

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Perfil de reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 ao alérgeno recombinante Blo t 5 de *Blomia tropicalis* e sua forma modificada em pacientes atópicos e não atópicos

Bárbara Godoi Melo

**Uberlândia – MG
Junho – 2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Perfil de reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 ao alérgeno recombinante Blo t 5 de *Blomia tropicalis* e sua forma modificada em pacientes atópicos e não atópicos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do
título de Mestre.

Bárbara Godoi Melo

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Orientador

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior
Coorientador

Uberlândia – MG
Junho – 2012

À minha família

“Pelo apoio durante todos os momentos da realização desse trabalho, desde a intenção de executá-lo até a sua conclusão. E por não me deixar esquecer da importância de sonhar alçar vôos cada vez mais altos.”

“Ela acreditava em anjos e, porque
acreditava, eles existiam...”

Clarice Lispector

(A Hora da Estrela)

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades e desafios proporcionados.

Aos meus pais José Carlos e Delta e minha irmã Fernanda, que foram meu porto seguro durante as tempestades e que sempre souberam reconhecer meu esforço e dedicação para seguir no caminho que me ensinaram.

Ao meu marido, Marcos Paulo que com muita paciência esteve ao meu lado, me proporcionando momentos que ao serem lembrados me inundam de entusiasmo. Ao Joaquim que está por vir, uma sementinha de ânimo nas horas difíceis.

Ao professor Dr. Ernesto, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por meu amadurecimento profissional durante sua execução. Ao coorientador Jair Júnior pela orientação durante os experimentos e palavras de motivação todos os dias.

À Dra. Deise que indiscutivelmente se tornou um modelo de dedicação e compromisso. Ao Prof. Carlos Ueira que, através dos conhecimentos transmitidos, concedeu a oportunidade do êxito na execução de todo trabalho.

Aos amigos que conheci no Laboratório de Alergia, Ana Carolina, Bia, Daniela, Isabella, Juliana, Karine, Laís, Laura e Leandro e aos amigos e professores do laboratório de Imunoparasitologia, pelos momentos felizes e de aprendizado. Às amigas Andressa, Luana, Maraísa e Monize, que compartilharam todos os aprendizados e experiências durante o curso.

Aos funcionários do laboratório de imunologia: Edilge, Marley, Max e Dona Zilda que tornaram viável a conclusão deste trabalho. Às secretárias Lucélia e Lucileide, sempre dispostas a nos orientar, sempre com dedicação.

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

Lista de Abreviaturas e Siglas

APC	Célula apresentadora de antígeno
Blo t 5	Principal alérgeno de <i>Blomia tropicalis</i> , pertencente ao grupo 5
BSA	Soro albumina bovina
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
Bt total	Extrato total de <i>Blomia tropicalis</i>
Bt+	Pacientes atópicos sensibilizado a <i>Blomia tropicalis</i>
Bt-	Pacientes atópicos sensibilizados a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> e/ou <i>Dermatophagoides farinae</i> mas não a <i>Blomia tropicalis</i>
CaCl	Cloreto de cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	3,3' diaminobenzina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DP	Desvio padrão
D.O	Densidade óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EUA	Estados Unidos da América
Fc ϵ RI	Receptor I de alta afinidade de IgE
Fc ϵ RII	Receptor II de baixa afinidade de IgE
g	Grama
<i>g</i>	Força relativa da gravidade
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
HCl	Ácido clorídrico
IE	Índice Elisa
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G

IgG1	Imunoglobulina da classe G subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina da classe G subclasse 4
IL	Interleucina
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
ISAAC	Estudo Internacional da Asma e Alergias na Infância (International Study of Asthma and Allergies in Childhood)
mBlo t 5	Forma modificada do alérgeno Blo t 5 de <i>Blomia tropicalis</i>
M	Molar
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Número de indivíduos
NA	Grupo de pacientes não atópicos
nBlo t 5	Alérgeno Blo t 5 nativo de <i>Blomia tropicalis</i>
ND	Não determinado
Ni-NTA	Coluna de níquel
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pET14b	Plasmídeo de expressão
pET14b-rBlo t 5	Plasmídeo de expressão com o inserto rBlo t 5
rBlo t 5	Proteína recombinante de Blo t 5 expressa em sistema procarioto <i>E. coli</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
Tampão TE	10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH8
TCP	Teste cutâneo de puntura
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1

Treg	Célula T reguladora
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Hidroximetil-aminometano HCl
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
W.H.O	Organização Mundial da Saúde (Organization Health World)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos indivíduos do estudo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de epítopes de células B e T, adaptado de FREW et al., 2006

Figura 2. Taxonomia dos principais ácaros da poeira domiciliar. Adaptado de CHUA, 2007.

Figura 3. Ilustração do ácaro *Blomia tropicalis*, presente na poeira domiciliar.
(Fonte:<<http://www.talkeczema.com>>)

Figura 4. (A) Sequência de aminoácidos do alérgeno Blo t 5 de *Blomia tropicalis* obtida através do Genbank, com número de acesso AAD10850. Os números arábicos referem-se à posição dos aminoácidos e as letras coloridas representam quatro fragmentos (I, II, III e IV) identificados na sequência do alérgeno nativo. (B) Sequência mosaico de aminoácidos no alérgeno modificado (mBlo t 5) obtido por alteração da ordem dos fragmentos (I, IV, II e III) identificados no alérgeno nativo.

Figura 5. (A) Expressão dos alérgenos recombinantes rBlo t 5 e mBlo t 5 de *Blomia tropicalis* em *E. coli* BL21 transformada com pET14b contendo os respectivos genes. Cepas de *E. coli* BL21 foram induzidas com 0,5mM de IPTG. Amostras foram corridas em gel SDS-PAGE 13,5% e o gel corado com Coomassie blue. Coluna 1: Extrato proteico de *E. coli* BL21/gene rBlo t 5 sem IPTG; Coluna 2: Extrato de *E. coli* BL21/gene rBlo t 5 com IPTG; Coluna 3: rBlo t 5 purificada; Coluna 4: Extrato proteico de *E. coli* BL21/gene mBlo t 5 sem IPTG; Coluna 5: Extrato proteico de *E. coli* BL21/gene mBlo t 5 com IPTG; Coluna 6: mBlo t 5 purificada. (B) Westernblot de rBlo t 5 purificada (Colunas 1 e 2) e de mBlo t 5 purificada (Colunas 3 e 4), testadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Blo t 5, clone 4G9 (Colunas 1 e 3) ou somente diluente (Colunas 2 e 4) e reveladas com anti IgG de camundongo biotinilada, estreptavidina-peroxidase e DAB. Os alérgenos rBlo t 5 e mBlo t 5 estão indicados. P: Padrão de peso molecular (MW – *molecular weight*) expresso em kiloDaltons (kDa).

Figura 6. Slot-blot do alérgeno recombinante rBlo t 5 (2,5 μ g) e do alérgeno modificado mBlo t 5 (2,5 μ g) de *Blomia tropicalis*. Como controles, soro albumina bovina (BSA- 5

μg) e extrato total de *B. tropicalis* (Bt total – 10 μg) foram blotados. **(A)** As membranas de nitrocelulose foram testadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Blo t 5, clone 4G9 (Coluna 1) ou apenas diluente (Coluna 2) e reveladas com anti-IgG de camundongo biotinilada, estreptavidina-peroxidase e DAB. **(B)** As membranas de nitrocelulose foram testadas com soro de paciente atópico Bt+ (Coluna 1), soro de paciente atópico Bt– (Coluna 2), soro de indivíduo não atópico (Coluna 3) e apenas diluente (Coluna 4). A reação foi revelada com anti-IgE humana biotinilada, estreptavidina peroxidase e DAB.

Figura 7. Níveis de IgE para o extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total), Blo t 5 nativo (nBlo t 5), Blo t 5 recombinante (rBlo t 5) e Blo t 5 modificado (mBlo t 5) determinado por ELISA em soro de pacientes atópicos Bt+ (n=55), pacientes atópicos Bt– (n=25) e indivíduos não atópicos (NA, n= 30). As barras horizontais indicam a mediana e as linhas tracejadas o valor de *cut-off* do índice ELISA para cada reação ($\text{IE} \geq 1,2$). Comparações entre os níveis de iisotipos de anticorpos dentro de cada grupo foram analisadas pelo teste de Friedman e pelo teste de comparação múltipla de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). O percentual de positividade para cada alérgeno em cada grupo está indicado.

Figura 8. Níveis de IgG1) para o extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total), Blo t 5 nativo (nBlo t 5), Blo t 5 recombinante (rBlo t 5) e Blo t 5 modificado (mBlo t 5) determinado por ELISA em soro de pacientes atópicos Bt+ (n=55), pacientes atópicos Bt– (n=25) e indivíduos não atópicos (NA, n= 30). As barras horizontais indicam a mediana e as linhas tracejadas o valor de *cut-off* do índice ELISA para cada reação ($\text{IE} \geq 1,2$). Comparações entre os níveis de iisotipos de anticorpos dentro de cada grupo foram analisadas pelo teste de Friedman e pelo teste de comparação múltipla de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). O percentual de positividade para cada alérgeno em cada grupo está indicado.

Figura 9. Níveis de IgG4 para o extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total), Blo t 5 nativo (nBlo t 5), Blo t 5 recombinante (rBlo t 5) e Blo t 5 modificado (mBlo t 5) determinado por ELISA em soro de pacientes atópicos Bt+ (n=55), pacientes atópicos Bt– (n=25) e indivíduos não atópicos (NA, n= 30). As barras horizontais indicam a

mediana e as linhas tracejadas o valor de *cut-off* do índice ELISA para cada reação ($IE \geq 1,2$). Comparações entre os níveis de iisotipos de anticorpos dentro de cada grupo foram analisadas pelo teste de Friedman e pelo teste de comparação múltipla de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). O percentual de positividade para cada alérgeno em cada grupo está indicado.

Figura 10. Correlação e associação dos níveis de isotipos de anticorpos entre os alérgenos recombinantes (rBlo t 5 e mBlo t 5). Níveis de IgE (A), IgG1 (B) e IgG4 (C) para rBlo t 5 e mBlo t 5 foram determinados por ELISA em 55 amostras de soros de pacientes atópicos Bt+. As linhas tracejadas indicam o valor de *cut-off* para o índice ELISA de cada reação ($IE \geq 1,2$). O coeficiente de correlação de Spearman (r_s) e os valores de p estão indicados. A porcentagem de amostras duplo-positivas, duplo-negativas, único-positivas e único-negativas estão indicadas no quadrante correspondente.

Figura 11. Correlação e associação entre níveis de isotipos de anticorpo (IgE, IgG1 e IgG4) para os alérgenos rBlo t 5 (A, B, C) ou mBlo t 5 (D, E, F) determinadas por ELISA em 55 amostras de soros de pacientes atópicos Bt+. As linhas tracejadas indicam o valor de *cut-off* do índice ELISA (IE) para cada reação ($IE \geq 1,2$). O coeficiente de correlação de Spearman (r_s) e os valores de p estão indicados. As porcentagens de amostras duplo-positivas, duplo-negativas, único-positivas e único-negativas estão indicadas nos quadrantes correspondentes.

Figura 12. (A) Comparação entre os níveis de isotipos de anticorpos (IgE, IgG1 e IgG4) para rBlo t 5 e mBlo t 5, determinados por ELISA em amostras individuais de soro de pacientes atópicos Bt+ positivos para rBlo t 5 (IgE, $n=23$; IgG1, $n=30$ e IgG4, $n=30$). As linhas tracejadas indicam o valor de *cut-off* do índice ELISA de cada reação ($IE \geq 1,2$) e os valores de mediana estão indicados. (B) Porcentagem de redução da reatividade de IgE, IgG1 e IgG4 para mBlo t 5 em relação a rBlo t 5 em amostra de soro de pacientes atópicos Bt+ positivas para rBlo t 5 para cada isotipo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	6
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Doenças alérgicas	18
1.2 Alérgenos	19
1.3 Ácaros da poeira domiciliar.....	21
1.4 <i>Blomia tropicalis</i> e seus alérgenos.....	23
1.5 Fisiopatologia da resposta imune alérgica	25
1.6 Imunoterapia e alérgenos recombinantes.....	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Aspectos éticos e critérios seletivos.....	30
3.2 Teste cutâneo de puntura (TCP)	31
3.3 Obtenção do soro de pacientes.....	32
3.4 Pesquisa da sequência gênica do alérgeno Blo t 5 de <i>Blomia tropicalis</i> e construção dos genes sintéticos	33
3.5 Produção de células bacterianas competentes	34
3.6 Reação de transformação de <i>E. coli</i> DH5- α com pET14b-rBlo t 5 e pET14b-mBlo t 5	35
3.7 Extração do plasmídeo pET14b-rBlo t 5 e pET14b-mBlo t 5 de <i>E. coli</i> DH5- α ..	35

3.8 Reação de transformação dos vetores pET14b-rBlo t 5 e pET14b-mBlo t 5 em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	36
3.9 Expressão de rBlo t 5 e mBlo t 5 em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	36
3.9.1 Teste de indução da expressão de rBlo t 5 e mBlo t 5 em <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.....	36
3.9.2 Produção de rBlo t 5 e mBlo t 5em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS em larga escala	37
3.9.3 Teste de solubilidade e extração das proteínas recombinantes	37
3.10 Purificação e dosagem proteica dos alérgenos rBlo t 5 e mBlo t 5.....	38
3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e detecção de rBlo t 5 e mBlo t 5 por <i>Western blotting</i>	39
3.12 Detecção de rBlo t 5 e mBlo t 5 por Slot-blot	40
3.13 Mensuração de IgE, IgG1 e IgG4 específicos ao extrato total de <i>B. tropicalis</i> (Bt total), Blo t 5 nativo (nBlo t 5) e as proteínas recombinantes rBlo t 5 mBlo t 5	41
3.14 Análise Estatística.....	42
3.15 Biossegurança	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Caracterização Demográfica e Clínica dos Indivíduos do Estudo.....	44
4.2 Construção dos genes sintéticos rBlo t 5 e mBlo t 5	46
4.3 Expressão, purificação e dosagem proteica dos alérgenos rBlo t 5 e mBlo t 5 em <i>E. coli</i> (DE3) pLysS	46
4.4 Imunodetecção dos alérgenos recombinantes rBlo t 5 e mBlo t 5 por <i>Western blotting</i>	49
4.5 Imunodetecção dos alérgenos recombinates rBlo t 5 e mBlo t 5 por Slot-blot	49
4.6 Reatividade de IgE, IgG1 e IgG4 ao extrato Bt total, ao Blo t 5 nativo (nBlo t 5), ao rBlo t 5 e mBlo t 5.....	50
4.7 Correlação e associação dos níveis de isótipos de anticorpos entre alérgenos recombinantes no grupo de pacientes atópicos Bt+.....	53
4.8 Correlação e associação entre os níveis de isótipos de anticorpos para rBlo t 5 ou mBlo t 5 no grupo de pacientes atópicos Bt+	54

4.9 Redução da reatividade dos isotipos de anticorpos para mBlo t 5 em relação ao rBlo t 5 no grupo de pacientes atópicos Bt+	57
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS	67
ANEXO A	81
ANEXO B	83
ANEXO C	84
ANEXO D	87

RESUMO

A exposição a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar é o principal fator de risco para o desenvolvimento de alergia respiratória. Blo t 5 é o principal alérgeno do ácaro *Blomia tropicalis* (Bt) e pelo menos 70% dos pacientes com rinite possuem reatividade de IgE a este alérgeno. O objetivo deste estudo foi avaliar perfil de modificada (mBlo t 5) em pacientes atópicos e não atópicos. Três grupos de pacientes foram avaliados (atópico Bt +, atópico Bt e não atópico), com base no teste cutâneo e testes sorológicos. Nós projetamos dois construtos, um que codifica a sequência original de Blo t 5 (rBlo t 5) e outro uma sequência modificada (mBlo t 5) e produzimos os respectivos alérgenos recombinantes. A reatividade específica do rBlo t 5 e mBlo t 5 foi provada com o anticorpo monoclonal anti-Blo t 5 e soro IgE positivo de pacientes atópicos Bt + por slot-blot. Os níveis de IgE e positividade para ambos rBlo t 5 e mBlo t 5 foram comparáveis no grupo de pacientes atópicos Bt +. Um perfil semelhante de reatividade de IgG1 aos alérgenos recombinantes foi encontrado em ambos pacientes atópicos e não atópicos. Foi notável uma reatividade de IgG4 aumentada ao mBlo t 5 em relação ao rBlo t 5 em pacientes atópicos Bt +. Houve uma correlação positiva entre IgE e IgG4 para ambos alérgenos recombinantes, sendo rBlo t 5 preferencialmente reconhecido por IgG1 e IgG4 do que por IgE, sendo esse fenômeno mais evidente para IgG4 em relação ao mBlo t 5. Redução da reatividade de IgE ocorreu em 48% das amostras e 26% delas apresentaram uma redução significante ($>20\%$). Em relação à reatividade de IgG4, 57% das amostras apresentaram um aumento, sendo que 37% dessas amostras tiveram um aumento $> 20\%$. Em conclusão, a modificação feita no alérgeno Blo t 5 favoreceu uma mudança de antigenicidade para o isotipo IgG4, tornando conveniente a sua utilização como potencial candidato em estudos de imunoterapia alérgeno específicos.

Palavras-chave: Blo t 5 - alérgeno recombinante - *Blomia tropicalis* - isotipos de imunoglobulinas - doenças alérgicas

ABSTRACT

Exposure to house dust mite (HDM) allergens is the main risk factor for the development of respiratory allergy. Blo t 5 is the most important allergen from the mite *Blomia tropicalis* (Bt) and at least 70% of rhinitis patients show IgE reactivity to this allergen. The aim of this study was to evaluate the IgE, IgG1 and IgG4 reactivity profile to recombinant Blo t 5 allergen and its modified form in atopic and non-atopic patients. Three patient groups were evaluated (atopic Bt+, atopic Bt- and non-atopic) with basis on the skin prick test and serological assays. We designed two constructs encoding the Blo t 5 full sequence, one with the original sequence (rBlo t 5) and another with a modified sequence (mBlo t 5) and produced the respective recombinant allergens. The specific reactivity of rBlo t 5 and mBlo t 5 was probed with the monoclonal antibody to Blo t 5 and positive IgE serum from atopic Bt+ patients in slot-blot assays. IgE levels and positivity to both rBlo t 5 and mBlo t 5 were comparable in atopic Bt+ patients. A similar profile of IgG1 reactivity to recombinant allergens was found in both atopic and non-atopic patients. It was notable an increased IgG4 reactivity to mBlo t 5 in relation to rBlo t 5 in atopic Bt+ patients. There was a positive correlation between IgE and IgG4 to both recombinant allergens and rBlo t 5 was preferentially recognized by IgG1 and IgG4 than IgE antibodies, being this phenomenon more evident for IgG4 to mBlo t 5. The IgE reactivity reduction occurred in 48% of samples and 26% of them had a significant reduction (>20%). In relation to IgG4 reactivity, 57% of samples presents an increase, and 37% of them presents an increase >20%. In conclusion, the modified Blo t 5 allergen showed a shift of antigenicity for the IgG4 isotype, thus making suitable its use as potential candidate in specific allergen immunotherapy practice studies.

