

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Paula Fernandes Santos

Mestrado

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Extrato enriquecido em Der f 1 derivado de *Dermatophagoides farinae* aumenta a reatividade para anticorpos IgG4 específicos

Paula Fernandes Santos

Uberlândia – MG

Fevereiro - 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Extrato enriquecido em Der f 1 derivado de *Dermatophagoides farinae* aumenta a reatividade para anticorpos IgG4 específicos

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

Paula Fernandes Santos

Professor Dr. Ernesto Akio Taketomi

Orientador

Professor Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior

Co-orientador

Uberlândia – MG

Fevereiro - 2016

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

S237e Santos, Paula Fernandes, 1991-
2018 Extrato enriquecido em Der f 1 derivado de *Dermatophagoides farinae* aumenta a reatividade para anticorpos IgG4 específicos [recurso eletrônico] / Paula Fernandes Santos. - 2018.

Orientador: Ernesto Akio Taketomi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1377>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Ácaros. 3. *Dermatophagoides farinae*.
4. Imunoterapia. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Paula Fernandes Santos

“Extrato enriquecido em Der f 1 derivado de Dermatophagoides farinae aumenta a reatividade para anticorpos IgG4 específicos”

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 25 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Herberto José Chong Neto – UFPR

Profa. Dra. Celene Maria de O. S. Alves – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi (orientador) – ICBIM/UFU

Aos meus maiores incentivadores e amparo nas dificuldades...

Eleny e Wandaick, meus pais, e Pablo, meu irmão.

Àquele que torna a minha vida mais feliz e completa...

meu namorado, Josael.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

Agradecimentos

“Chegar até aqui não foi fácil, mas tantos tornaram esse momento possível, aos quais devo eterna gratidão por mais essa meta alcançada.

Agradeço primeiramente a Deus, pelas bênçãos derramadas em todo esse processo de crescimento, tanto profissional quanto pessoal, pelo amparo nas minhas tribulações e pela oportunidade de alcançar mais essa vitória em minha vida.

Aos meus pais, Eleny e Wandaick, meu irmão, Pablo e minha cunhada, Vanessa, pelo amor incondicional e apoio em todas as minhas decisões.

Ao meu querido namorado, Josael, pelo amor, paciência, dedicação e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, pela confiança e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, por todo auxílio, pela paciência, constante incentivo e ensinamentos valiosos.

A Dra. Ana Cláudia Pajuaba, por toda a sua dedicação e colaboração nos experimentos.

Aos professores Dr. Herberto José Chong Neto, Dra. Celene Oliveira Alves e Dra. Danielle Reis Napolitano por terem aceitado o convite para participar da Banca examinadora contribuindo para o aprimoramento do trabalho.

Ao professor Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza pelo auxílio nas pesquisas.

Aos meus colegas que passaram e os que ainda fazem parte do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica: Bianca Uliana, Jade Leão, Juliana Miranda, Greice Japolla, Karine Canuto, Isabella Vilas Boas, Hellen Dayane, Guilherme Nunes, Lucas Andrade e Priscila Moreira, pelos ótimos momentos compartilhados, pela amizade e imensa disponibilidade em ajudar.

Aos meus colegas do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, em especial à Gabriela Borges, pelo carinho, auxílio nas dificuldades e pela amizade.

A todos os funcionários do Laboratório de Imunologia e da Pós-graduação, pela atenção e por toda ajuda prestada.

Às agências de fomento que possibilitaram a realização do presente estudo, com destaque para a Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos os voluntários por terem aceitado participar desse estudo.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho deixo aqui meus sinceros agradecimentos!”

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
1D	Unidimensional
ABTS	<i>2,2'-azinobis-3- ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i> (Ácido 2,2'-azinobis-3 etilbenzoatizolino-6 sulfônico)
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> (Célula Apresentadora de Antígeno)
AT	Atópico
BBS	<i>Borate Buffered Saline</i> (Solução salina tamponada com borato)
Bet v 1	Alérgeno de <i>Betula verrucosa</i> 1
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina do Soro Bovina)
D.O.	Densidade Óptica
DAB	<i>3,3'-diaminobenzidine</i> (3,3'-diaminobenzidina)
Der p 2	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> grupo 2
Der f 1	Alérgeno de <i>Dermatophagoides farinae</i> grupo 1
Der f 2	Alérgeno de <i>Dermatophagoides farinae</i> grupo 2
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
Fel d 1	Alérgeno de <i>Felis domesticus</i> grupo 1
Df _[HS]	Antígeno comercial de <i>Dermatophagoides farinae</i> proveniente do fabricante <i>Hollister-Stier</i>
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
IgG2	Imunoglobulina da classe G subclasse 2
IgG3	Imunoglobulina da classe G subclasse 3
IgG4	Imunoglobulina da classe G subclasse 4
IL	Interleucina
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i> (Estudo Internacional da Asma e Alergias na Infância)
IUIS	<i>International Union of Immunology Societies</i> (União Internacional das Sociedades de Imunologia)
kDa	<i>KiloDalton</i> (Quilodalton)
M	Molar
MD-2	<i>Lymphocyte antigen 96</i> (Antígeno 96 de Linfócito)
mg	Miligramas
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Mr	Massa Relativa
MW	<i>Molecular Weight</i> (Peso molecular)
n	n amostral
NAT	Não-atópico
ND	Não determinado
NPC2	Niemann-Pick tipo C2
nm	Nanômetro
ng	Nanogramas

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> (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 Albumina do Soro Bovina (BSA)
PBS-T-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e leite desnatado em pó
pH	Potencial hidrogeniônico
S1	Sobrenadante 1
S2	Sobrenadante 2
S3	Sobrenadante 3
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio)
SIT	<i>Allergen-specific Immunotherapy</i> (Imunoterapia alérgeno-específica)
T.A.	Temperatura Ambiente
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i> (Ácido tricloroacético)
TCP	Teste Cutâneo de Puntura
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Fator de Transformação do Crescimento Beta)
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
Th9	Linfócito T <i>helper</i> 9
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
Th22	Linfócito T <i>helper</i> 22
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

Treg	Linfócito T regulador
Tris-HCl	Hidroxometil-aminometano contendo ácido clorídrico
Tween 20	<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i> (Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano)
UA	Unidade Arbitrária
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Listagem dos grupos de alérgenos de *D. farinae*..... 29

Tabela 2. Características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos no estudo. 50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição taxonômica das espécies mais importantes na sensibilização alérgica.....	28
Figura 2. Digrama representativo da preparação dos extratos de <i>D. farinae</i>	42
Figura 3. Análise dos extratos de <i>D. farinae</i>	52
Figura 4. Níveis dos anticorpos IgE e IgG4 específicos para as frações de <i>D. farinae</i> nas amostras de soro dos indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT)	53
Figura 5. Análise pareada dos níveis de IgG4 específicos para <i>D. farinae</i>	54
Figura 6. Ensaio de slot blot para os antígenos de <i>D. farinae</i> e análise quantitativa das bandas expressas em valores de unidades arbitrárias (UA).....	56
Figura 7. Correlação e regressão linear entre os níveis dos anticorpos IgG4 específicos para os extratos de <i>D. farinae</i> e os valores de unidades arbitrárias (UA)	57

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1 Doenças alérgicas	22
1.2 Alergia e Atopia.....	23
1.3 Alérgenos.....	24
1.4 Ácaros da poeira doméstica	26
1.4.1 <i>Dermatophagoides farinae</i>	27
1.5 O sistema imune e a resposta alérgica	29
1.6 Imunoterapia.....	31
2. Hipóteses	35
3. Objetivos	37
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4. Materiais e Métodos.....	39
4.1 Pacientes	40
4.2 Teste cutâneo de puntura (TCP)	40
4.3 Coleta de sangue.....	41
4.4 Obtenção dos extratos de <i>D. farinae</i>	41
4.5 Dosagem proteica	42
4.6 Eletroforese 1D.....	43
4.7 ELISA para detecção de IgE e IgG4 específica para antígenos de <i>D. farinae</i>	43
4.8 ELISA para quantificação dos alérgenos Der f 1 e Der f 2 dos extratos de <i>D. farinae</i>	44
4.9 Slot Blot dos antígenos de <i>D. farinae</i>	45
4.10 Análise Estatística	47
5. Resultados	48
5.1 Dados clínicos e demográficos dos indivíduos.....	49
5.2 Obtenção dos extratos de <i>D. farinae</i>	49
5.3 Detecção dos anticorpos IgE e IgG4 específicos para os extratos de <i>D. farinae</i>	50
5.4 Slot Blot.....	55
6. Discussão	58
7. Conclusões	65

8. Referências Bibliográficas	67
9. Anexos	81
Anexo A.....	82
Anexo B.....	83
Anexo C.....	84

RESUMO

Os antígenos de ácaros da poeira doméstica são os principais causadores de doenças alérgicas respiratórias e *Dermatophagoides farinae* é uma das espécies de ácaros consideradas como mais relevantes clinicamente em determinadas regiões, particularmente em áreas de clima quente e de baixa umidade relativa do ar. A imunoterapia alérgeno-específica é uma estratégia de tratamento para tais doenças, modulando a resposta alérgica, com aumentos significativos dos níveis de IgG4. O presente estudo teve como objetivo fracionar os extratos antigênicos de *D. farinae* e avaliá-los em imunoenaios para verificar a reatividade aos anticorpos IgE e IgG4 específicos no soro de indivíduos atópicos e não-atópicos. Duas frações, uma hidrofílica e a outra hidrofóbica, foram obtidas e empregadas nos ensaios de ELISA para detecção dos anticorpos IgE e IgG4 alérgeno-específicos. Como controle, esse ensaio foi também realizado com um extrato comercial para *D. farinae* proveniente do fabricante *Hollister-Stier*. Um ensaio de slot blot para IgG4 específico e a quantificação dos principais alérgenos nas frações também foi feito. A fração hidrofóbica apresentou níveis expressivos de Der f 1 e níveis indetectáveis de Der f 2, enquanto a fração hidrofílica apresentou tanto Der f 1 quanto Der f 2. Ambas as frações, separadamente ou em associação, melhoraram a reatividade para anticorpos IgG4 alérgeno-específicos em soro de indivíduos atópicos e não-atópicos, em comparação com o extrato comercial. Portanto, as frações podem ser utilizadas para monitorar o aumento da IgG4 específica nas amostras de soro de pacientes sensibilizados a ácaros, sob imunoterapia. Além disso, a fração hidrofóbica, enriquecida em apenas um dos alérgenos principais de *D. farinae* (Der f 1), pode ser empregada como um extrato antigênico para averiguar a sensibilidade específica de pacientes, bem como para imunoterapia alérgeno-específica

para indivíduos sensibilizados à Der f 1 e não Der f 2. Desse modo, a utilização de agente hidrofóbico durante o processo de extração de alérgenos pode possibilitar o seu emprego na determinação da reatividade anticórpica de uma amostra de soro a um alérgeno específico ou a obtenção de um extrato alergênico mais apropriado (enriquecido de Der f 1) e conseqüentemente, mais eficiente para o tratamento específico de pacientes alérgicos para Der f 1, mas não para Der f 2.

Palavras-chave: ácaros da poeira doméstica; *Dermatophagoides farinae*; reatividade à IgG4; imunoterapia alérgeno-específica.

ABSTRACT

House dust mite antigens are the principal cause of respiratory allergic diseases and *Dermatophagoides farinae* is one of the most clinically relevant in certain regions, particularly in those with high temperature and low relative air humidity. The allergen-specific immunotherapy (SIT) is a treatment strategy for such diseases, modulating the allergic response, with significant increases of specific IgG4 levels. The present study aimed to fractionate the antigenic extracts of *D. farinae* and evaluate them in immunoassays concerning to the reactivity of IgE- and IgG4-allergen-specific antibodies in the atopic and nonatopic individuals' serum. Two fractions, one hydrophilic and other hydrophobic, were obtained and used in the IgE- and IgG4-allergen-specific measurement by ELISA. As control, this assay was also performed with a commercial extract of *D. farinae* from *Hollister-Stier*. A slot blot assay to specific IgG4 and the measurement of the major allergens in the fractions was also made. The hydrophobic extract presented expressive levels of Der f 1 and undetectable values of Der f 2, while the hydrophilic fraction presented both Der f 1 and Der f 2. Both extracts, either separately or in association, improve the reactivity of specific IgG4, in comparison with the commercial extract. Therefore, the fractions could be useful to monitoring the improvement of specific IgG4 levels in the serum samples of patients sensitized under SIT treatment. In addition the hydrophobic fraction, enriched in Der f 1, could be used as an antigenic extract to evaluate the specific sensitivity of patients and also to the allergen-specific immunotherapy to individuals sensitized to Der f 1 but no Der f 2. Thereby, the use of hydrophobic agent during the allergen extraction process, can make possible to determine the antibody reactivity in a serum sample to a specific allergen or to obtain an more appropriated allergen extract (enriched in Der f 1) and consequently, more efficient for specific treatment of allergic patients to Der f 1, but not to Der f 2.

Keywords: house dust mites; *Dermatophagoides farinae*; IgG4-reactivity; allergen-specific immunotherapy.

1. Introdução

Introdução

1.1 Doenças alérgicas

O conhecimento acerca das doenças alérgicas provém de séculos atrás, sendo descritas já na China antiga e em relatos na literatura grega (SIMONS, 1994). Na sociedade moderna, especialmente nas últimas décadas, as alergias têm alcançado proporções epidêmicas ao redor do planeta e a sua incidência permanece continuamente em crescimento, principalmente nos países mais industrializados (RING *et al.*, 2001; HOLGATE; POLOSA, 2008; AGUA-DOCE; GRACA, 2011). A preocupação acerca dessas doenças relaciona-se ainda, ao expressivo impacto causado tanto na qualidade de vida, devido à cronicidade das mesmas, quanto no âmbito socioeconômico, pelos custos com assistência médica e perdas por faltas no trabalho e escola (WOOLCOCK, 2000; MASOLI *et al.*, 2004).

As doenças alérgicas relacionam-se a diferentes respostas sintomáticas ocasionadas pela exposição a determinados antígenos ambientais, considerados normalmente como inócuos. No entanto, muito se tem conjecturado, ainda, a respeito das condições de exposição aos alérgenos no desenvolvimento da resposta imune, e como certos antígenos apresentam a capacidade de desencadear essas respostas alérgicas e não uma resposta imunológica tolerogênica (TRAIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009).

Muitos estudos demonstram que a exposição a potenciais alérgenos na primeira infância ou durante a gravidez possui um papel central para o desencadeamento de doenças alérgicas (HOLGATE; POLOSA, 2008). Em contrapartida, outros pesquisadores sugerem fortemente que a exposição a agentes microbianos, durante a infância protege contra as alergias (hipótese da higiene) (STRACHAN, 1989; BRAUN-FAHRLANDER *et al.*, 2002; GARN; RENZ, 2007). Desse modo, diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de desvendar os possíveis mecanismos que levam à proteção (imunotolerância) ou as reais causas para o desencadeamento de alergias em determinados indivíduos.

Apesar dessas divergências, sabe-se que o microambiente e o estilo de vida contribuem significativamente para o desenvolvimento das doenças alérgicas, incluindo diversos fatores tais como a predisposição genética; influências ambientais, como a poluição; fatores psicossociais; que incluem o estresse; a diminuição de estímulos do sistema imunológico (hipótese da higiene), além da maior permanência dos indivíduos em ambientes fechados, em especial os ambientes domésticos, escolares ou ocupacionais, nos quais a maioria dos potenciais alérgenos está presente (PLATTSMILLS *et al.*, 1997; RING *et al.*, 2001; PERFETTI *et al.*, 2004; HESSELMAR *et al.*, 2005; GARN; RENZ, 2007; FUENTES *et al.*, 2008; DE SOUZA; ROSÁRIO FILHO, 2012; LAI *et al.*, 2013).

