



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgE DE PACIENTES ATÓPICOS A ANTÍGENOS
DE *Dermatophagoides pteronyssinus* (ACARI: PYROGLYPHIDAE)
LIGANTES DE CONCAVALINA A**

Rafael de Oliveira Resende

Monografia apresentada à coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho de 2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgE DE PACIENTES ATÓPICOS A ANTÍGENOS
DE *Dermatophagoides pteronyssinus* (ACARI: PYROGLYPHIDAE)
LIGANTES DE CONCANAVALINA A**

Rafael de Oliveira Resende

Ernesto Akio Taketomi

Monografia apresentada à coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho de 2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

REATIVIDADE DE ANTICORPOS IgE DE PACIENTES ATÓPICOS A ANTÍGENOS
DE *Dermatophagoides pteronyssinus* (ACARI: PYROGLYPHIDAE)
LIGANTES DE CONCAVALINA A

Rafael de Oliveira Resende

Aprovado pela Banca Examinadora em 24/07/03 Nota 100

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Orientador / Membro da Banca Examinadora

Ana
Universidade Federal de Uberlândia
Prof.^a Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Margareth Leitão Gennari Cardoso
Prof.^a Dr.^a Margareth Leitão Gennari Cardoso
Membro da Banca Examinadora

Maria Aparecida de Souza
Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Souza
Membro da Banca Examinadora

Uberlândia, 24 de julho de 2003.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Maria das Graças, meus irmãos, Cícero e Juliano, e minha avó, D. Odete que acompanharam, assiduamente, cada etapa da minha graduação;

À minha namorada, Paula, por me proporcionar momentos de compreensão, carinho, companheirismo e inspiração;

A todos os amigos da 51ª Turma de Ciências Biológicas, *Los Coleópteros*, pelos momentos de alegria que tornaram esses quatro anos os mais felizes de minha vida;

Ao meu orientador, Prof. Ernesto, pelos ensinamentos oriundos de sua ilustre experiência profissional, além da gratificante confiança depositada em meu trabalho;

À Profª Deise, que com profissionalismo e uma inusitada dose de "maternidade científica" me acolheu durante toda a elaboração e execução deste trabalho;

À Mônica, pelo imensurável auxílio na condução dos experimentos, montagem do trabalho e aquisição de certos conhecimentos quase sempre incompatíveis a alunos de graduação;

Aos grandes amigos do grupo de alergia: Leandro, Ronaldo, Priscila, Fernando, Iolanda, Celi e Edsonéia, por dividir comigo os momentos de alegria, dedicação, apreensão, satisfação e alterações bruscas em nossos ritmos circadianos;

Aos membros da banca examinadora, Profª Maria Aparecida e Profª Margareth pela disponibilidade e aceitação em discutir, orientar, localizar e auxiliar na correção de eventuais erros e inconveniências observados neste estudo;

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia: Max, Ana Cláudia, Junão e Andréia; e do Hospital de Clínicas: Antônia (e demais técnicas de enfermagem), Odelmo (secretário) e Roberto (chefe do Laboratório de Análises Clínicas), pelo auxílio prestado ao decorrer de todas as etapas deste trabalho;

Aos meus mestres da disciplina de Imunologia, Prof. José Roberto Mineo, Prof. Rodolfo Mendes, Prof^a Janethe Pena e Prof^a Aurélia Gervásio, que me auxiliaram, direta ou indiretamente, desde os primeiros ensinamentos da Imunologia até a escolha da área para execução desta monografia;

Aos atuais pesquisadores do Laboratório de Imunologia: Vânia, Fernanda Caroline, Fernanda Santiago, Cíntia, Marta, Prof^a Neide, Tiago, Renato, Wesley, Serginho, Janaína, Edmar, Francielle, Sandra e Adriano; e aos antigos pesquisadores: Karine, Érika, Valeska, Gesmar, Jair Júnior, Cristiane e Elizabeth, pela solidariedade prestada nas atividades diárias do laboratório;

Aos pesquisadores dos laboratórios de Biologia Molecular e Bioquímica (Prof. Foued Salmen Spíndola) e Genética Molecular (Prof. Luiz Ricardo Goulart), pela gentileza em permitir a utilização de seus equipamentos;

Ao Prof. Federico Montealegre, do Laboratório de Imunoquímica da Escola Médica de Ponce, Porto Rico, pela gentileza na doação dos ácaros em meio de cultura e Prof. Sun-Sang Joseph Sung, da Divisão de Reumatologia da Universidade de Virgínia, EUA, pela doação da resina de *ConA-Sepharose* e do eluente *metil- α -D-manopiranosídeo*;

A todos os meus ex-alunos do Pré-Vestibular Futuro que se dispuseram a me auxiliar como voluntários, doando parte do seu sangue para este estudo;

A todos que não mencionei e tiveram participação direta ou indireta na elaboração, execução e conclusão deste trabalho.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Maria das Graças,
pelo exemplo de trabalho e dedicação,
que sempre os fizeram superar todas as dificuldades.*

Este estudo foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), projeto B-003/2002, durante o período de agosto de 2002 a julho de 2003.

RESUMO

O ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* têm sido considerado como uma das principais fontes de alérgenos da poeira domiciliar causadores de alergias respiratórias. Alguns de seus alérgenos são glicosilados e podem apresentar alta imunogenicidade. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as frações ligantes de ConA, analisando sua reatividade a anticorpos da classe IgE de pacientes alérgicos. O extrato bruto do ácaro (Dpt) foi fracionado por cromatografia de afinidade de ConA-Sepharose, constituindo a fração ligante de ConA (ConA/Dpt). Noventa e cinco indivíduos foram selecionados por teste cutâneo de punção e divididos em três grupos distintos: Grupo I (n=35) - pacientes alérgicos reativos a Dpt pelo teste cutâneo; Grupo II - pacientes alérgicos não reativos a Dpt (n=30) e Grupo III - indivíduos não alérgicos saudáveis (n=30). Por SDS-PAGE, foram visualizadas na fração ConA/Dpt bandas de peso molecular variado. Houve uma significativa correlação positiva entre IgE específica anti-Dpt e anti-ConA/Dpt para o Grupo I ($r = 0,8367$; $p < 0,0001$), determinados por ELISA, demonstrando ser a fração ligante de ConA uma importante ferramenta na determinação da sensibilização ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Palavras-chave: IgE; alérgeno glicosilado; rinite alérgica

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
	1.1. Hipersensibilidade e atopia	2
	1.1.1. Alergia	4
	1.1.1.1. Fisiopatologia	5
	1.1.1.2. Asma	6
	1.1.1.3. Rinite	7
	1.1.1.4. Imunoterapia	7
	1.2. Alérgenos	8
	1.3. Imunoglobulina E (IgE)	9
	1.4. Ácaros da poeira domiciliar	11
	1.4.1. <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	12
	1.4.1.1. Alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i>	13
	1.5. Lectinas e concanavalina A	15
2.	OBJETIVOS	15
3.	MATERIAL E MÉTODOS	16
	3.1. Aspectos éticos	16
	3.2. Casuística	17
	3.3. Teste cutâneo de puntura (TCP)	18
	3.4. Coleta de sangue	18
	3.5. Preparação do extrato alergênico (Dpt)	18
	3.5.1. Para testes sorológicos	19
	3.5.2. Para testes cutâneos	19
	3.6. Cromatografia de afinidade	20
	3.7. Dosagem protéica	21
	3.8. SDS-PAGE	22
	3.9. ELISA	22
	3.9.1. Quantificação de anticorpos IgE	23
	3.9.2. Determinação dos níveis de anticorpos	23
	3.10. Análise estatística	23
	3.11. Normas de biossegurança	24
4.	RESULTADOS	25
	4.1. Dados clínicos e demográficos	26
	4.2. Teste cutâneo de puntura (TCP)	27
	4.3. Fracionamento cromatográfico	28
	4.4. Dosagem protéica	29
	4.5. Perfil eletroforético	30
	4.6. Níveis de IgE específica	31
	4.6.1. Tamanho da pápula e níveis de IgE específica	31
	4.6.2. Correlação entre os níveis de IgE específica anti-Dpt e anti-ConA/Dpt	32
5.	DISCUSSÃO	33
6.	CONCLUSÕES	37