Key words: Blo t 5 - recombinant allergen - *Blomia tropicalis* - immunoglobulin isotypes - allergic diseases

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças alérgicas

Doenças alérgicas como asma, rinite/conjuntivite e dermatite atópica acometem cerca de 30% da população de países industrializados, resultando em um expressivo aumento em sua prevalência e morbidade, nos últimos anos (ASHER et al., 2006; FLÖISTRUP et al., 2006). Dentre os fatores que contribuíram para esses aumentos estão: os avanços no diagnóstico da alergia e a maior exposição ambiental, como consequência das mudanças no estilo de vida. O impacto socioeconômico dessas doenças é vasto e inclui o aumento dos gastos com cuidados com a saúde, redução da produtividade no trabalho e do desempenho escolar dos pacientes (SOARES et al., 2007; MASOLI et al., 2004). Mesmo com os progressos na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da alergia e do incremento das terapias disponíveis, ainda não há um controle efetivo das doenças alérgicas (BACHERT et al., 2008).

Indivíduos atópicos são aqueles que possuem uma predisposição genética para sintetizar imunoglobulina E (IgE), anticorpos específicos contra pequenas doses de alérgenos ambientais comuns, sendo portanto, os indivíduos mais afetados por doenças alérgicas (ROLLAND et al., 2009). O termo alergia foi utilizado pela primeira vez, no ano de 1906, por Clemens Von Pirquet, (palavra originada do grego “*Allos*”, que significa: alteração do estado original), para designar “capacidade alterada do organismo de reagir a uma substância estranha”. Atualmente alergia é definida como uma das respostas do sistema imune, denominada reação de hipersensibilidade (CRONWELL, 1997; CHARLES et al., 2006).

Além de fatores genéticos, uma das principais contribuições para o desenvolvimento de doenças alérgicas é a influência do meio ambiente. A sociedade atual convive com grande concentração populacional nas metrópoles, predominando o sedentarismo e o confinamento, mantendo-se grande parte do tempo no ambiente interno das moradias e locais de trabalho, nos quais pode haver carpetes, cortinas, condicionadores de ar. Esses fatores permitem uma maior exposição a substâncias estranhas e alérgenos circulantes, o que contribui para a maior sensibilização de indivíduos geneticamente predispostos. Evidentemente, estes fatores colaboraram para o

aumento da prevalência de doenças alérgicas, principalmente a asma e a rinite (POPE et al., 1993; SOARES et al., 2007).

As manifestações clínicas da alergia podem ser desencadeadas por substâncias de origem protéica, estranhas ao organismo, presentes em componentes comuns no meio ambiente, conhecidas como alérgenos (HUBY et al., 2000). Várias substâncias podem ser alergências, causando diferentes tipos de alergia, como alergia alimentar (ovo, castanhas e frutos do mar), a insetos (vespas e abelhas), alergia de contato (níquel e látex) e alergia a medicamentos (penicilina, alguns tipos de anestesias). As principais fontes de alérgenos respiratórios (aeroalérgenos) são: ácaros da poeira domiciliar, animais domésticos (cães e gatos), pólen de árvores e gramíneas, fungos e baratas.

A asma e a rinite são as manifestações das mais comuns e são consideradas as principais doenças alérgicas respiratórias no Brasil e no mundo (CAMARGOS et. al., 2007). Baseado em observações clínicas, a asma alérgica é caracterizada por inflamação do sistema respiratório inferior, induzindo quadro de hiper-reatividade brônquica e, consequentemente, episódios recorrentes de sibilância, dispneia, opressão torácica e tosse (LEMANSKE-JUNIOR & BUSSE, 2003). Segundo a Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia (1994), esses processos são desencadeados por reações alérgicas e acometem pessoas de várias idades e diferentes classes sociais, persistindo com alta morbidade e mortalidade (FERRARI et al., 1998). A rinite alérgica atinge aproximadamente 10 a 25% da população mundial (BEASLEY et al., 2000) e sua prevalência média na população brasileira é de 27% a 34% (SOLÉ et al., 2004). Apesar de apresentar perfil imunológico semelhante à asma, se distingue pelas inflamações nasais, tais como: aumento de secreção de muco, obstrução da cavidade, espirros e prurido. Pode também ser acompanhada de conjuntivite, constituindo-se num quadro denominado de rinoconjuntivite, que se caracteriza por lacrimejamento, prurido conjuntival e fotofobia (JOHANSSON et al., 2004).

1.2 Alérgenos

Alérgenos são os antígenos capazes de desencadear doenças alérgicas, segundo Johansson et al. (2004). Estão presentes tanto no ambiente extra-domiciliar, como grãos de pólen, quanto no ambiente domiciliar, destacando-se o epitélio de animais domésticos (cães e gatos), baratas, fungos e derivados de ácaros da poeira domiciliar

(CROMWELL, 1997; GALLI & LANTZ, 1999). Estes alérgenos são provenientes de diversas fontes, podendo ser de origem proteica, glicoproteica, compostos inorgânicos que podem atuar como haptenos que se ligam a proteínas e desempenham papel imunogênico, ou até mesmo carboidratos com relevância na sensibilização alergênica, e não só de origem peptídica na ativação de respostas do sistema imunológico (FÖTISCH & VIETHS, 2001; MEYER; COMINH; DEMOLY, 2004).

A fim de possibilitar a organização das informações no meio científico, fez-se necessário a criação de uma nomenclatura padronizada de alérgenos, sobretudo no desenvolvimento de mecanismos de diagnóstico específico e de extratos imunoterapêuticos com alérgenos recombinantes, a qual foi viabilizada pelo Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos, regulamentado pela União Internacional das Sociedades de Imunologia (I.U.I.S.) e pela Organização Mundial da Saúde (W.H.O.). Assim, determinou-se que a denominação dos alérgenos fosse representada pelas três primeiras letras do gênero ao qual o organismo pertence, juntamente com a primeira letra (ou mesmo as duas primeiras, no caso de ambigüidade) da espécie a partir da qual o alérgeno é derivado, acrescido de um numeral arábico, que se refere ao grupo o qual pertence o alérgeno. Como exemplo, o alérgeno do grupo 5 derivado da espécie *Blomia tropicalis* é chamado, dessa forma, de Blo t 5 (KING et al., 1995).

A fim de se unificar o sistema de nomenclatura dos alérgenos, uma determinada proteína é designada como alérgeno e nomeada segundo os critérios definidos, quando a mesma se liga à IgE de 5% dos soros de pacientes atópicos, o que é crítico para relacionar a importância relativa dos diferentes alérgenos (THOMAS et al., 2007). Se o alérgeno apresentar reatividade de IgE superior a 50% dos pacientes contra uma determinada fonte alergênica, esse alérgeno é denominado principal. Se a reatividade de IgE estiver entre 5% e 50%, o alérgeno é chamado de minoritário (LARSEN & LOWERSTEIN, 1996).

A porção do alérgeno reconhecida por anticorpos e receptores de membrana das células efetoras é conhecida como epítopo, ou determinante antigênico. O epítopo de um alérgeno é pequeno, geralmente formado por resíduos de aminoácidos que combinam com a região variável do anticorpo e por outros aminoácidos que se ligam a células T. Constitui-se de forma linear, quando as sequências de aminoácidos são contíguas, sendo assim, o alérgeno apresentado ao linfócito T é reconhecido por uma sequência de aminoácidos dispostos linearmente (epítópos de células T) ou então de

modo conformacional, caso os aminoácidos estejam separados na cadeia polipeptídica de forma que o enovelamento proteico possibilite espacialmente a ligação, caracterizando o principal meio de reconhecimento do alérgeno por células B (através de ligação com IgE) (Figura 1). Tal processo leva à caracterização do perfil de componentes do sistema imune que será ativado após o seu reconhecimento (SELA, 1969; ARLIAN; MORGAN; NEAL, 2002; CRAMERI, 2003).

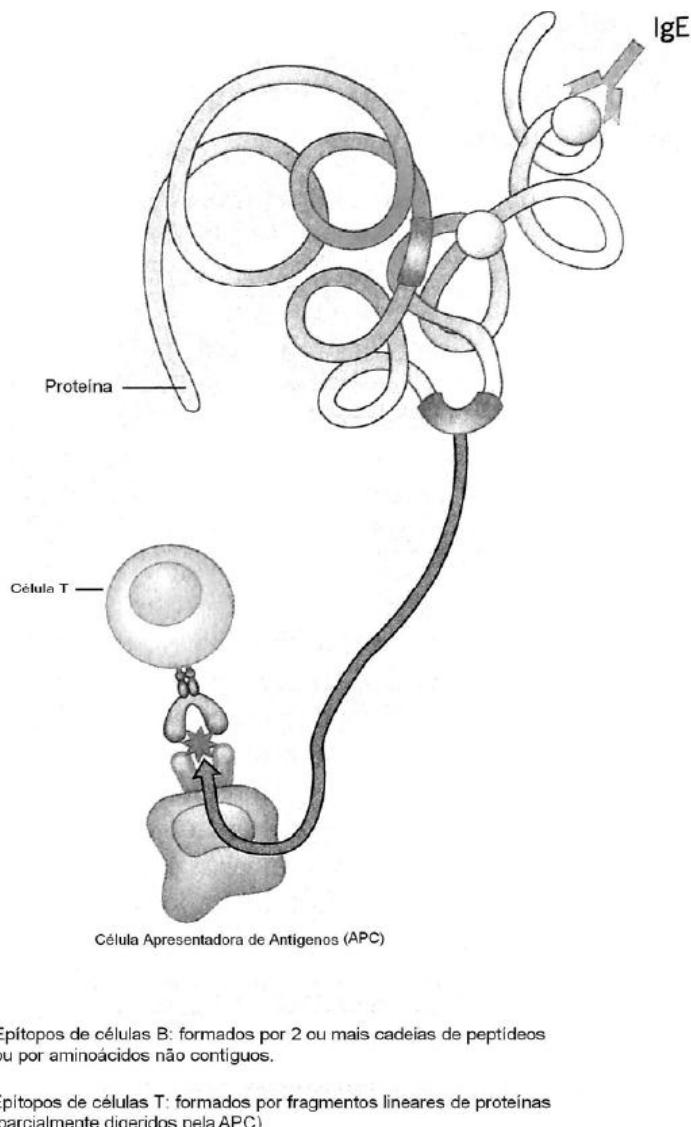


Figura 1. Representação de epítópos de células B e T, adaptado de FREW, 2006.

1.3 Ácaros da poeira domiciliar

A partir da descoberta de que antígenos presentes na poeira domiciliar produzem uma reação imunológica mediada por IgE, com capacidade desencadear alergia, por volta de 1920, vários estudos correlacionam a exposição a ácaros e sua influência na

prevalência de doenças alérgicas respiratórias (VOORHORST, 1967). A exposição à aeroalérgenos provenientes de ácaros é uma das causas primárias para o desenvolvimento de doenças alérgicas, atuando também como fator de exacerbação dos sintomas, uma vez que mais de 50% dos pacientes alérgicos são sensibilizados a esses alérgenos (PLATTS-MILLS & DE WECK, 1989; PLATTS-MILLS et al., 1992; SQUILLACE et al., 1997).

Ácaros da poeira domiciliar são animais microscópicos, com tamanho entre 0,1 a 0,6 mm de comprimento, possuem corpo ovóide, com oito pernas articuláveis e um ciclo de vida passando pelos estágios de ovo, larva, protoninfa, tritoninfa e adulto (ARLIAN; RAPP; AHMED, 1990; DE BOER, 1998; PIKE; CUNNINGHAM; LESTER, 2005). Algumas condições ambientais como temperatura em torno de 30°C e umidade do ar elevada (entre 75 e 80%), favorecem o crescimento e proliferação, determinando com isso diferenças geográficas e sazonais na prevalência e concentração de determinadas espécies de ácaros (ARLIAN et al., 1992; ANDRADE et al., 1995; MUNIR et al., 1995; BOQUETE et al., 2006). A presença destes animais na poeira está relacionada a seu hábito alimentar, que consiste de restos de pele humana e demais detritos orgânicos presentes no ambiente. Não é sem razão, que um dos principais gêneros de ácaro, o *Dermatophagoides*, significa comedor de pele. Dessa forma, o colchão, o travesseiro, cortinas e carpetes são um habitat ideal para a proliferação e crescimento de ácaros (HART, 1998). As proteínas que constituem o corpo e as fezes dos ácaros são capazes de induzir uma resposta imune e causar alergia em indivíduos geneticamente susceptíveis (PLATTS-MILLS & DE WECK, 1989). Existem várias medidas para reduzir a exposição de indivíduos alérgicos aos ácaros. As recomendações profiláticas são facilmente exequíveis em sua maioria, como o uso de acaricidas e aspiradores de pó, a lavagem dos cômodos com água quente, o uso de protetores de colchões e travesseiros e o uso de equipamentos que aumentam a ventilação no ambiente (HALLAS, 1991, HART, 1998, ARLIAN & PLATTS-MILLS, 2001).

Os ácaros presentes na poeira domiciliar foram descritos a partir da família Acaridae, Glycophagidae, Pyroglypidae e Echimyopodidae (Figura 2). Os ácaros da família Acaridae, *Acarus siro* e *Tyrophagus putrescentiae* são fontes de menor importância entre os alérgenos da poeira doméstica. Os ácaros da família Pyroglyphidae, *Dermatophagoides pteronyssinus* são encontrados prevalentemente em regiões de clima temperado a tropical, enquanto *Dermatophagoides farinae* são

localizados em regiões mais secas. Por outro lado, o *Euroglyphus maynei* é encontrado em regiões temperadas, mas em menor abundância. Na família Glyciphagidae, *Lepidoglyphus destructor* é considerado um ácaro essencialmente de estocagem, enquanto que *Blomia tropicalis* tem emergido como um importante ácaro da poeira doméstica em regiões tropicais e subtropicais, pertencendo à família Echimyopodidae (PLATTS-MILLS, 2001; ARLIAN, 2002; THOMAS et al., 2007).

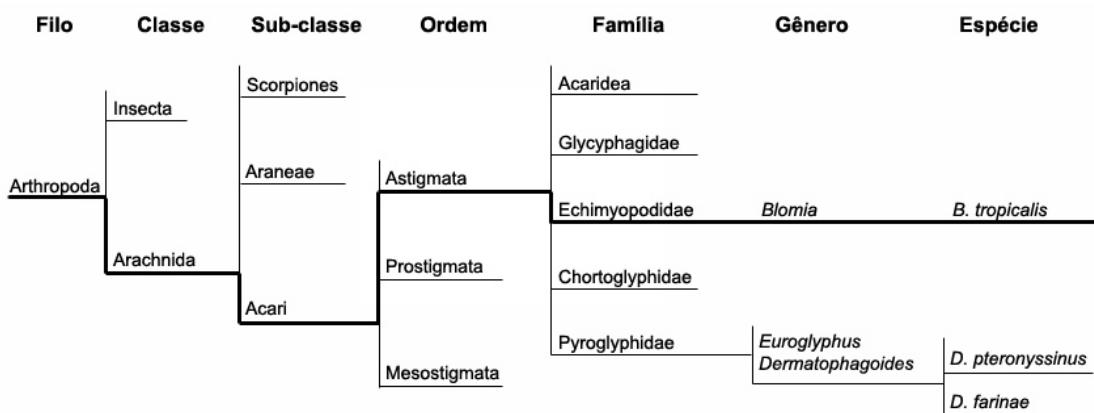


Figura 2. Taxonomia dos principais ácaros da poeira domiciliar. Adaptado de CHUA, 2007.

1.4 *Blomia tropicalis* e seus alérgenos

No ano de 1973, Van Bronswijk e colaboradores descreveram pela primeira vez o ácaro *Blomia tropicalis*, com tamanho entre 230 e 365 µm e forma globular (Figura 3). Sua classificação taxonômica é: reino Metazoa, filo Artopida, classe Arachnida, ordem Astigmata, família Echimyopodidae, gênero *Blomia*, espécie *Blomia tropicalis* (CHUA, 2007.). Inicialmente encontrado em fazendas, foi considerado um ácaro de estocagem e logo depois identificado em poeira domiciliar em países de clima tropical e sub-tropical, cuja temperatura média é de 28°C e umidade relativa média de 82% (ARRUDA et al., 1991; YI et al., 2006).



Figura 3. Ilustração do ácaro *Blomia tropicalis*, presente na poeira domiciliar.
(Fonte:<<http://www.talkeczema.com>>)

Muitos estudos publicados sobre a sensibilização por *B. tropicalis* foram realizados em países como a Espanha, Índia, Taiwan, Indonésia e Filipinas, assim como em países das Américas como a Colômbia e o Brasil, onde a sensibilização a este ácaro corresponde cerca de 60% a 80% em indivíduos atópicos. Nessas regiões *B. tropicalis* é considerado uma das mais importantes fontes de alergénos encontrados na poeira domiciliar, responsável pela sensibilização e pelas manifestações clínicas induzidas por respostas mediadas por IgE em pacientes com doenças alérgicas, como asma e rinite (PUERTA et al., 1991; ARRUDA et al., 1997; FERNADES-CALDAS et al., 1993; KUO, 2003).

O desenvolvimento de ferramentas utilizadas em biologia molecular, como a técnica do DNA recombinante, facilitou a identificação e a clonagem de alérgenos puros e quimicamente bem definidos, sendo utilizados como importantes instrumentos no diagnóstico e na imunoterapia de doenças alérgicas respiratórias (LARCHÉ, 2006; VALENTA et al., 2011). Em combinação com técnicas imunológicas, todo esse aparato técnico desempenha um papel importante na compreensão de como os ácaros da poeira domiciliar interagem com nosso sistema imunológico e qual seu real papel no desencadeamento das doenças alérgicas (CHUA et al., 2007).

Estudos prévios monstraram que pelo menos 21 alérgenos de *B.tropicalis* já foram identificados e descritos na literatura. A Blo t 1 é uma proteína de 221 resíduos, codificada por um DNA que apresenta 663 pb e peso molecular aproximado de 25 kDa, sendo caracterizada funcionalmente como uma cisteína protease. Seu alérgeno principal é um homólogo de Der p 1 de *D. pteronyssinus*, apresentando 35% de identidade entre sua sequência de aminoácidos e outros alérgenos do grupo 1, derivados de ácaros (MORA et al., 2003). O grupo 2 de alérgeno *B. tropicalis* ainda não foi totalmente caracterizado, sua função molecular é desconhecida e possui 39% de homologia com Der p 2 (CHUA et al., 2007). O alérgeno grupo 3 de *B. tropicalis* foi clonado com seu DNA apresentando 798 pb, codificando 231 aminoácidos, sendo caracterizada funcionalmente como tripsina cisteína. Seu peso molecular é 27,5 kDa e apresenta uma reatividade a IgE de aproximadamente 50-57% (YANG, 2003; FLORES, 2003). O alérgeno Blo t 4 do grupo 4 possui peso molecular de 56 kDa e apresenta 65% de homologia com o alérgeno Der p 4. Sua propriedade bioquímica é de alfa amilase, apresentando menos de 15% de reatividade aos anticorpos IgE em pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* (MILLS et al., 1999).

O principal alérgeno de *B. tropicalis*, enquadra-se no grupo 5, Blo t 5, que foi o primeiro alérgeno a ser clonado e expresso em sistema procarioto apresentando DNA 432

pb e codificando 134 aminoácidos. Possui massa molecular de aproximadamente 14 kDa e apresenta de 70 a 90% de reatividade ao anticorpo IgE em pacientes atópicos. Sua homologia com a sequência do alérgeno Der p 5 é de 40% a 50% e sua atividade bioquímica ainda é desconhecida (ARRUDA et al., 1995).

