

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ISABELLA VILAS BOAS ZAFALON

**UTILIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DAS
MOLÉCULAS DER P 2 E DER P 23 DO ÁCARO *DERMATOPHAGOIDES*
PTERONYSSINUS PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG4 EM
PACIENTES COM ALERGIA RESPIRATÓRIA**

UBERLÂNDIA

2017

ISABELLA VILAS BOAS ZAFALON

**UTILIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DAS
MOLÉCULAS DER P 2 E DER P 23 DO ÁCARO *DERMATOPHAGOIDES*
PTERONYSSINUS PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG4 EM
PACIENTES COM ALERGIA RESPIRATÓRIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Jair Pereira
da Cunha Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Ernesto
Akio Taketomi

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- Z17u
2017 Zafalon, Isabella Vilas Boas, 1991
 Utilização de peptídeos sintéticos derivados das moléculas Der p 2 e
 Der p 23 do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* para a detecção de
 anticorpos IgG4 em pacientes com alergia respiratória / Isabella Vilas
 Boas Zafalon. - 2017.
 47 p. : il.
- Orientador: Jair Pereira da Cunha Júnior.
 Coorientador: Ernesto Akio Taketomi.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.66>
 Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Alergia - Teses. 3. *Dermatophagoides*
pteronyssinus - Teses. 4. Peptídeos - Teses. I. Cunha Júnior, Jair Pereira
da. II. Taketomi, Ernesto Akio. III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
IV. Título.

CDU: 612.017

*Dedico este trabalho a todos que me apoiaram durante essa trajetória. Aos meus familiares,
amigos e colegas de trabalho, o meu muito obrigado*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, com o apoio financeiro das agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, as quais possibilitaram a aquisição dos equipamentos e materiais fundamentais para o desenvolvimento do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gilberto e Luciana, tia Evandra e Vovó Silvia por terem me educado, transferido valores e acompanharem todos os estágios da minha vida. A vocês que muitas vezes renunciaram seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

A todos os meus familiares, irmãos, primos, tios que me incentivaram direta e indiretamente.

A todos os amigos que Deus colocou em minha vida e escolhi para conviver: obrigada pelos momentos de alegria, incentivo, conselhos e paciência, em especial, Yara, Matheus, Diego e Cecílio.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, que sempre estiveram à disposição para quaisquer eventualidades, em especial à Ana Cláudia Pajuaba, que disponibilizou tempo para esclarecer várias dúvidas, para sugerir melhorias e contribuir com seu conhecimento.

Ao Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, exemplo profissional, que possibilitou o desenvolvimento do trabalho me aceitando como membro do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e sugeriu ideias relevantes.

Ao meu orientador Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, por confiar a pesquisa em minhas mãos inexperientes; por toda paciência, devo ter esgotado ela (risos); por todo conhecimento que transmitiu e ainda transmite. Enfim, todas as palavras que eu poderia escrever aqui seriam insuficientes para expressar a minha eterna gratidão.

Aos professores Cláudio, Elisângela e Danielle, que aceitaram compor minha banca de qualificação. Obrigada pelas sugestões que auxiliaram no melhoramento do trabalho.

Aos membros da banca Fernando, Juliana e Álvaro que aceitaram o convite de participar dessa etapa final, contribuindo com sugestões e críticas significativas às quais tentarei atender na versão definitiva do texto.

Aos meus colegas de laboratório, Paula, Bianca, Greice, Karine, Guilherme, Hellen, Vinícius, Lucas e Alfredo por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre e terem compartilhado seus conhecimentos comigo, muitas vezes me auxiliando nos trabalhos.

Com vocês, divido a alegria desta experiência única e mais uma vez agradeço a todos que participaram.

RESUMO

As alergias acometem cerca de 30% da população mundial e provocam grandes impactos nos sistemas de saúde, economia mundial e na qualidade de vida dos indivíduos. Estratégias que induzem a tolerância alérgica específica representam uma abordagem mais eficaz no tratamento das doenças alérgicas. O processo de imunoterapia alérgeno-específica (AIT) consiste na alteração da resposta Th2 em pacientes alérgicos para uma resposta de perfil Th1 e/ou Treg, em que o anticorpo IgG4 tem um papel relevante ao interromper a apresentação de antígenos mediados por FcεRI às células Th2 e bloquear a ativação de basófilos e mastócitos induzidos por alérgenos, o que reduz a resposta alérgica. Neste estudo, desenhamos e avaliamos dois peptídeos sintéticos derivados dos principais alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p 2 e Der p 23, para a detecção de anticorpos IgG4 em pacientes alérgicos. Os níveis de IgE e IgG4 em 55 amostras de soro foram avaliados por ELISA indireto. A análise de reatividade ao extrato de *D. pteronyssinus* (Dpt) mostrou 100% e 84,1% de positividade para IgE e IgG4 em amostras de soro de pacientes alérgicos. Dos 37 pacientes alérgicos que produzem IgG4 específica para Dpt, 48,6% das amostras de soro foram positivas para o peptídeo Der p 2 e 24,3% foram positivas para o peptídeo Der p23. Observou-se uma correlação positiva entre IgG4 para Dpt e IgG4 para Der p 2 ($p < 0,001$), mas não foi detectada correlação quando a IgG4 foi analisada em paralelo com Dpt *versus* Der p 23 ou Der p 2 *versus* Der p 23. Verificou-se que amostras de soro com razão de IgE:IgG4 elevadas para Dpt, também foram positivas aos peptídeos Der p2 e Der p 23, o que sugere que os peptídeos podem ser empregados na detecção de IgG4 por ELISA indireto. Assim, os peptídeos utilizados no presente estudo podem ser potencialmente úteis para monitorar os níveis de IgG4 durante os protocolos AIT.

Palavras-chave: Anticorpo IgG4, *Dermatophagoides pteronyssinus*, Peptídeos sintéticos, Der p 2, Der p 23, Alergia

ABSTRACT

Allergies affect about 30% of the world's population and it has major impacts on health systems, the world economy and people quality of life. Strategies that induce specific allergen tolerance represent a more effective approach in the allergic diseases treatment. The immunotherapy process involves shifting the Th2 response in allergic patients to a Th1 and/or Treg profile response profile response, where IgG4 antibody have a relevant role, disrupting the presentation of antigens mediated by FcεRI to Th2 cells and blocking the activation of basophils and mast cells induced by allergens, reducing the allergic response. In this study, we designed and evaluated two synthetic peptides derived from the *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) major allergens, Der p 2 and Der p 23, for detection IgG4 antibodies in allergic patients. The IgE and IgG4 levels in 55 serum samples were evaluated by ELISA. The reactivity analyze to Dpt-extract showed 100% and 84.1% of positivity for IgE and IgG4 in serum samples of allergic patients. From 37 allergic patients producing Dpt-specific IgG4, 48.6% of the serum samples were positive for Der p 2 peptide and 24.3% were positive for Der p23 peptides. A positive correlation was observed between IgG4 to Dpt and IgG4 to Der p 2 ($p < 0.001$), but no correlation was detected when IgG4 were analyzed in parallel with Dpt versus Der p 23 or Der p 2 versus Der p 23. We observed that serum samples with high IgE:IgG4 ratios to Dpt extract, were also positive to Der p 2 and Der p 23 peptides, indicating that the peptides may be employed in IgG4 detection by indirect ELISA. Thus, the peptides designed in the present study could be potentially useful to monitoring IgG4 levels during AIT protocols and predicting its efficacy.

Keywords: IgG4 antibody, *Dermatophagoides pteronyssinus*, synthetic peptides, Der p 2, Der p 23, Allergy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das moléculas de Der p 2 e Der p 23.....	39
Figura 2. Níveis de anticorpos IgE e IgG4 para extrato de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Dpt).....	42
Figura 3. Níveis de anticorpos IgG4 para Dpt e peptídeos de Der p 2 e Der p 23 em pacientes alérgicos e não alérgicos.....	43
Figura 4. Comparação entre os níveis de IgG4 específicos para Der p 2 e Der p 23.....	44
Figura 5. Comparação entre os níveis de IgE vs IgG4 anti-Dpt e entre os níveis de IgG4 anti-Dpt vs ambos peptídeos.....	46
Figura 6. Associação entre a razão IgE:IgG4 específicos para Dpt, Der p 2 e Der p 23.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Listagem dos grupos de alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i>	20
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
AIT	Imunoterapia alérgeno-específica
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BSA	Soro albumina bovina
D.O	Densidade óptica
Dpt	Extrato total de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Der p 1	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> grupo 1
Der p 2	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> grupo 2
Der p 23	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> grupo 23
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade do tipo I
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HDMs	ácaros da poeira doméstica
IE	Índice ELISA
IFN-γ	Interferon-gamma
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
kDa	Quilodalton
M	Molar
mg	Miligramas
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitros

n	n amostral
nm	Nanômetro
ng	Nanogramas
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
pH	Potencial hidrogênico
TCP	Teste cutâneo de Puntura
TGF-β	Fator de transformação do crescimento Beta
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
T reg	Linfócito T regulador
Tween 20	Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1. <i>Introdução</i>	12
1.1 Doenças respiratórias alérgicas.....	13
1.2 Alérgenos.....	16
1.3 Ácaros da poeira domiciliar.....	16
1.4 Resposta Alérgica.....	22
1.5 Imunoterapia e anticorpos bloqueadores.....	23
1.6 Uso de peptídeos na imunoterapia.....	26
2. <i>Hipóteses</i>	28
3. <i>Objetivos</i>	30
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. <i>Material e Métodos</i>	32
4.1 Pacientes.....	33
4.2 Peptídeos sintéticos e extrato de ácaros.....	33
4.3 Determinação de anticorpos IgE e IgG4 específicos para Dpt.....	34
4.4 Determinação de IgG4 específica para Der p 2 e Der p 23.....	36
4.5 Análise estatística.....	36
5. <i>Resultados</i>	38
5.1 Estrutura das moléculas Der p 2 e Der p 23.....	39
5.2 Níveis de IgE e IgG4 específicos para <i>D. pteronyssinus</i>	40
5.3 A reatividade de IgG4 para Dpt, Der p 2 e Der p 23.....	40
5.4 Correlação e Associação entre os níveis de IgE e IgG4	45
5.5 Associação entre a razão IgE:IgG4.....	48
6. <i>Discussão</i>	49
7. <i>Conclusões</i>	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças alérgicas respiratórias

As doenças alérgicas são conhecidas a mais de século e foram descritas na China antiga e na literatura grega (SIMONS, 1994), e estão entre as doenças mais dominantes no mundo sendo resultado do fenômeno de hiperreatividade com rompimento na tolerância imune que alguns indivíduos apresentam à exposição natural a determinados tipos de antígenos (CALDERÓN et al., 2010).

A palavra *alergia* foi aplicada pela primeira vez em 1906, por Béla Schick e Clemens Von Pirquet, que sugeriram o termo *alergia* de “*allos*” remetendo “outro” ou uma derivação do estado original e “*ergon*” que quer dizer reação (SIMONS, 1994).

Hoje, o termo *alergia* é utilizado como sinônimo de hipersensibilidade imediata e deve ser usado para descrever sintomas/sinais iniciados pela exposição a um determinado estímulo, do qual a dose seria tolerada por pessoas saudáveis. A reação é desenvolvida em indivíduos atópicos, os quais possuem uma tendência particular e/ou genética quando sensibilizados, sendo a reação mediada por anticorpos IgE, células e mecanismos específicos (JOHANSSON et al., 2004).

Atualmente, 30% a 40% da população mundial manifesta doenças alérgicas, que geram um grande impacto nos sistemas de saúde devido a fatores de risco potenciais, afetam a economia mundial pelos altos custos associados ao tratamento e prevenção, assim como a qualidade de vida dos pacientes e familiares por limitar interações sociais (GUPTA et al. 2013; PAWANKAR et al., 2012; 2013).