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
APÊNDICE 1. Comitê de Ética em Pesquisa	
APÊNDICE 2: Termo de consentimento	
APÊNDICE 3: Questionário clínico	
APÊNDICE 4: Dados demográficos, clínicos e laboratoriais	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipersensibilidade e atopia

O termo hipersensibilidade é aplicado para designar uma resposta imune adaptativa que ocorre de forma exagerada ou inapropriada (ROITT et al., 1999). A primeira classificação da hipersensibilidade foi proposta por Gell e Coombs (1968), dividindo-a em hipersensibilidade do tipo I, II, III e IV, os quais possuem características semelhantes entre si. Apesar de esta ser uma nomenclatura que vem sendo utilizada até os dias atuais, há dois anos atrás, Johansson et al. (2001) propuseram uma nova classificação, que caracterizam as hipersensibilidades como sintomas ou sinais iniciados pela exposição a um estímulo definido em uma dose tolerada por indivíduos normais. Sendo subdividida em hipersensibilidade alérgica e hipersensibilidade não alérgica, onde na primeira, o mecanismo imunológico é definido ou fortemente suspeito e, na segunda, ele é excluído.

Os indivíduos que são predispostos a produzirem anticorpos IgE, em resposta aos vários antígenos ambientais, e, que têm fortes respostas de hipersensibilidade imediata são classificados como atópicos e são considerados como tendo alergias (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

No início dos anos 20, Coca e Cooke (1923) introduziram o termo "atopia" para designar alguns fenômenos de hipersensibilidade no homem. Afirmaram estar ligados à atopia a hereditariedade, a resposta qualitativa anormal, a febre do feno, a asma brônquica e as reações cutâneas do tipo imediata. A definição proposta por Johansson et al. (2001) indica que a atopia é uma tendência pessoal ou familiar de produzir anticorpos IgE, em resposta a baixas doses de alérgenos, geralmente proteínas, e desenvolver sintomas típicos como asma, rinoconjuntivite ou eczema.

1.1.1. Alergia

A alergia é uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos, dentre eles, células e anticorpos. Esses últimos podem ser do isotipo IgE (alergia mediada por IgE) ou outros isotipos (alergia não mediada por IgE). As células de papel principal nesta reação são os linfócitos (JOHANSSON, 2001).

Sabe-se hoje que há uma forte aliança entre a genética e o desenvolvimento de alergias. O aumento nos níveis de IgE sérica e a prevalência de asma e rinite estão relacionados ao perfil hereditário do indivíduo. Além disso, seu desenvolvimento depende efetivamente de fatores extrínsecos como o nível de exposição aos alérgenos, estado nutricional do indivíduo e a presença de infecção crônica por doenças virais agudas (COOKSON, 1999; ROITT et al., 1999).

Os hábitos de vida que a população atualmente possui, fazem com que haja a necessidade de maiores explicações a respeito desta anomalia, sob os mais diversos aspectos. Estes modos, onde grande parte da população permanece durante muito tempo em ambientes fechados, expostos a carpetes, sistemas de ar condicionado e calefação, induzem, segundo Takafuji e Nakagawa (2000), ao aumento significativo da exposição a muitos fatores de risco em potencial para desencadear doenças alérgicas, como por exemplo, algumas micro e macropartículas presentes na poeira domiciliar, como pólenes, ácaros e fungos (PLATTS-MILLS et al., 1993).

Para Woolcock (2000), a alergia se tornou o principal problema de saúde em muitas sociedades modernas, onde sua prevalência aumentou em até 34% em crianças e 16,3% em adultos, entre as décadas de 60 e 90. Desta forma, um estudo

feito pelo comitê *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*, em 1998, adotando um questionário padronizado, revelou que os mais altos índices de prevalência da doença foram encontrados na Austrália, Nova Zelândia, Reino Unido, Estados Unidos e algumas cidades da América Latina. Ao contrário, os índices mais baixos foram encontrados em países não industrializados e áreas tipicamente rurais.

Em estudo revisado por Ring et al. (2001), diversos autores apontam hipóteses que revelam um crescimento acelerado da prevalência de alergia em países ocidentais, tidos como países de sociedades modernas. Dentre elas, destacam-se a influência de fatores químicos, físicos, biológicos e psico-sociais, como causadores e adjuvantes, além de fatores de predisposição genética populacional e fisiológica.

No Brasil, os estudos de prevalência alérgica mostram dados relevantes. Lugares públicos, como escolas e creches, são considerados locais de grande fontes de ácaros da poeira domiciliar e baratas (RULLO et al., 2002) e a exposição a estes constitui um importante fator de risco para desenvolvimento de asma brônquica (PLATTS-MILLS; CHAPMAN, 1987), especialmente em crianças de idade escolar (SMITH; DISNEY; WILLIAMS, 1969; SEARS; HERVISON; HOLDAWAY, 1989). Percebe-se também, que áreas urbanizadas apresentam maiores índices de sensibilização a ácaros da poeira domiciliar e fungos, comparadas a áreas tipicamente rurais, reforçando ainda mais a hipótese da influência da poluição urbana no aumento de patologias respiratórias (GALVÃO; KALIL; CASTRO, 2002).

Entretanto, um estudo realizado entre 1996 e 1999, por Camelo-Nunes et al. (2001), mostrou que não houve aumento significativo da prevalência de asma em crianças escolares de São Paulo neste período. Porém, notaram um aumento considerável na gravidade dos sintomas desta doença na população analisada.

Estes dados demonstram que a alergia é uma doença que está presente em grande parte dos países do mundo e que estudos epidemiológicos estão crescendo a ponto de esclarecer diversos aspectos envolvendo a prevalência alérgica e sua importância na prevenção e no tratamento hipossensibilizante.

1.1.1.1. Fisiopatologia

A alergia é uma reação do sistema imune mediada por anticorpos IgE. Estes anticorpos ligam-se aos receptores Fcε presente em mastócitos e basófilos, e cruzadamente nos antígenos, levando à liberação de mediadores farmacológicos.

Dois perfis de células T auxiliar podem caracterizar o sistema imune mediado por células CD4+: Th1 e Th2. O tipo de resposta da célula T efetora gerada *in vivo* é determinada pela concentração do antígeno, via de apresentação e presença de sinais inflamatórios, que influenciam a ativação da APC (Célula Apresentadora de Antígeno) e maturação de células dendríticas, regulando de forma crescente, as moléculas coestimulatórias - CD80 e CD86, proteínas do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe II, e produção de citocinas, bem como seus receptores (CELLA et al., 1997; SALLUSTO et al., 1998). A interação entre APCs e células T CD4+ durante a apresentação de antígeno envolve a ligação do receptor específico de célula T (TCR) pelo MHC de classe II. Na ausência de sinal coestimulatório, a ligação do TCR induz a uma inativação funcional e anergia (HOWLAND et al., 2000). Desta forma, as alergias podem ser consideradas como doenças dependentes das células Th2, pois essas produzem IL-4, necessária para a produção de IgE e IL-5, que induz a eosinofilia.