O alérgeno Blo t 6 apresenta aproximadamente 10% a 20 % de reatividade a IgE em soros de pacientes asmáticos. Seu DNA é constituído de 1045 pb e 270 aminoácidos com peso molecular de 25 kDa, apresentando homologia com Der p 6 de 58% (THOMAS et al., 2002; THOMAS; SMITH; HALES, 2004). Blo t 10 foi expresso em sistema procarioto e apresentou 20% a 29% de reatividade com IgE em pacientes atópicos. Codificado por uma proteína de 284 aminoácidos a partir de um DNA de 852 pb, possui mais de 90% de homologia com outros alérgenos de ácaros do grupo 10 e seu grupo funcional é uma tropomiosina (YI et al., 2002). O alérgeno Blo t 11 é considerado o alérgeno com maior peso molecular de *B. tropicalis*, aproximadamente 102 kDa. Apresenta em seu DNA 262 pb que codifica uma proteína de 875 aminoácidos, sua função proteica é de paramiosina e seu recombinante apresenta uma reatividade com o IgE de 18 a 52% (RAMOS, et al., 2003 a; RAMOS, et al., 2003 b). Blo t 12 é um alérgeno com DNA de 582 pb e o peso molecular em torno de 14,2 kDa, sendo expresso em sistema eucarioto e procarioto com variações na reatividade de 20 a 50% (LIM et al., 2002; PUERTA et al., 1996). O grupo 13 *B. tropicalis* possui peso molecular de aproximadamente 14 kDa sendo expresso por sistema procarioto, apresentando baixa reatividade a IgE (11%) e 80% de homologia com Der p 13 (CARABALLO et al., 1997; CHUA et al., 2007). A proteína Blo t 19 é codificada por 507 pb, com peso molecular de 7,2 kDa e baixa reatividade com IgE de 3 a 20% (THOMAS et al., 2002).

1.5 Fisiopatologia da resposta imune alérgica

Quando um indivíduo atópico é exposto pela primeira vez a um alérgeno, as células apresentadoras de antígeno (APCs) captam-no, processam-no e o apresentam aos linfócitos T CD4⁺ *naive* (Th0), os quais se diferenciam principalmente em células do perfil Th2 (OBOKI et al., 2008). Essas células, sob expressão do fator de transcrição GATA3, secretam as citocinas características desse perfil de resposta celular (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF)) (COUSINS; LEE; STAYNOV, 2002). Essas citocinas estão envolvidas

diretamente no *switch* de classe das células B para a síntese de IgE (IL-4 e IL-13), maturação de eosinófilos (IL-3, IL-5 e GM-CSF) e basófilos (IL-3 e IL-4), que são as principais células efetoras secretoras de mediadores da resposta alérgica.

Em indivíduos saudáveis, os níveis de IgE sérica específica apresentam-se em baixas concentrações, mas indivíduos atópicos além de apressentarem mastócitos e eosinófilos com maior número de receptores de alta afinidade para IgE (Fc ϵ RI), há um aumento da produção de IgE pelas células B por meio da IL-4 e IL-13 produzidas pelas células Th2, com isto mais moléculas de IgE se ligam aos receptores Fc ϵ RI presentes nos mastócitos e eosinófilos. Em uma exposição subsequente, o alérgeno ou seus produtos se ligam à IgE específica presente na membrana das células sensibilizadas, provocando uma cascata de degranulação com consequente liberação de mediadores pré-formados como histamina, prostaglandinas, leucotrienos, quimiocinas e outras citocinas que participam em conjunto, dando início à reação alérgica (RAVETCH & KINET, 1991; HOLGATE & POLOSA, 2008).

Além das células Th2, em resposta à exposição ao alérgeno, o indivíduo atópico produz células dos subtipos Th1, T reguladoras (Treg) e Th17. As células Treg desempenham um importante papel supressor da resposta alérgica, ao induzir tolerância periférica. Por outro lado, há relatos que as células Th17, que expressam o fator de transcrição ROR- γ T, podem aumentar a resposta inflamatória ao alérgeno, através da indução de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, particularmente envolvendo recrutamento e ativação de neutrófilos (BETELLI et al., 2008). Esses fatos foram comprovados em estudo previamente realizado que demonstrou que a expressão de RNAm que codifica IL-17, está aumentada em amostras de escarro, lavado broncoalveolar e soro de pacientes asmáticos, que apresentaram elevada hipersensibilidade das vias aéreas (OBOKI et al., 2008).

A IgE também se liga aos receptores FC ϵ RI da superfície de células dendríticas e de monócitos, como aos receptores de baixa afinidade (FC ϵ RII) CD23 na membrana de linfócitos B, o que permite a captação do alérgeno e a apresentação antigênica às células Th2, que podem mediar as reações alérgicas tardias. Essas reações se caracterizam por infiltração de células Th2 e eosinófilos, formação de edema, eritema e outros sintomas. No pulmão, o principal órgão acometido nas doenças alérgicas respiratórias, esta reação se manifesta pelo estreitamento das vias aéreas e por hipersecreção de muco (AKDIS et al., 2004).

O desenvolvimento de uma condição alérgica sabidamente mediada por IgE, ou uma condição saudável está intimamente relacionada à intensidade da resposta imune aos alérgenos. Sendo assim, outras classes de anticorpos têm sido analisadas frente a esta variação de resposta (BATARD et al., 1993; BATARD et al., 2006; JACKOLA et al., 2002). Em indivíduos saudáveis, a resposta de células B a alérgenos provenientes de ácaros da poeira domiciliar varia entre ausência de resposta, ou produção predominantemente de anticorpos IgG alérgeno-específicos, IgG1 ou IgG4, na presença ou ausência de baixas concentrações de IgE, já em indivíduos alérgicos além da detecção de altos níveis de IgE pode ser também detectados níveis de IgG, sendo que os níveis de IgG1 são similares aos de indivíduos saudáveis, diferente de IgG4 (AKDIS, 2006; KENEMY et al., 1989). Dentre as funções desempenhadas pela subclasse IgG4 está a potencialidade de agir como bloqueadora via competição direta por compartilharem a mesma especificidade a epítopos ligantes de IgE (DEVEY; WILSON; WHEELER, 1976; BOLUDA; CUADRA; BERRENS, 1996).

1.6 Imunoterapia e alérgenos recombinantes

A imunoterapia alérgeno específica foi introduzida por Noon em 1911 e ainda é uma das poucas ferramentas para o tratamento causal da alergia do Tipo I, que baseia-se na administração de doses crescentes de alérgenos para pacientes atópicos com intuito de induzir um estado de falta de responsividade (BOUSQUET, LOCKEY, MALLING, 1998; VALENTA et al., 2011). Vários estudos mostraram a eficácia da imunoterapia específica no tratamento de doenças alérgicas e há várias hipóteses sobre os mecanismos inerentes ao sucesso da imunoterapia. Dentre elas, a modulação da resposta alérgeno específica Th2 no sentido de um perfil de resposta preferencial Th1 (LARCHE, 2006), a indução de tolerância de células T alérgeno específicas através da produção de interleucina-10 (IL-10) secretada por células Treg, que suprimem a proliferação induzida por alérgenos de células Th1 e Th2, bem como a produção de citocinas características desses perfis (JUTEL et al., 2006) e a indução de anticorpos IgG alérgeno específicos que antagonizam os efeitos mediados por IgE (MOTHES et al., 2003).

Existem algumas desvantagens no uso de extratos alergênicos na imunoterapia: pois consistem de uma mistura de componentes alergênicos e não alergênicos, são de

difícil padronização e não podem ser administrados de acordo com o perfil de reatividade de cada paciente (BOUSQUET, LOCKEY, MALLING, 1998). Determinados alérgenos podem não estar presentes em quantidade suficiente para o tratamento de pacientes sensibilizados a essas moléculas, enquanto que pacientes podem também ser sensibilizados a alérgenos presentes no extrato, aos quais não eram alérgicos antes do tratamento (LINHART & VALENTA, 2012). Além disso, a administração de alérgenos ativos pode causar graves e potencialmente fatais efeitos anafiláticos. Várias alternativas foram testadas para reduzir esses efeitos, incluindo a adsorção de extratos alergênicos com adjuvantes para retardar a liberação sistêmica dos alérgenos no local de aplicação (MELLERUP et al., 2000) e a modificação química desses extratos alergênicos para reduzir a atividade alergênica (MAASCH & MARSH, 1987).

O avanço no desenvolvimento de técnicas de biologia molecular permitiu no final da década de 1980 a clonagem do primeiro alérgeno. Quando os primeiros alérgenos recombinantes foram produzidos muitos questionamentos foram levantados em relação a sua aplicabilidade no diagnóstico e na terapia de pacientes alérgicos. As principais dúvidas eram se esses alérgenos recombinantes imitariam as propriedades dos alérgenos naturais, se um painel limitado de alérgenos recombinantes que se assemelham aos epítópos de IgE dos extratos naturais poderia ser definido e se eles poderiam ser utilizados em imunoterapia (VALENTA et al., 1991).

O diagnóstico da alergia com alérgenos recombinantes requer que painéis dos alérgenos mais importantes de diversas fontes possam ser produzidos, mantendo os epítópos de IgE mais relevantes presentes nos extratos naturais, enquanto que a eficácia da imunoterapia exige uma modificação dirigida na estrutura dos alérgenos, com base no conhecimento de características moleculares e imunológicas, a fim de promover uma atividade alergênica reduzida (VRTALA, 2008).

Anticorpos IgG4 têm caráter não inflamatório, evitando o desenvolvimento dos sintomas da reação alérgica. Em esquemas de imunoterapia, almeja-se que esse isotipo capture o alérgeno antes que este se ligue a IgE presente na superfície das células efetoras, impedindo a ativação de mastócitos e basófilos. A indução de IgG4 desempenha um papel bloqueador pela inibição de eventos mediados por IgE, tanto a apresentação antigênica quanto da liberação de mediadores por mastócitos e basófilos (FUJITA et al., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o perfil de reatividade dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 aos alérgenos recombinantes Blo t 5 (rBlo t 5) de *Blomia tropicalis* e sua forma modificada candidata a hipoalérgeno (mBlo t 5) em soro de pacientes atópicos e não atópicos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenhar dois constructos com a sequência de genes que codificam (1) a proteína recombinante do alérgeno Blo t 5 (rBlo t 5) e (2) sua forma modificada candidata a hipoalérgeno (mBlo t 5) de *Blomia tropicalis*;
- Clonar, expressar e purificar a proteína recombinante Blo t 5 (rBlo t 5) e sua forma modificada candidata a hipoalérgeno (mBlo t 5) em *Escherichia coli*;
- Avaliar a reatividade da proteína recombinante rBlo t 5 e sua forma modificada candidata a hipoalérgeno (mBlo t 5) com o anticorpo monoclonal anti-Blo t 5 (clone 4G9) por Western blotting e Slot-blot;
- Avaliar a reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 à proteína recombinante rBlo t 5 e sua forma modificada candidata a hipoalérgeno (mBlo t 5), bem como ao extrato total de *B. tropicalis* (Bt total) e Blo t 5 nativo (nBlo t 5) por ELISA em soro de pacientes atópicos e não atópicos.
- Correlacionar os níveis das diferentes classes de anticorpos entre os alérgenos recombinantes no grupo de pacientes atópicos sensibilizados a *B. tropicalis*;
- Avaliar o potencial hipoalergênico da forma modificada de rBlo t 5 (mBlo t 5) pela análise da redução de reatividade aos anticorpos IgE e aumento da reatividade aos anticorpos IgG4 no grupo de pacientes atópicos sensibilizados a *B. tropicalis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos e critérios seletivos

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob processo nº 322/08 (Anexo A), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos, segundo as normas da Resolução CNS 196/96.

Pacientes atendidos no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) foram questionados após o atendimento clínico sobre a possibilidade de participarem do estudo. Aqueles que concordaram em participar foram previamente esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e todos os procedimentos que seriam realizados, sendo o aceite preenchido sob a forma de Termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B) e a seleção feita por meio do questionário clínico (Anexo C) elaborado segundo International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC, 1998), e pelo resultado do teste cutâneo de puntura (TCP) a extratos de aeroalérgenos. O Quadro 1 lista os critérios de inclusão e exclusão que foram adotados no processo de seleção dos pacientes.

A seleção possibilitou a triagem de oitenta pacientes atópicos ($n = 80$) de ambos os gêneros, faixa etária entre 18 e 60 anos, durante o período de março a dezembro de 2011. Os indivíduos triados foram distribuídos em dois grupos, segundo o histórico clínico e positividade ao teste cutâneo de puntura (TCP) e ao teste sorológico ELISA, o qual foi realizado posteriormente à triagem. O primeiro grupo composto por 55 pacientes atópicos (Bt+) com história clínica de sintomas relacionados à exposição à poeira domiciliar; TCP positivo e presença de IgE sérica específica para *Blomia tropicalis* (Bt). O segundo composto de 25 pacientes atópicos (Bt-) com história clínica de sintomas relacionados à exposição à poeira domiciliar; TCP e ELISA negativos para Bt, mas positivos aos ácaros *D. pteronyssinus* (Dp) e/ou *D. farinae* (Df). Um terceiro grupo composto de trinta indivíduos saudáveis ($n = 30$) de ambos os gêneros, faixa etária entre 19 e 59 anos, assintomáticos quanto a qualquer doença alérgica e com TCP negativo a todos os aeroalérgenos testados foram também selecionados entre funcionários e alunos da UFU. Todo o processo de seleção compreendido por anamnese, TCP e posteriormente coleta de sangue foi realizado sob a supervisão do médico alergologista responsável.

Critérios Seletivos	
Inclusão	Exclusão
Aceite em participar do estudo (Termo de consentimento)	Recusa em participar do estudo
Teste cutâneo de puntura (TCP) positivo para pelo menos um dos ácaros testados	Idade inferior a 18 anos ou superior a 60 anos
História clínica de sintomas relacionados com exposição à poeira domiciliar (Questionário clínico)	Tratamento com anti-histamínicos ou corticosteroides por via oral ou tópica na semana anterior ao teste Presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo Estar inserido em procedimento de imunoterapia ao alérgeno de <i>Blomia tropicalis</i>

Quadro 1. Critérios seletivos utilizados para a amostragem dos pacientes a serem incluídos no estudo.

3.2 Teste cutâneo de puntura (TCP)

A técnica de puntura é a mais usada pela boa reproduzibilidade e facilidade de aplicação, pois é rápido de realizar, permite testar vários alérgenos ao mesmo tempo e oferece menor risco de reações sistêmicas. Além disso, quando realizado com extratos adequados correlaciona-se com a sensibilidade clínica.

Uma gota de antígeno foi aplicada sobre a pele na região do antebraço. Passou-se uma lanceta através desta gota provocando a ruptura da camada mais superficial da pele. A leitura do resultado foi feita entre 15 a 20 minutos. Registrou-se a média (em mm) dos diâmetros da pápula e do eritema; foram anotados o diâmetro maior (em mm) e o diâmetro perpendicular no ponto médio do maior; a média desses valores (em mm) foi registrada. As reações consideradas clinicamente relevantes e, portanto, como resultados

positivos, apresentaram pápula com 3mm ou mais de diâmetro médio. (Anexo D) (DAHER et al., 2009).

Para auxiliar a interpretação dos testes são necessários os controles negativo e positivo. As soluções usadas como controle negativo são geralmente os diluentes utilizados na conservação dos extratos, servindo para detectar dermografismo e reatividade inespecífica da pele ao diluente e/ou ao puntor. Como controle negativo utilizou-se solução salina fisiológica em fenol 0,4% e glicerina diluída a 50% (OPPENHEIMER & NELSON, 2006). O controle positivo ajuda a detectar a supressão por medicamentos ou doença, como controle positivo, utilizou-se cloridrato de histamina a 10 mg/mL . A resposta positiva no teste cutâneo reflete a presença de anticorpos alérgeno-específicos ligados aos mastócitos, entretanto, não demonstra que este alérgeno seja a causa das manifestações clínicas. Isto é, a resposta positiva reflete sensibilização, mas não necessariamente alergia clínica.

O TCP foi realizado utilizando vários extratos aeroalergênicos: ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*); epitélio de cão (*Canis familiaris*), epitélio de gato (*Felis domesticus*), barata (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*), fungo (*Alternaria alternata*) e gramínea (*Lolium perene*). Os extratos alergênicos comerciais e soluções controle foram comprados da FDA Allergenic, RJ, Brasil.

3.3 Obtenção do soro de pacientes

Para a avaliação por testes sorológicos, foram utilizados soros de indivíduos atópicos, de acordo com o quadro clínico do paciente e TCP positivo ao ácaro *Blomia tropicalis* ou negativos para *B. tropicalis*, mas positivos para *D. pteronyssinus* e/ou *D. farinae*, bem como soros de indivíduos saudáveis (TCP negativo e ausência de sintomas relacionados à alergia). As amostras de sangue (20 mL de cada indivíduo) foram coletadas sem anti-coagulante por punção venosa na região do antebraço. Posteriormente, foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos e os soros obtidos foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C até a realização dos testes.

3.4 Pesquisa da sequência gênica do alérgeno Blo t 5 de *Blomia tropicalis* e construção dos genes sintéticos

Através da análise da sequência gênica do alérgeno Blo t 5 do ácaro *Blomia tropicalis* presente na poeira domiciliar, em bancos de dados no Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com número de acesso O96870, evidenciamos que esse alérgeno apresenta uma sequência de 537 pb e codifica um produto protéico de 134 aminoácidos (número de acesso AAD10850). A sequência gênica que codifica o alérgeno Blo t 5 de *B. tropicalis* foi utilizada para criar dois sistemas de expressão sintéticos, os quais foram adquiridos da empresa GenScript (www.genscript.com). Uma das sequências codifica a sequência nativa de Blo t 5 e outra sequência, com uma alteração que produziu um rearranjo na sequência nativa de Blo t 5. Essa mudança foi feita como um mosaico, ou seja, a sequência que codifica o alérgeno Blo t 5 nativo foi dividida em 4 fragmentos, os quais foram rearranjados provocando uma alteração na ordem convencional do alérgeno Blo t 5 nativo. Essa alteração teve como objetivo promover uma inversão na estrutura da molécula nativa e consequentemente, inviabilizar o reconhecimento de anticorpos do tipo IgE, ao romper um dos os epítópos conformacionais. Por outro lado, os epítópos lineares foram mantidos, podendo ser reconhecidos por células T, permanecendo efeito vicinal por meio de anticorpos do tipo IgG.(Figura 4 A, B). As sequências sintéticas foram ligados no vetor pUC57 e sub-clonadas no vetor de expressão pET14b (Novagen, EUA), a fim de promover a proteínas com cauda de histidina (afinidade ao níquel).