1.2 Alergia e Atopia

A terminologia utilizada na definição de conceitos no contexto das doenças alérgicas permanece confusa, sendo necessária a constante revisão e a colaboração de comitês para a padronização da nomenclatura a ser empregada por médicos e outros profissionais de saúde, em pesquisas científicas e pelos próprios pacientes (JOHANSSON *et al.*, 2004).

O termo *hipersensibilidade* deve ser utilizado para descrever sintomas ou sinais iniciados pela exposição a um determinado estímulo, cuja dose seria tolerada por pessoas normais (JOHANSSON *et al.*, 2004).

O termo *alergia* foi primeiramente empregado por Clemens Von Pirquet e Béla Schick, em 1906. Von Pirquet sugeriu o termo “*allos*” significando “outro” ou uma derivação do estado original e “*ergon*” que significa reação (SIMONS, 1994). A *alergia* deve ser considerada como uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos específicos, podendo ser mediada tanto por anticorpos (IgE), quanto por células, como os linfócitos alérgeno-específicos, no caso da dermatite de contato (JOHANSSON *et al.*, 2004).

O termo *atopia*, por sua vez, advém do grego “*atopos*” que se traduz como “estranho” e foi empregado primeiramente por Coca e Cooke, em 1923, para descrever um grupo de doenças que apresentavam, em comum, um mecanismo fisiopatológico envolvendo reações de hipersensibilidade do tipo I, no qual os indivíduos apresentavam

testes cutâneos positivos para aeroalérgenos e histórico familiar de asma e/ou rinite e/ou dermatite atópica (COCA; COOKE, 1923 apud JOHANSSON *et al.*, 2001). A *atopia* está relacionada a uma tendência pessoal ou familiar de um determinado indivíduo se tornar sensibilizado e produzir anticorpos IgE em resposta a alérgenos comuns, geralmente proteínas, desenvolvendo os sintomas característicos das doenças alérgicas, especialmente a asma, rinoconjuntivite ou eczema. Em outras palavras, a *atopia* refere-se à predisposição genética de um indivíduo em desenvolver doenças alérgicas (JOHANSSON *et al.*, 2004; ZOLKIPLI *et al.*, 2015).

As principais manifestações clínicas das doenças alérgicas incluem dermatite atópica, eczema, rinite, asma, dentre outras, sendo que as doenças respiratórias, como a asma e a rinite, apresentam grande destaque devido ao aumento considerável da prevalência nos últimos anos (ISAAC, 1998; SLY, 1999; WOOLCOCK, 2000; ASHER *et al.*, 2006; HOLGATE; POLOSA, 2008).

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores que, em indivíduos suscetíveis, causa episódios recorrentes de sibilância, dispneia, opressão torácica e tosse, principalmente no período da noite ou da manhã (LEMANSKE-JUNIOR; BUSSE, 2003). Ela é resultante de respostas imunológicas mediadas por anticorpos IgE (JOHANSSON *et al.*, 2004). Segundo o DATASUS, no Brasil em 2015, a doença atingiu cerca de 6,4 milhões de pessoas.

A rinite alérgica é uma desordem sintomática das vias aéreas superiores induzida após a exposição da mucosa nasal à alérgenos, sendo mediada por anticorpos IgE. Ela é caracterizada por rinorreia aquosa, obstrução nasal, prurido e crises de espirros (NORMAN, 1985; MIN, 2010). Trata-se de uma das formas mais comuns de rinite, afetando 500 milhões de pessoas no planeta (GOWDA *et al.*, 2014).

1.3 Alérgenos

Um imunógeno é definido como uma molécula capaz de desencadear uma resposta imunológica. Os imunógenos que induzem respostas mediadas por células do perfil Th2, culminando na produção do anticorpo IgE são denominados alérgenos. Assim, em resumo, os alérgenos são moléculas capazes de sensibilizar e induzir reações alérgicas (ARLIAN, 2002; WILLS-KARP, 2010). De forma geral, os alérgenos são

proteínas ou moléculas formadas principalmente de proteínas, como, por exemplo, as glicoproteínas. No entanto, carboidratos ou o polissacarídeo presente nas glicoproteínas, podem também desencadear uma resposta imune (ARLIAN, 2002).

Os alérgenos podem entrar em contato com os indivíduos predispostos a respostas alérgicas por meio da inalação, com destaque para os aeroalérgenos (dispersos pelo ar); por ingestão, no caso de alimentos; ou ainda absorvidos através da pele ou mucosa nasal (SMITH *et al.*, 1998; ARLIAN, 2002). As principais fontes de aeroalérgenos são o pólen de árvores e gramíneas, seguido pelas excreções de ácaros da poeira doméstica e baratas, esporos de fungos e pelos de animais (TRAIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009).

A rota de exposição, dose e função do alérgeno são cruciais para que ocorra a sensibilização alérgica (YU; CHEN, 2003; ROMAGNANI, 2004; AKDIS, 2006; RAJ *et al.*, 2013). De forma geral, a exposição a baixas concentrações do alérgeno, induz a produção de IgE e consequente reação alérgica. Por outro lado, a exposição a altas doses induz tolerância por meio das células T reguladoras (Treg), produção de altos níveis de anticorpos IgG4 alérgeno-específicos e pelo bloqueio dos sítios de ligação do anticorpo IgE às células efectoras. No entanto, de forma geral para todos os alérgenos, a definição de uma concentração como sendo alta ou baixa ainda é difícil de determinar, uma vez que a exposição individual a um imunógeno pode apenas ser estimada e não quantificada, além do fato de que a sensibilidade é variável em cada indivíduo (TRAIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009).

O uso de uma nomenclatura unificada é indispensável para o estudo dos alérgenos, sobretudo no desenvolvimento de mecanismos de diagnóstico específicos e de extratos imunoterápicos com alérgenos recombinantes (CHAPMAN *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2004; JUTEL *et al.*, 2015). Assim, com o intuito de padronizar a referência dos diversos alérgenos descritos na literatura científica, o Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia (IUIS), em parceria com a Organização Mundial de Saúde (OMS), adotou uma regra sistemática de nomenclatura (TRAIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009). Sendo assim, foi determinado que a designação dos alérgenos fosse representada pelas três primeiras letras do gênero ao qual o organismo pertence, juntamente com a primeira letra da espécie e o número correspondente à ordem cronológica da descoberta (KING

et al., 1995). A nomenclatura não deve ser em itálico, deve possuir um espaço após cada um dos primeiros dois elementos e utilizar números arábicos (Bet v 1, Der p 2, Fel d 1, por exemplo). A nomenclatura pode ainda representar as diferentes formas moleculares de um mesmo alérgeno: os isoalérgenos e as isoformas (ou variantes). Os isoalérgenos são múltiplas formas moleculares de um mesmo alérgeno que apresentam reatividade cruzada aos anticorpos IgE. Eles são definidos na nomenclatura como alérgenos de uma única espécie quando possuem 67% ou mais de identidade na sequência de aminoácidos. Isoformas são variantes polimórficos de um mesmo alérgeno, os quais tipicamente possuem mais de 90% de identidade (CHAPMAN *et al.*, 2007).

Para manter a integridade do sistema de nomenclatura, a mesma inclui apenas alérgenos com prevalência de reatividade de IgE acima de 5% ou com mérito comprovado por testes bioquímicos, moleculares e imunológicos que não permitam ambiguidade nos resultados. Se um determinado imunógeno possuir reatividade à IgE maior do que 50% dos indivíduos, o mesmo é denominado como alérgeno “principal”. Se a reatividade de IgE for menor do que este valor, o alérgeno é considerado como “minoritário” (LARSEN; LOWERSTEIN, 1996; CHAPMAN *et al.*, 2007, THOMAS *et al.*, 2007; TRAILD-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009).

1.4 Ácaros da poeira doméstica

Os ácaros são artrópodes microscópicos, ubíquos e com diferentes hábitos alimentares, podendo ser saprófagos, fungívoros, parasitas ou ainda, predadores (CUCA-SUÁREZ *et al.*, 2012). Eles apresentam entre 0,1 e 0,6 mm de comprimento, ciclo de vida com metamorfose completa (holometábolo) passando pelos estágios de ovo, larva, protoninfa, tritoninfa e adulto. O período de desenvolvimento pode sofrer variações de acordo com a espécie e também devido às condições abióticas, como temperatura e umidade (ARLIAN; RAPP; AHMED, 1990; DE BOER, 1998; PIKE; CUNNINGHAM; LESTER, 2005). Trata-se de um grupo bastante diverso, distribuindo-se diferentemente em cada região do mundo. Essa variação em um habitat está relacionada, além dos fatores abióticos determinantes no seu desenvolvimento, como a temperatura (25°C a 30°C) e umidade (75% a 80%), por outros fatores ecológicos e evolutivos (BINOTTI *et al.*, 2001; GONZÁLEZ LÉON *et al.*, 2005).

Com a ocupação do ambiente natural pelo homem, os ácaros invadiram o ambiente doméstico e passaram a viver em meio à poeira, designados desse modo como ácaros da poeira doméstica, habitando móveis, estofados, carpetes, cortinas, colchões, travesseiros, brinquedos de pelúcia, dentre outros (HART, 1998; CUCA-SUÁREZ *et al.*, 2012), e encontrando nesses locais, os alimentos necessários para a sua sobrevivência, como restos de pele humana e demais detritos orgânicos (ARLIAN; MORGAN, 2003).

Dentre os ácaros da poeira doméstica, as espécies *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* são as que apresentam maior importância clínica, em especial, nos países tropicais e subtropicais e pertencem à família Pyroglyphidae (THOMAS; SMITH; HALES, 2004).

1.4.1 *Dermatophagoides farinae*

Os ácaros da poeira doméstica são reconhecidos como as principais causas de doenças alérgicas respiratórias em todo o mundo, aos quais mais de 50% dos pacientes alérgicos são sensibilizados (CHAPMAN; PLATTS-MILLS, 1980; PLATTS-MILLS; WECK, 1989; ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001; BATARD *et al.*, 2016). Dentre as famílias destacam-se Glycyphagidae, Acaridae, Pyroglyphidae e Echimyopodidae (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001; ARLIAN; MORGAN, 2003; FERNADEZ-CALDAS, 1997), sendo que a família Pyroglyphidae engloba as espécies mais relevantes clinicamente e cuja classificação taxonômica está ilustrada na Figura 1.

A importância do gênero *Dermatophagoides* reside não apenas na potencialidade alergênica das espécies, mas também devido à ampla distribuição das mesmas em regiões com diferentes climas, coexistindo com a espécie *Blomia tropicalis*, um ácaro de estocagem, também relevante na sensibilização alergênica (ARRUDA *et al.*, 1991; GELLER; ESCH; FERNADEZ-CALDAS, 1993).

O gênero *Dermatophagoides* foi descrito por Bogdanov em 1864, sendo o nome originado dos termos gregos “*dermis*” que significa “pele”; “*phagos*”, que se refere a “alimentar”; e o sufixo “*oides*” que pode ser traduzido como “que parece”. Assim, de forma grosseira, o gênero *Dermatophagoides* poderia ser traduzido como “animal que aparenta se alimentar de pele” (COLLOFF, 1998).

O ácaro *D. farinae* tem sido reconhecido como importante fonte de alérgenos em todo o mundo, exercendo um importante papel nas doenças alérgicas respiratórias em indivíduos geneticamente predispostos (DUFF; PLATTS-MILLS, 1992). Vários estudos realizados no Brasil têm demonstrado a prevalência cada vez mais crescente dessa espécie na poeira domiciliar (SIMPLICIO *et al.*, 2007; SOPELETE *et al.*, 2000).

De forma geral, os alérgenos dos ácaros são enzimas associadas ao seu trato digestivo e encontradas em grande quantidade tanto no corpo quanto nas excreções (partículas fecais) (TOVEY *et al.*, 1981). Eles são divididos de acordo com a composição bioquímica, homologia e massa molecular, e os grupos nomeados de acordo com a ordem da descoberta. Até o momento, foram oficialmente descritos 27 alérgenos de *D. farinae*, descritos na Tabela 1, segundo o Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia, incluindo cisteínas proteases de 25 kDa no grupo 1 de alérgenos (Der f 1) e proteínas da família NPC2 (Niemann-Pick tipo C2) com um peso molecular de 15 kDa no grupo 2 de alérgenos (Der f 2), sendo as mesmas mimetizadores de MD-2, um lipopolissacarídeo correceptor para TLR-4, interagindo, desse modo, com o sistema imune inato (BRONNERT *et al.*, 2012; AN *et al.*, 2013).

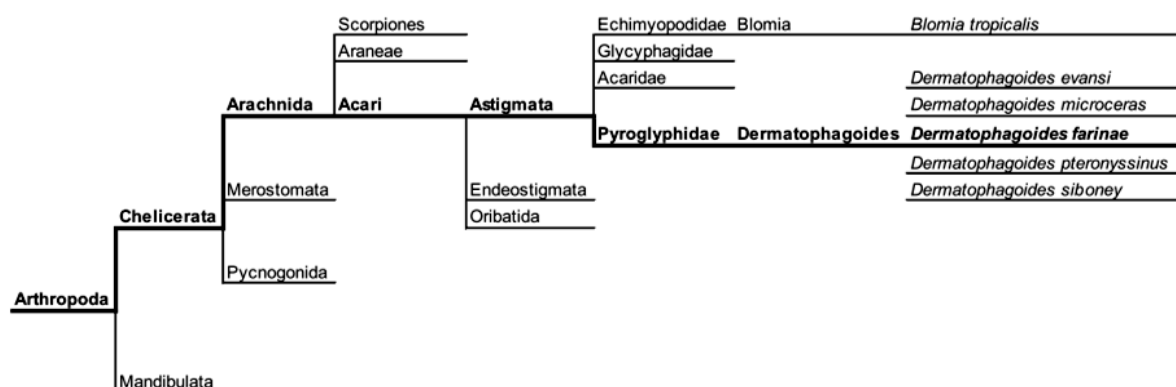


Figura 1. Distribuição taxonômica das espécies de ácaros mais importantes na sensibilização alérgica, com ênfase (grifo nosso) para *D. farinae*. Adaptado de: Taxonomy, 2011.

Tabela 1. Listagem dos grupos de alérgenos de *D. farinae*.

Alérgeno	Isoforma	Massa Relativa (kDa)	Identidade Bioquímica
Der f 1	1.0101-1.0110	27	Cisteína Protease
Der f 2	2.0101-2.0117	15	Família NPC2
Der f 3	3.0101	29	Tripsina
Der f 6	6.0101	25	Quimiotripsina
Der f 7	7.0101	30-31	ND
Der f 8	8.0101	32	Glutathione S-transferase
Der f 10	10.0101; 10.0102	37	Tropomiosina
Der f 11	11.0101	98	Paramiosina
Der f 13	13.0101	-	Proteína ligante de ácido graxo
Der f 14	14.0101	177	Apolipoforina
Der f 15	15.0101	98/109	Quitinase
Der f 16	16.0101	53	Geosolina/Vilina
Der f 17	17.0101	53	Proteína ligante de cálcio
Der f 18	18.0101	60	Proteína ligante de quitina
Der f 20	20.0101; 20.0201	40	Arginina quinase
Der f 21	21.0101	14	ND
Der f 22	22.0101	-	ND
Der f 24	24.0101	13	Homólogo de proteína ligante de ubiquinol- citocromo C redutase
Der f 25	25.0101; 25.0201	34	Triosefosfato isomerase
Der f 26	26.0101	18	Cadeia leve de miosina alcalina
Der f 27	27.0101	48	Serpina
Der f 28	28.0101; 28.0201	70	Proteínas <i>heat shock</i>
Der f 29	29.0101	16	Peptil-prolil cis-trans isomerase (Ciclofilina)
Der f 30	30.0101	16	Ferritina
Der f 31	31.0101	15	Cofilina
Der f 32	32.0101	35	Pirofosfatase inorgânica secretada
Der f 33	33.0101	52	Alfa-tubulina

Fonte: Subcomitê de Nomenclatura dos alérgenos (IUIS) (www.allergen.org) e *Allergome* (www.allergome.com). ND, não determinado; NPC2, Niemann-Pick tipo C2.