A ativação dos mastócitos e basófilos resulta em três tipos de respostas biológicas: secreção dos conteúdos pré-formados dos seus grânulos por um processo de exocitose regulada; síntese e secreção de mediadores lipídicos; e secreção de citocinas. Uma das hipóteses da ligação cruzada da IgE ao antígeno para degranulação é a ativação de proteínas tirosina-quinases, que por sua vez, promovem a ativação de uma cascata de proteínas quinases ativadas por mitógeno e uma fosfolipase C específica ao fosfatidilinositol (PI-PCLγ). A PI-PCLγ catalisa a liberação do trifosfato de inositol (IP₃) e do diacilglicerol (DAG) da membrana. A IP₃ causa a liberação do cálcio intracelular (Ca²⁺) do retículo endoplasmático. A combinação desta molécula, associada ao DAG e fosfolipídios da membrana para ativarem a proteína quinase C, induz a liberação dos mediadores pré-formados (TNF-α, IL-4, histamina, heparina, serotonina e proteases). A combinação de Ca²⁺ e uma proteína quinase ativada por mitógeno (MAP-quinase) ativam a enzima

fosfolipase A₂ cíclica (cPLA₂), que por sua vez, inicia a síntese dos mediadores lipídicos (leucotrieno C₄, prostaglandina D₂). Juntas estas moléculas apresentam efeito importante na ativação e recrutamento das células inflamatórias, além da contração da musculatura lisa associada à doença alérgica (ROBBIE-RYAN; BROWN, 2002; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

Um dos principais mediadores pré-formados sintetizados é a histamina. Os efeitos farmacológicos deste composto são mediados por quatro tipos de receptores de membrana – H1R, H2R, H3R e H4R. Estes receptores são caracterizados por apresentarem um sistema complexo, com funções e mecanismos de expressões distintos, que podem mudar de acordo com o estágio de diferenciação celular, bem como o microambiente (JUTEL et al., 2002).

O sistema complemento também exerce função primordial na imunopatologia da alergia. Os peptídeos catiônicos C3a e C5a agem como anafilatoxinas, afetando a contração da musculatura lisa, aumentando a permeabilidade vascular, ativando a produção de atividades oxidases em neutrófilos e eosinófilos, além de atuar como fator quimiotático para uma ampla variedade de leucócitos. Recentemente, um estudo feito por Kikuchi e Kaplan (2002) demonstrou que a liberação de histamina dos basófilos estimulados com IgG de pacientes com urticária crônica foi aumentada significativamente pelo C5a. Além disso, outra comprovação do papel do complemento foi feita por Humbles et al. (2000), onde o receptor para C3a (C3aR) foi deletado em camundongo para verificar sua função nos eosinófilos. Os resultados mostraram uma proteção completa no desenvolvimento de hipersensibilidade a metacolina nestes animais.

1.1.1.2. Asma

A asma é uma doença caracterizada pela inflamação do trato respiratório inferior, induzindo um quadro de hiperreatividade brônquica. Pode ser, segundo Johansson et al. (2001), de natureza alérgica ou não alérgica, sendo que a asma alérgica é mediada por mecanismos imunológicos, o que não é notado no segundo tipo.

Pode-se observar características peculiares com relação à patologia da asma, como: enchimento dos pulmões, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa dos brônquios e excessiva secreção de muco. Percebe-se também, microscopicamente, uma hiperplasia e hipertrofia de glândulas mucosas, além de descamação epitelial e presença de infiltrado de células inflamatórias. Essas características levam o indivíduo a apresentar os principais sintomas – o chiado e a dispnéia (TERR, 1997).

O mapeamento do genoma relacionado à asma em 11 populações revelou pelo menos 18 regiões genômicas onde provavelmente se localizam genes da asma ou atopia. As regiões replicadas mais consistentes estão nos cromossomos 5q, 2q, 13q, 5p e 12q. Todas essas regiões incluem genes candidatos que estão atualmente sendo investigados em diversos estudos. Genes relacionados à via IL-4 e IL-13 são particularmente intrigantes devido à variedade de funções na fisiopatologia da asma. Além disso, variação em genes codificantes destas citocinas e suas regiões intergênicas, bem como o principal sinal de tradução da molécula tem sido associada aos sintomas de asma (HOFFJAN; OBER, 2002).

Segundo estudo recente realizado por Beasley (2002), a asma afeta quase 155 milhões de indivíduos no mundo inteiro e bilhões de dólares são gastos por ano, nos diversos países do mundo, para o seu tratamento.

1.1.1.3. Rinite

A rinite alérgica é definida como uma reação de hipersensibilidade nasal mediada imunologicamente, onde se observam sintomas característicos como: rinorréia, obstrução e prurido nasal, espirros e prurido palatino, além de conjuntivite, acompanhada de lacrimejamento, prurido conjuntival e fotofobia (TERR, 1997; JOHANSSON, 2001).

Nesta doença, o alérgeno solúvel é inspirado, entrando em contato com a mucosa nasal, onde há resposta de IgE em mastócitos e basófilos locais, levando à liberação de mediadores farmacológicos no local. Sua absorção através da mucosa nasal ocorre principalmente por difusão passiva pela barreira intercelular formada pelas junções comunicantes. (TERR, 1997).

Para Abbas, Litchman e Pober (2003), a rinite é talvez a doença alérgica mais freqüente na população, sendo desencadeada por alérgenos comuns, como pólen de plantas ou ácaros da poeira doméstica.

1.1.1.4. Imunoterapia

Uma das formas de tratamento de doenças alérgicas é a imunoterapia. Ela tem sido utilizada como base para o tratamento da asma e rinite alérgica desde os primeiros anos do século XX. Nesta técnica são aplicadas doses crescentes de extrato alergênico, aumentando assim, a tolerância imunológica. Concomitantemente, existe um aumento inicial nos níveis de IgG e IgE ao antígeno específico, até que finalmente, níveis de IgG atinjam uma fase de *plateau*, acima dos níveis do pré-tratamento, ao passo que os níveis de IgE passam a decrescer lentamente (VAN METRE JR.; ADKINSON JR., 1993).

1.2. Alérgenos

Antígenos que estimulam hipersensibilidade mediada por um mecanismo imunológico são nomeados alérgenos, segundo Johansson (2002). Muitas vezes, estes são proteínas que podem conter uma cadeia lateral de carboidrato, outras vezes, esse sacáride pode ser o próprio alérgeno e em raros casos, compostos inorgânicos podem atuar como haptenos, sendo assim também considerados alérgenos.

A atual nomenclatura oficial para os alérgenos foi proposta pela Organização Mundial de Saúde em 1994, segundo King et al. (1995). O nome é composto pelas três primeiras letras do gênero e a primeira letra (ou mesmo as duas primeiras, no caso de ambigüidade) da espécie a partir da qual o alérgeno é derivado, acrescido de um número arábico, que denota o grupo ao qual pertence. O alérgeno do grupo 1 derivado de *Dermatophagoides pteronyssinus* é chamado, desta forma, de Der p 1. Já o termo Blo t 5 refere-se ao alérgeno do grupo 5 de *Blomia tropicalis*.