O aumento da ocorrência de manifestações alérgicas pode ser explicado devido às mudanças ocasionadas no estilo de vida moderno com a permanência das pessoas por longos períodos de tempo no ambiente doméstico e/ou profissional, dado que a maioria dos potenciais alérgenos estão presentes nesses locais, o que favorece a maior sensibilização de indivíduos predispostos (PLATTS-MILLS et al., 1997; PERFETTI et al., 2004).

Dentre as manifestações alérgicas, pode-se listar a dermatite atópica, conjuntivite, eczema, asma e rinite, sendo essas duas últimas as doenças respiratórias que mais se destacam pelo significativo aumento da prevalência nos últimos anos (ISAAC, 1998; ASHER et al., 2006; HOLGATE; POLOSA, 2008).

Segundo Li e colaboradores (2009), a exposição a alérgenos sensibilizadores pode exacerbar os sintomas de rinite e asma, aumentando a inflamação das vias respiratórias, que limita o fluxo aéreo e leva a uma hiper-reatividade brônquica. Verificou-se que os alérgenos provenientes de ácaros da poeira doméstica (HDMs) são os antígenos mais constantes associados com a presença e gravidade de ambas doenças respiratórias.

De acordo com Bousquet e colaboradores (2001), a rinite alérgica é considerada uma desordem sintomática das vias respiratórias superiores induzida por inflamação mediada por anticorpos IgE após a sensibilização da membrana da mucosa nasal com o alérgeno. Os principais sintomas observados são obstrução e prurido nasal, crises de espirros, congestão nasal e rinorréia aquosa, sendo que esses sintomas podem ser reversíveis quando realizado tratamento ou de forma espontânea.

A asma é definida como a inflamação crônica das vias respiratórias inferiores, também mediada por IgE, que leva a uma alta reatividade dos brônquios levando o paciente a desenvolver sintomas recorrentes como tosse, opressão torácica, dispneia e sibilância, durante o período noturno ou matutino na maioria dos casos (LEMANSKE; BUSSE, 2003).

Em estudo realizado na China, foram investigados os fatores associados à sensibilização ao alérgeno em pacientes e revelou que os ácaros da poeira doméstica foram os alérgenos mais prevalentes em induzir asma e/ou rinite, com destaque para a espécie *Dermatophagoides pteronyssinus*. No teste cutâneo de puntura (TCP), a positividade ao ácaro foi de 53,3% em pacientes asmáticos; 52,3% em pacientes com rinite e 68,3% em pacientes com ambas doenças. Na análise da prevalência para IgE específica, observou-se a positividade deste anticorpo em 49,1% dos pacientes asmáticos; 38,7% de pacientes com rinite e 56,7% em pacientes com as duas doenças (LI et al., 2012).

1.2 Alérgenos

Alérgenos são antígenos capazes de desencadear uma resposta alérgica com a produção de anticorpos IgE específicos e ativação de células do perfil Th2, sendo que, a antigenicidade está relacionada com características estruturais dos

alérgenos, de maneira variada (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001; ARLIAN, 2002; WILLS-KARP, 2010). São originados de várias fontes e podem entrar em contato com os indivíduos por meio da inalação, ingestão ou pelo contato com a pele ou mucosa (SMITH et al., 1998; ARLIAN; 2002).

Savolainen, Viander e Koivikko (1990) definiram os aeroalérgenos como alérgenos que estão distribuídos no ambiente e fazem parte da composição de diversos seres vivos. São presentes em gramíneas, animais domésticos (gatos e cachorros), baratas, fungos e ácaros da poeira domiciliar.

A maior parte dos alérgenos possui caráter proteico, porém, sabe-se que algumas moléculas ligadas a carboidratos também podem desencadear respostas imunes (ARLIAN, 2002), o que tem sido demonstrado na análise da imunogenicidade da porção glicídica de proteínas glicosiladas, destacando a influência dos epítomos de origem glicosídica (FÖTISCH; VIETHS, 2001).

Até hoje encontram-se dificuldades em compreender as características que diferenciam os alérgenos dos não-alérgenos. Entretanto, características como a estabilidade e a abundância da proteína são frequentemente citadas como prováveis fatores determinantes nessa diferenciação. Resultados de um estudo proteômico que avaliou as estabilidades termodinâmicas de alérgenos e não alérgenos de *D. pteronyssinus*, mostraram que quando a expressão e a estabilidade das proteínas são consideradas em combinação, há diferenças significativas entre os alérgenos e outras moléculas, sendo os alérgenos moléculas mais estáveis e mais expressas do que não alérgenos (OGBURN, 2016).

1.3 Ácaros da poeira domiciliar

De acordo com Arian e Morgan (2003), a disseminação destes artrópodes é facilitada pelo seu pequeno porte e devido às interferências humanas no meio ambiente. Por serem animais de fácil e rápida adaptação, os ácaros são facilmente encontrados na poeira domiciliar, principalmente em carpetes, colchões, brinquedos de pelúcia e estofados, onde há muito alimento e água disponíveis.

Alguns dos alérgenos mais potentes e frequentes são os provenientes de ácaros da poeira domiciliar, que provocam sensibilidade em mais de 50% de pacientes alérgicos (PLATIS-MILLS; WECK. 1989, ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

Dermatophagoides e *Blomia* são os gêneros que mais merecem destaque, pois são amplamente distribuídos em todo o mundo, principalmente em países tropicais e subtropicais, coexistindo entre si (ARRUDA et al., 1991; GELLER; ESCH; FERNANDEZ-CALDAS, 1993). O gênero *Dermatophagoides* foi descrito em 1864 por Bogdanov, e o nome indica sua alimentação à base de pele, já o nome da espécie *pteronyssinus* significa “amante de pena”, o que explica a dieta e o hábito de vida dessa espécie antes de se tornar comum nos ambientes domésticos (ARLIAN, 1999; COLLOF, 1998).

Dentre as proteínas de *D. pteronyssinus* mais importantes como alérgenos, estão Der p 1 e Der p 2 devido às altas concentrações encontradas na poeira e também aos altos níveis de IgE específica a elas em pacientes alérgicos (PLATTSMILLS et al., 1992) e recentemente descoberta, está inclusa a proteína Der p 23. Foi demonstrado por Weghofer e colaboradores (2013) 74% das amostras de soros de pacientes alérgicos apresentam IgE específica para a proteína Der p 23 levando-os a considerá-la um dos principais alérgenos de *D. pteronyssinus*, como ocorre para os alérgenos de Der p 1 e Der p 2. Esse fato é apoiado por outros estudos, como por exemplo, por pesquisas realizadas na Tailândia, onde 54% dos pacientes alérgicos exibiram respostas IgE específicas para Der p 23 (SOH et al., 2016).

Até o momento, foram descritos oficialmente 20 alérgenos de *D. pteronyssinus*, que são caracterizados e organizados em grupos, segundo parâmetros bioquímicos, de homologia e massa molecular. A lista oficial do Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia está representada na Tabela 1.

Vários estudos epidemiológicos destacam *D. pteronyssinus* como a principal fonte de alérgenos que desencadeia doenças respiratórias alérgicas em vários países do mundo, incluindo o Brasil (PLATTSMILLS, 2003). Em estudo realizado na Áustria, França, Itália e Suécia, foi demonstrado a alta prevalência de reatividade de IgE a alérgenos de HDMs purificadas em soros de pacientes alérgicos. Pelo menos 97% dos pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* foram IgE positivos ao mix de alérgenos Der p 1 e Der p 2. Contudo, mais de 50% dos pacientes também reagiram com outros alérgenos de *D. pteronyssinus* (WEGHOFER et al., 2008). Já no Brasil, segundo Siman e colaboradores (2013), os níveis de IgE para *D. pteronyssinus* apresentaram 87% de positividade em pacientes atópicos.

Tabela 1. Lista oficial dos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* de acordo com a composição bioquímica e massa molecular em quilo Dalton (kDa), segundo o Subcomitê de Nomenclatura dos Alérgenos (I.U.I.S.).

Alérgeno	Identidade Bioquímica	Massa molecular (kDa)
Der p 1	Cisteína protease	24
Der p 2	Família Niemann – Pick C2 (NPC2)	15
Der p 3	Tripsina	31
Der p 4	Alfa-amilase	60
Der p 5	<i>Não determinado</i>	14
Der p 6	Quimiotripsina	25
Der p 7	<i>Não determinado</i>	26, 30, 31
Der p 8	Glutathione S- transferase	27
Der p 9	Serina protease collagenolítica	29
Der p 10	Tropomiosina	36
Der p 11	Paramiosina	103
Der p 13	Proteína ligantes de ácidos graxos	15
Der p 14	Apolipoforina	177
Der p 15	Quitinase	63-105
Der p 18	Quitinase	60
Der p 20	Arginina quinase	40
Der p 21	<i>Não determinado</i>	16
Der p 23	Homologia do domínio A da proteína peritrofina	14
Der p 24	Proteína ligante de ubiquinol-citocromo c redutase	13
Der p 36	<i>Não determinado</i>	23

Fonte: <http://www.allergen.org>

Em pesquisa realizada por Posa e colaboradores (2017), quando analisados os níveis de IgE em soros de 191 pacientes jovens (0-20 anos), foi observada uma soroprevalência superior a 40% aos principais alérgenos (Der p 1, Der p 2 e Der p 23) comparados a outros 9 alérgenos de *D. pteronysinus*. A análise dos níveis de IgE específicas para cada alérgeno, mostrou que 77%, 61% e 50% das amostras foram positivas para Der p 2, Der p 1 e Der p 23, respectivamente.

Do mesmo modo, em relação à sororreatividade aos alérgenos específicos, dados apontam que a reatividade de IgE específica para os principais alérgenos é alta, sendo que 60% dos pacientes alérgicos são positivos para Der p 1 (BESSOT; PAULI, 2011); 90% são positivos para Der p 2 (SMITH et. al., 1998) e 74% reagem para Der p 23 (WEGHOFER et. al., 2013), ocorrendo variação desses dados de acordo com o local em que o estudo foi realizado.

1.4 Resposta Imune Alérgica

A homeostase do sistema imunológico é proveniente do equilíbrio de células T *helper* dos tipos 1, 2 e 17 e células T reguladoras com a particularidade de suas citocinas e fatores de transcrição (WANG et. al., 2014). De acordo com Oboki e colaboradores (2008), o desequilíbrio entre essas populações celulares pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes associadas com a exacerbação da ativação de células do tipo Th1 ou a de doenças alérgicas com a ativação de células do tipo Th2.

Respostas exageradas de células Th17 e o comprometimento de respostas de células T reguladoras têm sido implicadas no desenvolvimento de doenças alérgicas, como a rinite alérgica (WANG et al., 2014), assim como, também foi identificada uma forte capacidade de células Th17 induzirem doenças auto-imunes através da alta indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (BURGLER, et. al., 2009).

Além de células Th17 e células T reguladoras, outro subtipo celular que parece estar envolvido no desenvolvimento de doenças alérgicas são as células Th9 (KAPLAN, 2013), caracterizadas pela elevada expressão de IL-9 (interleucina 9), que afeta células inflamatórias e células normais, aumenta o número de linfócitos, eosinófilos e mastócitos, estimula a secreção de IgE e aumenta as respostas contra alérgenos através da estimulação da secreção de citocinas por células inflamatórias

(MCLANE et al., 1998; DUGAS et al., 1993; LOUAHED et al., 2000; SOUSSI-GOUNNI; KONTOLEMOS; HAMID, 2001).

O conhecimento do papel de outros tipos celulares, como células T reguladoras, Th17 e Th9 é importante para se concluir que a patogênese das doenças alérgicas não ocorre somente devido ao desequilíbrio de células Th1/Th2, mas é susceptível de envolver outros mecanismos celulares que influenciam diretamente no desenvolvimento das reações alérgicas.