1.5 O sistema imune e a resposta alérgica

A fisiopatologia das respostas imunes alérgicas é complexa e regulada por diversos fatores (MEILER *et al.*, 2008), incluindo suscetibilidade genética, rota de

exposição, concentração do alérgeno, tempo de exposição aos antígenos, características estruturais do alérgeno, dentre outros (AKDIS; AKDIS, 2007).

As reações alérgicas consistem de uma série de eventos que se iniciam com o reconhecimento da estrutura nativa do alérgeno, que ultrapassa as barreiras primárias do organismo, como a pele e mucosas, pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). As APCs processam o antígeno, resultando na formação de peptídeos. Estes são apresentados às células T *naive*, em associação com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, direcionando as células T para o perfil celular Th2, por uma via dependente do fator de transcrição GATA 3 (MARONE, 1998; AKDIS, 2006; SHAKIB; GHAEMMAGHAMI; SEWELL, 2008).

As células T *helper* (Th) são classificadas em diversas subpopulações (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e as chamadas células T reguladoras), sendo Th1 e Th2 as de maior destaque nas respostas imunológicas (AKDIS; AKDIS, 2015). Ambas derivam de um precursor comum em resposta a estímulos distintos e são diferenciadas, principalmente, de acordo com os padrões de secreção de citocinas. Células Th1 secretam, entre outras proteínas, a IL-2, IFN- γ e TNF- β , também denominada como linfotóxina, que mobilizam os mecanismos de defesa celular e humoral contra patógenos intracelulares e antagonizam as respostas à IgE. Em contrapartida, células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13, as quais realizam diversas funções reguladoras e efetoras, incluindo a produção de anticorpos IgE alérgeno-específico por células B e ocasionando as reações alérgicas imediatas (CORY; KHERADMAND, 1999; AKDIS, 2006).

O balanço dos perfis de citocinas Th1 e Th2 promove a homeostase do sistema imune, uma vez que a desregulação a favor de alguma subpopulação de células leva a uma excessiva ativação da mesma, culminando, por exemplo, no desenvolvimento de doenças autoimunes, associadas com a exacerbação de Th1, ou indução de doenças alérgicas, devido a um desvio para o perfil Th2 (OBOKI *et al.*, 2008).

A produção de IL-4 e IL-13 pelas células Th2 são essenciais para induzir a troca de classe dos anticorpos em linfócitos B e a consequente produção de IgE, durante a fase de sensibilização. A molécula IgE possui a mesma estrutura molecular apresentadas pelas outras imunoglobulinas, com duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas, também idênticas. A imunoglobulina E difere-se das outras classes de anticorpos apenas

pela presença de um domínio ϵ (épsilon) comparada à cadeia pesada γ (gamma) da molécula de IgG (GOULD; SUTTON, 2008).

Em indivíduos não-atópicos, os níveis séricos de IgE apresentam-se em baixas concentrações. Por outro lado, durante o primeiro contato de um indivíduo atópico com um determinado alérgeno, o anticorpo IgE alérgeno-específico é produzido em grandes quantidades pelas células B e se liga com alta afinidade ao receptor Fc ϵ RI presente na superfície de basófilos e mastócitos, levando à sensibilização do paciente. Em um segundo contato com o alérgeno, ocorre uma ligação cruzada com o complexo IgE-Fc ϵ RI nos basófilos e mastócitos sensibilizados, ativando-os e subsequentemente liberando mediadores pró-inflamatórios como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, citocinas e quimiocinas, resultando nas reações alérgicas imediatas (AKDIS; AKDIS, 2015).

Nos indivíduos não-atópicos, a resposta imune a alérgenos é caracterizada pelo predomínio de anticorpos IgG, especialmente da classe IgG4, ou pela ausência da produção de qualquer classe de anticorpo diante de um imunógeno. As subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) foram numeradas de acordo com a sua abundância no plasma. Sendo assim, IgG1 é a mais abundante (> 50% de IgG total) e IgG4 é a menos encontrada (< 5%). A molécula de IgG4 é monovalente e apresenta a peculiar característica de se ligar à outras imunoglobulinas (AALBERSE, 2009). A troca de classe de anticorpos das células B para IgG4 é mediada principalmente pela IL-10, uma citocina com características anti-inflamatórias, também produzida por células Th2, inibindo a ação do anticorpo IgE, suprimindo a secreção das proteínas inflamatórias e a inflamação das vias aéreas induzida por alérgenos (WONG *et al.*, 2001). Por essa razão, o anticorpo IgG4 pode ser encontrado tanto em indivíduos saudáveis, quanto em indivíduos atópicos frente a um imunógeno.

1.6 Imunoterapia

Para o tratamento das doenças alérgicas, quatro modalidades terapêuticas, não excludentes, são indicadas: (1) prevenir o contato dos pacientes aos alérgenos e controlar o ambiente nos quais os indivíduos estão incluídos; (2) conscientização do paciente; (3) farmacoterapia, a qual não possui efeitos na progressão da doença,

reduzindo a sintomatologia do paciente; e (4) imunoterapia, um tratamento que modifica o curso natural da doença alérgica, reduzindo os sintomas pela consequente indução da tolerância imunológica e, portanto, reduzindo o uso de medicação (ALVAREZ-CUESTA; BERISTAIN, 2003; CASALE; STOKES, 2011; ROGER *et al.*, 2014; LARSEN; BROGE; JACOBI, 2015).

Nos últimos anos, a indução de imunotolerância tem se tornado o principal alvo de desenvolvimento de estratégias para a prevenção e tratamento para muitas doenças nas quais a desregulação do sistema imunológico desempenha um importante papel (SMITH; AKDIS, 2014). A imunotolerância aos alérgenos pode ser definida como o estabelecimento de tolerância clínica aos alérgenos, em longo prazo (AKDIS; AKDIS, 2015).

A imunoterapia com alérgenos inaláveis iniciou-se há mais de um século, sendo indicada para pacientes alérgicos à pólen de gramíneas, ácaros da poeira doméstica e pelos de animais (VAN DER VALK; DE JONG; GERTH VAN WIJK, 2015). O seu mecanismo de ação é complexo e envolve o desvio da típica resposta Th2 em pacientes alérgicos, para uma resposta do perfil Th1, promovendo a produção de IFN- γ o qual estimula as células B a produzirem anticorpos IgG ao invés de IgE e/ou a indução de células T reguladoras que produzem as citocinas imunomodulatórias IL-10 e TGF- β . A citocina IL-10 possui propriedades anti-inflamatórias que induzem a troca de classe de anticorpos para IgG4, considerado como um anticorpo bloqueador, e TGF- β aumenta os níveis de IgA alérgeno-específica. O anticorpo IgG4 interrompe a apresentação de antígenos para células Th2 e bloqueia a ativação de basófilos e mastócitos induzida pelos alérgenos, reduzindo portanto a resposta alérgica (AKDIS *et al.*, 1998; CASALE; STOKES, 2011; LARSEN; BROGE; JACOBI, 2015; VAN DER VALK; DE JONG; GERTH VAN WIJK, 2015).

A imunoterapia alérgeno-específica é realizada pela administração de doses crescentes do alérgeno, até que uma dose alta o suficiente é alcançada e mantida (WANBRE, 2015). O alérgeno a ser utilizado no tratamento deve ser preferencialmente padronizado, uma vez que os extratos são heterogêneos e podem diferir na sua composição e atividade alergênica. A eficácia do procedimento imunoterápico deve ser quantificada utilizando *scores* de sintomas e de medicação utilizada e pela melhoria da

qualidade de vida do paciente. Além disso, novos exames para verificar os níveis de IgE, IgG e IgG4 também são recomendáveis (PFAAR *et al*, 2014).

As principais vias de administração são a subcutânea e a sublingual. A primeira é a mais estabelecida e utilizada, sendo a sua efetividade garantida por um longo período. A imunoterapia subcutânea é especialmente benéfica em pacientes com rinite alérgica e asma (VLADAMUDI; SHAKER, 2015). Jacobsen e colaboradores em 2007 demonstraram que um tratamento imunoterápico subcutâneo por três anos com extratos alergênicos padronizados de pólen, apresentou potenciais efeitos na prevenção do desenvolvimento da asma em crianças com rinoconjuntivite alérgica até sete anos após o tratamento. A imunoterapia sublingual, por sua vez, apresenta várias vantagens com relação à subcutânea, pois a mesma pode ser administrada na própria residência do paciente, é indolor e apresenta menor risco de anafilaxia. No entanto, as doses crescentes dos alérgenos devem ser administradas diariamente, se tornando um desafio para a aderência ao método por parte dos pacientes (VLADAMUDI; SHAKER, 2015).

Para que a imunoterapia seja recomendada por um médico alergista, o mesmo deve levar em consideração diversos aspectos, como a gravidade/duração dos sintomas alérgicos; se os fármacos administrados pelo paciente são eficientes ou não e se os mesmos geram efeitos adversos; a intenção do paciente de participar desse tratamento, após a explicação do processo e os possíveis riscos, dentre outros. Além disso, os alérgenos dominantes, isto é, aqueles que causam os principais sintomas da doença, e os alérgenos minoritários, devem ser identificados antes de iniciar o processo imunoterápico. As principais contraindicações da imunoterapia são: imunodeficiências graves e desordens imunológicas; doenças malignas; desordens psiquiátricas; tratamento com β -bloqueadores; asma grave ou obstrução crônica irreversível das vias aéreas; doenças cardiovasculares e crianças abaixo de cinco anos de idade. A gravidez não é considerada como uma contraindicação para a continuação do tratamento imunoterápico, porém, não é recomendado iniciar o tratamento durante a gravidez (ALVAREZ-CUESTA; BERISTAIN, 2003).

Diante do impacto causado pelas doenças alérgicas na sociedade moderna, o aprimoramento dos estudos que envolvam novas estratégias de tratamento ou aprimoramento de técnicas existentes, pode possibilitar a melhoria do diagnóstico e da imunoterapia alérgeno-específica, trazendo como consequência a melhoria na qualidade

de vida dos pacientes. Desse modo, a relevância da realização desse trabalho reside na possibilidade da utilização de uma metodologia de fácil execução e de boa reprodutibilidade para a obtenção de uma fração enriquecida no alérgeno Der f 1 de *D. farinae* como um extrato alergênico para ser empregado tanto para fins diagnósticos como para fins terapêuticos.

2. Hipótesis

Hipóteses

Com relação à obtenção da fração hidrofóbica a partir do extrato total de *D. farinae* pelo processo de precipitação de proteínas com acetona/água e a reatividade dos anticorpos IgE e IgG4 específicos, podemos inferir as seguintes hipóteses:

H0: A fração hidrofóbica obtida não apresentará os alérgenos principais de *D. farinae* ou apresentará em baixas concentrações, de maneira que o conteúdo alergênico seja insuficiente para a detecção de anticorpos IgE e IgG4 específicos no soro de pacientes atópicos e não-atópicos.

H1: A fração hidrofóbica poderá conter expressivas quantidades dos alérgenos principais de *D. farinae*, reconhecidos por anticorpos IgE e IgG4 específicos presentes no soro de pacientes atópicos e não-atópicos.

3. Objetivos

Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Obter e fracionar um extrato antigênico de *Dermatophagoides farinae* e avaliá-lo em imunoenaios para verificar a reatividade aos anticorpos IgE e IgG4 para indivíduos atópicos e não-atópicos.

3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Caracterizar o perfil eletroforético e antigênico das frações antigênicas obtidas de *D. farinae*;
- ❖ Quantificar os níveis de IgE e IgG4 específicos para as frações antigênicas extraídas de *D. farinae* por ELISA no soro de pacientes atópicos e não-atópicos e comparar com o antígeno comercial (*Hollister-Stier*);
- ❖ Verificar a reatividade do soro dos indivíduos atópicos e não-atópicos para IgG4 alérgeno-específico por meio de slot blot.

4. Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

4.1 Pacientes

O presente estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia sob o número CEP 174/10 (Anexo A).

Indivíduos com ou sem histórico de reações alérgicas envolvendo ácaros da poeira doméstica foram incluídos no presente estudo, sendo previamente esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e de todos os procedimentos a serem realizados. Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi preenchido por todos os participantes (Anexo B).

A seleção dos indivíduos foi realizada tanto por meio do questionário clínico (Anexo C) elaborado segundo a *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC, 1998), com algumas modificações, quanto pelo resultado do teste cutâneo de puntura (TCP) a um painel de aeroalérgenos comerciais.

Como critérios de exclusão foram considerados a idade inferior a 18 anos e maior do que 60 anos, uso de anti-histamínicos ou corticosteroides por via oral ou tópica na semana anterior à realização do teste, presença de lesões dermatológicas na área de realização do TCP e tratamentos prévios com imunoterapia alérgeno-específica.

4.2 Teste cutâneo de puntura (TCP)

A reação de hipersensibilidade imediata dos indivíduos foi avaliada por meio do teste cutâneo de puntura (TCP), segundo Ownby (1988). O teste foi realizado utilizando-se extratos alergênicos comerciais (FDA Allergen/Immunotech Farmácia de Manipulação, Rio de Janeiro, Brasil) de ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*), epitélio de cão (*Canis familiaris*), epitélio de gato (*Felis domesticus*), baratas (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*), fungo (*Alternaria alternata*), gramíneas (*Paspalum notatum* e *Cynodon dactylon*) e pólen (*Lolium multiflorum*). Como controle positivo, o cloridrato de histamina (10 mg/mL) foi utilizado e o controle negativo consistiu de solução salina fisiológica em fenol 0,4% e glicerina diluída a 50%.

Após antissepsia com álcool 70%, microgotas de aproximadamente 20 µL de cada extrato alergênico foram depositadas na face interna do antebraço e as punções realizadas com o auxílio de lancetas apropriadas (ALK Lancet, J. N. Eberle Federnfabrik GmbH, Hochfeldstr, Schwabmünchen, Alemanha). Após 15 minutos, a formação de uma pápula no local das microgotas acima de 03 milímetros de diâmetro, foi considerada como um teste positivo (PEREIRA *et al.*, 2005; AN *et al.*, 2013).

4.3 Coleta de sangue

Concomitantemente ao TCP, amostras de sangue (10 mL) foram coletadas de todos os indivíduos recrutados através da punção venosa na região do antebraço, utilizando tubos a vácuo e agulhas 21G1 (Vacutainer®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA). As amostras foram centrifugadas a 300 x g por 15 minutos e os soros obtidos foram armazenados a -20°C até a realização dos ensaios.

4.4 Obtenção dos extratos de *D. farinae*

O extrato de *D. farinae* foi obtido como descrito previamente (SOPELETE *et al.*, 2000). Brevemente, peneirado de ácaro (680 mg), cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Frederico Montealegre (Ponce School of Medicine, Porto Rico, EUA) foi macerado com nitrogênio líquido e os alérgenos extraídos em 20 mL de tampão borato salino (BBS) 5 mM (pH 8,0), contendo inibidores de protease (Complete™; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Após centrifugação (3.000 x g, 10 minutos, 4°C), foram obtidas uma fração sobrenadante, denominada S1, e uma fração particulada (*pellet*) (P1). Posteriormente, a fração S1 foi dialisada (Dialysis Tube Cellulose Membrane, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) com tampão fosfato salino (PBS), *overnight*. A solução resultante foi centrifugada (10.000 x g, 10 minutos, 4°C), obtendo-se uma fração hidrofílica sobrenadante denominada S2, a qual foi coletada e distribuída em alíquotas armazenadas a -20°C até o uso.

O fracionamento do extrato total de *D. farinae* foi realizado pela adição de acetona 50% (3:1) à fração particulada (P1). A solução permaneceu em agitação por uma hora, à temperatura ambiente (T.A) e logo após, centrifugada a 10.000 x g, por 10 minutos, T.A. A fração hidrofóbica obtida, denominada fração S3, foi coletada,

distribuída em alíquotas e armazenada a 4°C até o uso. A obtenção dos extratos de *D. farinae* está esquematizada na Figura 2.