Muitos alérgenos podem apresentar sítios glicosilados, o que parece ser um importante determinante para sua alergenicidade. Os oligossacarídeos aderem às

proteínas, geralmente entre os aminoácidos asparagina e serina/treonina, antes ou após a síntese protéica. Desta forma, isto influencia em várias de suas propriedades, como estabilidade, solubilidade, hidrofobicidade e até mesmo sua carga elétrica (PETERSEN et al., 1998; WEBER et al., 1987). Entretanto, pouco se sabe sobre estes alérgenos, o que reforça a necessidade de estudos verificando a influência destas cadeias glicosiladas na sua apresentação a células do sistema imune e no desencadeamento da resposta alérgica.

1.3. Imunoglobulina E (IgE)

As imunoglobulinas, também chamadas de anticorpos, constituem um grupo de glicoproteínas presentes no soro e fluidos teciduais de todos os mamíferos. São bifuncionais, onde uma região da molécula é responsável pela ligação ao antígeno, enquanto a região diferente promove as chamadas funções efetoras, que incluem a fixação das imunoglobulinas ao tecido do hospedeiro, às várias células do sistema imune, a algumas células fagocitárias e ao C1q da via clássica do sistema complemento. A estrutura básica de todas as imunoglobulinas consiste de uma unidade com duas cadeias polipeptídicas leves idênticas, e duas pesadas, unidas por pontes dissulfeto. As classes e subclasses de uma molécula de imunoglobulina são determinadas por suas cadeias pesadas (ROITT et al., 1999). As classes de imunoglobulinas conhecidas nos mamíferos são IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

A IgE é o isotipo de anticorpo que contém a cadeia pesada ϵ . Circula como um anticorpo bivalente e está normalmente presente no plasma em concentração inferior a 1 $\mu\text{g/ml}$. Em condições patológicas, tais como as infecções helmínticas e na atopia severa, esse nível pode subir para mais de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003). Uma característica importante da IgE é sua capacidade de se ligar aos mastócitos e basófilos com alta afinidade, através de sua porção F_{ce} , como demonstrado por Ishizaka e Ishizaka (1966). Embora sua meia vida no soro seja de alguns dias, os mastócitos podem permanecer sensibilizados pela IgE por muitos meses como resultado da ligação de alta afinidade aos receptores F_{ceRI} , com constante de ligação de aproximadamente 10^{10} M^{-1} , protegendo a IgE da destruição pelas proteínas séricas. O outro receptor para IgE, F_{ceRII} ou CD23,

possui uma menor afinidade pela imunoglobulina e se apresenta em duas formas, FcεRIIIa e FcεRIIIb, diferindo-se apenas pela região citoplasmática N-terminal (ROITT et al., 1999). Recentemente, Saini e McGlashan (2002) apresentaram quatro aspectos da biologia do receptor de IgE que possuem influência significativa no entendimento do sistema imune, são elas a) habilidade da IgE em regular a expressão de FcεRI, b) capacidade da IgE monomérica de induzir a sobrevivência, c) presença de receptores de alta afinidade em outros tipo celulares, criando uma reatividade com a imunoglobulina e, d) o papel que as subunidades do FcεRI desempenham na determinação do sinal da IgE nas células onde são expressos.

A ligação da IgE, bem como qualquer anticorpo, com o antígeno se dá pela formação de múltiplas ligações não-covalentes entre o antígeno e os aminoácidos anticórpicos do local de união. Embora as forças de atração (especialmente, pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas, Van der Waals e hidrofóbicas) envolvidas nestas uniões sejam individualmente fracas em comparação com as ligações covalentes, a multiplicidade das ligações resulta em uma energia de ligação total suficientemente forte (ROITT et. al, 1999).

1.4. Ácaros da poeira domiciliar

Os ácaros estão entre os vários grupos que ocupam microambientes não comuns, como cavidade nasal de pássaros e mamíferos, traquéia de insetos, folículos capilares de humanos e pele de répteis e mamíferos, além de algumas plantas. Existem também espécies predadoras, comedoras de fungos e detritos (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

Um dos eventos mais importantes da história da alergia foi a descoberta de que os ácaros são as principais fontes de alérgenos na poeira domiciliar, por Voorhorst et al (1967). Em áreas úmidas, estes animais podem ser responsáveis por mais de 30% da positividade dos testes cutâneos para diagnóstico de alergia, constituindo uma forte associação entre sua prevalência e o aumento significativo de asma, rinite e dermatite atópica (PLATTS-MILLS et al., 1997; ARRUDA et al., 1991). Dentre as espécies que induzem reações alérgicas estão *Panonychus citri*, *Tetranychus urticae*, *Hemisarcoptes cooremani*, *Sarcoptes scabiei*, *Glycypaghus*

domesticus, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Acaus siro*, *Chortoglyphus anculatus* e principalmente *Blomia tropicalis*, *Euroglyphus maynei*, *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus* (ARLIAN, 1996; VAN HAGE-HAMSTEN, 1985; ARLIAN; MORGAN; HOUCK, 1999).

Arruda e colaboradores (1991) realizaram um importante estudo sobre a sensibilização e exposição a alérgenos de ácaros entre as crianças asmáticas na cidade de São Paulo-SP. De forma regular, foi verificado aumento dos níveis de IgE específica a *Dermatophagoides pteronyssinus* em quase todas as crianças estudadas (95%). Além disso, os autores encontraram altos níveis de exposição aos dois principais alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) em 90% das residências avaliadas. Seguindo a mesma linha de pesquisa, há dois anos atrás, um estudo realizado por Sopelete et al. (2000) revelou que na cidade de Uberlândia-MG, *Dermatophagoides farinae* foi a espécie mais prevalente nas residências analisadas, apesar de também serem detectados níveis consideráveis de alérgenos de *D. pteronyssinus*. Adicionalmente, esse estudo mostrou ser as camas os principais locais de maior prevalência destes alérgenos dentro das residências, sem diferença significativa entre casas de pacientes asmáticos e não asmáticos.

Esses dados comprovam a importância dos ácaros da família Pyroglyphidae na sensibilização alérgica no Brasil e tendem a contribuir para estudos mais detalhados sobre estes animais, com o objetivo de conhecer suas propriedades alérgicas, como forma de diminuir ou controlar a incidência de doenças alérgicas desencadeadas por ácaros da poeira domiciliar.

1.4.1. *Dermatophagoides pteronyssinus*

Ácaros da espécie *Dermatophagoides pteronyssinus* constituem uma das principais fontes de alérgenos domiciliares (ARLIAN; MORGAN; NEAL, 2002). Foi descrito por Trouessart, em 1897, e sua classificação taxonômica foi revisada por Arlian e Platts-Mills (2001) onde, abreviadamente, se descreve, com complemento de Taxonomy Browser (2003):

Filo	Arthropoda
Subfilo	Chelicerata
Classe	Arachnida
Ordem	Acari
Subordem	Astigmata
Família	Pyroglyphidae
Gênero	<i>Dermatophagoides</i>
Espécie	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>

Para Lebrun et al. (1991), a poeira domiciliar é considerada seu habitat substituto, uma vez que seu habitat original provavelmente constitui de ninho de pássaros e pequenos mamíferos. O mecanismo de dispersão deste animal, incluindo a ocupação de seus habitats é favorecido pela sua morfologia, sendo desta forma, considerados como "plânctons aéreos". Além disso, adotando uma estratégia de vida r , a reprodução em massa é uma característica marcante, pois assim consegue ocupar um determinado ambiente em uma velocidade de tempo relativamente alta.