O epitélio é reconhecido cada vez mais como o local que se inicia a imunidade do tipo 2, visto que, a resposta imune alérgica começa quando indivíduos entram em contato com os alérgenos e estes ultrapassam as barreiras primárias do organismo. Para o combate dos alérgenos, o sistema imune desenvolveu respostas coordenadas por um conjunto de células com o objetivo primário de expulsão e posterior reparo tecidual. No entanto, a resposta pode ser exagerada e prejudicar o organismo, o que resulta nas reações alérgicas (KOUCHKOVSKY; GHOSH; ROTHLIN, 2017).

O contato com o alérgeno induz a produção de citocinas por células epiteliais, como por exemplo, a linfopoiatina estromal tímica (TSLP) (TAKAI, 2012), que induz as células dendríticas a apresentarem os antígenos às células T *naïve* por meio do MHC II, direcionando a resposta para o perfil Th2 (ITO et al., 2005). Com a diferenciação das células T *naïve* em Th2, citocinas como IL-33 e IL-25 influenciam no processo de maturação e migração das células Th2 para o sítio de inflamação (HOLGATE et al., 2012).

A cascata de reações provocada pelas citocinas de perfil Th2 influenciam na produção e secreção de IL-4 e IL-13, que estão envolvidas diretamente no *switch* de classe das células B para a síntese do anticorpo IgE, maturação de eosinófilos (IL-3 e IL-5), basófilos (IL-3 e IL-4) (HOLGATE et al., 2012) e mastócitos, que sofrem degranulação e libera mediadores pré-formados, incluindo, proteases, histamina e TNF- α , que amplificam a inflamação local (RIVERA et al., 2016; VOEHRINGER, 2013).

Ravetch e Kinet (1991) afirmam que em pessoas saudáveis, os níveis séricos de IgE específica apresentam-se baixos, porém, em pessoas atópicas, os níveis de IgE aumentam, assim como a presença de um maior número de receptores para IgE (Fc ϵ RI) em mastócitos e eosinófilos. Com as posteriores exposições aos antígenos, ocorre ligação cruzada pelas moléculas de IgE que já estão ligadas aos receptores

Fc ϵ RI na superfície de mastócitos, basófilos e eosinófilos, que influencia na liberação de histamina e leucotrienos e inicia os sintomas próprios das reações alérgicas.

Segundo Akdis (2006), outros tipos de anticorpos têm sido estudados na resposta alérgica, como por exemplo, as subclasses de IgG, principalmente IgG4. Em indivíduos não alérgicos, ocorre uma variação da resposta de anticorpo alérgeno-específica, sendo que a resposta de células B a alérgenos de ácaros pode variar entre ausência de resposta ou produção de anticorpos IgG alérgeno-específicos e baixa produção de IgE. Em indivíduos alérgicos, os níveis de IgE são altos, mas também são detectados altos níveis de IgG, principalmente IgG4.

1.5 Imunoterapia alérgeno-específica e anticorpos bloqueadores

Vários pontos devem ser analisados e levados em consideração ao recomendar a imunoterapia alérgeno-específica (AIT), como por exemplo: identificar os alérgenos principais que levam a manifestação dos sintomas; a gravidade e duração dos sintomas; se os fármacos utilizados são bons ou ruins; se o paciente está disposto a participar do tratamento mesmo tendo ciência dos riscos e principalmente, identificar pacientes em que a imunoterapia não é indicada, ou seja, aqueles que são imunodeficientes; que possuem doenças psiquiátricas; asma grave ou obstrução crônica irreversível das vias aéreas; doenças cardiovasculares; mulheres grávidas e crianças abaixo de 5 anos de idade (ALVAREZ-CUESTA; BERISTAIN, 2003).

Mesmo quando o tratamento é excluído para pacientes imunodeficientes, existem fatores de risco específicos que inclui o tipo de extrato, erros de administração, dose de acúmulo, terapia acelerada ou terapia de *cluster*, manifestação de asma, exacerbação sazonal dos sintomas, reação sistêmica prévia e uso de betabloqueadores e inibidores da enzima conversora da angiotensina, além de anafilaxia (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998; RANK; BERNSTEIN, 2014).

Embora existam fatores que influenciam no sucesso da AIT, esta é uma das estratégias mais efetivas no tratamento das alergias a qual se baseia na administração de doses graduais e crescentes de um alérgeno até alcançar uma dose máxima ou suficiente, capaz de induzir a tolerância alérgica específica. A

eficácia da terapia se dá por repetição constante em um período de manutenção que varia de paciente para paciente, com o objetivo de amenizar os sintomas provocados por futuras exposições (ROLLAND; DOUGLAS; O'HEHIR, 2000; BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001).

A AIT tem como fundamento a mudança da resposta Th2 em pacientes alérgicos para uma resposta de perfil Th1, promovendo a produção de IFN- γ que estimula células B a produzir anticorpos IgG em vez de IgE e/ou indução de células T reguladoras que produzem citocinas imunomoduladoras, como IL-10 e TGF- β (CASALE; STOKES, 2011). A IL-10 induz a produção de anticorpos para IgG4, que é considerada um anticorpo bloqueador (AKDIS et al., 1998). O anticorpo IgG4 interrompe a apresentação de antígenos às células Th2 e bloqueia a ativação de basófilos e mastócitos induzidos por alérgenos, reduzindo a resposta alérgica, a gravidade da doença e seus sintomas e induzindo um efeito curativo por longo período (LARSEN; BROGI; JACOBI, 2016).

Células T reguladoras contribuem para o controle da resposta imune por meio da supressão de APCs, células Th1 e Th2, mastócitos, basófilos, eosinófilos e IgE, assim como na indução de anticorpos anti-inflamatórios como IgG4 (MEILER et al., 2008).

A avaliação do sucesso da imunoterapia se dá pelos *scores* dos sintomas, da medicação utilizada e pela melhoria da qualidade de vida do paciente, além da análise dos níveis de IgE, IgG e IgG4 dos pacientes, visto que, o procedimento induz altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG4 alérgeno-específicos (GELHAR et al., 1999).

Muito se discute o papel de anticorpos bloqueadores, principalmente da subclasse IgG4, que atuam na competição por sítios de ligação do alérgeno com a IgE, no bloqueio da ativação de mastócitos e basófilos dependentes de IgE e/ou na inibição da inflamação alérgica, atuando como fator inibitório da reação de hipersensibilidade tipo 1 (DURHAM; TILL, 1998; KOWALSKI; JUTEL, 1998; LARCHÉ; AKDIS; VALENTA, 2006).

Estudos acerca do papel de IgG4 como anticorpo bloqueador, sugerem a capacidade dessa subclasse de inibir a liberação de histamina por basófilos, impedir a ligação do complexo alérgeno-IgE via receptores Fc ϵ R1I presentes em células B, e em seguida, a apresentação dos antígenos às células T (MOTHES et al., 2003; WACHHOLZ et al., 2003; PIPET et al., 2009). Assim, é importante conhecer a influência e os mecanismos de ação dos anticorpos IgG4, para possibilitar o avanço

da imunoterapia alérgeno específica, assim como o aprimoramento das técnicas atuais, aumentando a chance de sucesso do tratamento, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

1.6 Uso de peptídeos na imunoterapia

Entre as estratégias mais promissoras testadas atualmente contra doenças alérgicas está o uso de peptídeos imunomoduladores para induzir tolerância contra alérgenos. Em estudo realizado na Espanha, peptídeos foram utilizados em modelos murinos com intuito de induzir tolerância contra alérgenos alimentares ou prevenir a sensibilização alérgica. Observou-se que os peptídeos alimentares influenciaram na homeostase intestinal o que manteve e reforçou a função da barreira, afetou a sinalização celular intestinal para células imunes, secreção de muco e suprimiu as respostas inflamatórias (LOZANO-OJALVO; LÓPEZ-FANDIÑO, 2017).

Análises de bioinformática dos alérgenos de *Aspergillus fumigatus*, permitiram aos pesquisadores Thakur e Shankar (2016) mapear regiões de epítomos para selecionar potenciais peptídeos com intuito de induzir respostas imunes de células B e T específicas ao *Aspergillus* sp. Os resultados obtidos mostraram que cinco alérgenos apresentaram uma região com epítomos para células B e T em humanos e camundongos, com potencial para o desenvolvimento de uma vacina baseada em peptídeos.

Fellrath e colaboradores (2003) avaliaram a segurança e a imunogenicidade da imunoterapia com base em peptídeos sintéticos de sobreposição longa (LSPs) de toda a sequência de fosfolipase A2 (PLA2), de veneno de abelha (BV). Observou-se proliferação de células T reguladoras até o 14º dia, aumento da resposta de IgG4 específica e diminuição da resposta de IgE com aumento das citocinas IL-10 e IFN- γ . Demonstrou-se que a imunoterapia com alérgenos baseada em LSP foi segura e capaz de induzir hiporesponsividade de células T específicas, desvio imunitário em relação à secreção de citocinas Th1 com secreção paralela de IL-10 e produção aumentada de IgG4, reproduzindo o padrão de eventos celulares e humorais observados na imunoterapia convencional.

2 HIPÓTESES

A partir do desenho dos peptídeos sintéticos Der p 2 e Der p 23, derivados de *D. pteronyssinus*, com a finalidade de aplicação em testes sorológicos para a detecção de anticorpos IgG4 específicos, pode-se inferir as hipóteses abaixo:

H0: Peptídeos sintéticos derivados dos alérgenos Der p 2 e Der p 23 não apresentam capacidade de reagir com anticorpos IgG4 de pacientes alérgicos para aplicação em testes de ELISA indireto;

H1: Peptídeos sintéticos derivados dos alérgenos de Der p 2 e Der p 23 apresentam capacidade de reagir com anticorpos IgG4 de pacientes alérgicos para aplicação em testes de ELISA indireto.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso de peptídeos sintéticos derivados das proteínas Der p 2 e Der p 23 do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* para detecção de anticorpos IgG4 em pacientes alérgicos.

3.2 Objetivos específicos

- Desenhar peptídeos sintéticos de Der p 2 e Der p 23 para utilização em imunoensaios;
- Determinar os níveis de IgE e IgG4 específicos para extrato total de *D. pteronyssinus* em amostras de soros de pacientes com alergia por ELISA indireto;
- Quantificar os níveis de IgG4 específicos para peptídeos de Der p 2 e Der p 23;
- Verificar se existe correlação entre os níveis de anticorpos IgE e IgG4 específicos para extrato total de *D. pteronyssinus*;
- Determinar se existe correlação entre os níveis de IgG4 específico para extrato total de *D. pteronyssinus* e para os peptídeos sintéticos de Der p 2 e Der p 23;
- Verificar se existe uma associação entre a positividade para anticorpos IgG4 específicos para cada peptídeo e a razão entre IgE:IgG4 específica ao extrato total de *D. pteronyssinus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Uberlândia sob o número CEP 322/08 e obteve-se consentimento informado de todos os participantes antes do ingresso no estudo. O presente estudo avaliou um total de 55 amostras de soro obtidas de indivíduos com ou sem alergia respiratória recrutados no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (UFU). Após a avaliação inicial pelo médico, foram selecionados 44 pacientes (com idade entre 18 e 60 anos) com história clínica de rinite alérgica e/ou asma e confirmação laboratorial de IgE ao extrato alergênico de Dpt. Pacientes submetidos a tratamento farmacológico (anti-histamínico ou corticóide) ou imunoterapia anterior/atual foram excluídos do estudo. Onze voluntários (homens e mulheres, com idades entre 18 e 60 anos) foram selecionados com base na ausência de história clínica ou sintomas de doenças alérgicas.