A

I	20	40	II	60
MKFAIVLIAC FAASVLAQE	H KPKKDDFRNE FDHL	LIEQAN HAI	EKGEHQL LY	LQHQLDEL
NENKSKE	LE Q KIIRELDVVC AMIEGAQGAL ERELKRTDLN IL	ERFNYEEA QT	L SKILLKD	
KETE	QKVKD IQTQ			

B

I	20	40	IV	60
MKFAIVLIAC FAASVLAQE	H KPKKDDFRNE FDHL	ERFNYE EA	QTL SKILL	KDL KETE QKV
KDI	QTQ LIEQ ANHAI EKGEH QLLY LQHQL DEL NENSKEL QE	KIIRELDV	V CAMIEGAQG	
ALERE	ELKRTD LNIL			

Figura 4. (A) Sequência de aminoácidos do alérgeno Blo t 5 de *Blomia tropicalis* obtida através do Genbank, com número de acesso AAD10850. Os números arábicos referem-se à posição dos aminoácidos e as letras coloridas representam quatro fragmentos (I, II, III e IV) identificados na sequência do alérgeno nativo. (B) Sequência mosaico de aminoácidos no alérgeno modificado (mBlo t 5) obtido por alteração da ordem dos fragmentos (I, IV, II e III) identificados no alérgeno nativo.

3.5 Produção de células bacterianas competentes

As células bacterianas de *Escherichia coli* tornaram-se competentes para a transformação com utilização inicial de um pré-inóculo em meio de cultura Luria Bertani (LB) caldo (10 g de NaCl, 10 g de bactroptona e 5 g de extrato de levedura por litro pH 7,5) (Sigma-Aldrich Co., MO, EUA) crescido previamente por 18 horas (*E. coli* cepa DH5- α (Novagen, EUA)). Inoculou-se 250 μ L do pré-inóculo em 25 mL de meio de cultura LB caldo incubado em agitador orbital a 180 rpm a 37°C até atingir densidade óptica (D.O.) de 0,1 a 0,3 (aproximadamente 1 hora). As células foram posteriormente centrifugadas a 3000 x g a 4°C durante 15 minutos e o sedimento suspenso em 5 mL de solução de CaCl₂ a 50 mM a 4°C com suave agitação por inversão do tubo. A partir desse momento a suspensão de células manteve-se no gelo. Centrifugou-se novamente a 3000 x g a 4°C por 15 minutos, descartou-se o

sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso lentamente em 500 µL de solução de CaCl₂ a 50 mM a 4°C com adição de 250 µL de meio de cultura LB caldo. As células foram mantidas por 1 hora em banho de gelo, sendo a partir de então consideradas competentes (AZEVEDO, 2003). As células assim tratadas foram imediatamente utilizadas para transformação de *E. coli* com pET14b-rBlo t 5 e pET14b-mBlo t 5.

3.6 Reação de transformação de *E. coli* DH5- α com pET14b-rBlo t 5 e pET14b-mBlo t 5

A transformação das células competentes foi realizada através da incubação de 20 µL destas a partir de suspensões celulares com D.O 0,6 acrescidos de 2,5 µL (20 ng) de pET14b-rBlo t 5 e/ou pET14b-mBlo t 5 em gelo durante 5 minutos. Posteriormente, realizou-se o choque térmico por 3 minutos a 42°C com subsequente banho de gelo por 10 minutos. Adicionou-se 250µL de meio SOC (Qiagen Inc., CA, EUA) e a reação foi incubada por 1 hora a 37°C em agitação orbital a 180 rpm. A suspensão bacteriana obtida foi adicionada a placas de Petri contendo meio de cultura LB ágar com ampicilina (Sigma) a 10 µg / mL e incubada por 18h a 37°C. Foram utilizados diferentes volumes de suspensão bacteriana (10 µL, 15 µL, 25 µL, 50 µL e 150 µL). As colônias transformadas foram capazes de crescer nesse meio seletivo, foram coletadas e incubadas em meio de cultura LB caldo acrescido de ampicilina a 10 µg / mL por 18h a 37°C para extração do vetor (plasmídeo contendo o inserto).

3.7 Extração do plasmídeo pET14b-rBlo t 5 e pET14b-mBlo t 5 de *E. coli* DH5- α

A fim de promover a extração dos vetores pET14b-rBlo t 5 e pET14b-mBlo t 5 da *E. coli* DH5- α (bactéria de estocagem) para transfectar em BL21(DE3) pLySs (bactéria de expressão - Novagen) utilizou-se o protocolo “Miniprep Plasmid DNA kit” (Qiagen) conforme instruções do fabricante. Os inóculos crescidos por 18 horas foram centrifugados a 4700 rpm por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi processado utilizando o Kit Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit). Brevemente, foram adicionados em cada reação 250 µL do tampão P1 e posteriormente 250 µL do tampão P2 e 350 µL do tampão N3, invertendo o tubo cuidadosamente 6 vezes. Centrifugou-se a 25°C por 10 minutos com rotação de 10000 x g. O sobrenadante foi aplicado à coluna fornecida pelo kit e foi realizada outra centrifugação por 1 minuto a 10000 x g a 25°C

para retenção do DNA. Para lavagem da microcoluna, utilizou-se 750 µL do tampão PE, com posterior centrifugação por 1 minuto 10000 x g a 25°C. Para remover resíduos do tampão de lavagem, desprezou-se o sobrenadante e centrifugou-se por 1 minuto 10000 x g a 25°C. Para eluir o DNA, a microcoluna foi transferida para um microtubo limpo e foi adicionado 50 µL de tampão EB, centrifugando-se novamente por 1 minuto 10000 x g a 25°C. A confirmação da presença do gene para rBlo t 5 e mBlo t 5 foi realizada através da análise por eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen, CA, EUA) com corrida de 50 minutos a 120 Volts, utilizando como corante Blue Green Loading (LGC Biotecnologia LTDA).

3.8 Reação de transformação dos vetores pET14b-rBlo t 5 e pET14b-mBlo t 5 em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

A transformação de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS com pET14b-rBlo t 5 e pET14b-mBlo t 5 foi realizada em condições semelhantes como descrito no item 3.6.

3.9 Expressão de rBlo t 5 e mBlo t 5 em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

A expressão dos alérgenos recombinantes rBlo t 5 e mBlo t 5 foi dividida em três etapas:

- 1) Teste de indução da expressão proteica em pequena escala, com o objetivo de verificar se a expressão foi alcançada.
- 2) Produção em larga escala, visando a produção e posterior purificação dos alérgenos recombinantes em quantidade suficiente para os ensaios subsequentes.
- 3) Teste de solubilidade para avaliar condições ideais de purificação e escolha do tampão de lise.

3.9.1 Teste de indução da expressão de rBlo t 5 e mBlo t 5 em *E. coli* BL21(DE3) pLysS

Para o teste de expressão de rBlo t 5 e mBlo t 5 em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS foram selecionadas duas colônias. As colônias foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura LB caldo com ampicilina a 10 µg / mL e incubadas por 18 horas a 37°C em agitação de 180 rpm. Um volume de 250 µL dos inóculos foi suspenso em 25 mL de meio de cultura LB caldo com ampicilina a 10 µg / mL e incubado sob agitação de 180

rpm a 37°C até atingir a D.O de 0,6 (aproximadamente 3 horas). As alíquotas de 1 mL de suspensão bacteriana sem indução (Tempo inicial) foram separadas, centrifugadas a 9000 x g por 2 minutos e o sedimento foi ressuspento em 50 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH 6 SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% Glicerol a 20%). O volume restante foi utilizado para os testes de indução da expressão proteica.

Durante os ensaios de expressão adicionou-se IPTG (Sigma) aos inóculos em concentração de 0,5 mM, sendo estes incubados a 30°C em agitação de 180 rpm por 18 horas. Foram retiradas alíquotas de 1 mL após o período de indução (Tempo final) e o sedimento foi ressuspento em 100 µL de tampão de amostra. Para verificar a expressão de rBlo t 5 e mBlo t 5, o conteúdo proteico das amostras foi analisado em gel SDS-PAGE como descrito no item 3.11.

3.9.2 Produção de rBlo t 5 e mBlo t 5em E. coli BL21 (DE3) pLysS em larga escala

Para produção de rBlo t 5 e mBlo t 5em larga escala utilizou-se a cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformada, sendo esta inoculada em 100 mL de meio de cultura LB caldo com ampicilina a 10 µg / mL a 37°C por 18 horas. As células foram novamente inoculadas em 900 mL de meio de cultura LB caldo, totalizando um volume final de 1L, e incubadas a 37°C até atingir uma D.O de 0,6 (aproximadamente 1 hora). Adicionou-se 0,5 mM de IPTG e incubou-se por 18 horas no agitador orbital a 180 rpm a 30°C.

Células da cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas, foram cultivadas por 18 horas sem adição de IPTG para serem utilizadas como controle negativo, a fim de avaliar a eficiência da indução da produção protéica de rBlo t 5 e mBlo t 5. Para tal, foram separadas alíquotas de 1mL do tempo sem indução (Tempo inicial) e tempo induzido (Tempo final). Ambas as alíquotas foram centrifugadas a 9000 x g por 2 minutos e ressuspensas em tampão de amostra, 50 µL e 100 µL respectivamente. Posteriormente o perfil das bandas de indução foi avaliado em gel SDS-PAGE de 13,5%.

3.9.3 Teste de solubilidade e extração das proteínas recombinantes

Para avaliar o melhor tampão a ser utilizado na purificação, 100 µL da suspensão bacteriana do tempo induzido (Tempo final) foi utilizada. Centrifugou-se a

suspensão a 9000 x g por 2 minutos e o sedimento foi ressuspenso em 50 µL de salina tamponada com fosfato no pH 7,2 (PBS). Para a reação de lise bacteriana incubou-se por 30 minutos no gelo 5 µL de lisozima (Sigma) com 45 µL de bactéria com PBS, posteriormente congelou-se a amostra em gelo seco e descongelou a 42°C por 6 vezes. Centrifugou-se a 10000 x g por 20 minutos e o sobrenadante foi guardado para análise posterior com 100 µL de tampão de amostra. O sedimento foi ressuspenso com 500 µL de PBS e centrifugado por 20 minutos a 10000 x g, novamente o sedimento foi ressuspenso com 500 µL de PBS e centrifugado a 10000 x g. Adicionou-se ao sedimento final 100 µL de tampão de amostra. Posteriormente o sobrenadante e o sedimento final foram analisados em gel SDS-PAGE 13,5%, para averiguar se as proteínas recombinantes produzidas eram solúveis ou não.

3.10 Purificação e dosagem proteica dos alérgenos rBlo t 5 e mBlo t 5

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada através da utilização do sobrenadante ou sedimento obtido como descrito no item 3.11.3. A proteína recombinante rBlo t 5, foi ressuspensa em tampão de lise sem uréia (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 0,2% Triton, 1 mM Aprotinina pH 8.0) e mBlo t 5 em tampão de lise contendo 6M uréia, na razão de 5 mL de tampão por 1 g de sedimento. Após a solubilização do sedimento por 30 minutos à 4°C, este foi submetido à sonicação (Bandelin Sonoplus HD 2070) (10 vezes por 30s, 50 W, no gelo), para rompimento das células e dos corpos de inclusão e liberação da proteína.

As proteínas com cauda de histidina foram purificadas por cromatografia de afinidade a níquel Ni-NTA Agarose (Qiagem GmbH). Primeiramente, a coluna de níquel foi equilibrada com o tampão de ligação (50 mM fosfato de sódio anidro, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 7,4) sem uréia para rBlo t 5 e com 6 M de uréia para mBlo t 5. Após injetar a amostra na coluna, o tampão de ligação foi aplicado novamente antes do tampão de eluição (500 mM Imidazol, 50 mM fosfato de sódio, 500 mM NaCl pH 7.4) com ou sem uréia 6M para lavagem das proteínas que não têm afinidade pelo níquel. A proteína rBlo t 5 eluída foi dialisada e concentrada em Amicon (Millipore, MA, EUA) contra PBS com membrana de 3,5 kDa. A forma modificada mBlo t 5, foi dialisada e concentrada em Amicon contra tampão fosfato com concentrações decrescentes de uréia (4 M, 2 M, 1M, 0,5 M e 0M) com membrana de 3,5 kDa.

Alíquotas dos alérgenos recombinantes purificados foram armazenadas a -70°C, até o momento dos testes.

O concentração proteica das proteínas recombinantes rBlo t 5 e mBlo t 5 foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A curva de calibração foi realizada com soro albumina bovina (BSA, Sigma) em diluições duplas seriadas de 500 a 15,6 µg/mL. Os valores da densidade óptica (D.O.) a 595 nm das amostras analisadas foram obtidos e comparados aos da curva de calibração, utilizando o programa Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA), de forma a fornecer os dados da concentração proteica das amostras.

3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e detecção de rBlo t 5 e mBlo t 5 por *Western blotting*

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

Os gel de separação foi preparado a 13,5%, composto de uma solução Tris-HCl 375 mg / mol, pH 8,8, dodecil sulfato de sódio (SDS, Bio-Rad) 0.1%, N, N'-Metileno-bis-acrilamida (Bio-Rad) 15%, N,N,N,N-tetrametilenodiamina (TEMED, Bio-Rad) 0.125% e persulfato de amônia (Bio-Rad) 0,125%, diluídos em água deionizada. O gel de empilhamento foi preparado a 5%, com os mesmos compostos, porém utilizando Tris-HCl 125mg/mol (pH 6.8) como solução tamponante. O tempo de polimerização foi de aproximadamente 40 minutos para o gel de separação e 20 minutos para o gel de empilhamento.

As amostras foram previamente diluídas em tampão de amostra, contendo Tris-HCl 0.1M (pH 6.8), SDS 4%, azul de bromofenol 0.2% e glicerol 20%, e submetidos a aquecimento a 95°C em banho seco (Termobath ALB64- Finemould Precision Ind., Co., Seoul, Coréia do Sul), por 10 minutos, para desnaturação proteica antes da aplicação no gel, utilizando sistema para mini-gel (Mighty Small Multiple Caster, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA). As amostras foram aplicadas no sistema em paralelo com marcador de peso molecular (BenchMarkTM Protein Ladder 6-180 kDa, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha).

A eletroforese foi realizada sob condições de corrente de 20mA por aproximadamente 50 minutos. Após a corrida os géis foram corados com Coomassie

Blue (Coomassie brilliant blue R250, Sigma) e para descorar o gel utilizou-se uma solução descorante (Etanol 30%, Ácido Acético 10% e Água deionizada 60%). Todo o processo para corar e descorar o gel foi realizado com agitação pendular lenta, à temperatura ambiente.

Os géis não corados foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose (0,45, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) como anteriormente descrito (Towbin et al. 1979), utilizando um sistema de transferência semi-seco (Trans-blot SD, bio-Rad Laboratories Inc.). A fim de confirmar a produção dos alérgenos rBlo t 5 e mBlo t 5, frações recuperadas após a cromatografia de afinidade por níquel, foram provadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Blo t 5 (clone 4G9 - Indoor Biotechnologies Inc., Charlottesville, VA). As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) em PBS e 0,05% de Tween-20 (PBS-TM) durante 2 h à temperatura ambiente e, em seguida, incubadas por 18h a 4°C com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Blo t 5 (Indoor Biotechnologies Inc.) diluído 1:1000 em PBS-TM ou apenas PBS-TM. Um segundo passo, utilizando anticorpo biotinilado anti-IgG de camundongo (Kierkegaard Perry e Lab., Gaithersburg, EUA) diluído a 1:1000 foi adicionado e incubado durante 2 h à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-T, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com estreptavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich) diluída a 1:1000 e revelado com comprimidos de 10 mg de 3,3 'diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich) e 0,03% de H₂O₂, até o aparecimento de bandas, quando a reação foi interrompida com a adição de água destilada.

3.12 Detecção de rBlo t 5 e mBlo t 5 por Slot-blot

Para confirmar a reatividade específica das proteínas recombinantes produzidas e purificadas previamente, membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com rBlo t 5 (2,5 µg / slot) ou t mBlo 5 (2,5 µg / slot) em dispositivo a vácuo (Bio-dot ® SF aparelho, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Como controles, extrato total de *B. tropicalis* (Bt total) (10 µg / slot; FDA Allergenic) e soro albumina bovina (5 µg / slot; BSA, Sigma) também foram blotados nas mesmas condições. Para a detecção com anticorpo monoclonal de camungongo anti-Blo t 5 (4G9), as membranas foram bloqueadas com 800 µL de leite em pó desnatado a 5% (Molico) em PBS e 0,05% de Tween-20 (PBS-

TM) durante 2 h à temperatura ambiente, em seguida, foram incubadas por 18h a 4°C com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Blo t 5 (Indoor Biotechnologies Inc.) diluído 1:500 em PBS-TM ou apenas PBS-TM. Posteriormente, anticorpo biotinilado anti-IgG de camundongo (Kierkegaard Perry e Lab.) diluído 1:1000 foi adicionado e incubado durante 2 h à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-T, membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluída 1:1000 e reveladas com 10 mg de DAB (Sigma) diluído em 15 ml de solução salina tamponada com Tris 20 mM (pH 7.4) e 12 µL de peróxido de hidrogênio.

Em um segundo experimento, para detecção de rBlo t 5 e mBlo t 5 por IgE específica presente no soro, as membranas foram bloqueadas com BSA a 5% em PBS e 0,05% de Tween-20 (PBS-T-BSA) durante 2 h à temperatura ambiente e depois, incubadas por 18h a 4°C com amostras de soro de indivíduos atópico Bt+, atópico Bt– e não atópico, diluídas 1:2 em PBS-T-BSA ou apenas PBS-T-BSA. Em seguida, anti-IgE humana biotinilada (Kierkegaard Perry e Lab.) diluída 1:3000 foi adicionada e incubada durante 2 h à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-T, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluída 1:1000 em PBS-T-BSA e reveladas por DAB e 0,03% de H₂O₂. Agitação pendular lenta e constante foi utilizada durante toda a reação que foi interrompida com água destilada após a visualização das bandas.

3.13 Mensuração de IgE, IgG1 e IgG4 específicos ao extrato total de *B. tropicalis* (Bt total), Blo t 5 nativo (nBlo t 5) e as proteínas recombinantes rBlo t 5 mBlo t 5

Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados para a detecção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 contra os alérgenos de Bt total, nBlo t 5, r Blo t 5 e mBlo t 5 em amostras de soros dos pacientes atópicos e indivíduos não atópicos como descrito por Queirós e colaboradores (2008), com algumas modificações. Placas de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas (50µL / poço) com os extratos alergênicos de Bt total (10µg / poço) (FDA Allergenic) ou rBlo t 5 (5µg / poço) ou 1rBlo t 5 (5µg / poço) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas (150µL / poço) com PBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA, Sigma Chemical Co.) a 1% por uma hora à temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagens, as amostras de

soros (diluições: 1:2 para IgE, 1:5 para IgG1 e IgG4) foram adicionadas em duplicata e incubadas por 2 horas a 37°C. Em paralelo, soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. Após um ciclo de seis lavagens, as placas foram incubadas com os anticorpos secundários biotinilados (anti-IgE humana 1:3000 - Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.; anti-IgG1 humana 1:3000 – Sigma; anti-IgG4 humana 1:1000 - Sigma) por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (50 µl/poço) (Sigma) na diluição de 1:1000 em PBST-BSA 1%. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente e novas lavagens, as placas foram reveladas por meio da adição do substrato enzimático (50 µL / poço) (ABTS a 0,01 M em tampão citrato-fosfato a 0,07 M, pH 4,2 contendo 0,03% de H₂O₂). Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de placas de microtitulação (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 405 nm. Os níveis de anticorpos IgE foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE), segundo a fórmula: IE=D.O. amostra/cut off, onde *cut off* foi calculado como a média da DO de soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Valores de IE≥1,2 foram considerados positivos para excluir valores de reatividade limítrofes próximos a valores de IE=1,0.