O ciclo de vida do *D. pteronyssinus* consiste de cinco estágios: ovo, larva, protoninfa, tritoinfa e adulto e a duração deste ciclo é fortemente influenciado pela temperatura e umidade relativa do ambiente (ARLIAN, 1989; WALTZI, 1992; HART, 1998). O macho mede aproximadamente 350 μm de comprimento, quase duas vezes menor do que a fêmea (590 μm) (WALZL, 1991).

1.4.1.1. Alérgenos de *D. pteronyssinus*

São conhecidas hoje várias proteínas alergênicas de *D. pteronyssinus*, onde alguns são glicosilados. Esses peptídeos são divididos em grupos, de acordo com sua característica enzimática. Os principais alérgenos deste ácaro são os pertencentes aos grupos 1 e 2 (Der p 1 e Der p 2). O primeiro possui um sítio de glicosilação com atividade de cisteína-protease, apresentando homologia com papaína, actinidina e catepsinas B e H (CHUA et al., 1988). O segundo não possui função definida, porém, sabe-se que apresenta homologia com a proteína epididimal putativa humana e não possui qualquer sítio glicosilado (CHUA et al., 1990).

Além do Der p 1, outros alérgenos apresentam sítios glicosilados, como os alérgenos do grupo 4, 7 e 8 (KAWAMOTO et al., 2002). Em estudo realizado por Hales et al. (2000), foi demonstrado que a resposta de IL-5 a alérgenos do grupo 1 e 7 foram equivalentes, apesar de ser observada uma baixa frequência de ligantes de IgE do grupo 7, além de uma baixa imunogenicidade.

Alguns alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, incluindo *D. pteronyssinus* têm sido atualmente caracterizado em sua estrutura molecular, produzindo assim, compostos recombinantes, que tendem a ser utilizados também na prática clínica. Recentemente, van Oort et al. (2002) produziram precursor de Der p 1 recombinante (rpro-Der p 1), efetuando sua maturação induzida por deglicosilação e pela atividade protease natural de Der p 1. Estes estudos são de extrema importância, uma vez que o papel destes alérgenos na sensibilização, diagnóstico e imunoterapia poderão ser mais esclarecidos.

1.5. Lectinas e concanavalina A

O termo lectina (do latim *legere*, escolher) foi variavelmente descrito desde a sua primeira denominação, por Boyd e Shapleigh (1954). Hoje, percebe-se que grande parte dos autores as definem de diferentes formas, porém, com o mesmo conceito básico: "proteínas que se ligam a carboidratos de forma seletiva", como Goldstein et al. (1980), Dixon (1981), Kocourek e Horejski (1983), Pusztai (1991), Weis e Dickamer (1996) e Cummings (1997). Desta forma, adotando as descrições das diferentes propriedades das lectinas, pode-se defini-las, segundo Roque-Barreira (1997), como: "proteínas ligantes de carboidratos, não anticórpicas e não enzimáticas, que ligam de modo reversível e específico a mono e oligossacarídeos".

A primeira descrição de uma lectina foi feita há 116 anos, por Stillmark, através do estudo de semente de mamona (*Ricinus communis*), onde observou aglutinação de eritrócitos de diferentes animais. O princípio ativo isolado foi denominado ricina. Quatro décadas mais tarde, Summer e Howell (1936), purificaram pela primeira vez a concanavalina A, uma lectina ligante de manose e glicose, do extrato da semente do feijão, *Canavalia ensiformes*, onde analisaram sua atividade hemaglutinante, sugerindo que a aglutinação induzida pela lectina pode

ocorrer por reação com açúcares na superfície eritrocitária. Além disso, foi a primeira lectina da família Leguminosae a ser seqüenciada e ter sua estrutura determinada por cristalografia de raio X (CUNNINGHAM et al., 1975; HARDMAN e AINSWORTH, 1972; BECKER et al., 1975).

O uso da concanavalina A em diversas propriedades glicobiológicas, vem sendo estudado por vários autores desde sua descoberta. Os primeiros experimentos envolvendo seu uso em cromatografias de afinidade foram realizados por Lloyd e Bitoon (1971) e Steinemann e Stryer (1973), com a utilização da lectina, imobilizada em agarose ou fluoresceïnada, para isolamento de polissacárides e glicoproteínas para identificação de componentes glicosilados em tecidos animais. Em ácaros, proteínas de alto peso molecular de *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* foram isoladas e caracterizadas imuno e físico-quimicamente por Baldo e Uhlenbruck (1977) e por Stewart e Turner (1980), utilizando cromatografia de afinidade de concanavalina A, onde suas propriedades alergênicas foram avaliadas. Além disso, recentemente, Almeida et al. (2002) identificaram componentes glicosilados de *Blomia tropicalis*, através de fracionamento cromatográfico de afinidade a ConA-Sepharose, analisando a reatividade de anticorpos IgE de pacientes alérgicos ao extrato bruto e ao extrato fracionado, observando-se uma correlação positiva entre os níveis destes anticorpos e alérgenos fracionados do ácaro, através de ELISA e *immunoblotting*.

Vários estudos têm adotado a concanavalina A como ferramenta valiosa na detecção e no isolamento de glicoproteínas. Desta forma, sua utilização para a análise de alérgenos glicosilados, através de cromatografia, pode indicar um avanço para melhor conhecimento das propriedades bioquímicas e imunológicas destes antígenos, auxiliando assim no diagnóstico e tratamento de doenças alérgicas.

2. OBJETIVOS

- Identificar as frações de *Dermatophagoides pteronyssinus* ligantes de concanavalina A;
- Analisar a reatividade destes compostos frente a anticorpos IgE de pacientes atópicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracteres éticos

O projeto de pesquisa foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP / UFU), órgão do Conselho Nacional de Saúde, e aprovado, sem restrições, em 02 de maio de 2002, sob processo n° 039/2002 (Apêndice 1).

Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento (Apêndice 2), onde foram informados sobre todos os procedimentos adotados, esclarecendo eventuais dúvidas. Responderam, em seguida, a um questionário (Apêndice 3), segundo os critérios adotados pelo *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC, 1998), para avaliação de seu histórico clínico de alergia.

3.2. Casuística

Um total de 95 indivíduos, oriundos de Uberlândia e outras cidades da região do Triângulo Mineiro-MG, de ambos os sexos, com idade variando de 18 a 54 anos, foram selecionados e atendidos no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da UFU, por meio de marcação de consulta, durante o período de maio de 2002 a junho de 2003.

Os atendimentos foram realizados por membros da Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica e constaram de anamnese, realização de Teste Cutâneo de Puntura (TCP) a diferentes alérgenos inaláveis domiciliares e coleta de sangue, sob acompanhamento médico do Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi.

Os indivíduos foram divididos em três grupos, de acordo com o histórico clínico de asma e /ou rinite alérgica e reatividade ao teste cutâneo de puntura (TCP):

- Grupo I (n=35) – Indivíduos com histórico clínico de asma e/ou rinite alérgica, alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus*;
- Grupo II (n=30) – Indivíduos com histórico clínico de asma e/ou rinite alérgica, não alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus*;
- Grupo III (n=30) – Indivíduos saudáveis, sem histórico clínico de asma e/ou rinite alérgica e não reativos a quaisquer alérgenos testados (indivíduos controles).