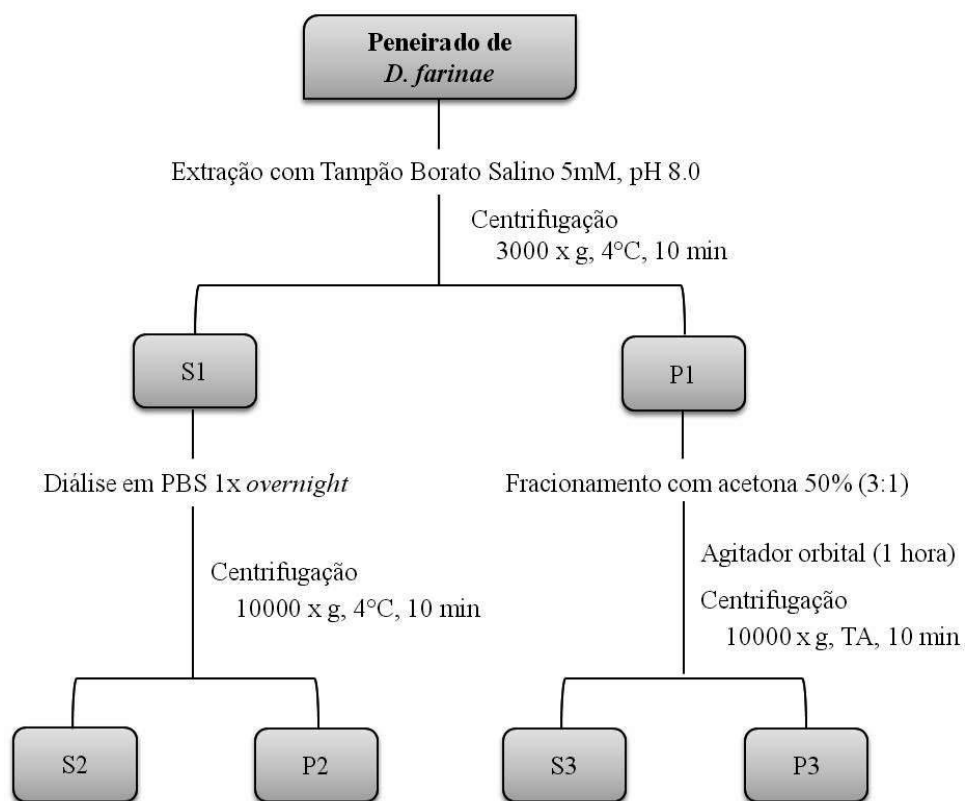


Figura 2. Digrama representativo da preparação do extrato total e obtenção das frações S1, S2 e S3 de *D. farinae*. S; sobrenadante; P; precipitado.

4.5 Dosagem proteica

A concentração proteica dos extratos de *D. farinae* obtidos foi determinada pelo método proposto por Bradford (1976). A curva de calibração foi realizada com albumina do soro bovina (BSA, Sigma Chemical Co.) em diluições duplas seriadas de 1000 a 15,6 µg/mL. Água ou acetona 50% no caso das frações S2 e S3, respectivamente, foram utilizados como controle negativo (*Blank*). Os valores da densidade óptica (D. O.) a 590 nm das amostras analisadas foram obtidos e comparados aos valores da curva de calibração pelo *software* Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), obtendo, desse modo, a concentração proteica.

4.6 Eletroforese 1D

O perfil proteico dos extratos S2 e S3 derivados de *D. farinae* foi analisado por SDS-PAGE a uma concentração de 14% sob condições desnaturantes e não-redutoras (LAEMMLI, 1970). Previamente à aplicação das amostras no gel de poliacrilamida (20 µL/poço), as mesmas foram aquecidas a 75 °C até a completa secagem e precipitação das proteínas, ressuspensas em tampão de amostra (v:v), composto por Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8), SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% e glicerol 20%, e aquecidas novamente a 95°C por 05 minutos para desnaturação das proteínas.

Para identificação das massas moleculares das bandas referentes à amostra, um marcador de peso molecular (Prestained Natural Protein Standards – Bio-Rad Laboratories Inc, CA, EUA) foi utilizado paralelamente. Após o processo, o gel foi corado por imersão com *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma Chemical Co.) *overnight* e descorado em água destilada para ótima visualização das bandas. O gel foi digitalizado (HP Scanjet 3800, Hewlett Packard Development Company, CA, EUA) para análises posteriores.

4.7 ELISA para detecção de IgE e IgG4 específica para antígenos de *D. farinae*

O ensaio imunoenzimático (ELISA) para os anticorpos IgE e IgG4 para *D. farinae* foi realizado como descrito anteriormente por Pereira e colaboradores (2005), com algumas modificações. Brevemente, microplacas de alta afinidade (Costar Corning Inc., Corning, New York, NY, EUA) foram sensibilizadas com as frações e incubadas *overnight*, a 4°C. Para a sensibilização, a fração hidrofílica S2 e o extrato comercial (Df_[HS]) (*Hollister-Stier Laboratories LLC*, Spokane, WA, EUA) foram previamente diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 60 mM (pH 9,6), enquanto a fração S3 foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato 60mM (pH 9,6), juntamente com acetona P.A. (v:v). A concentração proteica final de todos os extratos foi de 30 µg/mL em um volume de 50 µL por poço. Após a sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato salino (PBS) e Tween 20 (Labtrade & LGCBio) a 0,05% (PBS-T).

Em seguida, foi realizado o bloqueio dos sítios ativos das placas por duas horas, T.A., adicionando-se PBS-T acrescido BSA (Sigma Chemical Co.) (PBS-T-BSA) 1%

para IgE ou 2% para IgG4, em um volume de 150 µL por poço. A solução PBS-T-BSA 1% foi utilizada nas etapas seguintes como diluente dos soros e reagentes.

Após um novo ciclo de três lavagens (PBS-T), as microplacas foram incubadas por uma hora a 37 °C com os soros dos indivíduos adicionados em duplicata, diluídos 1:2 no caso de reações específicas para IgE e 1:5 para reações específicas para IgG4, em um volume final de 50 µL por poço. Três soros controles positivos e três soros controles negativos foram incluídos em cada placa.

Após seis lavagens (PBS-T), as placas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-IgE humano biotinizado (1:1000, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Baltimore, MD, EUA) ou anti-IgG4 humano biotinizado (1:1000, Sigma Chemical Co.), também em um volume final de 50 µL, e incubadas por uma hora, a 37°C. Novamente as placas foram lavadas por seis vezes (PBS-T) e 50 µL/poço do conjugado estreptavidina-peroxidase foi adicionado (1:500, Sigma Chemical Co.). As placas foram então incubadas por 30 minutos, no escuro, T. A. O substrato enzimático comercial ABTS® (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Baltimore, MD, EUA) foi utilizado para revelação da reação. Os valores de D.O. foram obtidos em leitor de placas de microtitulação (Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System, Biotek, Winooski, VT, EUA) a 405 nm. Os resultados de IgE e IgG4 foram expressos em Índice ELISA (IE), seguindo a formula:

$$IE = \frac{D.O. amostra}{D.O. controle + 3\delta}$$

sendo, D. O. amostra = média da densidade óptica da amostra testada; D. O. controle = média da densidade óptica dos controles negativos e δ = desvio padrão das densidades ópticas dos controles negativos. Valores de IE > 1,2 são considerados como positivos.

4.8 ELISA para quantificação dos alérgenos Der f 1 e Der f 2 dos extratos de *D. farinae*

Para quantificação dos níveis de Der f 1 e Der f 2 nos extratos hidrofílico (S2) e hidrofóbico (S3) de *D. farinae*, um ELISA reverso foi utilizado como descrito anteriormente por Sopelete e colaboradores (2000), com modificações correspondentes quando necessárias. Brevemente, microplacas de alta afinidade (Costar Corning Inc.,

Corning, New York, NY, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura anti-Der f 1 (Clone 6A8) e anti-Der p 2 (Clone 1D8) em um volume de 50 µL/poço, diluídos 1:1000 em tampão carbonato-bicarbonato 60 mM (pH 9,6). Subsequentemente, as placas foram incubadas *overnight*, a 4°C.

Após três lavagens com PBS-T, os sítios ativos das placas foram bloqueados com PBS-T-BSA 1% (150 µL/poço) por uma hora, T. A. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas por três vezes (PBS-T) e incubadas com as frações S2 e S3 em duplicata e em diferentes concentrações, utilizando-se uma curva de diluição dupla seriada com o primeiro ponto na proporção de 1:250 em PBS-T-BSA 1% por uma hora, T. A. Em paralelo, amostras padrões de Der f 1 e Der p 2 (Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA, EUA) foram incubadas, em diluição seriada variando de 500 a 0,4 µg/mL.

As placas foram lavadas por seis vezes (PBS-T) e os anticorpos de detecção biotinilados específicos ao grupo 1 (clone 4C1, University of Virginia, EUA) ou ao grupo 2 (Clone 7A1, University of Virginia, EUA) foram adicionados (50 µL/poço) na proporção de 1:1000 (diluição em PBS-T-BSA 1%). As placas foram então incubadas por uma hora, T. A. Subsequentemente, elas foram novamente lavadas por seis vezes com PBS-T e o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.), diluído 1:1000 em PBS-T-BSA 1%, foi acrescentado (50 µL/poço), sendo incubado por 30 minutos, T. A., ao abrigo da luz. Um novo ciclo de seis lavagens foi realizado (PBS-T) e o substrato enzimático comercial ABTS® (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Baltimore, MD, EUA) foi utilizado para revelar a reação (50 µL/poço).

As densidades ópticas das amostras foram obtidas por espectrofotometria em leitor de microplacas de titulação (Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System, Biotek, Winooski, VT, EUA) a 405 nm e as médias dos valores de D. O. obtidos das amostras foram convertidas em µg/mL, tendo como referência os valores da curva padrão. Os dados foram analisados pelo *software* Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad).

4.9 Slot Blot dos antígenos de *D. farinae*

Membranas de nitrocelulose (0,45 µm; Merck Millipore Co., Darmstadt, Alemanha ou 0,45 µm; GE Water & Process Technologies, New York, EUA) foram

sensibilizadas em sistema à vácuo (Hybri-slot™ Manifold, Whatman Biometra, Göttingen, Alemanha) com o extrato comercial (Df_[HS]) (10 µg/mL), com a fração hidrofílica S2 (10 µg/mL), a fração hidrofóbica S3 (20 µg/mL) ou ambas as frações (S2+S3). Os controles positivos e negativos foram preparados em cada tira com o anticorpo anti-IgG4 humano biotinilado (1:200) e BSA (10 µg/mL), respectivamente.

Em seguida, as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% diluído em ácido tricloroacético (TCA) 0,25% e cortadas em tiras com aproximadamente 03 milímetros de diâmetro, as quais foram bloqueadas com PBS-T contendo leite em pó desnatado 5% (Molico, Nestlé, São Paulo, Brazil) (PBS-T-M) *overnight*. Os passos subsequentes utilizaram PBS-T-M 0,5% para diluição das amostras e reagentes. Após três lavagens com PBS-T, as tiras foram incubadas com as amostras de soro diluídas 1:5 por uma hora, T. A.

Subsequente a um novo ciclo de seis lavagens (PBS-T), o anticorpo secundário anti-IgG4 humano biotinilado (Sigma) foi adicionado às membranas na proporção de 1:1000, por um período de uma hora, T. A. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas por seis vezes (PBS-T) e o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluído 1:500 foi acrescentado, permanecendo em incubação por 30 minutos, T. A., ao abrigo da luz.

A reação foi revelada adicionando-se o substrato enzimático DAB (AMRESCO LLC, Solon, OH, EUA), diluído em 10 mL de tampão fosfato salino e Tris-HCl 20 mM (pH 7,2) acrescido de 20 µL de peróxido de hidrogênio, até o aparecimento das bandas, quando a reação foi interrompida com a adição de água destilada. Toda a reação se deu sob agitação pendular lenta e constante (Agitador Kline 108, Nova Ética, Brasil).

As tiras foram então secas em papel filtro, documentadas (HP Scanjet 3800, Hewlett Packard Development Company, CA, EUA) e analisadas com o auxílio do *software* ImageQuant 300 1.0.3 (GE Healthcare, Uppsala Sweden). As bandas de cada tira foram identificadas digitalmente, e a sua intensidade, dada em *pixels*, convertida em picos. Os valores dos volumes da área sob a curva (picos) foram considerados como unidades arbitrárias (UA) e tais valores foram utilizados em análises quantitativas do ensaio de slot blot.

4.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças na idade, sexo e positividade no TCP foram realizadas, respectivamente, pelos testes de Mann-Whitney, teste exato de Fisher e Qui-quadrado. Os níveis dos anticorpos IgE e IgG4 entre os grupos (atópicos e não-atópicos) foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. A análise pareada dos valores de IgG4 para os diferentes extratos de *D. farinae* testados nos dois grupos de indivíduos, foi realizada pelo teste de Wilcoxon. A correlação entre os valores do Índice ELISA (IE) para o anticorpo IgG4 e os valores de unidades arbitrárias (UA) das bandas do slot blot foram analisados por correlação de Spearman e uma regressão linear também foi aplicada nesse contexto. As diferenças foram consideradas como estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. Resultados

Resultados

5.1 Dados clínicos e demográficos dos indivíduos

Os dados referentes à faixa etária, gênero e quadro clínico dos pacientes incluídos no presente estudo estão apresentados na Tabela 2.

Um total de 32 pacientes foi selecionado segundo os critérios estabelecidos em Materiais e Métodos (item 4.1), sendo os mesmos divididos nos grupos atópicos (AT, n = 11) e não-atópicos (NAT, n = 21). Todos os indivíduos considerados atópicos apresentaram um histórico clínico de rinite alérgica relacionada à exposição a ácaros da poeira doméstica e TCP positivo para os extratos de aeroalérgenos, especialmente para as espécies de ácaros *D. farinae* (100%), *D. pteronyssinus* (90,9%) e também para o ácaro de estocagem *Blomia tropicalis* (81,8%) ($p < 0,0001$).

Diferenças estatísticas não foram encontradas com relação à idade dos indivíduos entre os grupos ($p = 0,4132$). Pacientes atópicos apresentaram uma idade média de 22 anos e os indivíduos não-atópicos uma média de 25 anos. Em relação ao gênero, em ambos os grupos (AT e NAT), as mulheres estavam mais presentes em comparação com os homens. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,5444$).

5.2 Obtenção dos extratos de *D. farinae*

O processo de preparação dos extratos de *D. farinae* resultou em três frações: S1, S2 e S3. No entanto, o estudo foi conduzido apenas com as frações hidrofílica (S2) e a hidrofóbica (S3) (Fig. 2.), cuja concentração proteica obtida, avaliada pelo ensaio de Bradford, foi de 482,7 µg/mL para S2 e 387,1 µg/mL para S3.

O perfil eletroforético de ambos os extratos foi demonstrado na Figura 3, A. A banda em destaque na fração S3, cujo peso molecular é de 25 kDa, corresponde ao alérgeno Der f 1. Notavelmente, a proteína de 15 kDa, correspondente ao alérgeno Der f 2, não estava presente nesse extrato. Os resultados do ELISA reverso para quantificação dos principais alérgenos de *D. farinae* corroboram esse fato (Fig. 3, B). Nesse ensaio,

enquanto a fração S2 apresentou ambos os alérgenos testados (Der f 1 e Der f 2), a fração S3 apresentou níveis indetectáveis de Der f 2 e expressivos níveis de Der f 1.

Tabela 2. Características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos no estudo.