Para detecção de níveis de IgE, IgG1 e IgG4 para a proteína Blo t 5 nativa foi realizado um ELISA reverso (Queirós et al. 2008). Placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Blo t 5 (clone 4G9; Indoor Biotechnologies) a 1.0 µg / poço e incubados subsequentemente com extrato Bt total, amostras de soros, anticorpo secundário biotinilado, conjugado estreptavidina peroxidase e substrato enzimático como descrito acima para o ELISA convencional.

3.14 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças entre os grupos referentes à idade foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. Diferenças quanto ao gênero, à positividade no TCP e ao diagnóstico clínico foram analisados pelo Qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, quando apropriado. Diferenças no tamanho médio da pápula foram avaliadas por ANOVA e testes de comparação múltipla de Tukey. As diferenças nos níveis de anticorpos entre os

alérgenos dentro de cada grupo foram analisadas por Friedman e teste de comparação múltipla de Dunn, e entre os grupos para cada alérgeno pelo teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. Diferenças na soropositividade entre os alérgenos dentro de cada grupo foram analisadas pelo teste exato de Fisher. A correlação entre os níveis de isotipos de anticorpos ou entre os alérgenos de Blo t 5 foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Valores de $p <0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.15 Biossegurança

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

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização Demográfica e Clínica dos Indivíduos do Estudo

Os cento e dez indivíduos selecionados que aceitaram participar do estudo e preencheram os critérios éticos e seletivos definidos em Material e Métodos (item 3.1) foram distribuídos nos grupos atópico Bt+ (Bt+), atópico Bt- (Bt-) e não atópico (NA), segundo histórico clínico de sintomas relacionados à asma e/ou à rinite e resultados do TCP ao extrato de alérgenos de ácaros. As características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos no estudo estão demonstradas na Tabela 1.

Não foram encontradas diferenças significativas para gênero e idade entre os três grupos analisados (atópicos Bt+, Bt- e não atópicos), embora o gênero feminino tenha sido o mais frequente em cada grupo ($p < 0,01$). No grupo de pacientes atópicos Bt+, 96,4% e 94,5% eram cossensibilizados a *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, respectivamente, com apenas dois pacientes também sensibilizados a *D. farinae* e três a *D. pteronyssinus*. No grupo atópico Bt-, 96% e 92% foram sensibilizados a *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, respectivamente, com apenas um paciente monossensibilizado a *D. farinae* e dois a *D. pteronyssinus*. Não foram encontradas diferenças significativas para a positividade no TCP e no tamanho médio de pápula entre os grupos de pacientes atópicos, bem como dentro de cada grupo. O diagnóstico mais frequente foram os sintomas associados à rinite no grupo de pacientes atópicos Bt+ (92,8%). Este grupo (Bt+) também apresentou maior frequência de sintomas relacionados à rinite do que no grupo atópico Bt- (44%) ($p < 0,0001$). Por outro lado, rinite associada à asma predominou no grupo atópico Bt- (40%), enquanto que no grupo de pacientes atópicos Bt+ foi menor (7,2%) ($p = 0,0008$). Apenas 16% dos pacientes do grupo atópico Bt- apresentaram outros sintomas.

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos indivíduos do estudo

Características	Grupos			Valor de p
	Atópico Bt+	Atópico Bt-	Não atópico	
Número de indivíduos	55	25	30	
Gênero				
Masculino	20	7	5	<0,2476 ^a
Feminino	35*	18*	25*	
Idade (anos)				
Mediana (intervalo)	28 (18-55)	34 (19-60)	29 (19-59)	0,2532 ^b
Positividade no TCP (n,%)				
<i>B. tropicalis</i>	55 (100%)	0	0	ND
<i>D. pteronyssinus</i>	53 (96,4%)	24 (96%)	0	1,0000 ^a
<i>D. farinae</i>	52 (94,5%)	23 (92%)	0	0,6453 ^a
Tamanho da pápula (média ± DP, mm)				
<i>B. tropicalis</i>	6,3 ± 3,3	0	0	ND
<i>D. pteronyssinus</i>	7,1 ± 3,6	6,6 ± 3,1	0	0,5325 ^c
<i>D. farinae</i>	7,2 ± 3,4	6,6 ± 3,2	0	0,4239 ^c
Diagnóstico clínico (n,%)				
Rinite	51 (92,8%)	11 (44%)	0	<0,0001 ^a
Rinite + asma	4 (7,2%)	10 (40%)	0	0,0008 ^a
Outros sintomas	0	4 (16%)	0	ND

Bt+: pacientes com TCP positivo para o extrato total de *Blomia tropicalis*; Bt-: pacientes com TCP negativo para o extrato total de *B. tropicalis*, mas positivo o extrato total de *D. pteronyssinus* e/ou *D. farinae*. Valores de p representam comparações feitas horizontalmente entre os grupos e asteriscos(*) representam comparações feitas verticalmente entre os parâmetros analisados (gênero e diagnóstico clínico) dentro de cada grupo. ND: não determinado; DP: desvio padrão; n: número; %: porcentagem; mm: milímetros.

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

^b Teste Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn;

^c ANOVA e teste de comparação múltipla de Tukey.

4.2 Construção dos genes sintéticos rBlo t 5 e mBlo t 5

A sequência original do gene que codifica o alérgeno Blo t 5 de *B. tropicalis* (537 pb) foi usada para criar dois genes sintéticos, um que codifica a sequência do alérgeno Blo t 5 nativo e (rBlo t 5) e outra uma sequência modificada do alérgeno Blo t 5 nativo (mBlo t 5). Para a construção do gene mosaico mBlo t 5, a sequência original de aminoácidos de Blo t 5 foi dividida em 4 fragmentos (I (resíduos 1-34), II (resíduos 35-68), III (resíduos 69-102) e IV (resíduos 103-134)) que foram reagrupados na ordem I(resíduos 1-34), IV (resíduos 103-134), II (resíduos 35-68)e III (resíduos 69-102) (Fig. 1A, B). Depois da síntese dos genes sintéticos, os vetores pET14b-rBlot5 e pET14b-mBlot5 foram utilizados para transfectar os genes desses alérgenos recombinantes em *E. coli* cepa BL21 e posterior expressão.

4.3 Expressão, purificação e dosagem proteica dos alérgenos rBlo t 5 e mBlo t 5 em *E. coli* (DE3) pLysS

A cinética de expressão dos alérgenos recombinantes rBlo t 5 e mBlo t 5 em *E. coli* BL21 transformada com o plasmídeo pET14b-Blo t 5 ou pET14b-mBlo t 5, foi avaliada através do teste de expressão em menor escala. Este foi realizado em diferentes tempos, variando do tempo zero a 18 horas com temperatura de 30°C e com rotação de 180 rpm. Após adicionar o indutor de expressão (IPTG) na concentração de 0,5 mM houve uma significativa expressão dos alérgenos rBlo t 5 e mBlo t 5, que apresentaram peso aproximado de 15 kDa.

A expressão de rBlo t 5 e mBlo t 5 em larga escala foi realizada com um inoculo bacteriano pré-selecionado no ensaio cinético. O volume total de 1L, com tempo de indução de expressão de 18 horas, a 30°C e rotação de 180 rpm foi produzido. As frações das amostras de rBlo t 5 e mBlo t 5 induzidas foram analisadas em gel SDS-PAGE 13,5%, conforme descrito a seguir.

O teste de solubilidade realizado para avaliar o tampão de lise ideal a ser usado na extração e purificação, demonstrou que o alérgeno recombinante rBlo t 5 estava presente no sobrenadante do lisado de células bacterianas, uma proteína solúvel, não sendo necessário a utilização de tampão com uréia. O alérgeno recombinante mBlo t 5 foi produzido dentro dos corpos de inclusão (sedimento), tratando-se de proteína insolúvel, sendo necessária a adição de tampão com alta molaridade de uréia para conseguir lisar os corpos de inclusão bacterianos e solubilizar a proteína. Após a

extração das proteínas, as mesmas foram purificadas por cromatografia de afinidade, as proteínas de interesse possuem uma cauda de histidina que se liga ao níquel da coluna cromatográfica. Os alérgenos recombinantes foram dialisados conforme descrito no item 3.10.

O perfil eletroforético de amostras do crescido bacteriano sem o indutor de expressão, assim como do crescido bacteriano induzido com IPTG e dos alérgenos recombinantes purificados foi analisado em gel SDS-PAGE 13,5%. Gel corado com Coomassie Blue revelou a presença de uma banda adicional de 15 kDa no extrato de *E. coli*/pET14b-rBlot5 induzidas com IPTG (Fig. 5A, coluna 2). Após a purificação desta amostra em resina de Ni-NTA agarose e separação em SDS-PAGE (Fig. 5A, coluna 3), observou-se uma banda fortemente corada (30 kDa) que pode representar dímeros estáveis de rBlo t 5 na presença de SDS, enquanto que o monômero de rBlo t 5 foi visualizado fracamente migrando com cerca de 15 kDa. Uma banda adicional foi também detectada com migração de cerca de 64 kDa que pode representar tetrâmeros estáveis de rBlo t 5. Em extratos de *E. coli*/pET14b-mBlot5 induzidas com IPTG (Fig. 5A, coluna 5) foi visualizada uma banda adicional fortemente corada com peso molecular de aproximadamente 15 kDa, provável monômero de mBlo t 5 (Fig. 5A, coluna 6). Outra banda adicional foi visualizada migrando entre 26 e 37 kDa podendo representar dímeros de mBlo t 5.

A dosagem proteica de rBlo t e mBlo t 5 pelo método de Bradford demonstrou que as concentrações das proteínas foram de 330 µg / mL e 250 µg / mL, respectivamente.

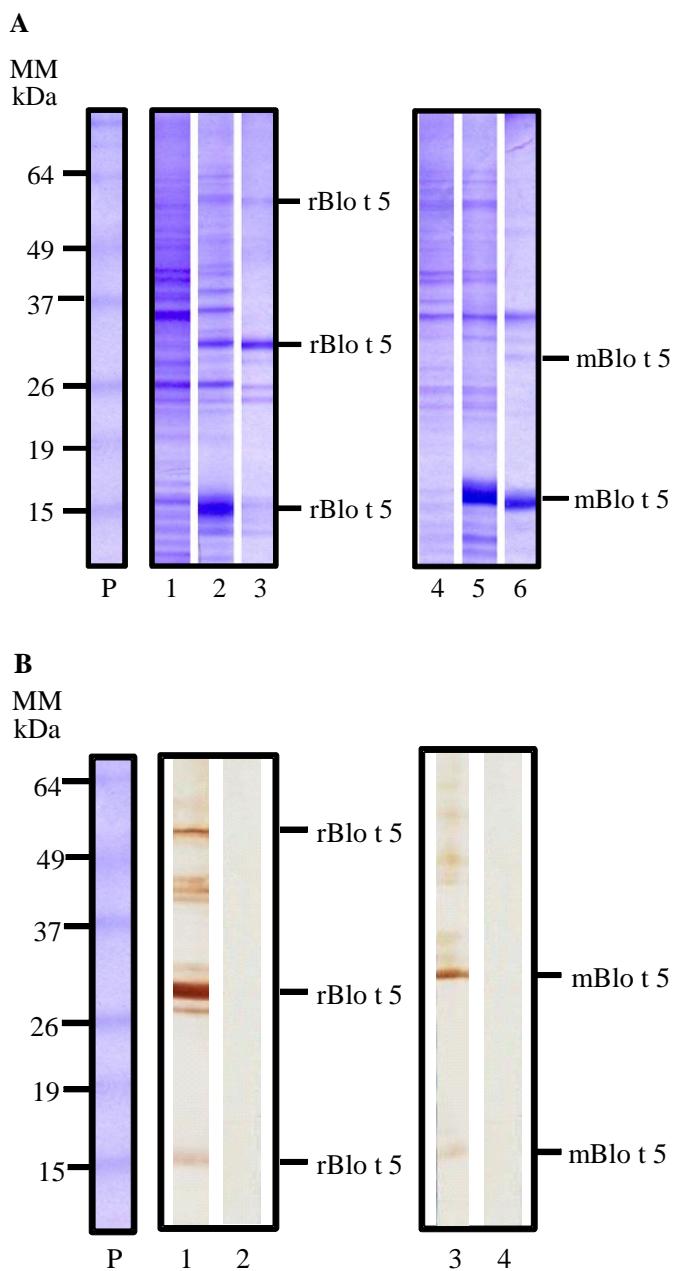


Figura 5. (A) Expressão dos alérgenos recombinantes rBlo t 5 e mBlo t 5 de *Blomia tropicalis* em *E. coli* BL21 transformada com pET14b contendo os respectivos genes. Cepas de *E. coli* BL21 foram induzidas com 0,5mM de IPTG. Amostras foram corridas em gel SDS-PAGE 13,5% e o gel corado com Coomassie blue. Coluna 1: Extrato proteico de *E. coli* BL21/gene rBlo t 5 sem IPTG; Coluna 2: Extrato de *E. coli* BL21/gene rBlo t 5 com IPTG; Coluna 3: rBlo t 5 purificada; Coluna 4: Extrato proteico de *E. coli* BL21/gene mBlo t 5 sem IPTG; Coluna 5: Extrato proteico de *E. coli* BL21/gene mBlo t 5 com IPTG; Coluna 6: mBlo t 5 purificada. (B) Westernblot de rBlo t 5 purificada (Colunas 1 e 2) e de mBlo t 5 purificada (Colunas 3 e 4), testadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Blo t 5, clone 4G9 (Colunas 1 e 3) ou somente diluente (Colunas 2 e 4) e reveladas com anti IgG de camundongo biotinilada, estreptavidina-peroxidase e DAB. Os alérgenos rBlo t 5 e mBlo t 5 estão indicados. P: Padrão de massa molecular (MM: Massa molecular) expresso em kiloDaltons (kDa).

4.4 Imunodetecção dos alérgenos recombinantes rBlo t 5 e mBlo t 5 por *Western blotting*

Os resultados do perfil eletroforético, visualizados no gel SDS-PAGE 13,5%, foram analisados por westernblot utilizando o anticorpo monoclonal anti-Blo t 5 anticorpo (clone 4G9). A Figura 5B, coluna 1, representa o perfil eletroforético do alérgeno rBlo t 5 purificado e mostrou marcação de bandas de cerca de 15, 30 e 60 kDa, com coloração mais intensa para a banda de 30 kDa comprovando a formação de monômero, dímero e tetrâmero de rBlo t 5. Duas bandas adicionais entre 19 e 26 kDa foram também detectadas em SDS-PAGE (Fig. 5A, coluna 2), mas nenhuma reatividade com o anticorpo monoclonal anti-Blo t 5 foi encontrada para essas bandas (Fig. 5B, coluna 1). Quando a amostra purificada de mBlo t 5 foi testada com anticorpo monoclonal anti-Blo t 5 (Fig. 5B, coluna 3), as únicas bandas detectadas foram as de 15 kDa (monômero) e 30 kDa (dímero), com coloração mais intensa para a banda de 30 kDa.

4.5 Imunodetecção dos alérgenos recombinantes rBlo t 5 e mBlo t 5 por Slot-blot

A reatividade específica de rBlo t 5 e de mBlo t 5 também foi confirmada por slot-blot, utilizando o anticorpo monoclonal anti-Blo t 5 e soro IgE positivo de paciente atópico Bt+, comparando-se com soro de indivíduos dos demais grupos (paciente atópico Bt- e indivíduo não atópico). Uma reatividade forte foi observada com o anticorpo monoclonal anti-Blo t 5 a ambos os alérgenos, particularmente para rBlo t 5, mas nenhuma reatividade foi encontrada para extrato Bt total, bem como a proteína irrelevante BSA (Fig. 6A, coluna 1). Da mesma forma, uma reatividade forte para IgE foi observada para ambos os alérgenos recombinantes, bem como ao extrato Bt total, que foi detectado por IgE específica presente no soro de paciente atópico Bt+ (Fig. 6B, coluna 1) enquanto não foi observada reatividade de IgE do soro de paciente atópico Bt- (Fig. 6B, coluna 2) e indivíduo não atópico (Fig. 6B, coluna 3), bem como nenhuma reação de qualquer um dos soros, à proteína irrelevante BSA, foi detectada.

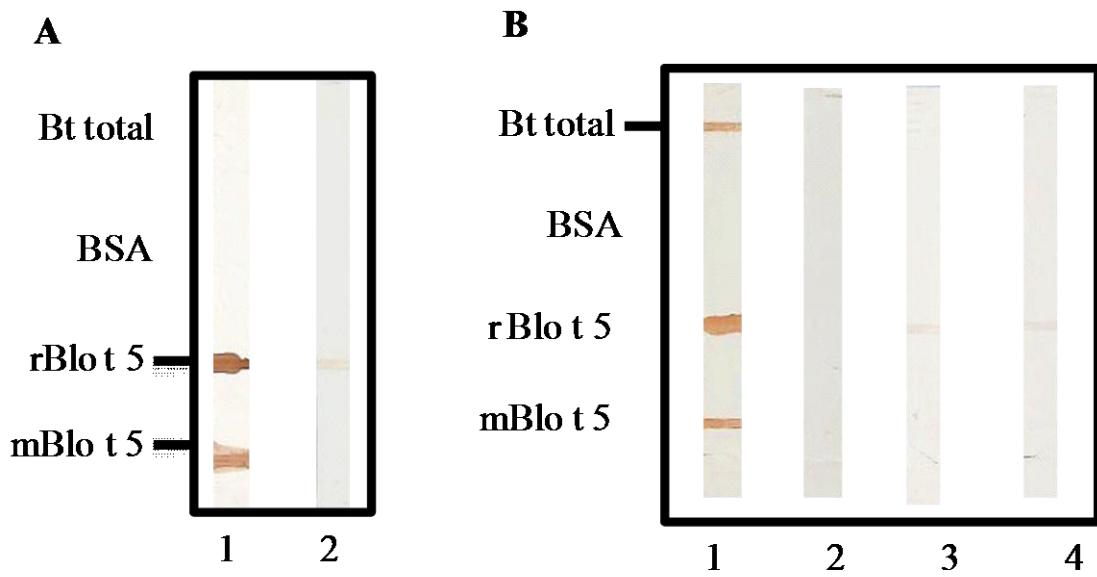


Figura 6. Slot-blot do alérgeno recombinante rBlo t 5 (2,5 μ g) e do alérgeno modificado mBlo t 5 (2,5 μ g) de *Blomia tropicalis*. Como controles, soro albumina bovina (BSA- 5 μ g) e extrato total de *B. tropicalis* (Bt total – 10 μ g) foram blotados. (A) As membranas de nitrocelulose foram testadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Blo t 5, clone 4G9 (Coluna 1) ou apenas diluente (Coluna 2) e reveladas com anti-IgG de camundongo biotinilada, estreptavidina-peroxidase e DAB. (B) As membranas de nitrocelulose foram testadas com soro de paciente atópico Bt+ (Coluna 1), soro de paciente atópico Bt– (Coluna 2), soro de indivíduo não atópico (Coluna 3) e apenas diluente (Coluna 4). A reação foi revelada com anti-IgE humana biotinilada, estreptavidina peroxidase e DAB.