4.2 Peptídeos sintéticos e extratos de ácaros

Foi selecionada uma sequência de vinte e três aminoácidos na região C-terminal (42-64) da molécula Der p 23 (número de acesso EU414751) para serem sintetizados quimicamente utilizando a estratégia Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo) (Biomatik Incorporation, Ontario, Canadá). O peptídeo referente à sequência de Der p 23 foi projetado de maneira a considerar a imunodominância e alergenicidade desta região do alérgeno Der p 23, previamente descrita (BANERJEE et. al., 2014). A sequência de aminoácidos (62-82, número de acesso AAF86462) da molécula Der p 2 foi selecionada com base em trabalho anterior demonstrando que o peptídeo Der p 2 (62-103) induz forte resposta humoral em modelo murino e que anti-Der p 2 também inibe a ativação de basófilos induzida por alérgenos (CHEN et. al., 2012).

Todos os peptídeos sintéticos foram identificados por espectrometria de massa e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), obtendo-se

uma pureza maior que 90%. Os peptídeos sintéticos foram preparados com cisteína adicional na extremidade C-terminal de cada sequência e foram acoplados à proteína soro albumina bovina (BSA) utilizando 4- (N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo como agente de *crosslink* (Biomatik Incorporation, Ontario, Canada). O extrato de Dpt foi obtido de Hollister-Stier Laboratories (Spokane, WA, EUA) e utilizados em protocolos de ELISA subsequentes.

4.3 Determinação de anticorpos IgE e IgG4 específicos para o extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*

As amostras de soro foram avaliadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação de níveis de IgE específicos para Dpt, como descrito anteriormente (MIRANDA et. al., 2011). As placas de microtitulação de alta afinidade foram sensibilizadas (Costar-Corning Incorporated, NY, EUA) com extrato de Dpt (1,5 µg / poço para IgE ou 0,5 µg / poço para IgG4) diluído em tampão carbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram bloqueadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween 20 e 1% de BSA (PBS-T-BSA) e depois incubadas com amostras de soro diluídas com PBS-T a 1: 2 (IgE) ou 1:10 (IgG4) durante 2 horas a 37 ° C.

Após passo adicional de lavagem, as placas foram incubadas com anticorpos biotinilados secundários anti-IgE humana (1: 750; SeraCare KPL, Milford, MA, EUA) ou anti-IgG4 humana (1: 1000; Sigma Co, St Louis, EUA) durante 1 hora a 37°C e subsequentemente lavadas e incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase (1: 500; Sigma Co). A reação foi desenvolvida com substrato ABTS-peroxidase (SeraCare KPL) e os valores de densidade óptica (D.O) foram determinados a 405 nm, por meio do uso de leitor de placas de microtitulação (Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System, Biotek, Winooski, VT, EUA). Os níveis de anticorpos foram expressos como o índice ELISA (IE) de acordo com a fórmula:

$$IE = D.O. amostra \div cutoff (D.O. controle + 3 \times \sigma)$$

Sendo que a D.O. amostra = média da densidade óptica das amostras testadas em duplicatas; D.O. controle = média da densidade óptica dos controles

negativos e σ = desvio padrão das densidades ópticas dos controles negativos. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos.

4.4 Determinação de IgG4 específica para peptídeos de Der p 2 e Der p 23

As amostras de soro foram avaliadas por ELISA como descrito anteriormente (MIRANDA et. al., 2011). As placas de microtitulação de alta afinidade foram sensibilizadas (Costar-Corning Incorporated, NY, EUA) com cada peptídeo (0,5 µg/poço) e conduzida a reação como descrito para a determinação de IgG4 específica para Dpt. Os níveis de anticorpos foram expressos como índice ELISA (IE) de acordo com a fórmula:

$$IE = \frac{D.O \text{ amostra} - D.O \text{ amostra com BSA}}{D.O \text{ controle} + 3 \times \sigma} \div cutoff$$

Em que, D.O. amostra = média da densidade óptica das amostras testadas com peptídeo; D.O. amostra com BSA = média da densidade óptica das amostras testadas com BSA; D.O. controle = média da densidade óptica dos controles negativos e σ = desvio padrão das densidades ópticas dos controles negativos. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos.

4.5 Análise estatística

Os níveis de anticorpos IgE e IgG4 específicos para Dpt em amostras de soro de pacientes alérgicos e não alérgicos foram analisados pelo teste *U* de Mann-Whitney. As diferenças entre os níveis de IgG4 para os extratos de Dpt, Der p 2 e Der p 23 foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn ou, quando apropriado, com o teste *U* de Mann-Whitney. A correlação entre os níveis de anticorpos específicos para cada alérgeno foi analisada pelo teste de correlação de Spearman. Valores de *p* < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc.).

5 RESULTADOS

5.1 Peptídeos derivados das moléculas Der p 2 e Der p 23 do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*

O peptídeo de Der p 2 foi sintetizado com 21 aminoácidos (17,18% da sequência completa) com peso molecular de 2,43 kDa. A análise da sequência peptídica no software Cn3D mostrou uma ligação dissulfeto dentro da sua estrutura, como em destaque na Figura 1. A presença de ligação dissulfeto pode estabilizar a estrutura secundária do peptídeo e assim manter a imunogenicidade. O peptídeo de Der p 23 foi construído com 23 aminoácidos (34,29% da sequência completa) com peso molecular de 2,9 kDa.

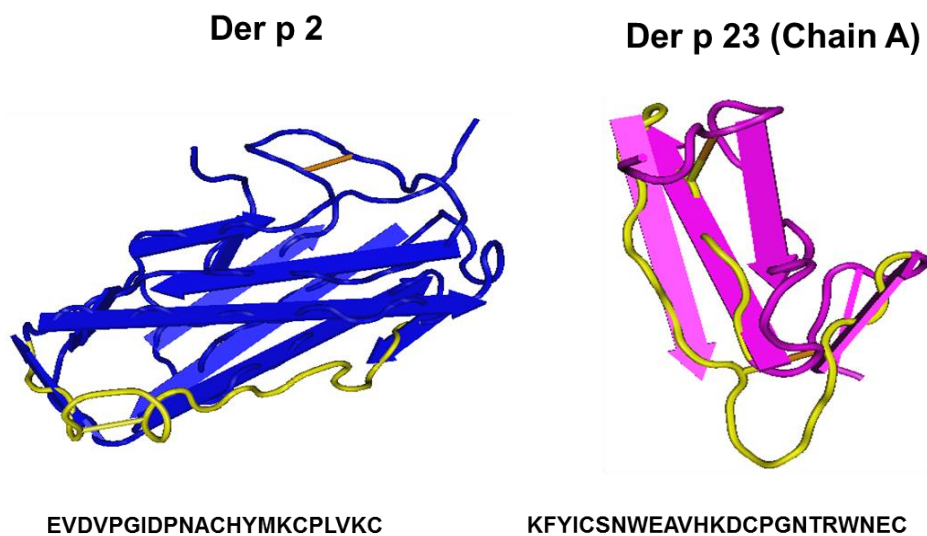


Figura 1. Estrutura das moléculas de Der p 2 e Der p 23. Diagrama de fita da estrutura da proteína de Der p 2 (pdb: 1A9V, Azul) (A) e cadeia A de Der p 23 (pdb: 4ZCE, Magenta) (B), os quais mostram as posições das folhas- β pregueadas e duas ligações dissulfeto em cada molécula. Os peptídeos selecionados que foram quimicamente sintetizados estão indicados em amarelo nas respectivas estruturas.

5.2 Níveis de IgE e IgG4 específicos para *D. pteronyssinus*

Os níveis de anticorpos IgE e IgG4 foram avaliados em 55 amostras de soro de indivíduos com alergia (n= 44) ou sem alergia respiratória (n=11). Os níveis de anticorpos IgE foram significativamente maiores em pacientes alérgicos em relação a indivíduos não alérgicos ($p < 0,0001$) (Figura 2A), com 100% de amostras soropositivas para IgE em pacientes alérgicos e nenhuma positividade observada em indivíduos não alérgicos. Os níveis de IgG4 também foram significativamente diferentes entre pacientes alérgicos e não alérgicos ($p < 0,0001$), com 84,1% positivos (37 de 44) e 15,9% de soros negativos (7 de 44) em pacientes alérgicos (Figura 2B). As amostras de soros de indivíduos não alérgicos apresentaram valores abaixo do limiar de positividade para IgG4 (Figura 2B).

5.3 Reatividade de IgG4 para Dpt e para os peptídeos de Der p 2 e Der p 23

Para analisar as diferenças na reatividade do soro frente a Dpt, Der p 2 e Der p 23, as amostras de soro foram divididas em 3 grupos com base na reatividade de IgG4 a Dpt (alérgicos produtores de IgG4 (n= 37), alérgicos não-produtores de IgG4 (n= 7) e não alérgicos (n= 11)) (Fig. 3). Como esperado, os níveis de IgG4 para Dpt foram maiores em pacientes produtores de IgG4 em comparação com não produtores de IgG4 ($p < 0,0001$) e com indivíduos não alérgicos ($p < 0,0001$) (Figura 3A). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IgG4 entre os três grupos, quando os peptídeos de Der p 2 e Der p 23 foram utilizados como antígenos (Figuras 3B e C), sendo que 48,6% (18 de 37) e 24,3% (9 de 37) das amostras de soro de pacientes produtores de IgG4 apresentaram positividade aos peptídeos Der p 2 e Der p 23, respectivamente (Figuras 3B e C). Duas amostras de soro IgG4 negativas para Dpt em pacientes alérgicos não produtores de IgG4 mostraram positividade ao peptídeo de Der p 2 (Figura 3B). Do mesmo modo, uma amostra IgG4 negativa para Dpt de um voluntário não alérgico exibiu positividade para o peptídeo de Der p 2, indicando que Der p 2 nativo pode estar representado pobremente no extrato de *D. pteronyssinus* utilizado nos ensaios ELISA.