Características	Grupos		Valor de <i>p</i>
	Atópicos	Não-atópicos	
Número de indivíduos	11	21	—
Idade (anos)			
Mediana \pm DP	22 \pm 1.41	25.5 \pm 10.19	0.4132 ^a
Gênero (M:F)	2:9	5:16	0.5444 ^b
Teste cutâneo de puntura positivo (n, %)			
<i>Dermatophagoides farinae</i>	11 (100%)	0	<0.0001 ^c
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	10 (90.9%)	0	<0.0001 ^c
<i>Blomia tropicalis</i>	9 (81.8%)	0	<0.0001 ^c

^a Teste de Mann-Whitney; ^b Teste exato de Fisher ($P < 0.05$); ^c Qui-quadrado; DP: desvio padrão.

5.3 Detecção dos anticorpos IgE e IgG4 específicos para os extratos de *D. farinae*

Os índices de reatividade dos anticorpos IgE e IgG4 específicos para o extrato comercial (Df_[HS]), fração S2 e fração S3 de *D. farinae*, determinados por ELISA em amostras de soro de pacientes atópicos e não-atópicos, são demonstrados na Figura 4.

Os níveis de IgE específico para Df_[HS] foram maiores para os indivíduos considerados atópicos do que os não-atópicos ($p < 0,0001$), com 18,18% (2/11) de positividade para AT e nenhuma positividade (0/21) para NAT. No caso do anticorpo IgG4, os níveis de reatividade também são maiores no grupo dos pacientes alérgicos ($p = 0,0495$) com 54,5% (6/11) de positividade nos atópicos em comparação com 38% (8/21) de reatividade para os não-atópicos. No entanto, em ambos os anticorpos testados, os níveis de reatividade estão muito abaixo do esperado para um extrato comercial, em relação aos resultados obtidos com a fração total *in house* (fração S2) (Fig. 4).

Em relação à fração S2, percebe-se um aumento considerável da reatividade aos anticorpos avaliados nas diferentes amostras de soro, comparando-se com o antígeno comercial ($Df_{[HS]}$). Para o anticorpo IgE, nos indivíduos atópicos houve maior reatividade comparado aos não-atópicos ($p < 0,0001$) com 63,3% (7/11) de positividade no grupo atópico e nenhuma positividade (0/21) para os não-atópicos. Do mesmo modo, os níveis de IgG4 na fração S2 foram maiores para os pacientes alérgicos (10/11) do que para os indivíduos não-atópicos (11/21) ($p < 0,0033$), apesar de ambos apresentarem reatividade (90,9% AT e 57,1% NAT) (Fig. 4).

A fração S3, por sua vez, também apresentou uma reatividade aumentada com relação à IgG4. Assim como a fração S2, o antígeno S3 proporcionou maiores níveis do anticorpo em questão para os indivíduos atópicos (90,9%; 10/11) em relação ao outro grupo (47,6%; 10/21) (Fig. 4). Para o anticorpo IgE, entretanto, não foi possível padronizar a detecção do mesmo por meio do ensaio de ELISA, uma vez que os componentes presentes na fração hidrofóbica (S3), provavelmente de natureza lipídica/glicolipídica, interagiram de forma inespecífica com o anticorpo IgE biotinilado, promovendo resultados inconclusivos (dados não mostrados).

De acordo com os resultados obtidos, percebe-se que as frações *in house* de *D. farinae* (S2 e S3) melhoraram a reatividade dos pacientes frente aos anticorpos IgE e principalmente para IgG4, em comparação com o antígeno comercial ($Df_{[HS]}$), comumente utilizado em testes cutâneos de puntura (TCP) e procedimentos imunoterápicos. Tais resultados são particularmente demonstrados na análise pareada entre os níveis de IgG4 detectados nas amostras de soro, dado pelos valores de Índice ELISA, frente aos antígenos ($Df_{[HS]}$, S2 e S3), tanto para os indivíduos atópicos, quanto para os não-atópicos. É importante notar que, nesse ensaio, diferenças significativas não foram verificadas apenas para o grupo não-atópico (NAT) para a fração S3 em comparação com o antígeno comercial ($Df_{[HS]}$). Na análise pareada também foi possível verificar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as frações hidrofílica (S2) e hidrofóbica (S3) (Fig. 5).

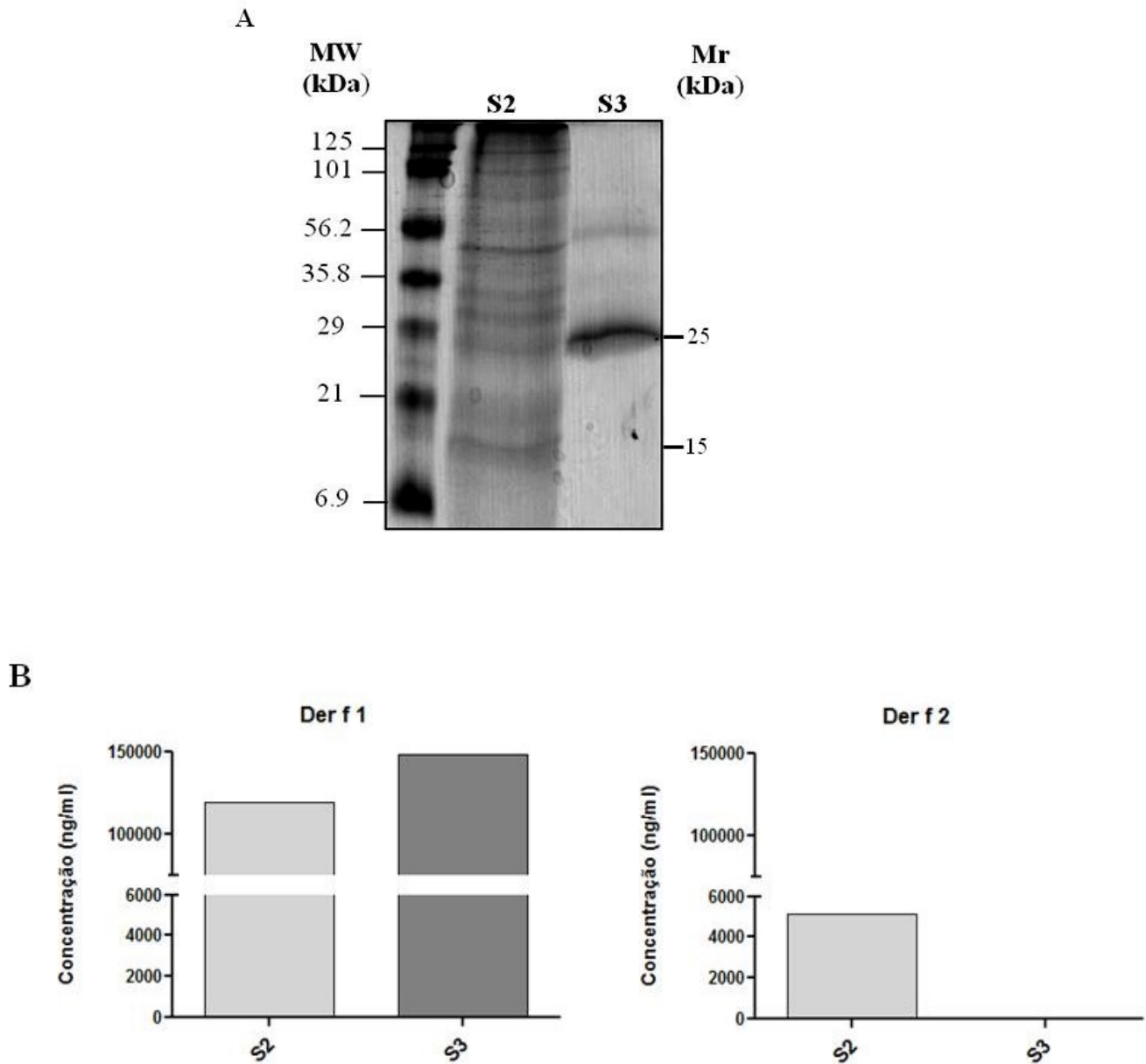


Figura 3. Análise dos extratos de *D. farinae*. (A) Análise eletroforética das frações hidrofílica (S2) e hidrofóbica (S3) extraídas do peneirado de *D. farinae*. As barras horizontais indicam as proteínas de 25 kDa, que corresponde ao alérgeno Der f 1, e de 15 kDa, que corresponde ao alérgeno Der f 2, presente apenas na fração S2. (B) Quantificação dos principais alérgenos de *D. farinae* nas frações S2 e S3, por meio de ELISA reverso. A concentração dos alérgenos foi expressa em ng/mL.

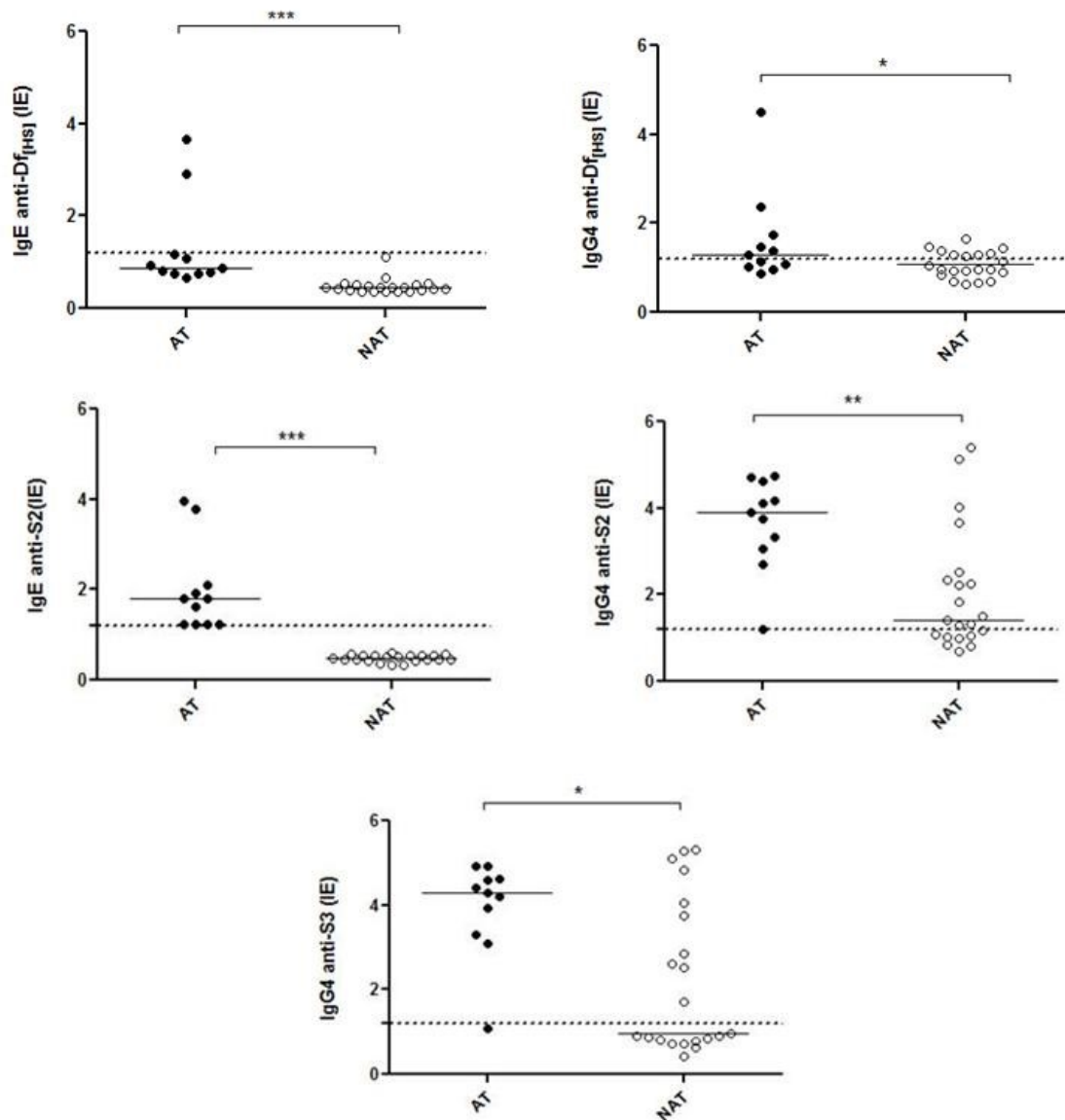


Figura 4. Níveis dos anticorpos IgE e IgG4 específicos para as frações de *D. farinae* (S2 e S3) e para o extrato comercial (Df_[HS]) nas amostras de soro dos indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT). Os dados são expressos em valores de Índice ELISA (IE). A linha pontilhada representa o *cutoff* (IE > 1.2) e a mediana é indicada pelas barras horizontais. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

5.4 Slot Blot

Um ensaio utilizando o método de slot blot foi realizado com o intuito de verificar a reatividade do soro dos indivíduos recrutados para os anticorpos IgG4, frente à sensibilização às frações S2, S3, S2+S3 e para o antígeno comercial (Df_[HS]) e posteriormente, averiguar a correlação desses resultados com o ensaio de ELISA. Devido a problemas técnicos com relação ao processo de revelação e, ainda, por razões estéticas, algumas das tiras presentes na Figura 6 foram retiradas. Entretanto, a análise quantitativa dos dados foi realizada com todas as tiras, uma vez que as bandas puderam ser identificadas pelo *software*.

Para as frações S2 e S3, detectou-se apenas uma discreta reatividade das amostras de soro dos indivíduos dos dois grupos (AT #7, #30; NAT #17, #22), o que não é similar aos resultados obtidos no ELISA, cuja positividade é expressiva no soro de vários pacientes. Por outro lado, a combinação dos extratos S2 e S3 promoveu uma reatividade expressiva para os indivíduos AT e NAT (Fig. 6, A).

Em relação ao extrato comercial (Df_[HS]), diferenças na reatividade para os anticorpos IgG4-alérgeno-específicos foram encontradas (Fig 6, B), comparando-se com a fração S2. Esta proporcionou uma maior reatividade dentre os indivíduos, corroborando os resultados obtidos no ELISA para o anticorpo em questão (Fig. 4).

Uma análise quantitativa do ensaio de slot blot foi realizada por meio da avaliação dos volumes da área sob os picos das bandas presentes na membrana, dado em unidades arbitrárias (UA) (Materiais e Métodos, item 4.10). No entanto, a análise dos dados demonstrou que não houve diferenças significativas entre os grupos AT e NAT (Fig. 6). Com o intuito de verificar se de fato havia alguma correlação entre os dois testes, ELISA e slot blot, uma correlação de Spearman foi realizada entre os valores dos Índices ELISA para o anticorpo IgG4 específico para as frações de *D. farinae* testadas e os valores de unidades arbitrárias (UA) do slot blot. Como esperado, a correlação não foi considerada estatisticamente significativa para nenhum dos antígenos avaliados pelos dois ensaios ($p > 0,05$). A regressão linear indicou que apesar de a linha de tendência indicar uma correlação positiva discreta, os valores de r^2 também não foram estatisticamente significantes (Fig. 7).