4.6 Reatividade de IgE, IgG1 e IgG4 ao extrato Bt total, ao Blo t 5 nativo (nBlo t 5), ao rBlo t 5 e mBlo t 5

Os níveis de IgE, IgG1 e IgG4 ao extrato Bt total, ao alérgeno nativo Blo t 5 (nBlo t 5) e aos alérgenos recombinantes (rBlo t 5 e mBlo t 5) foram mensurados por ELISA em amostras de soros de pacientes atópicos (grupos Bt+ e Bt–) e indivíduos não atópicos. Em pacientes atópicos Bt+, os níveis de IgE ao extrato Bt total foram maiores do que para os alérgenos nativo e recombinantes ($p < 0,001$) e os níveis de IgE para nBlo t 5 foram menores do que para mBlo t 5 ($p < 0,05$), mas não para rBlo t 5 (Fig. 7). No grupo atópico Bt–, os níveis médios de IgE estavam abaixo do cut-off, embora uma reatividade limite foi detectada para todos os alérgenos, com apenas dois pacientes apresentando níveis de IgE elevados ao rBlo t 5. No grupo não atópico, não foi encontrada reatividade de IgE para nenhum os alérgenos analisados (Fig. 7). Ao analisar a positividade de IgE, a porcentagem de amostras de soros positivos ao extrato Bt total, em pacientes atópicos Bt+, foi maior do que aos outros alérgenos, enquanto que

a positividade de IgE ao nBlo t 5 foi a menor ($p < 0,05$) (Fig. 7). Não houve diferença significativa na positividade de IgE para os outros grupos.

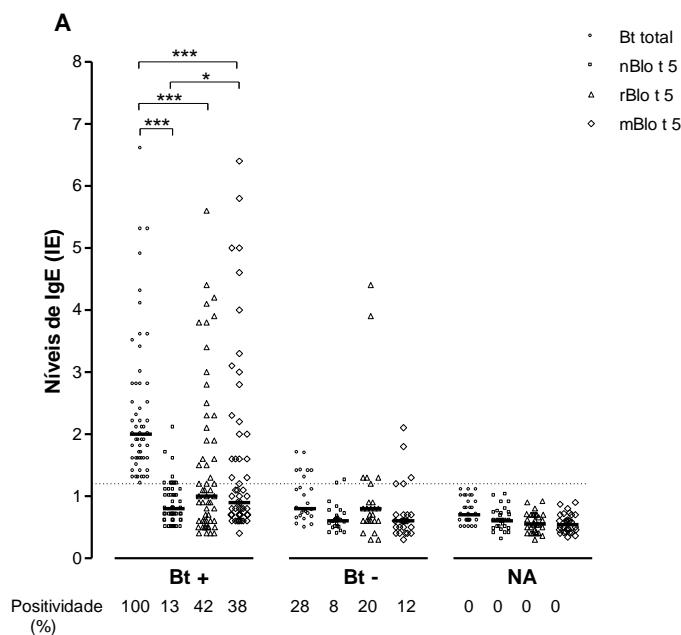


Figura 7. Níveis de IgE para o extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total), Blo t 5 nativo (nBlo t 5), Blo t 5 recombinante (rBlo t 5) e Blo t 5 modificado (mBlo t 5) determinado por ELISA em soro de pacientes atópicos Bt+ (n=55), pacientes atópicos Bt- (n=25) e indivíduos não atópicos (NA, n= 30). As barras horizontais indicam a mediana e as linhas tracejadas o valor de cut-off do índice ELISA para cada reação (IE $\geq 1,2$). Comparações entre os níveis de iisotipos de anticorpos dentro de cada grupo foram analisadas pelo teste de Friedman e pelo teste de comparação múltipla de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$). O percentual de positividade para cada alérgeno em cada grupo está indicado.

Ao analisar a reatividade de IgG1 (Fig. 8), em ambos grupos atópicos Bt+ e não atópicos, foi observada que os níveis IgG1 foram semelhantes ao extrato Bt total, ao rBlo t 5 e mBlo t 5, mas foram menores ao nBlo t 5, quando comparado aos outros alérgenos ($p < 0,05$). No grupo atópico Bt-, no entanto, os níveis de IgG1 para nBlo t 5 foram menores apenas quando comparados com o extrato Bt total e mBlo t 5 ($p < 0,05$), mas não para rBlo t 5. A positividade para IgG1 foi semelhante para o extrato Bt total e para os alérgenos recombinantes, mas maior que nBlo t 5 nos grupos de pacientes atópicos Bt + e indivíduos nãoatópicos ($p < 0,05$). No grupo de pacientes atópicos Bt-, embora a positividade de IgG1 para nBlo t 5 tenha sido menor do que para os outros alérgenos, o nível de significância não foi alcançado (Fig. 8).

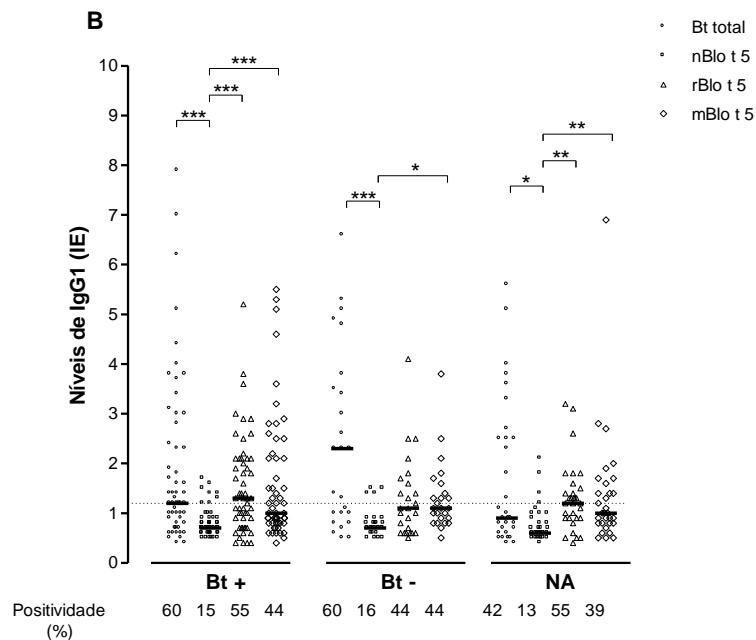


Figura 8. Níveis de IgG1) para o extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total), Blo t 5 nativo (nBlo t 5), Blo t 5 recombinante (rBlo t 5) e Blo t 5 modificado (mBlo t 5) determinado por ELISA em soro de pacientes atópicos Bt+ (n=55), pacientes atópicos Bt- (n=25) e indivíduos não atópicos (NA, n= 30). As barras horizontais indicam a mediana e as linhas tracejadas o valor de *cut-off* do índice ELISA para cada reação (IE \geq 1,2). Comparações entre os níveis de iisotipos de anticorpos dentro de cada grupo foram analisadas pelo teste de Friedman e pelo teste de comparação múltipla de Dunn (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,0001). O percentual de positividade para cada alérgeno em cada grupo está indicado.

Em relação ao isotipo IgG4 (Fig. 9), os níveis de IgG4 para mBlo t 5 foram superiores aos níveis ao extrato Bt total e ao rBlo t 5 no grupo atópico Bt+ ($p < 0,05$), mas não ao nBlo t 5. Dentro dos grupos atópicos Bt- e não atópicos, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os níveis de IgG4 para nenhum dos alérgenos (Fig. 7C). No grupo atópico Bt+, a positividade de IgG4 foi ligeiramente superior para mBlo t 5 do que para os demais alérgenos, embora não tenha atingido o nível de significância. Nos demais grupos (atópicos Bt- e não atópicos), não foi encontrada diferença significativa para positividade de IgG4 para nenhum dos alérgenos.

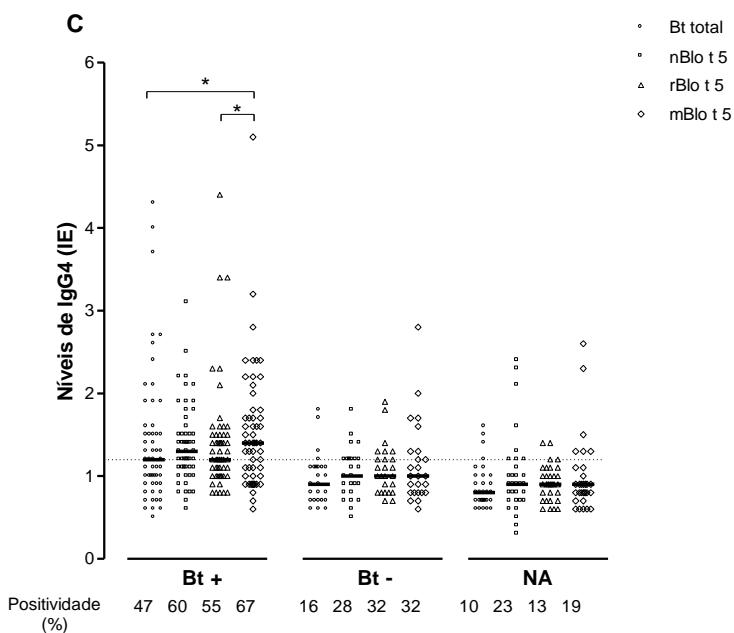


Figura 9. Níveis de IgG4 para o extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total), Blo t 5 nativo (nBlo t 5), Blo t 5 recombinante (rBlo t 5) e Blo t 5 modificado (mBlo t 5) determinado por ELISA em soro de pacientes atópicos Bt+ (n=55), pacientes atópicos Bt- (n=25) e indivíduos não atópicos (NA, n= 30). As barras horizontais indicam a mediana e as linhas tracejadas o valor de *cut-off* do índice ELISA para cada reação (IE $\geq 1,2$). Comparações entre os níveis de iisotipos de anticorpos dentro de cada grupo foram analisadas pelo teste de Friedman e pelo teste de comparação múltipla de Dunn (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,0001). O percentual de positividade para cada alérgeno em cada grupo está indicado.

4.7 Correlação e associação dos níveis de isotipos de anticorpos entre alérgenos recombinantes no grupo de pacientes atópicos Bt+

Comparando a reatividade dos anticorpos aos alérgenos rBlo t 5 e mBlo t 5, observou-se uma alta correlação positiva para IgE ($r_s = 0,7769$, $p < 0,0001$; Fig. 10A) e IgG1 ($r_s = 0,7125$, $p < 0,0001$; Fig. 10B), mas baixa correlação positiva para o isotipo IgG4 ($r_s = 0,3783$, $p = 0,0044$; Fig. 10C). A associação entre rBlo t 5 e mBlo t 5 para IgE, mostrou que 38% das amostras IgE positivas para mBlo t 5, 35% eram duplo-positivas (rBlo t 5 e mBlo t 5), sendo apenas 3% IgE positivas somente para mBlo t 5 (Fig. 10A). Da mesma forma, 44% das amostras IgG1 positivas a mBlo t 5, 40% foram duplo-positivas para ambos os alérgenos recombinantes e 4% foram positivas apenas para mBlo t 5 (Fig. 10B). Em contraste, 67% das amostras positivas para IgG4 ao mBlo t 5, 27% foram IgG4 positivas exclusivamente para mBlo t 5 (Fig. 10C), mostrando que

a positividade única de IgG4 ao mBlo t 5 foi maior do que aquela encontrada para IgG1 e IgE ($p = 0,0010$).

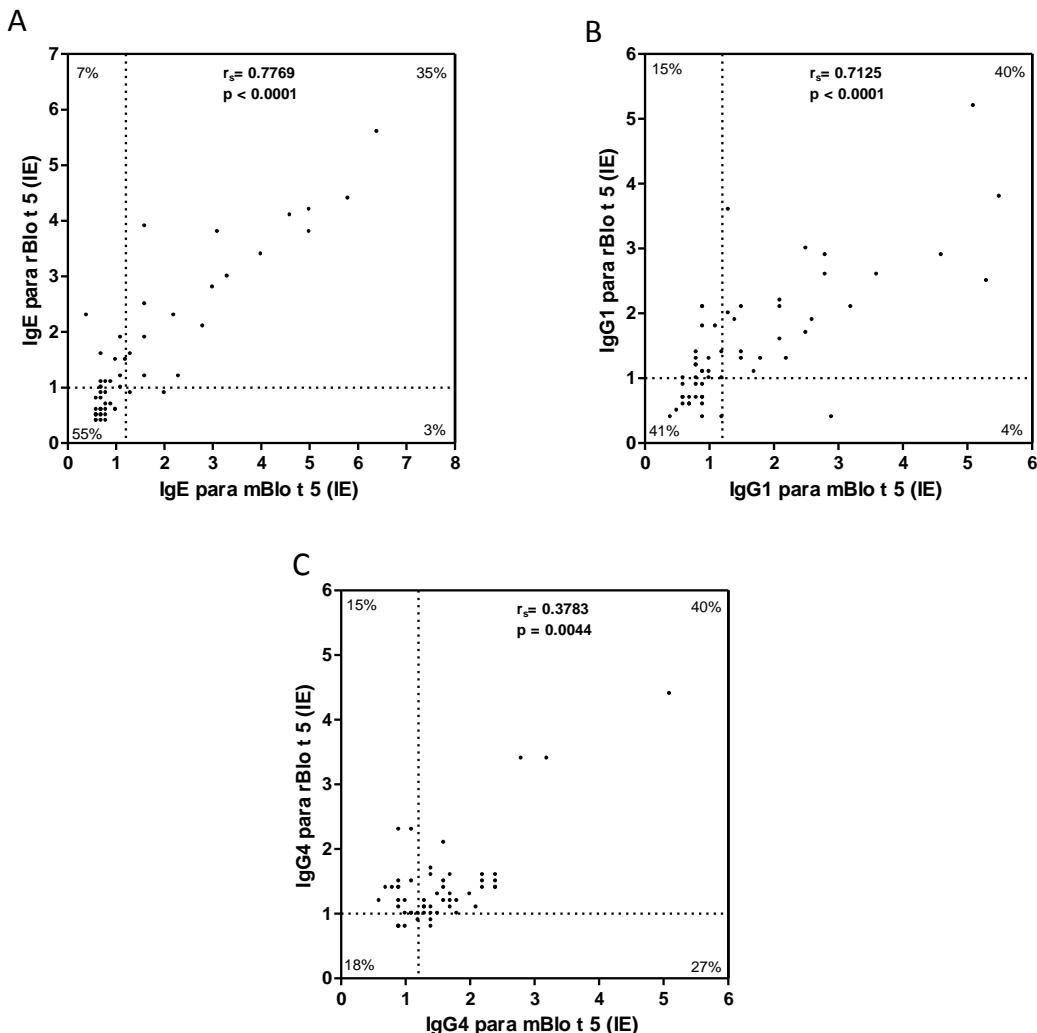


Figura 10. Correlação e associação dos níveis de isotipos de anticorpos entre os alérgenos recombinantes (rBlo t 5 e mBlo t 5). Níveis de IgE (A), IgG1 (B) e IgG4 (C) para rBlo t 5 e mBlo t 5 foram determinados por ELISA em 55 amostras de soros de pacientes atópicos Bt+. As linhas tracejadas indicam o valor de *cut-off* para o índice ELISA de cada reação ($IE \geq 1,2$). O coeficiente de correlação de Spearman (r_s) e os valores de p estão indicados. A porcentagem de amostras duplo-positivas, duplo-negativas, único-positivas e único-negativas estão indicadas no quadrante correspondente.

4.8 Correlação e associação entre os níveis de isotipos de anticorpos para rBlo t 5 ou mBlo t 5 no grupo de pacientes atópicos Bt+

Uma correlação significativa, porém baixa, foi encontrada somente entre IgE e IgG4 para rBlo t 5 ($r_s = 0,2750$, $p = 0,0422$; Fig. 11B) ou mBlo t 5 ($r_s = 0,3461$, $p = 0,0096$; Fig. 11E). Quando analisada a associação entre isotipos de anticorpos para rBlo

t 5, observou-se que a porcentagem de amostras somente positivas para IgG1 (31%) e IgG4 (27%) foi ligeiramente maior do que a das amostras positivas somente para IgE (18% e 15 %, respectivamente), embora sem diferença significativa (Fig.11A, B). Estes achados foram mais acentuados para o alérgeno recombinante mBlo t 5, ao analisar amostras unicamente IgG4 positivas (35%) em comparação com amostras positivas somente para IgE (5%) ($p = 0,0002$) (Fig. 11E). Além disso, a porcentagem de amostras apenas IgG4 positivas (38%) também foi maior do que a de amostras positivas somente IgG1 (15%) para mBlo t 5 ($p = 0,0087$) (Fig. 11F).

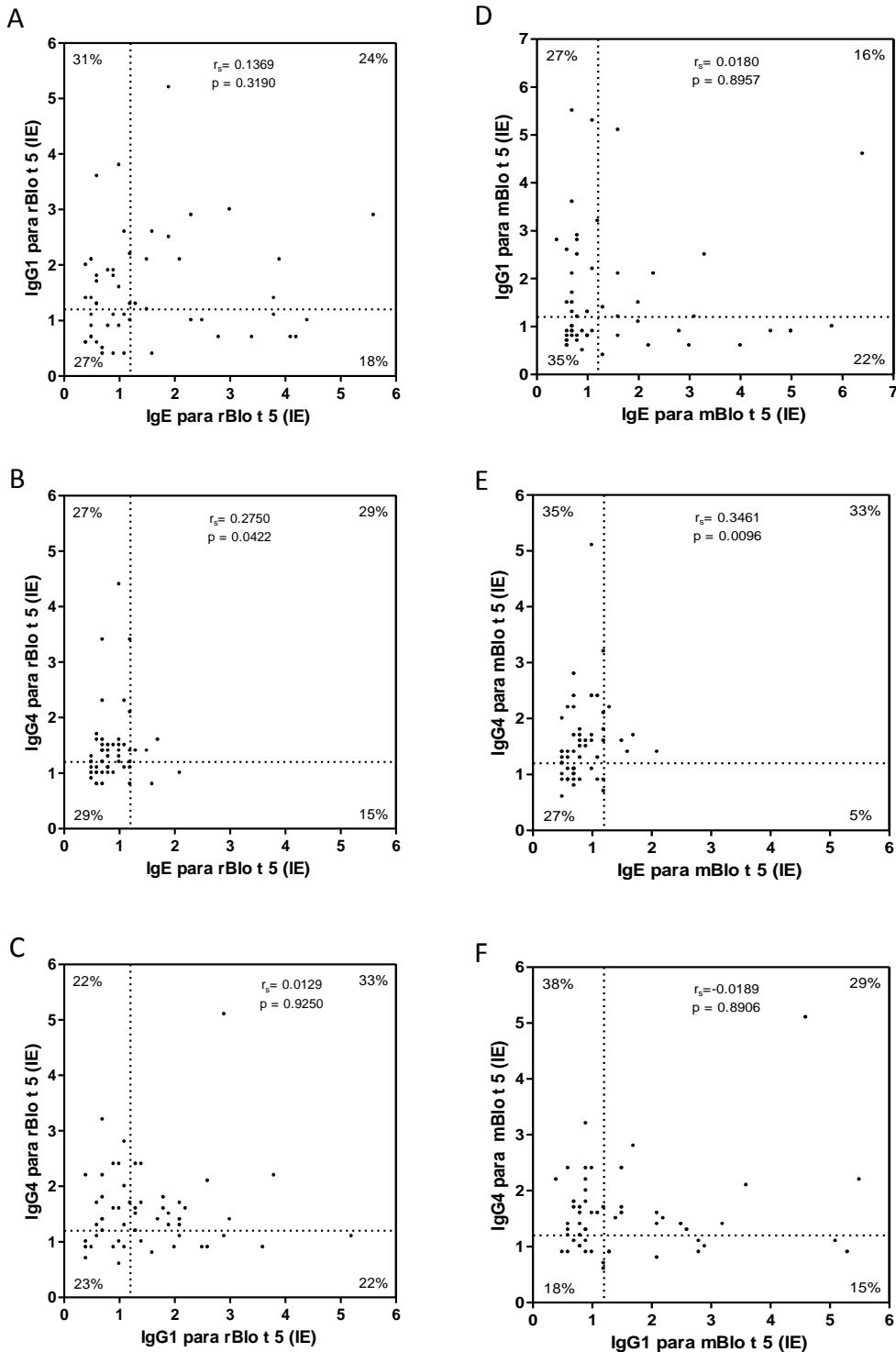


Figura 11. Correlação e associação entre níveis de isótipos de anticorpo (IgE, IgG1 e IgG4) para os alérgenos rBlo t 5 (**A, B, C**) ou mBlo t 5 (**D, E, F**) determinadas por ELISA em 55 amostras de soros de pacientes atopicos Bt+. As linhas tracejadas indicam o valor de *cut-off* do índice ELISA (IE) para cada reação ($IE \geq 1,2$). O coeficiente de correlação de Spearman (r_s) e os valores de p estão indicados. As porcentagens de amostras duplo-positivas, duplo-negativas, único-positivas e único-negativas estão indicadas nos quadrantes correspondentes.