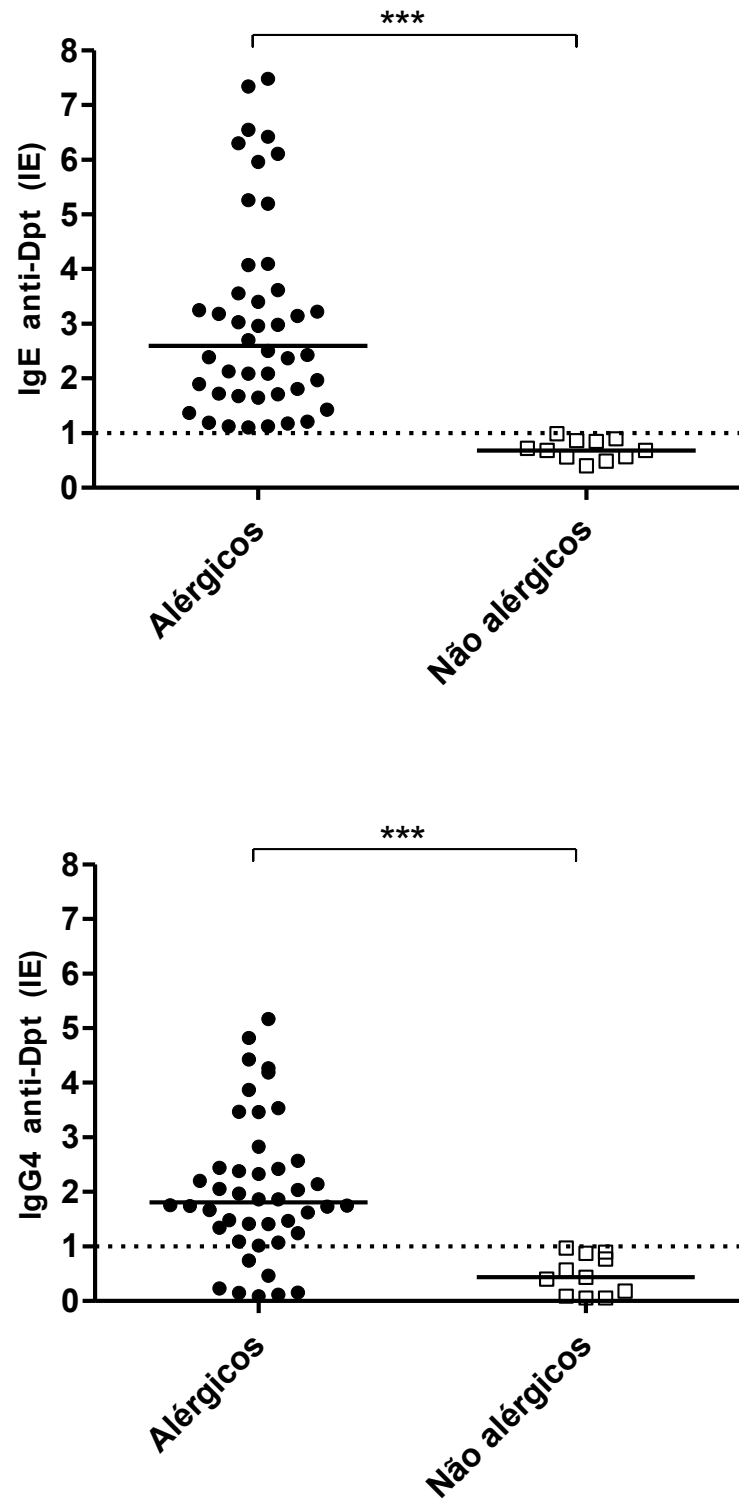


Figura 2. Níveis de anticorpos IgE (A) e IgG4 (B) para o extrato de Dpt em 55 amostras de soro de pacientes alérgicos e não alérgicos. Os dados são expressos em índice ELISA (IE) e a mediana em cada grupo é indicada por barras horizontais. A linha tracejada indica o ponto de corte da reação (IE > 1,0). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste *U* de Mann-Whitney (***) $p < 0,0001$.

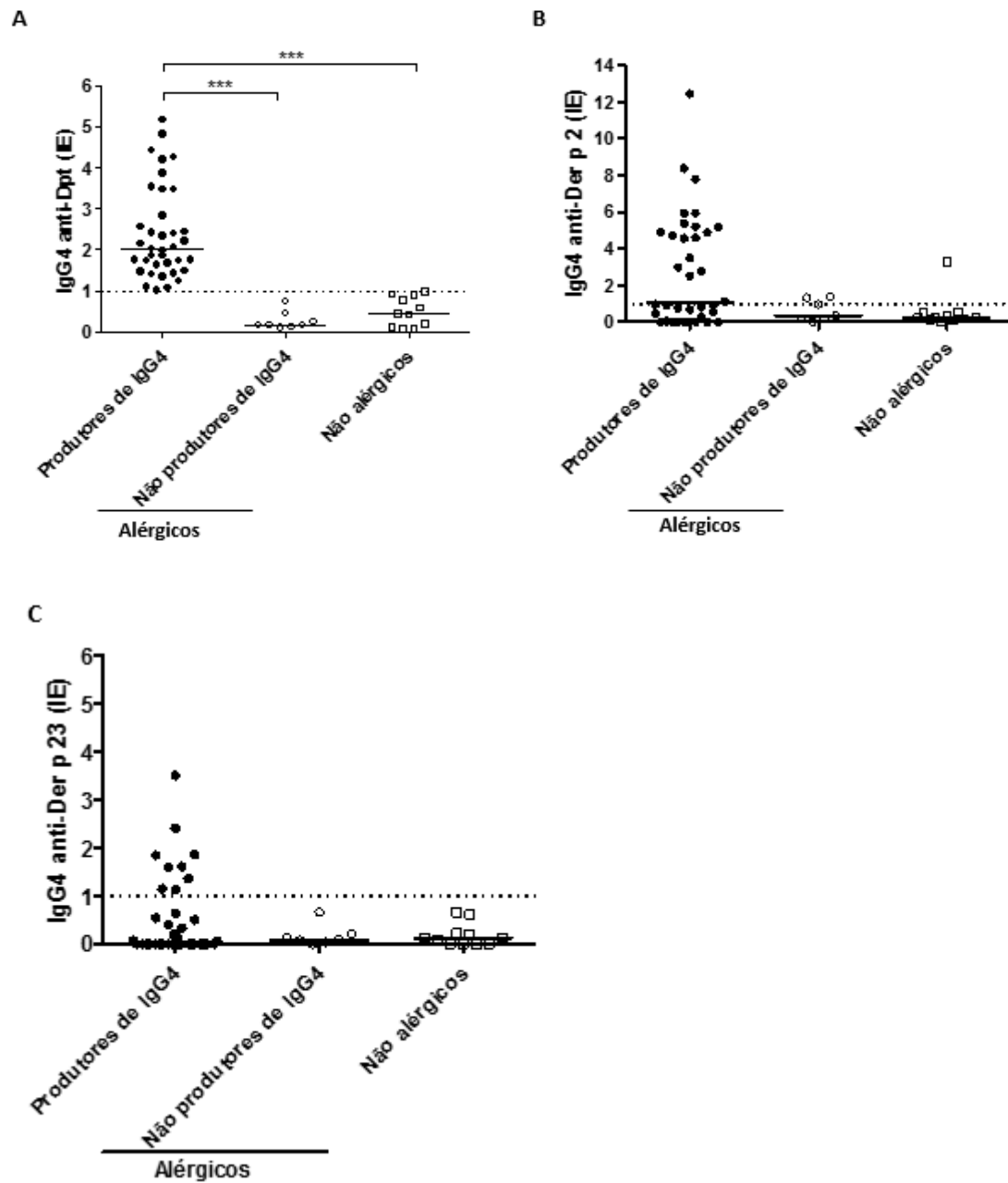


Figura 3. Níveis de anticorpos IgG4 para o extrato de Dpt (A), para o peptídeo Der p 2 (B) e peptídeo Der p 23 (C) em 55 amostras de soro de pacientes alérgicos (n= 44) (produtores de IgG4 e não-produtores de IgG4) e não alérgicos (n= 11). Os dados são expressos em índice ELISA (IE). As barras horizontais indicam os valores da mediana. A linha tracejada indica o ponto de corte da reação (IE > 1,0). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis com a comparação múltipla de Dunn (***) p < 0,0001).

Quando foram utilizadas apenas amostras de soro positivas para cada peptídeo (21 amostras para Der p 2 e 9 amostras para Der p 23) numa análise comparativa, os níveis de IgG4 específicos para Der p 2 foram significativamente mais elevados em comparação com Der p 23 ($p < 0,0001$). Nesta análise, apenas 14,3% das amostras de soro (3 de 21), definidas como Der p 2 positivas, foram concomitantemente positivas para Der p 23 (Figura 4A). De outro modo, não foi observada diferença nos níveis de IgG4 quando amostras positivas de Der p 23 foram analisadas comparativamente com Der p 2 (Figura 4B), com apenas 33,3% das amostras (3 de 9) duplamente positivas para ambos os antígenos.

5.4 Correlação e associação entre os níveis de IgE e IgG4 ao Dpt e peptídeos Der p 2 e Der p 23.

A análise de correlação e associação demonstrou correlação positiva entre os anticorpos IgE e IgG4 específicos para Dpt ($r^2 = 0,458$, $p < 0,0001$), sendo 65,5% (36 de 55) das amostras duplo positivas e 21,8% (12 de 55) duplo negativas para Dpt. Sete amostras de soro foram IgE reativas apenas a Dpt (12,7%). Não se observou positividade de IgG4 quando as amostras de soro foram IgE negativas para Dpt (Fig. 5A). Do mesmo modo, foi observada uma correlação positiva entre IgG4 para Dpt e IgG4 para Der p 2 ($r^2 = 0,259$, $p < 0,0001$), com 34,5% (19 de 55) e 27,3% (15 de 55) de amostras duplo positivas e duplo negativas, respectivamente (Fig. 5B). Foi detectada positividade única de 32,7% (18 de 55) para IgG4 anti-Dpt e apenas 5,5% (3 de 55) para IgG4 anti-Der p 2. Não foi detectada correlação quando os anticorpos IgG4 foram analisados em paralelo com Dpt *versus* Der p 23 ($r^2 = 0,005$, $p = 0,588$) ou Der p 2 *versus* Der p 23 ($r^2 = 0,015$; $p = 0,367$) (Fig. 5C e D). Verificou-se uma positividade única de IgG4 anti-Dpt (50,9%, 28 de 55) quando os níveis de IgG4 foram analisados para Dpt *versus* Der p 23. Por outro lado, observou-se uma dupla negatividade predominante quando os níveis de IgG4 foram analisados para Der p 2 *versus* Der p 23 (52,7%, 29 de 55).

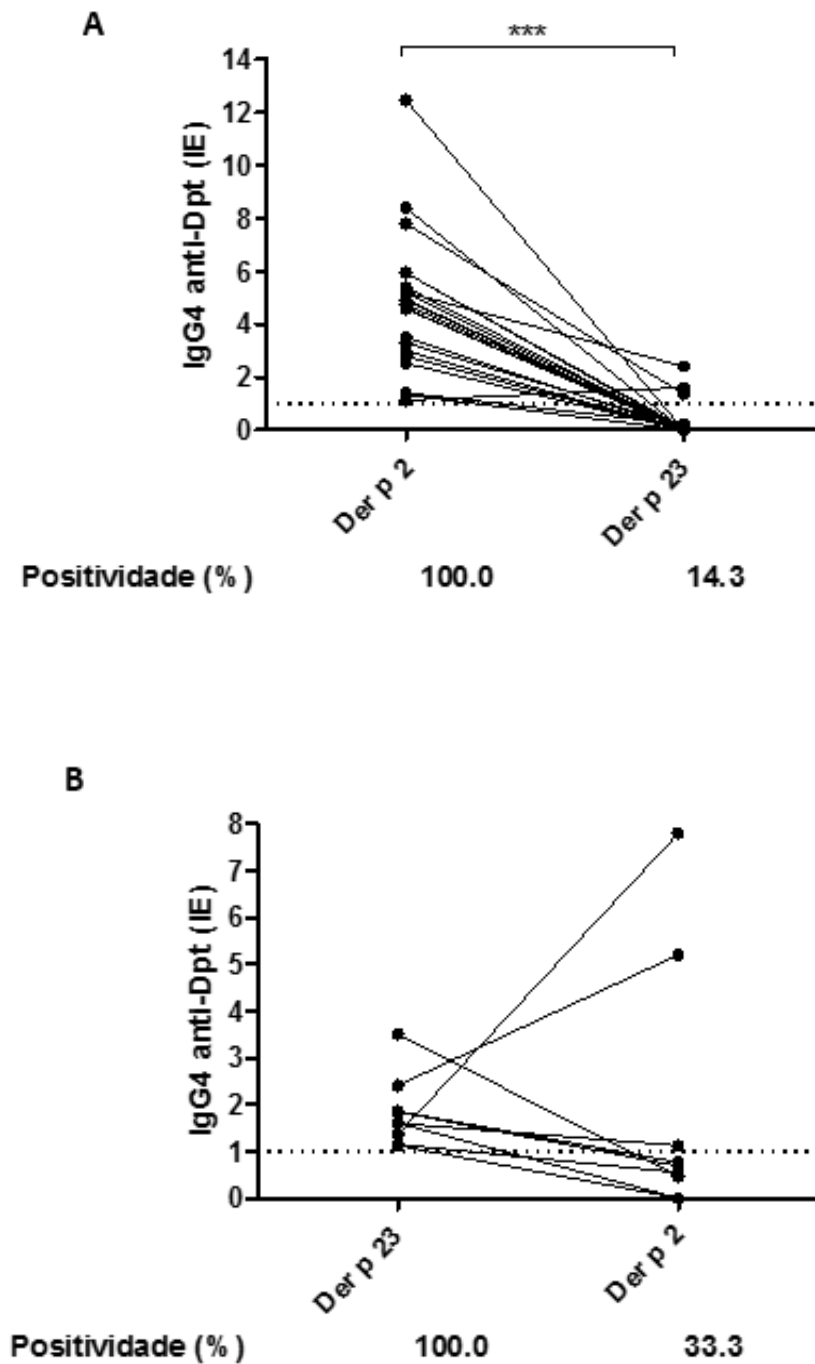


Figura 4. Comparação entre os níveis de anticorpos IgG4 específicos dos peptídeos Der p 2 e Der p 23. Foram avaliadas em paralelo 21 amostras de soro positivas para o peptídeo Der p 2, para determinação da reatividade com o peptídeo Der p 23 (A) e 9 amostras de soro positivas para o peptídeo Der p 23 foram analisadas em paralelo para Der p 2 (B). A linha tracejada indica o ponto de corte da reação (IE > 1,0). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste U de Mann-Whitney (***) $p < 0,0001$.