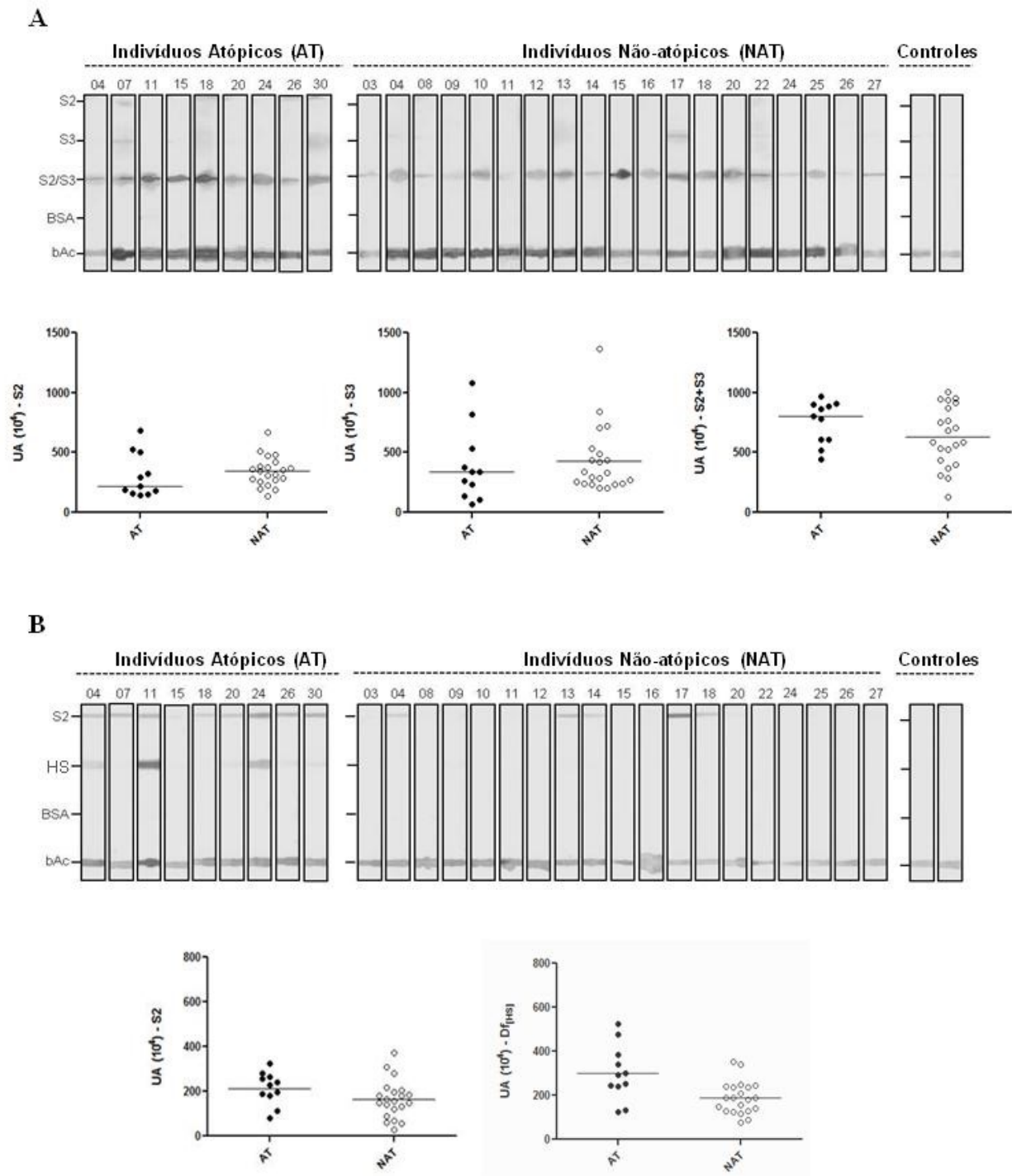


Figura 6. Ensaio de slot blot para os antígenos de *D. farinae* e análise quantitativa das bandas expressas em valores de unidades arbitrárias (UA). (A) Reatividade do anticorpo IgG4 específico para as frações S2, S3 e S2+S3, nas amostras de soro dos indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT). (B) Reatividade dos anticorpos IgG4 específicos para a fração S2 e o antígeno comercial (Df_[HS]) para amostras de soro dos pacientes selecionados. BSA foi utilizada como controle negativo e o anticorpo biotilado IgG4 anti-humano como controle positivo. A mediana é representada pelas barras horizontais. Nenhuma diferença estatística foi encontrada pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

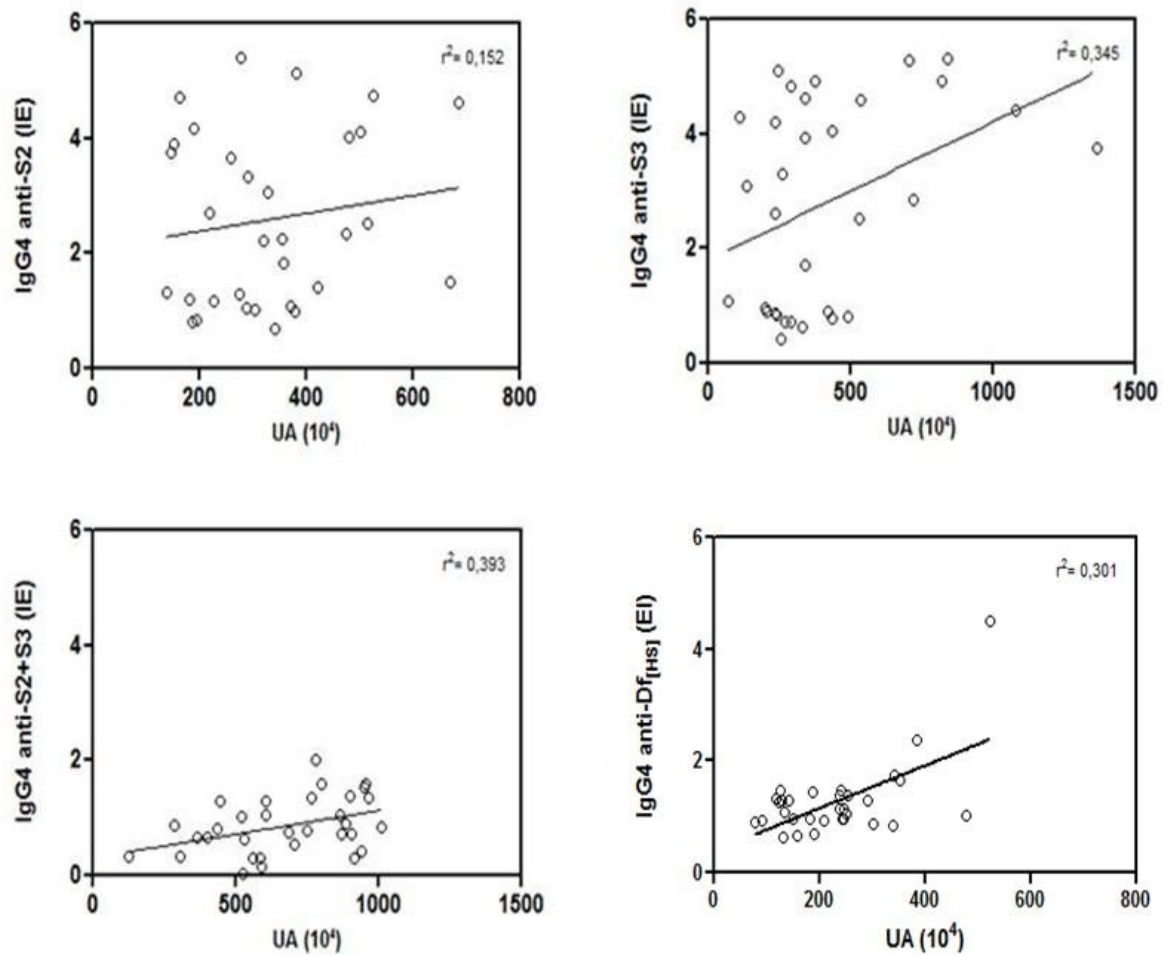


Figura 7. Correlação e regressão linear entre os níveis dos anticorpos IgG4 específicos para os extratos S2, S3, S2+S3 e antígeno comercial (Df_[HS]) de *D. farinae* nas amostras de soro de indivíduos atópicos (AT) e não-atópicos (NAT) e os valores de unidades arbitrárias (UA) correspondentes aos volumes dos picos das bandas presentes no ensaio de slot blot. Os níveis do anticorpo foram expressos por Índice ELISA (IE). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nem pela correlação de Spearman e nem pela regressão linear.

6. Discussão

Discussão

O aumento de casos de pacientes com doenças alérgicas respiratórias é cada vez mais notável e preocupante, sendo desencadeados por diversos fatores incluindo predisposição genética e mudanças no ambiente (LIAO; LIN; TSAI, 2013; SOKYA *et al.*, 2014). Diversas estratégias para evitar os sintomas das doenças alérgicas têm sido utilizadas, como a prevenção do contato dos pacientes com os aeroalérgenos, a terapia por meio de fármacos e, principalmente, a imunoterapia alérgeno-específica (PITTNER *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2014). Esse tratamento visa modular o perfil da resposta imunológica dos indivíduos tratados, induzindo a produção de anticorpos bloqueadores específicos, particularmente IgG4, e a produção de células indutoras de tolerância e mediadores anti-inflamatórios. O processo terapêutico envolve a aplicação repetitiva de alérgenos específicos, promovendo a redução da exacerbação da resposta alérgica, diminuindo os riscos de sensibilizações a novos alérgenos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (KARAKOC *et al.*, 2012; AYDOGAN *et al.*, 2013; PFAAR *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2014).

Dentre os alérgenos envolvidos no desencadeamento das doenças alérgicas respiratórias, aqueles provenientes de ácaros da poeira doméstica (*D. farinae* e *D. pteronyssinus*) são os mais expressivos, e seus alérgenos estão localizados principalmente nas fezes (DE SOUZA; ROSÁRIO FILHO, 2012). Entre eles, os alérgenos dos grupos 1 e 2 representam os mais importantes clinicamente (TAKETOMI *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2012).

Para que um processo imunoterápico seja de fato eficiente, é indispensável conhecer os alérgenos específicos para os quais os pacientes são sensibilizados, especialmente com relação aos ácaros, uma vez que seus extratos, utilizados tanto na imunoterapia quanto em testes cutâneo de puntura, contém ao menos 15 alérgenos bem caracterizados e o perfil de reatividade de IgE é variável entre os pacientes (TAKETOMI *et al.*, 2005). Do mesmo modo, é importante monitorar o balanço IgE/IgG4 durante o tratamento, visto que nos pacientes uma mudança na taxa de IgE e IgG4 específicos, a favor de IgG4, é esperada. Esse fato reflete o desvio da resposta imune do perfil Th2 para Th1, o que estimula as células B a produzirem IgG ao invés de IgE ou promove a indução de células T reguladoras, que produzem principalmente IL-10, desencadeando uma troca de classe para o anticorpo IgG4 (LARSEN; BROGE;

JACOBI, 2015). Esse aumento de IgG4 específico no soro é corroborado por Lai e colaboradores (2013) que mostraram um aumento inicial considerável desse anticorpo, mesmo poucas semanas (10 semanas) após o início da imunoterapia com alérgenos de *D. pteronyssinus*, em comparação com o grupo controle.

A seleção dos indivíduos participantes do estudo foi baseada no histórico clínico e nos resultados do TCP. Com relação a esses dois parâmetros, todos os pacientes atópicos apresentaram um histórico clínico de doenças alérgicas (rinite alérgica) e TCP positivo para pelo menos um dos extratos alergênicos de ácaros (*D. farinae*, *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*). Os indivíduos não-atópicos apresentaram um TCP negativo para todos os aeroalérgenos testados. Os dois grupos não demonstraram nenhuma diferença estatística com relação à idade e apesar de não ser estatisticamente significativa, uma predominância de mulheres foi observada.

Os protocolos de extração de alérgenos de *D. farinae* utilizados no presente estudo, resultaram em duas frações principais, sendo uma hidrofílica (S2) e outra hidrofóbica (S3). O método de precipitação de proteínas por meio de acetona, utilizado para a obtenção de S3 é empregado principalmente em estudos voltados para a proteômica, com o intuito de isolar os mais diversos tipos de proteínas, por exemplo, de algumas plantas e sementes, de animais, como decápodes, e fungos. Entretanto, os protocolos empregados se diferenciam daqueles aplicados nesse estudo, pelo fato de utilizarem acetona gelada e em associação com outros solventes orgânicos (PARIS *et al.*, 1991; FUJII *et al.*, 1996; PANCHOUT *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013; DE CEGLIE *et al.*, 2014). Lind (1985) e Haida e colaboradores (1985) utilizaram diversos protocolos para o isolamento de alérgenos de ácaros da poeira doméstica, incluindo *D. farinae*. Dentre os métodos aplicados, a precipitação por acetona/água foi um deles. Contudo, eles não avaliaram as frações obtidas no tocante à imunoreatividade de anticorpos. Portanto, pela primeira vez, o presente estudo mostra a reatividade a anticorpos IgE e IgG4 a uma fração antigênica de *D. farinae*, resultante de um particular protocolo de extração de alérgenos, sendo tal fração passível de ser aplicada em imunoterapia.

Como citado anteriormente e pela análise eletroforética das frações obtidas foi possível constatar, particularmente na fração S3, uma proteína de peso molecular de 25 kDa, que corresponde ao alérgeno Der f 1, além de algumas outras proteínas com alto peso molecular. De acordo com Haida e colaboradores (1985) as frações mais

alergênicas do extrato de *D. farinae*, estão distribuídas na faixa de 20 a 30 kDa, sendo o principal componente proteico acompanhado de uma pequena quantidade de polissacarídeo. Ainda de acordo com o perfil proteico observado para essa fração, notavelmente a proteína de 15 kDa, correspondente ao alérgeno Der f 2, não está presente, sendo tal fato corroborado pelo ensaio de ELISA reverso para quantificar os principais alérgenos de *D. farinae* nos extratos, que indicou níveis não significativos para o alérgeno Der f 2 na fração S3. Por outro lado, a fração hidrofílica (S2) apresentou ambos os alérgenos, tanto na análise eletroforética quanto nos resultados do ELISA reverso, porém, com níveis de Der f 1 maiores em comparação com Der f 2.

Portanto, esse método de extração de proteínas promove um maior enriquecimento de Der f 1 mas não Der f 2 e portanto, a fração S3 pode ser empregada como um extrato antigênico em vários procedimentos, para avaliar a reatividade de pacientes por meio de testes cutâneos de puntura ou pelo soro dos mesmos, de forma específica para o alérgeno Der f 1 de *D. farinae*. Esse enriquecimento de Der f 1 na fração hidrofóbica corrobora a nossa hipótese inicial, a qual sugeria um aumento dos alérgenos principais de *D. farinae* no extrato em questão. Contudo, a ausência do alérgeno Der f 2 foi inesperada.

Com relação à análise dos níveis dos anticorpos IgE e IgG4, determinados por ELISA indireto, observou-se em todos os extratos uma maior reatividade para o anticorpo IgG4 no grupo de pacientes atópicos, apesar de ambos os grupos (AT, NAT) terem apresentado reatividade. A maior reatividade dos pacientes atópicos em relação aos indivíduos saudáveis já foi demonstrada anteriormente pelo nosso grupo (YNOUE, 2011). No processo alérgico, células Th2 induzem a produção, além de IgE, de anticorpos IgG4 pela IL-10, a principal citocina reguladora presente em doenças inflamatórias. Em indivíduos saudáveis, dois modos de resposta imune podem resultar em imunotolerância: através da ativação de células Treg produtoras de IL-10 as quais, por sua vez, estimulam células B a produzirem anticorpos bloqueadores IgG4 e/ou uma resposta a favor do perfil de citocinas Th1 sobre Th2, na presença de algum alérgeno, o que previne a troca de classe de anticorpos para IgE pela inibição do desenvolvimento de Th2 devido à presença de IFN- γ no microambiente dos locais de inflamação alérgica (AKDIS *et al.*, 1998; TILL *et al.*, 2004; AKDIS; AKDIS, 2015).