Os critérios de exclusão para a execução do estudo compreenderam indivíduos:

- Com idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos;
- Que apresentaram lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;
- Em tratamento com drogas antiinflamatórias esteroidais e/ou anti-histamínicos de primeira ou segunda geração;
- Que não apresentaram sintomas clínicos para rinite e/ou asma alérgica, mas foram positivos ao teste cutâneo;
- Que não tiveram o sangue coletado por algum motivo;
- Que não assinaram o Termo de Consentimento;
- Que se recusaram a participar do estudo por motivos pessoais.

3.3. Teste cutâneo de puntura (TCP)

A hipersensibilidade imediata foi avaliada pelo método de puntura, de acordo com a Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica - EAACI (1993), descrito anteriormente por Ownby (1988). Para a realização do teste, foram utilizados extratos brutos dos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*, todos a 2 mg/mL, preparados no Laboratório de Imunologia da UFU. Para o controle positivo, utilizou-se histamina a 10 mg/mL (IPI/ASAC Brasil, São Paulo, Brasil) e para o controle negativo, solução salina (IPI/ASAC Brasil, São Paulo, Brasil).

Uma gota (aproximadamente 10 μ L) de cada extrato alergênico foi depositada, a uma distância de 3 cm entre elas, na região anterior do antebraço (DÂNGELO; FATTINI, 1998), após anti-sepsia do local com álcool 70%. A puntura cutânea foi feita com puntor apropriado (Aiko, Rio de Janeiro, Brasil) para tal procedimento sobre a gota do extrato e após 15 minutos foram medidos os diâmetros das pápulas formadas, ortogonalmente, com régua milimetrada (*Morrow Disposable / Skin Test Needle Aller Guard*[®]). As pápulas que apresentaram média aritmética dos diâmetros maiores do que 3 mm em relação aos do controle negativo foram consideradas positivas ao teste.

3.4. Coleta de sangue

Foram obtidos 20 mL de amostras sangue de cada indivíduo, através de punção venosa na região anterior do cotovelo (DÂNGELO; FATTINI, 1998), utilizando-se tubos de 5 mL e agulhas 21G1 (*Vacutainer* - Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA), gentilmente cedidos pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFU. As amostras de sangue foram mantidas em repouso por 15 minutos e então submetidas à centrifugação durante 10 minutos a 2.000 g. Os soros obtidos foram aliquotados em tubos de polipropileno tipo *ependorf* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.5. Preparação do extrato alergênico (Dpt)

3.5.1. Para testes sorológicos

A extração de alérgenos do ácaro foi procedida de acordo com método adotado por Kummar, Singh e Gandal (1998), com adaptações. Inicialmente, foram pesados 200 g do ácaro em material de cultura, gentilmente cedido pelo Prof. Federico Montealegre (*Immunochemistry Laboratory, Medical School of Ponce – Porto Rico, EUA*) e então peneirados (Granutest-Telastem Peneiras para Análise LTDA., ABNT 35, abertura em mm = 0,50 / TYLER 32) para separar corpos e fezes dos ácaros do restante do material de cultivo. Logo após, 10 g do material acarológico peneirado foram diluídos em uma solução de 50 mL de tampão borato (BBS) 5 mM, pH 8,0, contendo PMSF (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, EUA) 1mM, Benzamidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) 1mM, Aprotinina (Sigma) 0,2% e Leupeptina (Sigma) 1 μ M como inibidores de protease. A mistura foi macerada em nitrogênio líquido, posteriormente transferida para tubos cônicos de 50 mL e incubada durante 18 horas a 4°C em agitação orbital.

Após duas pré-centrifugações a 3.000 g por 15 minutos a 4°C, e uma centrifugação a 30.000 g durante 45 minutos a 4°C, o sobrenadante final obtido foi submetido à diálise em membrana porosa com *cut-off* 10-12 kDa (SPECTRA/POR® Spectrum Medical Industries, Inc., Houston, EUA) em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01 M, pH 7,2, por 24 horas a 4°C com pelo menos quatro trocas da solução de diálise.

O material retido na membrana de diálise foi definido como o extrato bruto total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), sendo aliqotado e armazenado a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.5.2. Para testes cutâneos

Para preparação do extrato a ser utilizado nos testes cutâneos (TCP), o extrato total de Dpt obtido de acordo com o procedimento descrito acima foi diluído em PBS contendo Fenol 0,4% e Glicerina 50% (Bayer Corporation, Spokane, EUA) a uma concentração final de 2 µg/mL. Esta solução foi armazenada em frascos de vidro do tipo âmbar com conta-gotas a 4°C até a realização dos testes cutâneos.

Os extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis* a serem utilizados no TCP foram preparados como descrito para *D. pteronyssinus*.

3.6. Cromatografia de afinidade

A coluna de cromatografia de afinidade de ConA - Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Upsala, Suécia) foi equilibrada para tampão de uso e otimizada através de *cross-linking*.

Inicialmente, 5 mL de resina ConA - Sepharose foram lavados com 250 mL de PBS contendo L-lisina (Sigma) 0,2 M, pH 8,3 e 100 mL de PBS acrescido de L-lisina 0,2 M e D-manose (*D-mannopyranose* – Sigma), pH 8,3. Em seguida, 1,5 µL de Glutaraldeído 25% (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. O excesso deste foi removido utilizando 25 mL de solução tampão consistindo de Glicina (Quimibrás Indústrias Químicas, S.A., Rio de Janeiro, Brasil), Tris (*Hydroxymethyl aminometan* – Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,1 M e HCl (Quimibrás Indústrias Químicas, S.A., Rio de Janeiro, Brasil), 1 M, pH 9,2, adicionado de D-Manose 0,2 M. A coluna foi incubada mantida por 10 minutos em agitação orbital e, finalmente, lavada com 50 mL de PBS.

A amostra de Dpt foi aplicada à coluna previamente preparada e equilibrada em um volume de 3 mL, com 18,6 mg de proteínas. Após incubação do material na coluna por 2 horas a 4°C, o material que não se ligou à coluna (Void) foi eluído com PBS e coletado em volumes de 2 mL, monitorando quanto à densidade óptica em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, Brasil), com filtro de 280 nm, até atingir valores de absorvância próximos de zero. A fração que se ligou à coluna (ConA/Dpt) foi eluída da mesma utilizando metil- α -D-manopiranosídeo (Ferro Pfanstiehl Laboratories, Inc., Waukegan) 0,2 M, pH 7,4, diluído em PBS e coletada em volumes

de 2 mL, com intervalo de 2 minutos entre cada coleta, até que as leituras de absorvância atingissem valores próximos de zero.

As amostras eluídas da coluna (Void e ConA/Dpt) que apresentaram maiores valores de absorvância foram concentradas e dialisadas em Amicon (W.R. Grace & Co., Beverly, EUA), utilizando membrana YM10 (*cut-off* 10kDa), sendo posteriormente aliquotadas a -20° C, até a condução dos demais experimentos.

3.7. Dosagem protéica

As concentrações protéicas do extrato total (Dpt) e das frações alergênicas (ConA/Dpt e Void) foram determinadas pelo método de Lowry et al. (1951).

Para a curva de calibração foi utilizada soroalbumina bovina (BSA) em diluições seriadas de 500 µg/mL a 15,6 µg/mL. A concentração de proteínas foi determinada em mg/mL e calculada com o auxílio do software Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA).

3.8. SDS-PAGE

O perfil protéico das amostras de Dpt e ConA/Dpt foi analisado em Gel de Eletroforese de Poliacrilamida em Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli (1970), a 12%, em condições desnaturantes e não redutoras.