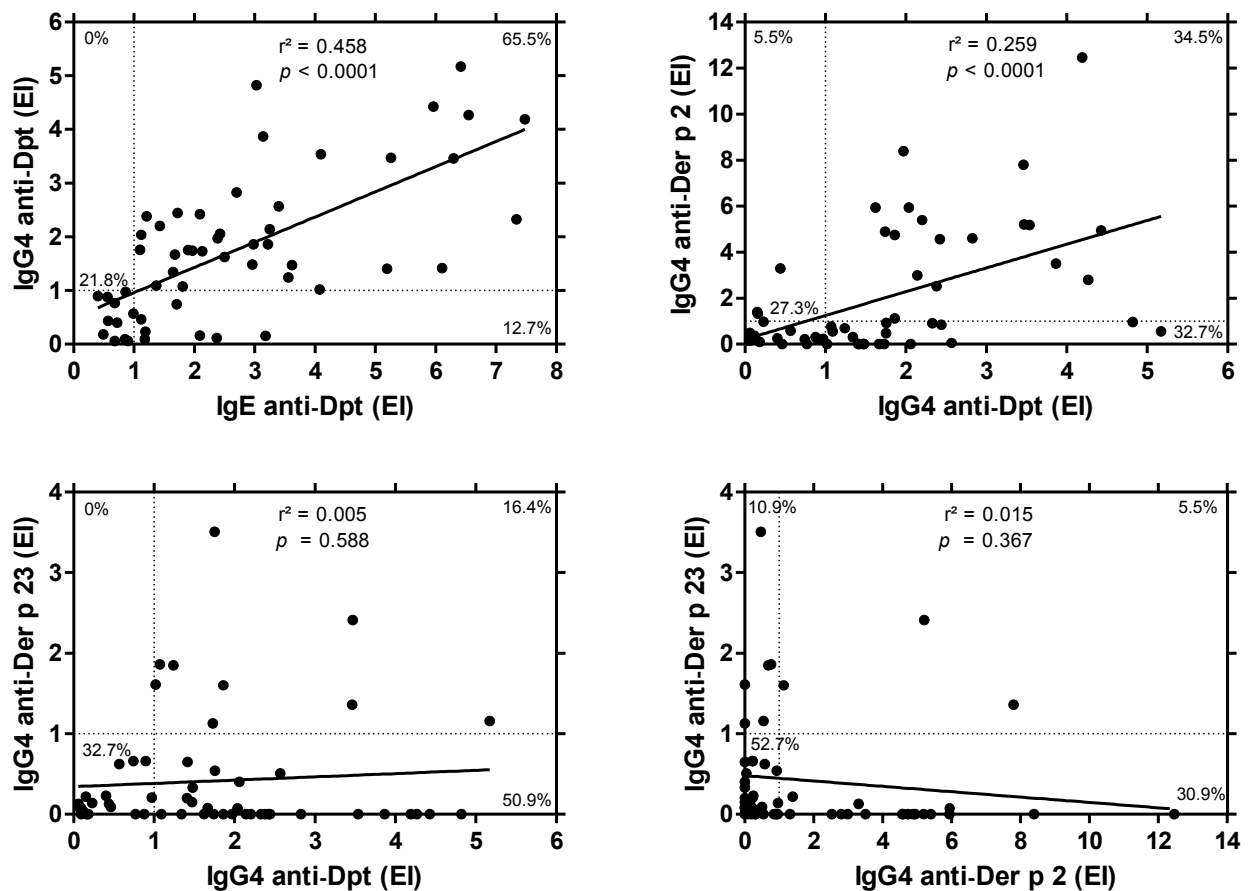


Figura 5. Comparação entre os níveis de IgE versus IgG4 anti-Dpt (A), IgG4 anti-Dpt versus IgG4 anti-Der p 2 e anti-Der p 23 (B, C) e IgG4 anti-Der p 2 versus IgG4 anti-Der p 23 (D) em amostras de soro de pacientes alérgicos e não alérgicos. As porcentagens de duplo positivo, duplo negativo ou positivo único para cada análise foram indicadas em cada quadrante. O coeficiente de correlação de Spearman e a significância estatística também são indicados. As linhas tracejadas indicam o ponto de corte da reação (IE > 1,0).

5.5 Associação entre a razão IgE: IgG4 para Dpt com anticorpos IgG4 específicos para os peptídeos Der p 2 e Der p 23

Para avaliar as amostras de soro em paralelo com IgG4 específica para cada peptídeo e razão IgE:IgG4 para Dpt (baixa <1,0, alta > 1,0 e <2,0 e muito alta > 2,0) foi realizada uma análise de associação em pacientes produtores de IgG4 (Figura 6). Observou-se alta associação entre as amostras positivas para IgG4 para o peptídeo Der p 2 e a razão IgE: IgG4 para Dpt, com 33,3% (6 de 18) e 66,7% (12 de 18) sendo parte de amostras de soro com baixa e alta razão IgE:IgG4 para Dpt. As

amostras IgG4 positivas para Der p 23 apresentaram uma associação alta (77,8%, 7 de 9) e muito alta (22,2%; 2 de 9) entre a razão IgE: IgG4 para Dpt, indicando que os pacientes que produzem IgG4 a Der p23 também são produtores de níveis mais elevados de anticorpos IgE específicos para Dpt.

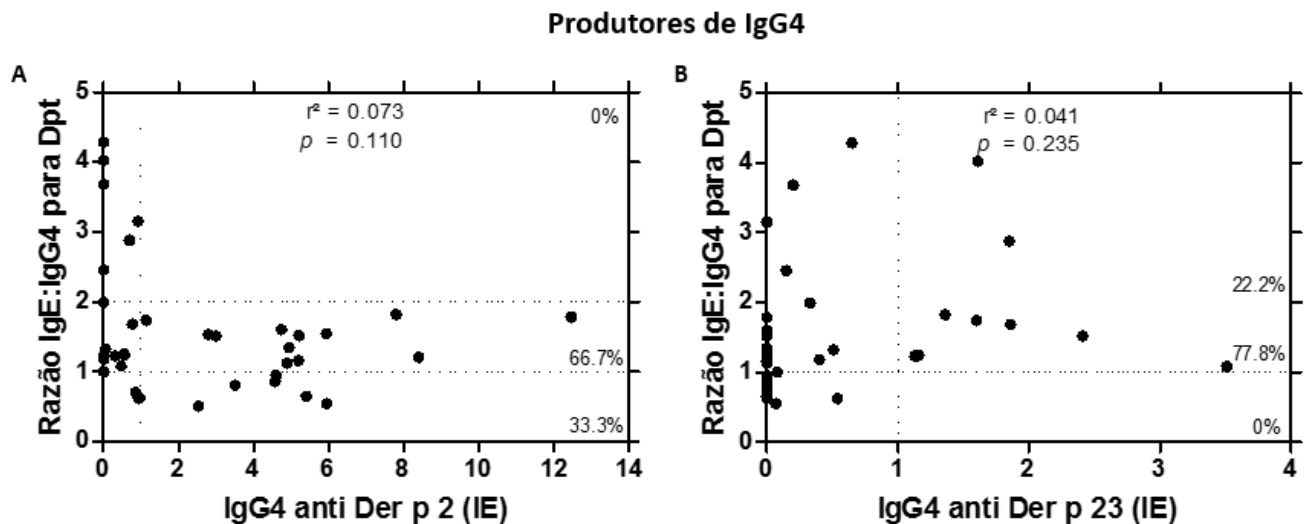


Figura 6. Associação entre a razão dos níveis de IgE e IgG4 para Dpt e IgG4 específica para peptídeos Der p 2 (A) ou Der p 23 (B). A razão IgE: IgG4 para Dpt > 1,0 e > 2,0 e o índice de ELISA EI > 1,0 para IgG4 específica para o peptídeo são indicados por linhas tracejadas. Valores com a razão IgE: IgG4 < 1,0; razão IgE: IgG4 > 1,0 e < 2,0, e razão IgE: IgG4 ≥ 2,0 foram arbitrariamente consideradas como razão baixa, alta e muito alta, respectivamente. As porcentagens de amostras positivas para cada peptídeo estão indicadas nos cantos direitos.

6 DISCUSSÃO

O peptídeo de Der p 23 foi concebido dentro da sequência C-terminal da molécula considerando as suas propriedades imunodominantes como anteriormente relatado (BANERJEE et. al., 2014), enquanto que o peptídeo da molécula Der p 2 foi selecionado dentro de uma sequência de aminoácidos com base na sua capacidade de induzir uma forte resposta de anticorpos no modelo murino e que anticorpos específicos ao peptídeo também inibem a ativação de basófilos induzida por alérgenos (CHEN et. al., 2012). A análise de cada peptídeo quanto às respectivas estruturas das moléculas Der p 2 e Der p 23 demonstrou que os peptídeos selecionados eram acessíveis à superfície hidrofílica sugerindo que podiam ser epítomos potenciais de células B (PARKER; GUO; HODGES, 1986; LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006) com uma finalidade viável para serem ainda utilizados nas detecções de anticorpos IgG, particularmente subclasse IgG4.

Como esperado, observou-se alta positividade de IgE ao extrato de Dpt em pacientes alérgicos, destacando o papel central dos ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae* como principais fontes de alérgenos nesta região do Brasil, conforme relatado anteriormente (MIRANDA et. al., 2011; SIMAN et. al., 2013). Os níveis de IgE e IgG4 para Dpt foram mais elevados em pacientes alérgicos em comparação com não alérgicos, sugerindo que os alérgenos que provocam respostas IgE também são bons indutores de IgG4. Corroborando com esses fatos, verificou-se também uma correlação positiva entre IgE e IgG4 específica para Dpt, reforçando que as citocinas Th2 induzem a produção de ambos anticorpos (AKDIS; AKDIS, 2015; AALBERSE; STAPEL; SCHUURMAN, 2009; KOBAYASHI et.al., 1996).

Grupos bem caracterizados (alérgicos produtores de IgG4, alérgicos não produtores de IgG4 e não alérgicos), foram determinados para avaliar a capacidade dos peptídeos Der p 2 e Der p 23 de reagir com anticorpos IgG4. Em nossas condições, os peptídeos Der p 2 e Der p 23 reagiram com ~49% e ~25% de amostras de soro previamente definidas como IgG4 positivas para Dpt, respectivamente. Resultados semelhantes estão presentes em um trabalho clássico avaliando as respostas de anticorpos IgE e IgG4 a diferentes fragmentos de epítomos recombinantes obtidos a partir da molécula Der p 2 (KOBAYASHI et. al.,

1996). Neste estudo, Kobayashi e colaboradores (1996) demonstraram que 4 de 9 amostras de soro (44,4%) eram IgG4 positivas a um fragmento recombinante de Der p 2 (64-105 aminoácidos), uma sequência de Der p 2 semelhante com a descrita no nosso trabalho. As diferenças observadas entre a positividade de IgG4 para Dpt em comparação com os peptídeos de Der p 2 ou Der p 23 podem ser devidas à sensibilização individual com outros alérgenos diferentes de *D. pteronyssinus*, dentre eles o alérgeno principal Der p 1 observado em trabalho anterior (MIRANDA et. al., 2011).