As frações S2 e S3 foram as que mais promoveram o aumento da reatividade para os anticorpos IgG4, em comparação com o antígeno comercial (Df_[HS]), fato indicado também na análise pareada dos níveis de Índice ELISA para cada um dos extratos testados. É importante notar, que mesmo não havendo uma diferença estatisticamente significativa para os indivíduos não-atópicos com relação à fração S3, houve uma tendência para o aumento da reatividade. Entre os dois extratos (S2 e S3), não houve diferenças estatísticas na análise pareada, visto que ambos promoveram esse aumento a favor do anticorpo IgG4. No entanto, salienta-se que a fração S3, possui basicamente duas bandas eletroforéticas, incluindo o alérgeno Der f 1 e glicolípídeos de alto peso molecular, enquanto que a fração total S2 apresenta inúmeras bandas. Sendo assim, a fração S3 pode ser considerada como mais reativa, possivelmente devido a maior pureza no alérgeno Der f 1 e ao mesmo tempo, na ausência de outros alérgenos irrelevantes. Nesse sentido, a reatividade de anticorpos IgG4 é maior para o alérgeno Der f 1 do que para Der f 2, cujos achados foram observados com o emprego do extrato S3. Desse modo, pode-se inferir que o alérgeno Der f 1 é extraído, por meio do uso de acetona, em maior quantidade do que Der f 2 e, por este motivo, a grande parte da reatividade de anticorpos IgG4 se deva à presença da maior concentração de Der f 1. Contudo, é interessante notar que a ausência de Der f 2 no extrato S3 não interferiu negativamente no grau de reatividade desses anticorpos IgG4 quando comparado com a sua reatividade contra a fração S2. Portanto, conforme os resultados deste trabalho, pode-se concluir que o alérgeno Der f 1 parece ser de maior importância do que Der f 2 para a análise e quantificação da reatividade de anticorpos IgG4 específicos.

Os níveis de IgE alérgeno-específicos também foram quantificados para a fração hidrofílica S2 e antígeno comercial (Df_[HS]). Uma vez que os pacientes atópicos já foram sensibilizados para *D. farinae*, anticorpos IgE específicos estavam presentes no soro, na avaliação com os dois alérgenos testados. O oposto ocorre com os indivíduos não atópicos. Contudo, assim como para o anticorpo IgG4, a reatividade do extrato comercial (Df_[HS]) ficou muito abaixo do esperado para esse antígeno, em comparação aos resultados obtidos para a fração total S2. Possivelmente, o extrato comercial mesmo sendo considerado como padronizado, apresenta uma composição antigênica menos reativa do que na fração S2 obtida *in house*, razão pela qual a reatividade dos anticorpos IgE e IgG4 foi muito menor do que quando comparada às outras frações, como mostrado pela análise pareada.

O ensaio de slot blot foi realizado para verificar a reatividade do anticorpo IgG4 nas amostras de soros dos indivíduos para as frações S2, S3, S2+S3 e o antígeno comercial (Df_[HS]). Enquanto a reatividade do anticorpo IgG4 para as frações S2 e S3 não foi expressiva individualmente, a associação dos dois extratos (S2+S3) demonstrou uma alta reatividade em todas as amostras de soro, tanto em atópicos quanto em não-atópicos. Portanto, a fração S3 associada com outros extratos pode melhorar a reatividade de IgG4 presente na amostra de soro de pacientes e pode ser empregada no monitoramento de pacientes em imunoterapia específica contendo alérgenos de *D. farinae*. No segundo ensaio, a fração S2 em comparação com o extrato comercial (Df_[HS]), demonstrou uma maior reatividade das amostras de soro dos indivíduos dos dois grupos testados (AT, NAT), corroborando com os resultados obtidos no ELISA.

A fim de avaliar os resultados demonstrados no slot blot de forma quantitativa, as bandas foram analisadas no *software* ImageQuant e os volumes foram expressos utilizando unidades arbitrárias (UA). A análise indicou que os valores de unidades arbitrárias não foram estatisticamente diferentes entre os indivíduos atópicos e não-atópicos, provavelmente devido à baixa sensibilidade do teste.

As análises da correlação de Spearman e da regressão linear demonstraram que não há uma correlação entre os valores de Índice ELISA (EI) e os resultados do slot blot expressos pelos valores de unidades arbitrárias. De acordo com os resultados, o ensaio de ELISA é mais sensível do que o slot blot e, portanto, deve ser empregado para averiguar de forma mais decisiva a reatividade das amostras de soro aos anticorpos IgG4.

De modo geral, nossos resultados mostraram que as frações S2 e S3, separadamente ou em associação, puderam melhorar a detecção do anticorpo IgG4 específico nas amostras de soro de indivíduos sensibilizados, em comparação ao Df_[HS], podendo ser utilizados para monitoramento de pacientes sob imunoterapia específica. O extrato hidrofóbico (S3), enriquecido em Der f 1, também pode ser empregado como um extrato alergênico para determinar a reatividade de uma amostra de soro para um alérgeno específico, promovendo portanto, uma fonte de extrato alergênico para ser utilizado na imunoterapia de forma mais apropriada, e consequentemente, mais eficiente em pacientes alérgicos para Der f 1, mas não Der f 2, tendo a possibilidade de individualizar a composição do extrato imunoterapêutico, especialmente devido ao

conhecimento da existência das diferenças na reatividade de IgE aos alérgenos dos grupos 1 e 2 em pacientes sensibilizados a ácaros da poeira domiciliar, já demonstrado anteriormente pelo nosso grupo (TAKETOMI *et al*, 2006).

Na prática clínica, é importante conhecer que, diferentes protocolos de extração de alérgenos, empregados pelos diversos fabricantes para a produção dos extratos a serem utilizados em imunoterapia alérgeno-específica e TCP, podem substancialmente variar no conteúdo alergênico, particularmente no tocante aos alérgenos considerados os principais responsáveis pela indução de respostas mediadas por IgE na maioria dos pacientes com doenças alérgicas respiratórias. Assim, um extrato alergênico de determinado fabricante pode ser melhor ou pior para um paciente em particular, sendo recomendado que os fabricantes forneçam aos alergistas, o conteúdo dos alérgenos principais presentes nos respectivos extratos, para possibilitar a escolha objetiva de um determinado extrato alergênico, que seja mais apropriado para tratar os pacientes.

7. Conclusões

Conclusões

- ❖ Pela primeira vez, o presente estudo mostra a reatividade de anticorpos IgE e IgG4 a uma fração enriquecida em Der f 1, obtida a partir de um particular protocolo de extração de alérgenos (precipitação com acetona/água), que poderá apresentar potencial aplicabilidade na imunoterapia específica com alérgenos.
- ❖ Aparentemente, o alérgeno Der f 1 apresenta uma maior importância do que Der f 2 no tocante à análise e quantificação da reatividade de anticorpos IgG4 específicos.
- ❖ As frações hidrofílica (S2) e hidrofóbica (S3) de *D. farinae* são capazes de aumentar a reatividade de indivíduos atópicos e não-atópicos aos anticorpos IgG4 em comparação com o antígeno comercial (Df_[HS]) de *D. farinae*, tanto de forma isolada (individual) quanto em associação (S2+S3), podendo ser aplicados para monitoramento de pacientes sob imunoterapia.
- ❖ Por ser enriquecida em apenas um dos principais alérgenos de *D. farinae* (Der f 1), a fração S3 pode ser utilizada com um extrato antigênico para averiguar a sensibilidade específica de pacientes, bem como para imunoterapia alérgeno-específica em indivíduos sensibilizados à Der f 1 e não à Der f 2, promovendo um tratamento mais específico.

8. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

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

AGUA-DOCE, A.; GRACA, L. Prevention of house dust mite induced allergic airways disease in mice through immune tolerance. **PlosOne**, 6, 1-8, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022320>

AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Mechanism of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. **World Allergy Organ J**, 14, 17, 2015. <https://doi.org/10.1186/s40413-015-0063-2>

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

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

AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol**, 119, 780-789, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.01.022>

ALLERGEN NOMENCLARURE. Disponível em: <<http://www.allergen.org>>. Acesso em 24 jan. 2016.

ALLERGOME. Disponível em: <<http://www.allergome.com>>. Acesso em 26 jan. 2016.

ALVAREZ-CUESTA, E.; BERISTAIN, A. Practical management of immunotherapy. **Rev Fr Alergol**, 43, 301-309, 2003.

AN, S.; SHEN, C.; LIU, X.; CHEN, L.; XU, X.; RONG, M.; LIU, Z.; LAI, R. Alpha-actinin is a new type of house dust mite allergen. **PLoS One**, 8:e81377, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081377>

ARLIAN, L. G. Arthropod allergens and human health. **Annu Rev Entomol**, 47, 395-433, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145224>

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

ARLIAN, L. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **J Allergy Clin Immunol**, 107, 406-413, 2001. Supplement 3.

ARLIAN, L. G.; RAPP, C. M.; AHMED, S. G. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **J Med Entomol**, 27, 1035-1040, 1990. <https://doi.org/10.1093/jmedent/27.6.1035>

ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; FERNADEZ-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. **Clin Exp Allergy**, 21, 433-439, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1991.tb01683.x>

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**, 368, 733-743, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69283-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69283-0)

AYDOGAN, M.; EIFAN, A. O.; KELES, S.; AKKOC, T.; NURSOY, M. A.; BAHCECILER, N. N.; BARLAN, I. B. Sublingual immunotherapy in children with allergic rhinoconjunctivitis mono-sensitized to house-dust mites: a double-blind-placebo-controlled randomized trial. **Respir Med**, 107, 1322-1329, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2013.06.021>

BATARD, T.; BARON-BODO, V.; MARTELET, A.; LE MINGON, M.; LEMOINE, P.; JAIN, K.; MARIANO, S.; HORIOT, S.; CHABRE, H.; HARWANEGG, C.; MARQUETTE, C. A.; CORGIER, B. P.; SOH, W. T.; SATITSUKSANO, P.; JACQUET, A.; CHEW, F. T.; NONY, E.; MOINGEON, P. Patterns of IgE sensitization in house dust mite-allergic patients: implications for allergen immunotherapy. **Allergy**, 71, 220-229, 2016. <https://doi.org/10.1111/all.12796>

BINOTTI, R. S.; MUNIZ, J. R.; PASCHOAL, I. A.; PRADO, A. P.; OLIVEIRA, C. H.; House dust mites in Brazil – an annotated bibliography. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96, 1177-1184, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000800027>

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRAUN-FAHRLANDER, C.; RIEDLER, J.; HERZ, U.; EDER, W.; WASER, M.; GRIZE, L.; MAISCH, S.; CARR, D.; GERLACH, F.; BUFE, A.; LAUENER, R. P.; SCHIERL, R.; RENZ, H.; NOWAK, D.; VON MUTIUS, E. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. **N Engl J Med**, 347, 869-877, 2002. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020057>

BRONNERT M.; MANCINI, J.; CIRNBAUM, J.; AGABRIEL, C.; LIABEUF, V.; PORRI, F.; CLEACH, I.; FABRE, A.; DENEUX, I.; GRANDNE, V.; GROB, J. J.; BERBIS, P.; CHARPIN, D.; BONGRAND, P.; VITTE, J. Component-resolved diagnosis with commercially available *D. pteronyssinus* Der p 1, Der p 2 and Der p 10: relevant markers for house dust mite allergy. **Clin Exp Allergy**, 42, 1406-1415, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.04035.x>

CASALE, T. B.; STOKES, J. R. Future forms of immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol**, 127, 8-15, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.034>

CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. E. Purification and characterization of the major allergen from *D. pteronyssinus*-antigen PI. **J Immunol**, 125, 587-592, 1980.

CHAPMAN, M. D.; POMÉS, A.; BREITENEDER, H.; FERREIRA, F. Nomenclature and structural biology of allergens. **J Allergy Clin Immunol**, 119, 414-420, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.11.001>

CHAPMAN, M. D.; SMITH, A. M.; VAILES, L. D.; ARRUDA, K.; DHANARAJ, V.; POMÉS, A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. **J Allergy Clin Immunol**, 106, 409-418, 2000. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.109832>

CHEN, K. W.; BLATT, K.; THOMAS, W. R.; SWOBODA, I.; VALENT, P.; VALENTA, R.; VRTALAA, S. Hypoallergenic Der p 1/Der p 2 combination vaccines

for immunotherapy of house dust mite allergy. **J Allergy Clin immunol**, 130, 435-443, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.035>

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

CORRY, D. B.; KHERADMAND, F. Induction and regulation of the IgE response. **Nature**, 402, B18-B19, 1999. Supplement 25.

CUCA-SUÁREZ, L. E.; MENDONZA-MEZA, D. L.; ÁLVAREZ-CABALLERO, J. M.; MACÍAS-VILLAMIZAR, V. E.; COY- BARRERA, E. D. Actividad acaricida de extractos de lauráceas sobre los ácarosintradomiciliarios *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis*. **Rev Cubana Pl Med**, 17, 308-319, 2012.

DATASUS. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em 24 jan. 2016.

DE BOER, R. Reflections on the control of mites and mite allergens. **Allergy**, 53, 41-46, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb04995.x>

DE CEGLIE, C.; CALVANO, C. D.; ZAMBONIN, C. G. Determination of hidden hazelnut oil proteins in extra virgin olive oil by cold acetone precipitation followed by in-solution tryptic digestion and MALDI-TOF-MS analysis. **J Agric Food Chem**, 62, 9401-9409, 2014. <https://doi.org/10.1021/jf504007d>

DE SOUZA, C. T.; ROSÁRIO FILHO, N. A. Perfil de aeroalérgenos intradomiciliares comuns no Brasil: Revisão dos últimos 20 anos. **Rev Bras Alerg Immunopatol**, 35, 47-52, 2012.

DUFF, A. L.; PLATTS-MILLS, T. A. Allergens and asthma. **Pediatr Clin North Am**, 39, 1277-1291, 1992. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(16\)38445-0](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(16)38445-0)

FERNANDEZ-CALDAS, E. Mite species of allergologic importance in Europe. **Allergy**, 52, 383-387, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1997.tb01016.x>

FERREIRA, F.; WALNNER, M.; THALHAMER, J. Customized antigens for desensitizing allergic patients. **Adv Immunol**, 84, 79-129, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)84003-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)84003-3)

FUENTES, Y. R. C.; RODRIGUEZ, R.; MARTÍNEZM I.; LABRADA, A. Eficiencia de dos pruebas diagnósticas em la determinación de alergia por ácaros en niños. **VacciMonitor**, 17, 1-6, 2008.

FUJII, M.; NAGAOKA, Y.; IMAMURA, S.; SHIMIZU, T. Purification and characterization of a prolidase from *Aureobacterium esteraromaticum*. **Biosci Biotechnol Biochem**, 60, 1118-1122, 1996. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.1118>

GARN, H.; RENZ, H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. **Immunobiology**, 212, 441-452, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.03.006>

GELLER, M.; ESCH, R. E.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Sensibilização acarina na atopia respiratória do Rio de Janeiro – considerações preliminares. **Na Acad Nac Med**, 153, 4, 174-175, 1993.

GONZÁLEZ LEON, M.; CASTRO ALMARALES, R. L.; LABRADA ROSADO, A.; NAVARRO VILTRE, B. I.; ÁLVAREZ-CASTELLÓ, M.; GARCÍA GOMES, I. Prevalencia de la sensibilización a tres ácaros domésticos en la población infantil alérgica de un consultorio médico. **Rev Cubana Med Gen Integr**, 21, 2005.