4.9 Redução da reatividade dos isotipos de anticorpos para mBlo t 5 em relação ao rBlo t 5 no grupo de pacientes atópicos Bt+

Ao analisar amostras individuais de soro dos pacientes atópicos Bt+, positivos para rBlo t 5, para cada isotipo de anticorpo, não foi observada diferença significativa na mediana dos níveis de reatividade para nenhum dos isotipos de anticorpos (Fig. 12A). Por outro lado, quando a redução de reatividade dos isotipos de anticorpos para mBlo t 5 em relação ao rBlo t 5 foi analisada, verificou-se uma grande variação no perfil de redução reatividade, com 48% de amostras apresentando redução da reatividade de IgE (26% com redução > 20%) (Fig. 12B). Para IgG1, 40% das amostras apresentaram aumento de reatividade (30% com aumento > 20%), enquanto que 57% das amostras analisadas apresentaram aumento de reatividade de IgG4 (37% com aumento > 20%) (Fig. 12B).

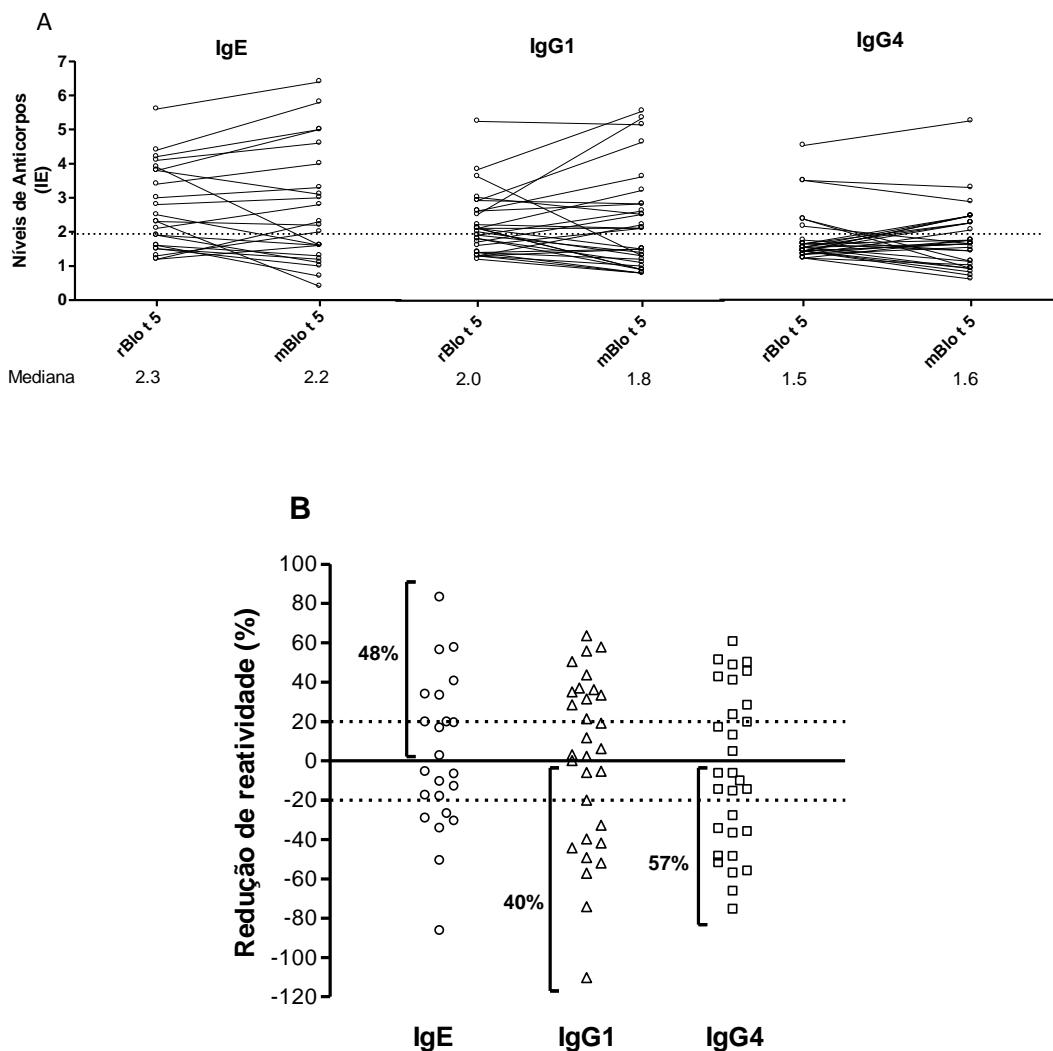


Figura 12. (A) Comparação entre os níveis de isotipos de anticorpos (IgE, IgG1 e IgG4) para rBlo t 5 e mBlo t 5, determinados por ELISA em amostras individuais de soro de pacientes atópicos Bt+ positivos para rBlo t 5 (IgE, n=23; IgG1, n=30 e IgG4, n=30). As linhas tracejadas indicam o valor de *cut-off* do índice ELISA de cada reação ($IE \geq 1,2$) e os valores de mediana estão indicados. (B) Porcentagem de redução da reatividade de IgE, IgG1 e IgG4 para mBlo t 5 em relação a rBlo t 5 em amostra de soro de pacientes atópicos Bt+ positivas para rBlo t 5 para cada isotipo.

5 DISCUSSÃO

A prevalência das doenças alérgicas aumentou durante os últimos 30 anos (YI et al., 2004) e a exposição a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar é reconhecido como o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da alergia respiratória. A alta incidência na sensibilização por *Blomia tropicalis*, espécie predominante em regiões tropicais, está fortemente associada à doença alérgica em Singapura, na Malásia e no Brasil, onde mais de 90% dos indivíduos com rinite alérgica têm TCP positivo para este ácaro (FERNANDES-CALDAS et al., 1993; CHAN et al., 2008).

No presente estudo, foram avaliados três grupos de indivíduos, um de pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* (atópico Bt+), outro de pacientes sensibilizados a ácaros do gênero *Dermatophagoides*, mas não a *B. tropicalis* (atópico Bt-) e um composto por indivíduos não atópicos (NA). A análise dos grupos selecionados em nosso estudo revelou predominância do gênero feminino em todos os grupos, com representatividade de 64% no grupo de pacientes atópicos Bt+, 72% no grupo atópico Bt- e de 71% no grupo de indivíduos não atópicos. Um fator que pode estar envolvido nesta predominância do gênero feminino poderia ser a percepção diferente dos sintomas em relação aos homens, o que leva a procura de atendimento clínico visando à melhora dos sintomas e consequentemente da qualidade de vida, muito afetada pela cronicidade da rinite e também da asma (BAQUEIRO et al., 2007). Um elevado grau de cossensibilização (> 95%) foi observado, por TCP, para *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae* no grupo de pacientes atópicos B +, indicando a importância dos desses três ácaros na sensibilização e no desenvolvimento de doenças respiratórias alérgicas, em indivíduos geneticamente predispostos de regiões tropicais e subtropicais do mundo. Além disso, não foi encontrado nenhum paciente monossensibilizado a *B. tropicalis* dentro do grupo atópico Bt+, reforçando resultados anteriores que mostraram baixa sensibilização exclusiva (6%) para *B. tropicalis* (PEREIRA et al., 2005). No entanto, um estudo anterior relatou diferenças alergênicas entre *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*, ao evidenciar baixa a moderada reatividade cruzada entre eles (CHEW et al., 1999), considerando assim a sensibilização a *B. tropicalis* uma causa independente e importante de alergia (ARRUDA et al., 1997). Neste contexto, verificou-se que a rinite foi encontrada predominantemente em pacientes atópicos Bt+, enfatizando a importância da sensibilização a *B. tropicalis* no desenvolvimento da rinite alérgica.

Da mesma forma, o grupo atópico Bt– apresentou elevada cossensibilização (> 92%) entre os alérgenos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, suportando que estes ácaros da poeira domiciliar são as principais fontes de alérgenos em todo o mundo, podendo considerar este grupo de pacientes como um controle essencial na avaliação dos alérgenos recombinantes de *B. tropicalis* para o diagnóstico *in vitro* de sensibilização a esse ácaro. Além disso, uma predominância de rinite associada à asma no grupo de pacientes atópicos Bt– foi mostrada, sugerindo que a sensibilização a alérgenos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae* pode estar mais relacionada a este diagnóstico clínico, quando indivíduos geneticamente predispostos entram em contato com esses aeroalérgenos (BARNES & MARSH, 1998; PLATTSMILLS; WHEATLEY; AALBERSE, 1998).

O diagnóstico e as estratégias terapêuticas atuais para doenças alérgicas ainda não é satisfatória devido à falta de alérgenos altamente purificados. Assim, a produção de alérgenos recombinantes representa uma maneira eficiente de obter rendimentos elevados de alérgenos puros tanto para estudos imunológicos, bem como para o diagnóstico e o tratamento das doenças alérgicas (LIM et al., 2004). O alérgeno do grupo 5, Blo t 5, é o mais prevalente entre alérgenos de *B. tropicalis*, e a reatividade de IgE para Blo t 5 corresponde a pelo menos 70% de indivíduos alérgicos (KUO et al., 2003; CHAN et al., 2008). Neste contexto, nós desenhamos dois constructos para a produção de alérgenos recombinantes, um que codifica a sequência original do alérgeno Blo t 5 (rBlo t 5) e outro uma sequência com alterações na ordem original dos aminoácidos que codificam o alérgeno nativo de Blo t 5 (mBlo t 5). Após a purificação parcial de rBlo t 5 e mBlo t 5, foi possível visualizar monômeros, dímeros ou tetrâmeros nos procedimentos de eletroforese e posteriormente confirmados por imunodetecção com anticorpo monoclonal específico para Blo t 5. Estes resultados podem ser explicados devido à formação de oligômeros estáveis durante o passo de purificação em cromatografia de afinidade (PRAMANIK et al., 2011). Além disso, para rBlo t 5, no ensaio de westernblot, foram corados alguns componentes com pesos moleculares intermédios, sugerindo a formação de produtos proteoliticamente degradados, mesmo com o uso de inibidores de protease, indicando uma provável atividade de metaloproteases bacterianas. Foi interessante notar que o anticorpo monoclonal para Blo t 5 reconheceu tanto rBlo t 5 quanto mBlo t 5, indicando que o epitopo deste clone (4G9) foi mantido em mBlo t 5, apesar do rearranjo realizado na sequência original.

Em seguida, a reatividade específica de rBlo t 5 e mBlo t 5 foi demonstrada, ao serem testadas com o anticorpo monoclonal para Blo t 5 e soro IgE positivo de pacientes atópicos Bt+, em comparação com os outros grupos (atópicos Bt– e não atópicos), por slot-blot. O clone 4G9 detectou fortemente ambos os alérgenos, principalmente rBlo t 5, mas nenhuma reatividade foi encontrada para extrato Bt total, provavelmente devido à fraca representação do alérgeno Blo t 5 nativo neste extrato (VALENTA et al., 2011). Da mesma forma, observou-se reatividade de IgE a ambos os alérgenos recombinantes e para o extrato Bt total, com marcação mais intensa para rBlo t 5, no soro de paciente atópico Bt+, ao passo que nenhuma reatividade de IgE do soro de pacientes atópicos Bt– e indivíduo não atópico foi detectada.

Quando se analisa a reatividade dos isótipos de anticorpos para o extrato Bt total, ao alérgeno nativo ou recombinantes de Blo t 5 por ELISA, a reatividade de IgE ao extrato Bt total foi predominante no grupo de pacientes atópicos Bt+ como esperado, uma vez que outros componentes alergênicos de *B. tropicalis*, presentes no extrato, podem desempenhar um papel na sensibilização destes pacientes. Foi surpreendente que a reatividade de IgE ao nBlo t 5 tenha sido menor que a ambos os alérgenos recombinantes. Estes resultados podem ser explicados devido a uma baixa concentração de Blo t 5 nativo capturado a partir do extrato Bt total no ELISA reverso e/ou exposição reduzida de epítópos específicos disponíveis para a interação com os anticorpos IgE específicos. Vale salientar que estes resultados também podem ser influenciados pela modelo de reação e pelo tipo de anticorpo monoclonal (clone 4G9) usado para capturar o alérgeno Blo t 5 nativo, uma vez que um estudo anterior (YI et al., 2004), utilizou outro anticorpo monoclonal (clone 4A7) para purificar o alérgeno Blo t 5 nativo a partir de extrato total de *B. tropicalis*. Yi e colaboradores, descobriram por cromatografia de afinidade, que a alergenicidade dos alérgenos Blo t 5 nativo e recombinante foi semelhante, mas não completamente idênticas, sugerindo que as várias isoformas do alérgeno Blo t 5 nativo pode apresentar epítópos adicionais para IgE. Por outro lado, os níveis e a positividade de IgE para ambos rBlo t 5 e mBlo t 5 foram semelhantes, indicando que mesmo a mutação realizada no alérgeno mBlo t 5 não foi capaz de alterar significativamente a ligação de IgE, enquanto que rBlo t 5 mostrou ser uma ferramenta útil para o diagnóstico *in vitro* da sensibilização por *B. tropicalis*, apesar da baixa ou moderada reatividade cruzada com *D. Pteronyssinus*; como verificado por reatividade de IgE limítrofe observada no grupo de pacientes atópicos não sensibilizados a *B.*

tropicalis. Estes achados são corroborados por relatos anteriores que identificaram identidade entre as sequências de aproximadamente 40% entre o grupo 5 de alérgenos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* (NAIK et al., 2008). Além disso, os prováveis contaminantes residuais nas amostras purificadas dos alérgenos recombinantes não causaram qualquer interferência na sorologia por ELISA, uma vez que nenhuma reatividade de IgE aos alérgenos recombinantes foi encontrada em indivíduos não atópicos.

Em relação ao isotipo IgG1, observou-se um perfil similar de reatividade de IgG1 ao extrato Bt total e aos alérgenos recombinantes em ambos os pacientes atópicos e nos indivíduos não atópicos, indicando que o isotipo IgG1 pode estar intimamente relacionado com a exposição alergênica e a estímulos抗igenicos repetidos (PEREIRA et al., 2005). Por outro lado, a reatividade de IgG1 para nBlo t 5 foi a menor entre os alérgenos analisados em todos os grupos, novamente suportando uma baixa captura do alérgeno nativo no ELISA reverso. Em contraste, foi notável uma reatividade aumentada de IgG4 para mBlo t 5 em relação ao rBlo t 5 e ao extrato Bt total em pacientes atópicos Bt+, indicando que a forma mutante do alérgeno Blo t 5 apresentou maior antigenicidade para IgG4 do que para os outros isotipos. Estas descobertas sugerem que mBlo t 5 pode ser uma ferramenta valiosa para ser empregada em procedimentos de imunoterapia alérgeno específicas, ao investigar o seu potencial na ativação de subconjuntos de células B produtoras de IgG4. Foi surpreendente que nBlo t 5 e mBlo t 5 mostraram reatividades de IgG4 semelhantes, sugerindo que epítopos para IgG4 poderiam estar mais acessíveis no alérgeno Blo t 5 nativo capturado pelo anticorpo monoclonal no ELISA reverso. Além disso, como já foi demonstrado (YI et al., 2004), pelo menos, cinco isoformas distintas de Blo t 5 foram identificadas, e é provável que a isoforma de Blo t 5 nativo capturado pelo anticorpo monoclonal no nosso ELISA reverso foi melhor reconhecido por IgG4 do que pelos isotipos IgE e IgG1.

As reatividades dos isotipos de anticorpos para rBlo t 5 e mBlo t 5 também foram comparadas no grupo de pacientes atópicos Bt+, mostrando uma alta correlação positiva para IgE e IgG1 para ambos recombinantes, além de resultados altamente concordantes entre os alérgenos rBlo t 5 e mBlo t 5, uma vez que a porcentagem de amostras unicamente positivas para IgE ou IgG1 foi baixa. Esses achados indicam que o alérgeno mBlo t 5 ainda mantém as principais características estruturais de rBlo t 5,

incluindo vários epitopos preservados que puderam ser reconhecidos por esses isotipos de anticorpos. Por outro lado, uma baixa correlação positiva do isotipo IgG4 para rBlo t 5 e mBlo t 5 associada a uma porcentagem mais elevada de amostras exclusivamente IgG4 positivas para mBlo t 5 em comparação com outros isotipos, sugerem que a forma modificada do rBlo t 5 demonstrou uma maior antigenicidade para o isotipo IgG4. Este resultado é particularmente atraente em abordagens para produzir novos alérgenos recombinantes com potencial aplicação em imunoterapia específica.

Quando os isotipos de anticorpos para cada alérgeno recombinante foram comparados, houve uma correlação positiva apenas entre a IgE e IgG4 a ambos alérgenos recombinantes, reforçando que a síntese destes isotipos é regulada por citocinas do perfil Th2 que medeiam os mecanismos de mudança de classes (SHIMITD-WEBER & BLASER, 2004). Foi interessante notar que rBlo t 5 foi preferencialmente reconhecido por IgG1 e IgG4 do que por anticorpos IgE, sendo este fenômeno mais evidente para IgG4 em relação ao alérgeno mBlo t 5, enfatizando o reconhecimento prevalente desse alérgeno modificado pelo isotipo IgG4. Diversos estudos realizados com alérgenos recombinantes delinearam claramente os mecanismos inerentes ao sucesso da imunoterapia específica. Assim, a indução de subclasses de anticorpos IgG alérgeno específicos que podem inibir a inflamação alérgica imediata e tardia, bem como reduzir a produção de IgE específica diante de uma subsequente exposição alergênica, são mecanismos comuns que foram identificados e colaboraram para uma imunoterapia específica bem sucedida (VALENTA et al., 2011). Além disso, estudos de imunoterapia suportam que o isotipo IgG4 possui um papel importante como anticorpo bloqueador da reação alérgica e que os níveis de IgG4 tendem a aumentar durante o processo de imunoterapia com hipoalérgenos(AALBERSE et al., 2009).