Intrigantemente, duas e uma amostras de soro previamente consideradas IgG4 anti-Dpt negativas foram IgG4 positivas ao peptídeo de Der p 2 em pacientes alérgicos não produtores de IgG4 e em pacientes não alérgicos, respectivamente. Estes achados podem ser explicados pela baixa quantidade da molécula de Der p 2 no extrato total de Dpt, o que torna difícil a detecção de anticorpos IgG4 nestes grupos utilizando o ELISA convencional. Neste sentido, a utilização de peptídeos sintéticos pode ser uma ferramenta importante para melhorar a sensibilidade de imunoensaios para a detecção de IgG4 específica para alérgenos clinicamente relevantes.

Por outro lado, quando amostras de soro positivas para cada peptídeo (Der p 2 e Der p 23) foram analisadas comparativamente, os níveis de IgG4 para Der p 2 foram significativamente mais elevados em comparação com Der p 23, o que indicou mais uma vez que Der p 2 pode ser um dos principais indutores de sensibilização alérgica. Foi observada uma baixa positividade de IgG4 para Der p 23 em pacientes IgG4 positivos para Der p 2 enquanto que uma positividade relativamente baixa foi detectada em amostra positiva de IgG4 para Der p 2 em comparação com Der p 23, o que sugere que os epítomos aqui selecionados foram capazes de discriminar as respostas individuais de IgG4 contra cada alérgeno particular (Der p 2 ou Der p 23). Esses achados foram reforçados pela análise de associação que demonstrou um número baixo de amostras concomitantemente IgG4 duplo positivas para Der p 2 e Der p 23.

Alguns trabalhos demonstraram que a resposta diferencial nos níveis de anticorpos IgE, IgG e IgA específicos para alérgenos pode ser útil na determinação do desfecho clínico do AIT, particularmente por discriminar os respondedores e os que respondem pouco ao regime terapêutico (SUGIMOTO et al., 2016; WRIGHT et. al., 2016). Neste cenário, a análise da razão IgE:IgG4 para os alérgenos de ácaros

também pode ser particularmente atraente. Em nosso estudo, amostras de soro com altas ou muito altas proporções IgE: IgG4 para Dpt foram predominantemente positivas aos peptídeos Der p 2 e Der p 23 indicando que os peptídeos podem ser empregados na detecção de IgG4 por ELISA indireto.

Atualmente, não existem ensaios laboratoriais de rotina para a detecção de anticorpos IgG4 específicos para alérgenos que possam ser úteis para monitorar AIT. Sabe-se que o aumento nos níveis de IgG4 alérgeno-específicos está normalmente relacionado com a atividade bloqueadora que essa subclasse de anticorpo é capaz de desenvolver, o que pode modular o perfil da resposta imunológica e assim reduzir a resposta inflamatória e, como consequência, obter melhora clínica (AALBERSE et. al., 1993).

7 CONCLUSÕES

De acordo com o trabalho realizado, pode-se concluir que os peptídeos utilizados foram capazes de detectar níveis de anticorpos (IgG4) alérgeno-específicos por meio do ELISA indireto, o qual obteve sucesso ao caracterizar grupos de pacientes alérgicos e não alérgicos a partir de ensaios com anticorpos IgE e IgG4. Dessa forma, os peptídeos desenhados apresentaram potencial para melhorar a sensibilidade do teste ELISA, visto que, quando realizou-se testes com o peptídeo de Der p 2, ele foi capaz de reconhecer amostras positivas à IgG4 que foram negativas quando avaliadas no extrato total de Dpt. Além disso, os epítomos aqui selecionados foram capazes de discriminar as respostas individuais de IgG4 contra cada alérgeno em particular, dado reforçado pela análise de associação que demonstrou baixo número de amostras concomitantemente duplo positivas, e mostrou, mais uma vez, que Der p 2 poder ser um dos principais alérgenos indutores de alergia, já que mais amostras foram positivas a este alérgeno em comparação com Der p 23. Amostras de soro com altas proporções de IgE:IgG4 para Dpt foram predominantemente positivas aos peptídeos, o que indica que estes podem ser empregados na detecção de IgG4 por ELISA indireto, mostrando grande potencial para monitorar os níveis de IgG4 durante protocolos de AIT. Assim, os dados analisados confirmaram a hipótese H1 inferida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERSE, R. C.; VAN MILLIGEN, F.; TAN, K.Y.; STAPEL, S.O. Allergen-specific IgG4. **Allergy**, v. 48, n. 4, p. 559-569, 1993. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1993.tb00749.x>

AALBERSE, R.C.; STAPEL, S.O.; SCHUURMAN, J.; RISPENS T. Immunoglobulin G4: an odd antibody, **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 469–477, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03207.x>

AKDIS, C.A.; BLESKEN, T.; AKDIS, M.; WÜTHRICH, B.; BLASER, K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. **J Clin Invest**, v. 102, p. 98–106, 1998. <https://doi.org/10.1172/JCI2250>

AKDIS, M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. **Curr Opin Immunol**, v. 18, p. 738-744, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.06.003>

AKDIS, C.A.; AKDIS, M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens, **World Allergy Organization Journal**, v. 8, 2015.

ALVAREZ-CUESTA, E.; BERISTAIN, A. Practical management of immunotherapy. **Rev Fr Alergol**, v.43, p. 301-309, 2003 [https://doi.org/10.1016/S0335-7457\(03\)00194-1](https://doi.org/10.1016/S0335-7457(03)00194-1)

ARLIAN, L. G.; House dust mites. In: MACHER, J. Ed. **Bioaerosols: assessment and control**. Cincinnati: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, p. 22.1-22.9, 1999.

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. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.113670>

ARLIAN, L. G. Arthropod allergens and human health. **Annu Rev Entomol**, v.47, p. 443-468, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145224>

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S. Biology, ecology and prevalence of dust mites. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.23, n. 3, p. 443-468, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0889-8561\(03\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0889-8561(03)00005-5)

ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; FERNANDEZ-CLADAS, 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. **Clin Exp Allergy**, v.21, p. 433-439, 1991.

<https://doi.org/10.1111/j.13652222.1991.tb01683.x>

ASHER, M.I.; MONTEFORT, S.; BJORKSTÉN, 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.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69283-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69283-0)

BANERJEE, S.; WEBER, M.; BLATT, K.; SWOBODA, I.; FOCKE-TEJTL, M.; VALENT, P.; VALENTA, R.; VRTALA, S. Conversion of Der p 23, a New Major House Dust Mite Allergen, into a Hypoallergenic Vaccine, **J Immunol**, v. 192, p. 4867-4875, 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400064>

BESSOT, J. C.; PAULI, G. Mite allergens: an overview. **European Annals of Allergy and Clinical Immunology**, Paris, v. 43, n. 5, p. 141-156, 2011.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its Impact on Asthma: Aria Workshop Report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, p. 147-270, 2001. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.118891>

BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.; MALLING, H. J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. **J Allergy Clin Immunol**, v.102, p. 558-62, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70271-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70271-4)

BURGLER, S.; OUAKED, N.; BASSIN, C.; FHA, D. I.; BASINSKI, T. M.; MANTEL, P.; SIEGMUND, K.; MEYER, N.; AKDIS, C. A.; SCHMIDT-WEBER, C. B. Differentiation and functional analysis of human TH17 cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 3, p. 588-595, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.017>

CALDERÓN, M. A.; CASALE, T. B.; TOGIAS, A.; BOUSQUET, J.; DURHAM, S. R.; DEMOLY, P. Allergen-specific immunotherapy for respiratory allergies: From meta-analysis to registration and beyond. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v.127, n.1, p. 30-38, 2010.

CASALE, T.B.; STOKES, J. R. Future forms of immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, p. 8–15, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.034>

CHAPMAN, M. D.; POME'S, A.; BREITENEDER, H.; FERREIRA, F. Nomenclature and structural biology of allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 2, p. 414-420, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.11.001>

CHEN, K.-W.; FOCKE-TEJKL, M.; BLATT, K.; KNEIDINGER, M.; GIERAS, A.; DALL'ANTONIA, F.; FAÉ, I.; FISCHER, G.; KELLER, W.; VALENT, P.; VALENTA, R.; VRTALA, S. Carrier-bound nonallergenic Der p 2 peptides induce IgG antibodies blocking allergen-induced basophil activation in allergic patients, **Europe PMC Funders Group**, v. 67, p. 609–621, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02794.x>

COLLOFF, M.J. Taxonomy and identification of dust mites. **Allergy**, v.53, p.7-12, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb04989.x>

DUGAS, B.; RENAULD, J.C.; PÈNE, J.; BONNEFOY, J.Y.; PETI-FRÈRE, C.; BRAQUET, P.; BOUSQUET, J.; VAN SNICK, J.; MENCIA-HUERTA, J.M. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes. **Eur J Immunol**, v.23, p.1687-1692, 1993. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230743>

DURHAM, S. R.; TILL, S. J. Immunological changes associated with allergen immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 102, n.2, p. 157-164, 1998.

FELLRATH, J.M.; KETTNER, A.; DUFOUR, N.; FRIGERIO, C.; SCHNEEBERGER, D.; LEIMGRUBER, A.; CORRADIN, G. Allergen-specific T-cell tolerance induction with allergen-derived long synthetic peptides: Results of a phase I trial. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 4, p. 854–861, 2003. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1337>

FÖTISH, K.; VIETHS, S.N.-an- O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. **Glycoconjugate Journal**, v.18, n.5,p. 373-390, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1014860030380>

GELHAR, K.; SCHLAACK, M.; BECKER, W.; BUFE, A. A Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: The ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 497-506, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00525.x>

GELLER, M.; ESCH, R.E.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Sensibilização acarina na atopia respiratória do Rio de Janeiro – considerações preliminares. **Na acad nac Med**, v.153, n. 4, p.174-175, 1993.
GUPTA R. HOLDFORD, D. BILAYER L., DYER A. HOLL, J. MELTZER D. The Economic Impact of Childhood Food Allergy in the United States. **JAMA Pediatrics**. v.167, 2013.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 218–230, 2008. <https://doi.org/10.1038/nri2262>

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 673–683, 2012. <https://doi.org/10.1038/nm.2731>

ISAAC. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. **Lancet**, v. 351, p. 1225–1232, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07302-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07302-9)

ITO, T.; WANG, Y.; DURAMAD, O.; HORI, T.; DELESPESE, G.J.; WATANABE, N.; QIN, F.X.; YAO, Z.; CAO, W.; LIU, Y. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, p. 1213–1223, 2005. <https://doi.org/10.1084/jem.20051135>

JOHANSSON, S. G. O.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P.S.; LANIER, B.Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; MATERLL, J. A. O.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; RING, J.; THIEN, J.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, n. 5, p. 832–836, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.591>

KAPLAN, M.H. Th9 cells: differentiation and disease. **Immunol Rev**, v. 252, p. 104–115, 2013. <https://doi.org/10.1111/imr.12028>

KOBAYASHI, I.; SAKIYAMA, Y.; TAME, A.; KOBAYASHI, K.; MATSUMOTO, S. IgE and IgG4 antibodies from patients with mite allergy recognize different epitopes of *Dermatophagoides pteronyssinus* group II antigen (Der p 2), **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, p. 638–645, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(96\)70309-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(96)70309-3)

KOUCHKOVSKY, D. A.; GHOSH, S.; ROTHLIN C. Negative Regulation of Type 2 Immunity. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 3, p. 154–167, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.12.002>

KOWALSKI, M. L.; JUTEL, M. Mechanisms of specific immunotherapy of allergic diseases, Munksgaard, **Allergy**, Copenhagen, v. 53, n. 5, p. 485–492, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb04085.x>

LARCHÉ, M.; AKDIS, C. A.; VALENTA, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 10, p. 761-771, 2006. <https://doi.org/10.1038/nri1934>

LARSEN, E.P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes, **Immunome Research**, v. 2, 2006.