GOULD, H. J.; SUTTON, N. J.; IgE in allergy and asthma today. **Nat Rev Immunol**, 8, 205-217, 2008. <https://doi.org/10.1038/nri2273>

GOWDA, G.; LAKSHIMI, S.; PARASUMALU, B. G.; NAGARAJ, C.; GOWDA, B. V. C.; SOMASHEKARA, K. G. A study on allergen sensitivity in patients with allergic rhinitis in Bangalore, India. **J Laryngol Otol**, 128, 892-896, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0022215114001984>

HAIDA, M.; OKUDAIRA, H.; OGITA, T.; ITO, K.; MIYAMOTO, T.; NAKAJIMA, T.; HONGO, O. Allergens of the house dust mite *Dermatophagoides farinae* – immunochemical studies of four allergenic fractions. **J Allergy Clin Immunol**, 75, 686-692, 1985. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(85\)90094-6](https://doi.org/10.1016/0091-6749(85)90094-6)

HART, B. J. Life cycle and reproduction of house-dust mites: environmental factors influencing mite populations. **Allergy**, 53, 13-17, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb04990.x>

HESELMAR, B.; ABERG, B.; ERIKSSON, B.; BJORKSTÉN, B.; ABERG, N. Building characteristics affect risk of allergy development. **Pediatr Allergy Immunol**, 16, 126-131, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2005.00222.x>

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nat Rev Immunol**, 8, 218-230, 2008. <https://doi.org/10.1038/nri2262>

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**, 351, 1225-1323, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07302-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07302-9)

JACOBSEN, L.; NIGGEMANN, B.; DREBORG, S.; FERDOUSI, H. A.; HALKEN, S.; HOST, S.; KOIVIKKO, A.; NORBERG, L. A.; VALORVIRTA, E.; WAHN, U., MÖLLER, C, THE PAT INVESTIGATOR GROUP. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. **Allergy**, 62, 943-948, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01451.x>

JOHANSSON, S. G. O.; HOURIHANE, J. O. B.; BOUSQUET, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; DREBORG, S.; HAATELA, T.; KOWALSKI, M. L.; MYGIND, N.; RING, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; WÜTHRICH, B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, 56, 813-824, 2001. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.t01-1-00001.x>

JOHANSSON, S. G.O.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S.; LANIER, B. Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; MARTELL, 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. **J Allergy Clin Immunol**, 113, 5, 832-836, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.591>

JUTEL, M.; AGACHE, I.; BONINI, S.; BURKS, W.; CALDERON, M.; CANONICA, W.; COX, L.; DEMOLY, P.; FREW, A. J.; O'HEHIR, R.; KLEIN-TEBBE, J.; MURARO, A.; LACK, G.; LARENAS, D.; LEVIN, M.; NELSON, H.; PAWANKAR, R.; PFAAR, O.; VAN REE, R.; SAMPSON, H.; SANTOS, A. F.; DU TOIT, G.; WERFEL, T.; VAN WIJK, R. G.; ZHANG, L.; AKDIS, C. A. International consensus

on allergy immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol**, 136, 556-568, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.04.047>

KARACOC, G. B.; YILMAZ, M.; ALTINTAS, D. U.; KENDIRLI, S. G. Can serum-specific IgE/Total IgE ratio predict clinical response to allergen-specific immunotherapy in children monosensitized to House Dust Mite? **J Allergy**, 2012: 694094, 2012.

KIM, S. H.; SHIN, S. Y.; LEE, K. H.; SIM, S. W.; CHO, J. S. Long-term effects of specific allergen immunotherapy against house dust mites in polysensitized patients with allergic rhinitis. **Allergy Asthma Immunol Res**, 6, 535-540, 2014. <https://doi.org/10.4168/aair.2014.6.6.535>.

KING, T. P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. **Allergy**, 50, 9, 765-774, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1995.tb01222.x>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685, 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

LAI, X.; LI, J.; XIAO, X.; LIU, E.; ZHANG, C.; WANG, H.; GJESIN, B.; ZHONG, N.; SPANGFORT, M. Specific IgG4 production during house dust mite immunotherapy among age, gender and allergic disease populations. **Int Arch Allergy Immunol**, 160, 37-46, 2013. <https://doi.org/10.1159/000339239>

LARSEN, J. N.; BROGE, L.; JACOBI, H. Allergy immunotherapy: the future of allergy treatment. **Drug Discv Today**, 21, 26-37, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.07.010>

LARSEN, J. N.; LOWERSTEIN, H. Allergen nomenclature. **J Allergy Clin Immunol**, 97, 577-578, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(96\)70301-9](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(96)70301-9)

LEMANSKE-JUNIOR, R. F.; BUSSE, W. W. Asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 111, 502-519, 2003.

LIAO, E. C.; LIN, Y. H.; TSAI, J. J. Detection of group 2 *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen for environmental monitoring of dust mite infestation. **Biosci Trends**, 7, 82-88, 2013. <https://doi.org/10.5582/bst.2013.v7.2.82>

- LIND, P. Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. **J Allergy Clin Immunol**, 76, 753-761, 1985. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(85\)90682-7](https://doi.org/10.1016/0091-6749(85)90682-7)
- MARONE, G. Asthma: recent advances. **Immunol Today**, 19, 5-9, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01187-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01187-0)
- MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLTS, S.; BEASLEY, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA dissemination committee report. **Allergy**, 59, 469-478, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00526.x>
- 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**, 63, 1455-1463, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01774.x>
- MIN, Y. G. The pathophysiology, diagnosis and treatment of allergic rhinitis. **Allergy Asthma Immunol Res**, 2, 65-76, 2010. <https://doi.org/10.4168/aaair.2010.2.2.65>
- NORMAN, P. S. Allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, 75, 531-542, 1985. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(85\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0091-6749(85)90024-7)
- OBOKI, K.; OHNO, T.; SAITO, H.; NAKAE, S. Th17 and allergy. **Allergol Int**, 57, 121-134, 2008. <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-07-160>
- OWNBY, D. Allergy testing: *in vivo* versus *in vitro*. **Pediatr Clin North Am**, 35, 995-1009, 1988. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(16\)36544-0](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(16)36544-0)
- PANCHOUT, F.; LETENDRE, J.; BULTELE, F.; DENIER, X.; ROCHER, B.; CHAN, P.; VAUDRY, D.; DURAND, F. Comparison of protein-extraction methods for gills of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), and application to 2DE. **J Biomol Tech**, 24, 218-223, 2013. <https://doi.org/10.7171/jbt.13-2404-002>
- PARIS, S.; DEBEAUPUIS, J. P.; PREVOST, M. C.; CASOTTO, M.; LATGE, J. P. The 31 kd major allergen, Alt a I1563, of *Alternaria alternata*. **J Allergy Clin Immunol**, 88, 902-908, 1991. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(91\)90247-L](https://doi.org/10.1016/0091-6749(91)90247-L)
- PEREIRA, E. A.; SILVA, D. A.; CUNHA-JUNIOR, 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**, 60, 401-406, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00738.x>

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). **Sci Total Environ**, 328, 15-21, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.01.028>

PFAAR, O.; BACHERT, C.; BUFE, A.; BUHL, R.; EBNER, C.; ENG, P.; FRIENDRICH, F.; FUCHS, T.; HAMELMANN, E.; HARTWIG-BADE, D.; HERING, T.; HUTTEGGER, I.; JUNG, K.; KLIMEK, L.; KOPP, M. V.; MERK, H.; RABE, U.; SALOGA, J.; SHIMID-GRENDELMEIER, P.; SCHUSTER, A.; SCHWERK, N.; SITTER, H.; UMPFENBACH, U.; WEDI, B.; WOHL, S.; WORM, M.; KLEIN-TEBBE, J.; KAUL, S.; SCHWALFENBERG, A. Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases: S2k Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Austrian Society for Allergy and Immunology (OGAI), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (DGhNO-KHC), the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine (DGKJ), the Society for Pediatric Pulmonology (GPP), the German Respiratory Society (DGP), the German Association of ENT Surgeons (BV-HNO), the Professional Federation of Paediatricians and Youth Doctors (BVKJ), the Federal Association of Pulmonologists (BDP) and the German Dermatologists Association (BVDD). **Allergo J Int**, 23, 282-319, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40629-014-0032-2>

PIKE, A. J.; CUNNINGHAM, M. J.; LESTER, P. J. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari:Pyroglyphidae) at constant and simultaneously fluctuating temperature and humidity conditions. **J Med Entomol**, 42, 266-269, 2005. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.3.266>

PITTNER, G.; VRTALA, S.; THOMAS, W. R.; WEGHOFER, M.; KUNDI, M.; HORAK, F.; KRAFT, D.; VALENTA, R. Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. **Clin Exp Allergy**, 34, 597-603, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.1930.x>

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VERVOLET, D.; THOMAS, W.; AALBERSE, R.; CHAPMAN, M. Indoor allergens and asthma. Report of a Third International Workshop. **J Allergy Clin Immunol**, 100, 1-24, 1997.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; WECK, A. L. Dust mite allergens and asthma – a worldwide problem. **J Allergy Clin Immunol**, 83, 416-427, 1989. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(89\)90128-0](https://doi.org/10.1016/0091-6749(89)90128-0)

RAJ, D.; LODHA, R.; PANDEY, A.; MUKHERJEE, A.; AGRAWAL, A.; KABRA, S. K.; NEW DELHI CHILDHOOD ASTHMA STUDY. Aeroallergen sensitization in childhood asthmatics in northern India. **Indian Pediatr**, 50, 1113-1118, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13312-013-0304-9>

RING, J.; KRÄMER, U.; SCHÄFER, T.; BEHRENDT, K. H. Why are allergies increasing? **Curr Opin Immunol**, 13, 701-708, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00282-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00282-5)

ROGER, A.; DEREUX, N.; JURGENS, Y.; HEATH, M. D.; GARCIA, G.; SKINNER, M. A. A novel and well tolerated mite allergoid subcutaneous immunotherapy: evidence of clinical and immunologic efficacy. **Immun Inflamm Dis**, 2, 92-98, 2014. <https://doi.org/10.1002/iid3.23>

ROMAGNANI, S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? **Immunology**, 112, 352-363, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01925.x>

SHAKIB, F.; GHAEMMAGHAMI, A. M.; SEWELL, H. The molecular basis of allergenicity. **Trends Immunol**, 29, 633-642, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.08.007>

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

SIMPLICIO, E. C.; SILVA, D. A. O.; BRAGA, I. A.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite and pet allergen exposure in Midwestern Brazilian hotels. **Indoor Air**, 17, 278-283, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2006.00470.x>

SLY, R. M. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. **Ann Allergy Asthma Immunol**, 82, 233-248, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62603-8](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62603-8)

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.

Clin Immunol Immunopathol, 86, 102-109, 1998.

<https://doi.org/10.1006/clin.1997.4454>

SMITH, H. H.; AKDIS, C. A. In utero priming by worms protects against respiratory allergies. **J Allergy Clin Immunol**, 134, 1280-1281, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.051>

SOKYA, M. B.; VAN DE VEEN, W.; HOLZMANN, D.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Scientific foundations of allergen-specific immunotherapy for allergic disease. **Chest**, 146, 1347-1357, 2014. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0049>

SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; TAKETOMI, E. A. *Dermatophagoides farinae* (Der f 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) allergen exposure among subjects living in Uberlandia, Brazil.

Int Arch Allergy Immunol, 122, 257-263, 2000. <https://doi.org/10.1159/000024407>

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, 299, 1259-1260, 1989. <https://doi.org/10.1136/bmj.299.6710.1259>

SUN, T.; YIN, K.; WU, L. Y.; JIN, W. J.; LI, Y.; SHENG, B.; JIANG, Y. X. . A DNA vaccine encoding a chimeric allergen derived from major group 1 allergens of dust mite can be used for specific immunotherapy. **In J Clin Exp Pathol**, 7, 5473-5483, 2014.

TAKETOMI, E. A.; SILVA, D. A. O.; QUEIROS, M. G. J.; CHIBA, H. F.; ALVES, R.; ALMEIDA, K. C.; YNOUE, L. H.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. S.J. Heterogeneity of the IgE antibody response to major allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* among patients with respiratory allergy: Implications for allergen-specific immunotherapy. **Rev Bras Alerg Immunopatol**, 2, 298-303, 2005.

TAKETOMI, E. A.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; GERVÁSIO, A. M.; ALVES, R.; SUNG, S. J. Differential IgE reactivity to Der p 1 and Der p 2 allergens of *Dermatophagoides pteronyssinus* in mite-sensitized patients. **J Investig Allergol Clin Immunol**, 16, 104-109, 2006.

TAXONOMY. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/taxonomy/6954>. Acesso em: 24 jan. 2016.

THOMAS, W. R.; HEINRICH, T. K.; SMITH, W. A.; HALES, B. J. Pyroglyphid house dust mite allergens. **Protein Pept Lett**, 14, 943-953, 2007. <https://doi.org/10.2174/092986607782541169>

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

TILL, S. J.; FRANCIS, J. N.; NOURI-ARIA, K.; DURHAM, S. R. Mechanisms of immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol**, 113, 1025-1034, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.024>

TOVEY, E. R.; CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. Mite faeces are a major source of house dust allergens. **Nature**, 289, 592-593, 1981. <https://doi.org/10.1038/289592a0>

TRAIDL-HOFFMANN, C.; JAKOC, T.; BEHRENDT, H. Determinants of allergenicity. **J Allergy Clin Immunol**, 123, 558-566, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.003>

VADLAMUDI, A.; SHAKER, M. New developments in allergen immunotherapy. **Curr Opin Pediatr**, 27, 649-655, 2015. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000267>

VAN DER VALK, J. P.; DE JONG, N. W.; GERTH VAN WIJK, R. Review of immunotherapy in airway allergen sensitized patients. **Neth J Med**, 73, 263-269, 2015.

WAMBRE, E. Effect on allergen-specific immunotherapy on CD4+ T cells. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, 15, 581-587, 2015. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000216>

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

WONG, C. K.; HO, C. Y.; KO, F. W. S.; CHAN, C. H. S.; HO, A. S. S.; HUI, D. S. C.; LAM, C. W. K. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and the Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. **Clin Exp Immunol**, 125, 177-183, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01602.x>

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

YNOUE, L. H. **Perfil de reatividade de IgE, IgG4 e IgG1 ao extrato alergênico de *Dermatophagoides farinae* em indivíduos atópicos e não atópicos por meio de imunoproteômica**. 2011. 95 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2011.

YU, C. K.; CHEN, C. L. Activation of mast cells is essential for development of house dust mite *Dermatophagoides farinae*-induced allergic airway inflammation in mice. **J Immunol**, 171, 3808-3815, 2003. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3808>

ZHU, X. X.; LI, Y. J.; YANG, L.; ZHANG, D.; CHEN, Y.; KMONICKOVA, E.; WENG, X. G.; YANG, Q.; ZIDEK, Z. Divergent immunomodulatory effects of extracts and phenolic compounds from the fern *Osmunda japonica* Thumb. **Chin J Integr Med**, 19, 761-770, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11655-013-1460-4>

ZOLKIPLI, Z.; ROBERTS, G.; CORNELIUS, V.; CLAYTON, B.; PEARSON, S.; MICHAELIS, L.; DJUKANOVIC, R.; KURUKULAARATCHY, R.; HASAN ARSHAD, S. Randomized controlled trial of primary prevention of atopy using house dust mite allergen oral immunotherapy in early childhood. **J Allergy Clin Immunol**, 136, 1541-1547, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.04.045>

9. Anexos

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) 3239-4131; e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 476/10 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
174/10

Projeto Pesquisa: Imunoquímica, biologia molecular e engenharia genética no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento de doenças alérgicas respiratórias.

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo 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 de entrega do 1º relatório parcial: agosto de 2011.

Data de entrega do 2º relatório parcial: agosto de 2012.

Data de entrega do relatório final: dezembro de 2013.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO 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, 30 de julho de 2010

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

Anexo B



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Nesta pesquisa, estamos buscando entender o perfil de anticorpos frente à diversas frações de proteínas de diferentes espécies de ácaros da poeira domiciliar. Para isso, você será submetido à realização de teste alérgico a aeroalérgenos para triagem dos pacientes e indivíduos saudáveis que participarão do estudo.

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

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

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

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

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

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

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

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

Dr. Ernesto A. Taketomi
Avenida Pará, 1720 Bloco 4C Campus Umuarama
Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia-MG
Tel.: (34)3218-2398 / Telefax: (34) 3218-2333

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

Uberlândia, ____ de ____ de ____.

Assinatura

Anexo C



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

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

Questionário 1 (Módulo Asma)

- 1) Alguma vez na vida você teve sibilos (chiado no peito)?
() Sim () Não
- Se você respondeu “não”, passe para a questão número 7.
- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito) ?
() Sim () Não
- 3) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?
Nenhuma crise ()
- 4) Nos últimos 12 (doze) meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?
Nunca acordou com chiado ()
Menos de uma noite por semana ()
Uma ou mais noites por semana ()
- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?
() Sim () Não
- 6) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?
() Sim () Não
- 7) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?
() Sim () Não
- 8) Alguma vez na vida você teve asma?
() Sim () Não

Questionário 2 (Módulo Rinite)

- Todas as perguntas deste módulo são sobre problemas que ocorreram quando você não estava gripado ou resfriado.

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