Quando as amostras de soro de pacientes atópicos Bt+ positivo para rBlo t 5 foram individualmente comparados com a sua reatividade a mBlo t 5 para cada isotipo de anticorpo, a alteração (redução ou aumento) dos níveis médios de todos os isotipos foi muito baixa, embora houve uma grande variação individual no perfil de reatividade dos anticorpos. No entanto, quando o grau de redução foi analisado, observou-se que 48% das amostras apresentou redução da reatividade de IgE ao passo que 57% das amostras tiveram um aumento na reatividade de IgG4. Chan e colaboradores em 2008 consideraram, em um estudo prévio, uma redução de reatividade significativa (>20%), que ocorreu em 26% das amostras para IgE, enquanto que para IgG4, 37% das amostras

apresentaram um aumento da reatividade > 20%. Estas descobertas sugerem que a modificação feita no alérgeno mBlo t 5, colaborou para um aumento de antigenicidade para o isotipo IgG4 em relação ao IgE, tornando assim a sua utilização como potencial candidato em estudos de imunoterapia. Neste contexto, oligômeros de alérgenos recombinantes representam uma variação interessante, pois apesar de manterem alguma reatividade de IgE, eles perdem a atividade alergênica devido a uma apresentação alterada dos epítópos de IgE (CAMPANA et al., 2011). Estudos adicionais são necessários para avaliar a potencial atividade hipoalergênica e funcional deste alérgeno modificado (mBlo t 5) em ensaios de degranulação dos basófilos (EBO et al., 2012), bem como o perfil de citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes atópicos sensibilizados a *Blomia tropicalis* após estimulação *in vitro* com rBlo t 5 e mBlo t 5.

6 CONCLUSÕES

- Os constructos sintetizados foram clonados e expressos em sistema procarioto de expressão *E. coli*, como o esperado. O perfil eletroforético das amostras purificadas das proteínas recombinantes, mostrou a formação de monômeros, dímeros e tetrâmeros de rBlo t 5 e de monômeros e dímeros de mBlo t 5, confirmados por *Western blotting*, com anticorpo monoclonal anti-Blo t 5;
- A reatividade da proteína recombinante rBlo t 5 e da sua forma modificada mBlo t 5 foram confirmadas tanto com o anticorpo monoclonal anti-Blo t 5 quanto com soro IgE positivo de paciente atópico Bt+, por Slot-blot. Logo, apesar da mudança realizada na sequência de mBlo t 5, esta ainda mantém o epítopo de reconhecimento para o anticorpo monoclonal anti-Blo t 5, como também epítopos ligantes de IgE;
- Os resultados do ELISA com soro de pacientes atópicos Bt+ apresentaram níveis de IgE semelhantes para rBlo t 5 e mBlo t 5, enquanto que para nBlo t 5 foram menores. Sendo assim, é promissor o uso do alérgeno rBlo t 5 no diagnóstico *in vitro* da sensibilização a *B. tropicalis*. Os níveis de IgG1 foram similares aos alérgenos em todos os grupos (atópicos e não atópicos), confirmando que a presença desse isotipo no soro está relacionada ao contato com o alérgeno. Os níveis de IgG4 no soro de pacientes atópicos Bt+ foram maiores do que nos outros grupos, principalmente para o alérgeno modificado mBlo t 5;
- As correlações dos níveis das diferentes classes de anticorpos entre os alérgenos recombinantes, para o grupo de pacientes atópicos Bt+, mostrou uma alta correlação positiva entre os níveis de IgE e de IgG1 para ambos alérgenos, enquanto que para IgG4, obteve-se uma correlação positiva, porém baixa, devido ao maior reconhecimento de mBlo t 5 por esse isotipo, quanto comparado ao rBlo t 5. Assim, evidencia-se que a alteração realizada na sequência de mBlo t 5 favoreceu o reconhecimento (maior antigenicidade) dessa proteína pelo isotipo IgG4, tornando-a uma ferramenta atrativa no estudo de alérgenos recombinantes com potencial aplicação em imunoterapia alérgeno específica;

- Ao avaliar a redução de reatividade de IgE, para mBlo t 5 em relação a rBlo t 5, em soro de pacientes atópicos Bt+, verificamos redução em 48% das amostras, sendo que 26% apresentaram redução > 20%. Ao analisar o isotipo IgG4, tivemos um aumento na reatividade em 57% das amostras, sendo que 37% tiveram aumento > 20%. Uma vez que a redução da reatividade de IgE e o aumento de IgG4 são requisitos importantes no sucesso da imunoterapia, outros estudos que avaliem tanto a atividade funcional da IgE como a habilidade de ativação de células T via anticorpos IgG4 bloqueadores, devem ser realizados para confirmar o verdadeiro potencial hipoalergênico da proteína mBlo t 5.

7 REFERÊNCIAS

AALBERSE, R. C.; STAPEL, S. O.; SCHUURMAN, J.; RISPENS, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. **Clinical and Experimental Allergy**, v.39, n. 4, p. 469-477, 2009.

AKDIS, M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 738-744, 2006.

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

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

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

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

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

ARLIAN, L.G.; BERNSTEIN, D.; BERNSTEIN, I.L.; FRIEDMAN, S.; GRANT, A.; LIEBERMAN, P.; LOPEZ, M.; METZGER, J.; PLATTS-MILLS, T.; SCHATZ, M.; SPECTOR, S.; WASSERMAN, S.I.; ZEIGER, R.S. Prevalence of dust mites in the

homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 90, p. 292-300, 1992.

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

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

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

ASHER, M. I.; MONTEFORT, S.; BJÖRKSTÉN, B.; LAI, C. K.; STRACHAN, D. P.; WEILAND, S. K.; WILLIAMS, H.; ISAAC PHASE THREE STUDY GROUP. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **Lancet**, v. 368, p. 733-743, 2006.

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

BACHERT, C.; JORISSEN, M.; BERTRAND, B.; KHALTAEV, N.; BOUQUET, J. Allergic rhinitis and its impact on asthma: a update (ARIA 2008). **B-ENT**, v. 4, n. 4, p. 253-257, 2008.

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

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

BATARD, T.; BASUYAUX, B.; LAROZE, A.; LAMBIN, P.; BREMARD-OURY, C.; AUCOUTURIER, P.; HAMILTON, R. G.; DAVID, B.; PELTRE, G. Isotypic analysis of grass-pollen-specific immunoglobulins in human plasma. 2. Quantification of the IgE, IgM, IgA class and the IgG subclass antibodies. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 102, n. 3, p. 279-287, 1993.

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

BEASLEY, R.; CRANE, J.; LAI, C. K.; PEARCE, N. Prevalence and etiology of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 2, p. 466-472, Fev. 2000.

BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Induction and effector functions of Th17 cells. **Nature**, v. 453, p. 1051-1057, 2008.

BOLUDA, L.; CUADRA, B.; BERRENS, L. Binding affinities of allergens from pollen, mites, and house dust for specific IgG subclass antibodies. **Allergy**, v. 51, n. 10, p. 706-711, 1996.

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

BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.; & MALLING, H. J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. **Journal Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, p. 558-562, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins of utilizing the protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p. 248-254.

CAMAPANA, R.; VRTALA, S.; MADEREGGER, B.; DALL'ANTONIA, Y.; ZAFRED, D.; BLATT, K. Altered IgE epitope presentation: a model for hypoallergenic activity revealed for Bet v 1 trimer. **Molecular Immunology**, v.48, p. 431-441, 2011.

CAMARGOS, P.; IBIAPINA, C.; LASMAR, L.; CRUZ, A. A. Obtaining concomitant control of allergic rhinitis and asthma with a nasally inhaled corticosteroid. **Allergy**, v. 62, n. 3, p. 310-316, 2007.

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

CHAN, L. S.; ONG, T. C.; GAO, Y. F.; TIONG, Y. S.; WANG, D. Y.; CHEW, F. T.; MOK, Y. K. Nuclear magnetic resonance structure and IgE epitopes of Blo t 5, a major dust mite allergen. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 2586-2596, 2008.

- CHARLES, A.; JANEWAY, J. R.; PAUL, T.; WALPORT, M.; MARK, J. S. Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. **Artmed**, 6.ed, p. 762-767, 2006.
- CHEONG, N.; YANG, L.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. Cloning of a group 3 allergen *Blomia tropicalis* mites. **Allergy**, v. 58, p. 352-356, 2003.
- CHEW, F. T.; YI, F. C.; CHUA, K. Y.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; ARRUDA, L. K.; et al. Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clinical and Experimental Allergy**, v.29, p.982-988, 1999.
- CHUA, K. Y.; CHEONG, N.; KUO, I. C.; LEE, B. W.; YI, F. C.; HUANG, C. H.; LIEW, L. N. The *Blomia tropicalis* allergens. **Protein & Peptide Letters**, v. 14, p. 325-333, 2007.
- COUSINS, D. J.; LEE, T. H.; STAYNOV, D. Z. Cytokine coexpression during human TH1/TH2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of TH2 cytokines. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 2498–2506, 2002.
- CRAMERI, R. Correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. **Biochemical Journal**, v. 376, 1, e1–e2, 2003.
- CROMWELL, O. Biochemistry of allergens. In: KAY, A. B. **Allergy and allergic diseases**, ed. 1, v. 2, p. 797-810, 1997.
- DAHER, S., GALVÃO, C.; ABES, A.; COCCO, R. Diagnóstico em doenças alérgicas mediadas por IgE. Guia prático de alergia e imunologia – **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**, v. 32, n. 1, p. 1-6, 2009.
- DE BOER, R. Reflections on the control of mites and mite allergens. **Allergy**, v. 53, 41-46, 1998. Supplement 48.

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

EBO, D. G.; BRIDTS, C. H.; MERTENS, C. H.; HAGENDORENS, M. M.; STEVENS, W. J.; DE CLERCK, L. S. Analyzing histamine release by flow cytometry (HistaFlow): a novel instrument to study the degranulation patterns of basophils. **Journal Immunological Methods**, v. 375, p.30-38, 2012.

FERNANDEZ-CALDAS. E.; PUERTA, L.; MERCADO, D.; LOCKEY, R. F.; CARABALLO, L.R. Mite fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergen levels in a tropical environment. **Clinical and Experimental Allergy**, n. 23, p.292-297, 1993. FERRARI, F. P.; ROSÁRIO-FILHO, N. A.; RIBAS, L. F. O.; CALLEFE, L. G.; Prevalência de asma em escolares de Curitiba - Projeto ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood). **Jornal de Pediatria**, v. 74, p. 299-305, 1998.

FLÖISTRUP, H.; SWARTZ, J.; BERGSTRÖM, A.; ALM, J. S.; SCHEYNIUS, A.; VAN HAGE, M.; BRAUN-FAHRLÄNDER, C.; SCHRAM-BIJERK, D.; HUBER, M. Allergic disease and sensitization in Steiner school children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. 59-66, 2006.

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

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

FREW, A. J. Immunotherapy: how safe is safe? **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p.251-253, 2006.

FUJITA, H.; SOYKA, M. B.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Clinical Transl Allergy**, v.5, p.1 - 8, 2012.

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

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

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

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

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

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

JACKOLA, D. R.; PIERSON-MULLANY, L. K.; LIEBELER, C. L.; BLUMENTHAL, M. N.; ROSENBERG, A. Variable binding affinities for allergen suggests a ‘selective competition’ among immunoglobulins in atopic and non-atopic humans. **Molecular Immunology**, v. 39, n.5-6, p.367-377, 2002.

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

JUTEL, M.; AKDIS, M.; BLASER, C. A. Mechanisms of allergen specific immunotherapy – T-cell tolerance and more. **Allergy**, v. 61, p. 796-807, 2006.

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

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

KUO, I. C.; CHEONG, N.; TRAKULTIVAKORN, M.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. An extensive study of human IgE cross-reactivity of Blo t 5 and Der p 5. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 603-609, 2003.

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

LARCHÉ, M. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. **Current Opinion of Immunology**, v. 18, p. 745-750, 2006.

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

LEMANSKE-JUNIOR, R.F.; BUSSE, W.W. Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 502-519, supplement 2, 2003.

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

LIM, D.; SHEK, P.; SHAIKH, W.; BARATAWIDJAJA, K.; TRAKULTIVAKORN, M.; CHEONG, N.; CHUA, K. Y.; LEE, B. W. Pattern of sensitization to *Blomia tropicalis* and its recombinant allergens in four tropical asian populations **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.109, p.531-537, 2002.

LINHART, B.; VALENTA, R. Mechanisms underlying allergen vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivates. **Vaccine**, v. 30, p. 4328-4335, 2012.

MAASCH, H. J.; MARCH, D. G. Standardized extracts modified allergens – allergoids. **Clinical Rev Allergy**, v. 5, p. 89 - -106, 1987.

MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; & BEASLEY, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, v. 59, p. 469-478, 2004.

MELLERUP, M. T.; HAHN, G. W.; POULSEN, L. K.; MALLING, H. Safety of allergen-specific immunotherapy. Relation between dosage regimen, allergen extract, disease and systemic side-effects during induction treatment. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 1423-1429, 2000.

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

MILLS, K. L.; HART, B. J.; LYNCH, N. R.; THOMAS, W. R.; SMITH, W. Molecular characterization of the group 4 house dust mite allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and its amylase homologue from *Euroglyphus maynei*. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.120, p.100-107, 1999.

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

MORA, C.; FLORES, I.; MONTEALEGRE, F.; DIAZ, A. Cloning and expression of Blo t 1, a novel allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*, homologous to cysteine proteases. **Clinical and Experimental Allergy**, v.33, p.28-34, 2003.

MOTHE, N.; HEINZKILL, M.; DRACHENBERG, K. J.; SPERR, W. R.; KRAUTH, M. T.; MAJLESI, Y. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduce seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 1198-1208, 2003.

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

NAIK, T. M.; CHANG, C. F.; KUO, I. C.; KUNG, C. C. H.; YI, F. C.; CHUA, K.Y. Roles of structure and structural dynamics in the antibody recognition of the allergen proteins: an NMR study on *Blomia tropicalis* major allergen. **Structure**, v. 16, p. 125-136, 2008.

OBOKI, K.; OHNO, T.; SAITO, H.; NAKAE, S. Th17 and allergy. **Allergology International**, v. 57, p. 121-134, 2008.

OPPENHEIMER, J.; NELSON, H. S. Skin testing: a survey of allergists. **Annual Allergy Asthma Immunology**, v. 96, p.19-23, 2006.

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

PIKE, A. J.; CUNNINGHAM, M. J.; LESTER, P. J. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) at constant and

simultaneously fluctuating temperature and humidity conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 266-269, 2005.

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

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

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

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

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

PRAMANIK, A.; HAUF, W.; HOFFMANN, J.; CERNESCU, M.; BRUTSCHY, B.; BRAUN, V. Oligomeric structure of ExbB and ExbB-ExbD isolated from *Escherichia coli* as revealed by LILBID mass spectrometry. **Biochemistry**, v. 50, p. 8950-8956, 2011.

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

PUERTA, L.; LERENA, L.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; CARABALLO, GRACIA, L.R.; LOCKEY, R. F. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides* spp-allergic individuals. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 88, p. 943-950, 1991.

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

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

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

RAVETCH, J. V.; KINET, J. P. Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 9, p. 457-492, 1991.

ROLLAND, J. M.; GARDNER, L. M.; O'HEHIR, R. E. Allergen-related approaches to immunotherapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 121, p. 273-284, 2009.

SCHMIDT-WEBER, C. B.; BLASER, K. Regulation and role of transforming growth factor-beta in immune tolerance induction and inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 709-716, 2004.

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

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

SOLÉ, D.; CAMELO-NUNES, I. C.; VANA, A. T.; YAMADA, E.; WERNECK, F.; DE FREITAS, L. S.; SOLOGUREN, M. J.; BRITO, M.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; STEIN, R. T.; NASPITZ, C. K. Prevalence of rhinitis and related-symptoms in schoolchildren from different cities in Brazil. **Alergologia e immunopathologia**, v. 32, p. 7-12, 2004.

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

THOMAS, W.R.; SMITH, W. A.; HALES, B. J.; MILLS, K. L.; O'BRIEN, R. M. Characterization and immunobiology of house dust mit allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 129, p.1-8, 2002.

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

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

VALENTA, R.; LINHART, B.; SWOBODA, I.; NIEDERBERGER, V. Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. **Allergy**, v. 66, p.775-783, 2011.

VALENTA, R.; DUCHENE, M.; VRTALA, S.; BIRKNER, T.; EBNER, C.; HIRSCHWEHR, R. Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-polen allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 88, p. 889 – 894, 1991.

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

VRTALA, S. From allergen genes to new forms os allergy diagnosis and treatment. **Allergy**, v. 63, p. 299 – 309, 2008.

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

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

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

YI, F. C.; SHEK, L. P. C.; CHEONG, N.; KAW, Y. C.; LE, B. W.; Molecular Cloning of *Blomia tropicalis* Allergens – A Major Source of Dust Mite Allergens in the Tropics and Subtropics. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**; n.5, p. 261-266, 2006.

ANEXO A



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: cep@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

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

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

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

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

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

O CEP/UFU lembra que:

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

Data para entrega do relatório final: julho de 2010.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 08 de agosto de 08.

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

Orientações ao pesquisador

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

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
 - O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
-
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

ANEXO B



Universidade Federal de Uberlândia

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

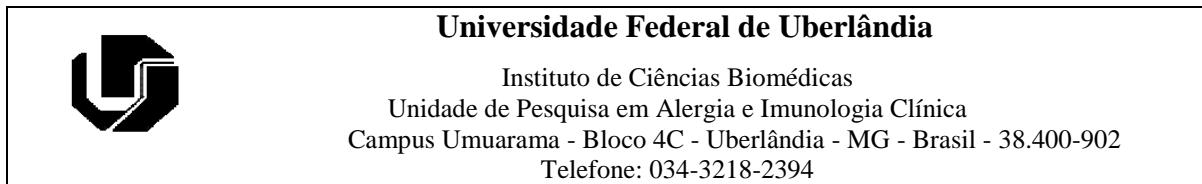
Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação. Terei a liberdade de me retirar da pesquisa a qualquer momento em que desejar, sem a necessidade prévia de explicações.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

Uberlândia, _____ de _____ de 20____.

ASSINATURA

TESTEMUNHA

ANEXO C



QUESTIONÁRIO CLÍNICO

Nome: _____

Data: ____/____/____

Idade: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: () Masculino () Feminino

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

Nível sócio-econômico (renda familiar):

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

Questionário 1 (Módulo Asma)

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

- () Sim () Não

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

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

- () Sim () Não

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

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

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

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

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

- () Sim () Não

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

Questionário 2 (Módulo Rinite)

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

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

Questionário 3 (Módulo Eczema)

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

() Sim () Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6

- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve essas manchas na pele (eczema)?

() Sim () Não

- 3) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?

() Sim () Não

- 4) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) desapareceram completamente nos últimos doze meses?

() Sim () Não

- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa dessa coceira na pele?

() Nunca nos últimos 12 (doze) meses

() Menos de uma noite por semana

() Uma ou mais noites por semana

- 6) Alguma vez na vida você teve eczema?

() Sim () Não

ANEXO D

Anexo D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica

Av. Pará, 1720 - Campus Umuarama - Bloco 4C - CEP 38400-902 - Uberlândia - MG
Telefone: (34) 3218-2195 - Fax: (34) 3218-2333

TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (Ácaros de poeira domiciliar)

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

*Valores de referência:

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

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

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Responsável técnico