O gel de separação foi preparado utilizando-se Tris-HCl (Sigma) 0,375 M, pH 8,8, SDS (Sigma) 1%, EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético, Quimibrás) 2mM, solução de acrilamida a 30% e bis-acrilamida a 0,8% (Pharmacia-LKB, AB, Bromma, Suécia), TEMED (N,N,N,N-Tetrametil-etilenodiamino, Pharmacia-LKB) 0,125 % e APS (Persulfato de amônio, Pharmacia-LKB, AB) 0,125%.

Para preparação do gel de empilhamento, foram utilizados Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 0,1%, EDTA 2mM, solução de acrilamida / bis-acrilamida a 5%, TEMED 0,125 % e APS 0,125%.

O Tampão de Corrida (pH 8,3) consistiu de glicina (Sigma) 0,19M, Tris (Sigma) 0,025 M, SDS (Sigma) 0,075% e EDTA (Quimibrás) a 1,9 M.

As amostras foram diluídas em Tampão de Amostra contendo Tris-HCl 0,1M, pH 6,8; SDS a 4%; azul de bromofenol a 0,2% e glicerol a 20% e submetidas a um aquecimento de 95° C (Termobath ALB64 – Finemould Precision Ind., Co., Seul, Coréia) durante 3 minutos, sendo posteriormente aplicadas aos poços na concentração de 13 µg/poço. Paralelamente às amostras, foram aplicados os padrões de peso molecular *Wide Range* (Sigma) e *Rainbow* (Amersham Life Science, Little Chalfont, Inglaterra).

O sistema foi preparado em aparelho apropriado para mini-gel (SE 215 Mighty Small Multiple Caster, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA) e conectado a um gerador (*Electroforesis Power Suply* EPS 301 - Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e submetido a uma corrente constante de 20 mA para a migração das proteínas por aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

A coloração do gel foi realizada de acordo com a técnica descrita por Friedman (1982), onde o gel foi inicialmente imerso em um recipiente contendo solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,05%) por 2 horas à temperatura ambiente, e posteriormente incubado em etanol 50% durante vinte minutos por 3 vezes e pré-tratado com tiosulfato de sódio (Quimibrás) 0,02% por 1 minuto. Em seguida o gel foi incubado em 50 mL de solução de nitrato de prata (Labsinth, Diadema, Brasil) a 0,2% acrescido de formaldeído 0,003% em câmara escura por 20 minutos. Para revelar as bandas protéicas, foi utilizado 50 mL de solução contendo carbonato de sódio (Ecibra Ind. Brasileira, São Paulo, Brasil) 6%, formaldeído 0,0005% e tiosulfato de sódio 0,02% e para interromper a reação, uma solução contendo metanol 50% e ácido acético 12% foi utilizada.

O gel foi finalmente digitalizado em Scanner HP PrecisionScan LTX, versão 1.2. (Hewlett Packard, Co.), fixado entre duas folhas de papel celofane e seco à temperatura ambiente por 18 horas.

3.9. ELISA

3.9.1. Quantificação de anticorpos IgE

Para detecção e quantificação de anticorpos IgE específicos a Dpt e ConA/Dpt, foi utilizado o ensaio imunoenzimático cELISA (ELISA convencional), de acordo com Silva et al. (2001), com modificações.

Placas de alta afinidade (Costar, Corning Inc., Corning, EUA) contendo 96 poços foram sensibilizadas com 50 µL por poço de Dpt e ConA/Dpt, diluídos em tampão carbonato 0,06 M, pH 9,6, na concentração protéica de 20 µg/mL, por 18 horas, a 4° C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 (*Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate* – Sigma) a 0,05% (PBS-T). Os sítios ativos dos poços foram então bloqueados com solução PBS-T contendo BSA (Soroalbumina bovina - Sigma) a 1% (PBS-T/BSA), por 1 hora à temperatura ambiente.

Os soros diluídos na proporção de 1:2,5 em PBS-T foram adicionados, em duplicata, em volumes de 50 µL/poço, após três lavagens prévias com PBS-T. Como controles da reação, foram utilizados PBS-T/BSA e soros controles negativos não-atópicos. Após incubação a 37° C por 2 horas, as placas foram lavadas por seis vezes com PBS-T e incubadas com 50 µL por poço de anticorpo secundário de cabra anti-IgE humana biotilada (Kirkegaard e Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EUA) diluído a 1:1000 em PBS-T/BSA durante 1 hora à 37° C.

Após novo ciclo de seis lavagens com PBS-T, adicionou-se o conjugado Estreptavidina-peroxidase (Sigma), diluído a 1:500 em PBS-T/BSA, em volume de 50 µL/poço e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A revelação da reação foi feita com substrato enzimático H₂O₂ (*Hydrogen Peroxide* - Sigma) a 0,03%, acrescido de ABTS (*2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid* - Sigma), diluídos em tampão citrato-fosfato 0,07 M, pH 4,2.

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

3.9.2. Determinação dos níveis de anticorpos

Os níveis de anticorpos IgE específica foram expressos em Índice ELISA (IE), calculados através da fórmula abaixo, utilizada por Silva et al. (2002), com modificações:

$$IE = \frac{DO_{\text{am teste}}}{Cut\ off}$$

Onde:

$DO_{\text{am teste}}$ = densidade óptica média da amostra teste;

$Cut\ off$ = limiar de positividade, obtido através da fórmula:

$$Cut\ off = DO_{\text{contr neg}} + (3 \times dp)$$

Onde:

$DO_{\text{contr neg}}$ = média aritmética das densidades ópticas de três amostras de soros do controle negativo;

dp = desvio-padrão das densidades ópticas das amostras do grupo controle.

3.10. Análise estatística

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar o nível de significância (p) entre os valores de IgE específica a Dpt e ConA/Dpt nos diferentes grupos. A correlação entre estes níveis dentro de cada grupo foi determinada através da reta de regressão linear e os coeficientes de correlação (r) foram calculados através do teste de Spearman.

O intervalo de confiança adotado foi de 95%.

Todos os cálculos e gráficos foram realizados utilizando os softwares GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc.) e Microsoft Excel 2000 (Microsoft Co.).

3.11. Normas de biossegurança

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

4. RESULTADOS

4.1. Dados clínicos e demográficos

Noventa e cinco indivíduos foram selecionados para o estudo. Um questionário clínico foi utilizado para identificação da suspeita de doença alérgica entre os sujeitos deste estudo. As perguntas foram elaboradas para que o indivíduo pudesse responder de forma concisa, segundo ISAAC (1998) com modificações, sendo aplicadas com o auxílio do médico alergologista, anotando todas as respostas e demais dados relevantes. Nenhum indivíduo se recusou a responder o questionário.

Dentre os indivíduos do estudo, 65 (68,4%) apresentaram sintomas característicos de asma e/ou rinite alérgica. Deste número, somente 8 (12,3%) foram caracterizados como asmáticos, apresentando quadro de sibilos, dificuldade respiratória ou tosse seca de origem não gripal. Os demais pacientes sintomáticos (87,7%) relataram sintomas sugestivos de rinite alérgica, como espirros, coriza e/ou lacrimejamentos nos olhos.

Suas idades variaram entre 18 e 54 anos (média: 28,1 anos; desvio-padrão: 9,9 anos), sendo que as idades médias foram de 24,4 anos (desvio-padrão: 6,4) para o grupo I; 31,8 anos (desvio-padrão: 10,6) para o grupo II e 28,8 anos (desvio-padrão: 11,1) para o grupo III.