LARSEN, J. N.; BROGE, L.; JACOBI, H. Allergy immunotherapy: the future of allergy treatment. **Drug Discovery Today**, v. 21, p. 26–37, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.07.010>

LEMANSKE-JUNIOR, R.F.; BUSSE, W.W. Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. s502-519, 2003. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.94>

LI, J.; SUN, B.; HUANG, Y.; LIN, X.; ZHAO, D.; TAN, G.; WU, J.; ZHAO, H.; CAO, L.; ZHONG, N. A multicentre study assessing the prevalence of sensitizations in patients with asthma and/or rhinitis in China. **European Journal of Allergy and clinical immunology**, v.64, n. 7, p. 1083–1092, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.01967.x>

LI, J.; HUANG, Y.; LIN, X.; ZHAO, D.; TAN, G.; WU, J.; ZHAO, C.; ZHAO, J.; SPANGFORT, M. D.; LAI, X.; ZHONG, N. Factors associated with allergen sensitizations in patients with asthma and/or rhinitis in China. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 26, n. 2, p. 85-91, 2012. <https://doi.org/10.2500/ajra.2012.26.3751>

LOZANO-OJALVO, D.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Immunomodulating peptides for food allergy prevention and treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1275519>

LOUAHED, J.; TODA, M.; JEN, J.; HAMID, Q.; RENAULD, J.C.; LEVITT, R.C.; NICOLAIDES, N.C. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 22, p. 649-656, 2000. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.22.6.3927>

MCLANE, M.P.; HACZKU, A.; VAN DE RIJN, M.; WEISS, C.; FERRANTE, V.; MACDONALD, D.; RENAULD, J.C.; NICOLAIDES, N.C.; HOLROYD, K.J.; LEVITT, R.C. Interleukin-9 promotes allergen-induced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in transgenic mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.19, p. 713-720, 1998. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.19.5.3457>

MEILER, F.; KLUNKER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, C.A.; AKDIS, M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. **Allergy**, v.63, n. 11, p. 1455-1463, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01774.x>

MIRANDA, D.O.; SILVA, D.A.O.; FERNANDES, J.F.C.; QUEIRÓS, M.G.J.; CHIBA, H.F.; YNOUE, L.H.; RESENDE, R.O.; PENA, J.D.O.; SUNG, S.J.; SEGUNDO,

G.R.S.; TAKETOMI, E.A. Serum and Salivary IgE, IgA, and IgG4 Antibodies to Dermatophagoides pteronyssinus and Its Major Allergens, Der p1 and Der p2, in Allergic and Nonallergic Children, **Clin Dev Immunol**, 2011.
<https://doi.org/10.1155/2011/302739>

MOTHES, N.; HEINZKILL, M.; DRACHENBERG, K. J.; SPERR, W. R.; KRAUTH, M. T.; MAJLESI, Y.; SEMPER, H.; VALENT, P.; NIDERBERGER, V.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 7, p. 5, 2009.

OBOKI, K.; OHNO, T.; SAITO, H.; NAKAE, S. Th17 and allergy. **Allergology International**, v. 57, n.2, 2008. <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-07-160>

OGBURN, R.N.; RANDALL, T.A.; XU, y.; ROBERTS, J. H.; MEBRAHTUA, B.; KARNUTAA, J.M.; RIDER, S. D.; KISSLING, G. E.; LONDON, R. E.; POMÉS, A.; ARLIAN, L.; FITZGERALD, M. C.; MUELLER, G. A. Are dust mite allergens more abundant and/or more stable than other Dermatophagoides pteronyssinus proteins? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2016.

PARKER, J.M.R.; GUO, D.; HODGES, R.S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and x-ray-derived accessible sites, **Biochemistry**, V. 25, p. 5425–5432, 1986. <https://doi.org/10.1021/bi00367a013>

PAWANKAR, R.; CANONICA, G. W; HOLGATE, S. T.; LOCKEY, R. F. “Allergic diseases and asthma: a major global health concern,” **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v.12, p. 39–41, 2012.
<https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32834ec13b>

PAWANKAR, R.; CANONICA, G. W; HOLGATE, S. T.; LOCKEY, R. F.; BLAISS, M. **The WAO White Book on Allergy, World Allergy Organization (WAO)**, 2013.

PERFETTI, L.; FERRARI, M.; GALDI, E.; POZZI, V.; COTTICA, D.; GRIGNANI, E.; MINOIA, C.; MOSCATO, G. House dust mites (Der p 1, Der f 1), cat (Fel d 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in indoor work-places (offices and archives). **Science of the Total Environment**, v. 328, n. 1-3, p. 15-21, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.01.028>

PIPET, A.; BOTTURI, K.; PINOT, D.; VERVLOET, D.; MAGNAN, A. Allergen-specific immunotherapy in allergic rhinitis and asthma. Mechanisms and proof of efficacy. **Respiratory Medicine**, v. 103, n. 6, p. 800-812, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.01.008>

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. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(89\)90128-0](https://doi.org/10.1016/0091-6749(89)90128-0)

PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; VERVLOET, D.; CHAPMAN, M. D. Dust mite allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, n. 5, p. 1046-1060, 1992. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(92\)90228-T](https://doi.org/10.1016/0091-6749(92)90228-T)

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; CHAPMAN, M. D. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, p. 2-24, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70292-6](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70292-6)

PLATTS-MILLS, T. A. Indoors Allergens. In: ADKINSON, N. F. JR.; YUNGINGER, J. W.; BUSSE, W. W.; BOCHNER, B. S.; HOLGATE, S. T.; <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-05659-5.00033-4>

POSA, D.; PERNA, S.; RESCH, Y.; LUPINEK, C.; PANETTA, V.; HOFMAIER, S.; ROHRBACHA, A.; HATZLER, L. Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 2, p. 541–549, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.014>

RANK, M. A.; BERNSTEIN, D. I. Improving the safety of immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 2, p. 131-5, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2013.09.017>

RAVETCH, J. V.; KINET, J.P. Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, v.9, p. 457-492, 1991. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.09.040191.002325>

RIVERA, A.; SIRACUSA, M. C.; YAP, G. S.; GAUSE, W.C. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. **Nature Immunology**, v. 17, p. 356-363, 2016. <https://doi.org/10.1038/ni.3375>

ROLLAND, J. M.; DOUGLAS, J.; O'HEHIR, R. E. Allergen immunotherapy: current and new therapeutic strategies. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v. 9, n. 3, p. 515-527, 2000. <https://doi.org/10.1517/13543784.9.3.515>

SAVOLAINEN, J.; VIANDER, M.; KOIVIKKO, A. IgE-, IgA- and IgG-antibody responses to carbohydrate and protein antigens of *Candida albicans* in asthmatic children. **Allergy**, v. 45, n. 1, p. 54-63, 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1990.tb01084.x>

SIMAN, I. L.; DE AQUINO, L. M.; YNOUE, L. H.; MIRANDA, J. S.; PAJUABA, A. C.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SILVA, D. A.; TAKETOMI, E. A. Allergen-specific IgG antibodies purified from mite-allergic patients sera block the IgE recognition of *Dermatophagoides pteronyssinus* antigens: an in vitro study. **Clin Dev Immunol**, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/657424>

SIMONS, F. E. R. Ed. Allergy Principles and Practice. **New York: Mosby**; p. 465-78, 2003.

SMITH, A. M.; YAMAGUCHI, H.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; FU, S. M. Prevalence of IgG anti-der p 2 antibodies in children from high and low antigen exposure groups: relationship of IgG and subclass antibody responses to exposure and allergic symptoms. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.86, n. 1, p. 102-109, 1998. <https://doi.org/10.1006/clin.1997.4454>

SIMONS, F. E. R. Ed. Ancestors of Allergy. **New York: New York Global Medical Communications**, p. 110-117, 1994.

SOH, W.T.; LE MIGNON, M.; SURATANNON, N.; SATITSUKSANO, P.; CHATCHATEE, P.; WONGPIYABORON J.; et al: The house dust mite major allergen Der p 23 displays O -glycan-independent IgE reactivities but no chitin-binding activity. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 168, p.150–160, 2016. <https://doi.org/10.1159/000442176>

SOUSSI-GOUNNI, A.; KONTOLEMONS, M.; HAMID, Q. Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v.107, p. 575-582, 2001. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.114238>

SUGIMOTO, M.; KAMEMURA, N.; NAGAO, M.; IRAHARA, M.; KAGAMI, S.; FUJISAWA, T.; KIDO, H. Differential response in allergen-specific IgE, IgGs, and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy, **Pediatric Allergy and Immunology**, v.27, p. 276–282, 2016. <https://doi.org/10.1111/pai.12535>

TAKAI, T. TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. **Allergol. Int.**, v. 61, p. 3–17, 2012. <https://doi.org/10.2332/allergolint.11-RAI-0395>

THAKUR, R.; SHANKAR, J. In silico Identification of Potential Peptides or Allergen Shot Candidates Against *Aspergillus fumigatus*. **BioResearch**, v. 5, 2016.

VOEHRINGER, D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 362-375, 2013. <https://doi.org/10.1038/nri3427>

WACHHOLZ, P. A.; SONI, N. K.; TILL, S. J.; DURHAM, S.R. Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 5, p. 915-922, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(03\)02022-0](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(03)02022-0)

WANG, S. B.; DENG, Y.; REN, J.; XIAO, B.; LIU, Z.; TAO, Z. Exogenous interleukin-10 alleviates allergic inflammation but inhibits local interleukin-10 expression in a mouse allergic rhinitis model. **BMC Immunology**, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1471-2172-15-9>

WEGHOFER, M.; THOMAS, W. R.; KRONQVIST, M.; MARI, A.; PUROHIT, A.; PAULI, G.; HORAK, F.; GRÖNLUND, H.; VAN HAGE, M.; VALENTA, R.; VRTALA, S. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. **Eur J Clin Invest**, v. 38, n.12, p. 959–965, 2008.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.02048.x>

WEGHOFER, M.; GROTE, M.; RESCH, Y.; CASSET, A.; KNEIDINGER, M.; KOPEC, J.; THOMAS, W.R.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; KABESCH, M.; FERRARA, R.; MARI, A.; PUROHIT, A.; PAULI, G.; HORAK, F.; KELLER, W.; VALENT, P.; VALENTA, R.; VRTALA, S. Identification of Der p 23, a Peritrophin-like Protein, as a New Major *Dermatophagoides pteronyssinus* Allergen Associated with the Peritrophic Matrix of Mite Fecal Pellets, **J Immunol**, v. 190, p. 3059-3067, 2013.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202288>

WILLS-KARP, M. Allergen-specific pattern recognition receptor pathways. **Curr Opin Immunol**, v.22, p. 777-782, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.10.011>

WRIGHT, B. L.; KULIS, M.; ORGEL, K. A.; BURKS, A. W.; DAWSON, P.; HENNING, A. K.; JONES, S. M.; WOOD, R. A.; SICHERER, S. H.; LINDBLAD, R. W.; STABLEIN, D.; LEUNG, D. Y. M.; VICKERY, B. P.; SAMPSON, H. A. Component-resolved analysis of IgA, IgE, and IgG4 during egg OIT identifies markers associated with sustained unresponsiveness, **European Journal of Allergy and clinical Immunology**, v. 71, p.1552–1560, 2016. <https://doi.org/10.1111/all.12895>