalis</i>		
4	Controle positivo		
5	Controle negativo		

Valores de referência:

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

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

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Responsável técnico