A quantidade de indivíduos do sexo feminino totalizou 69, sendo que 19 delas pertenceram ao grupo I, 27 ao grupo II e 23 ao grupo III. Vinte e seis indivíduos foram do sexo masculino, sendo 16 do grupo I, 3 do grupo II e 7 pertencentes ao grupo III.

Os quadros com a idade, sexo e diagnóstico clínico de cada indivíduo nos diferentes grupos estão apresentadas no Apêndice 4.

4.2. Teste cutâneo de puntura (TCP)

Os indivíduos foram submetidos ao Teste Cutâneo de Puntura (TCP) para avaliação da hipersensibilidade imediata utilizando extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*. Nenhuma reação sistêmica adversa foi observada durante ou após a realização do teste.

A Tabela 1 mostra o resultado do TCP nos 65 indivíduos alérgicos a *D. pteronyssinus* recrutados para o estudo.

Dentre os pacientes do grupo I, todos que apresentaram positividade ao TCP para o ácaro *D. pteronyssinus* também foram positivos para *D. farinae*. Entretanto, do total de pacientes deste grupo, 31 (88,6%) apresentaram positividade a *B. tropicalis* e somente 4 (11,4%) não foram positivos. O diâmetro médio das pápulas para o extrato de *D. pteronyssinus* neste grupo foi de 10,5 mm (desvio-padrão: 2,7).

Não houve casos de positividade para os ácaros do gênero *Dermatophagoides* nos trinta pacientes do grupo II, porém, dois deles (6,6%) foram

reativos a extrato de *Blomia tropicalis*, apresentando tamanhos médios das pápulas de 3,5mm e 4,5 mm para este extrato.

Todos os indivíduos do grupo III apresentaram TCP negativo para os extratos de ácaros testados.

Os dados que reportam o tamanho da pápula de cada indivíduo nos diferentes grupos deste estudo estão incluídos no Apêndice 4.

Tabela 1. Resultados do Teste Cutâneo de Puntura (TCP) aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) com ou sem reatividade aos alérgenos de *Dermatophagoides farinae* (Df) e/ou *Blomia tropicalis* (Bt) em 65 pacientes sintomáticos.

Resultados do TCP	Pacientes sintomáticos	
	Grupo I (n = 35)	Grupo II (n = 30)
Dpt +	35	-
Dpt + / Df +	35 (100%)	-
Dpt + / Df -	0	-
Dpt + / Bt +	31 (88,6%)	-
Dpt + / Bt -	4 (11,4%)	-
Dpt -	-	30
Dpt - / Df +	-	0
Dpt - / Df -	-	30 (100%)
Dpt - / Bt +	-	2 (6,6%)
Dpt - / Bt -	-	28 (93,4%)
Tamanho da pápula (mm)	10,5 ± 2,7 ^a	4,0 ± 0,7 ^b

a = média aritmética ± desvio-padrão (Dpt)

b = média aritmética ± desvio-padrão (Bt)

(+) Positivo; (-) Negativo

4.3. Fracionamento cromatográfico

Dois ensaios de cromatografias foram realizados utilizando extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) em coluna de afinidade de ConA-Sepharose, otimizada através de "cross-linking".

A Figura 1 apresenta o cromatograma representativo de um dos ensaios realizados. Cada tubo coletor conteve 2 mL de amostra fracionada pela coluna, sendo estes monitorados a 280 nm.

O primeiro pico representa o Void, fração protéica que não apresentou interação com a coluna. Este foi eluído da coluna utilizando PBS 0,01 M e apresentou densidade óptica (D.O.) máxima de 0,939. As amostras contidas nos tubos de número 1 e 2 não apresentaram valores de absorbância legíveis pelo espectrofotômetro, portanto foram excluídas dos valores do gráfico. As amostras dos tubos de 1 a 9 foram reunidas, sendo posteriormente dialisadas e concentradas em Amicon.

O segundo pico representa a fração ligante de ConA (ConA/Dpt), eluída com tampão PBS contendo Metil- α -D-manopiranosídeo 0,2 M. As amostras contidas nos tubos de 42 a 55 foram reunidas, dialisadas e concentradas em Amicon.

As amostras de Void obtidas nos dois ensaios cromatográficos foram reunidas em uma amostra única, após confirmação da semelhança das bandas protéicas pela análise do perfil eletroforético. O processo foi semelhantemente realizado para a ConA/Dpt.

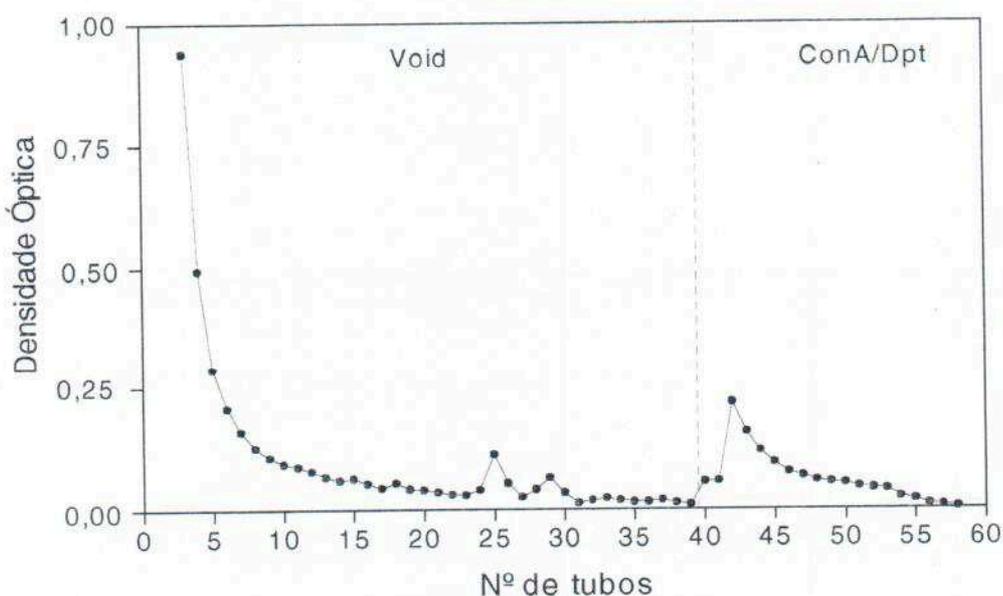


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* em coluna de afinidade de ConA-Sepharose. O Void foi obtido pela eluição com PBS. Obteve-se o eluato ConA/Dpt pela adição de metil- α -D-manopiranosídeo 0,2 M (linha pontilhada). Volume da coluna: 5,0 mL; amostra aplicada: 18,6 mg em um volume de 3,0 mL.

4.4. Dosagem protéica

As concentrações protéicas dos extratos e frações obtidos foram: Dpt = 6,25 mg/mL, Void = 1,12 mg/mL e ConA/Dpt = 0,21 mg/mL.

4.5. Perfil eletroforético

Os perfis protéicos de Dpt e ConA/Dpt foram determinados por SDS-PAGE a 12%. A coloração deste gel foi realizada por nitrato de prata.

A Figura 2 mostra o perfil das bandas nestas amostras com as respectivas massas moleculares de referência (*Mr*). No extrato total (Dpt), foram detectadas principalmente bandas de 106, 90, 48, 17 e 11 kDa.

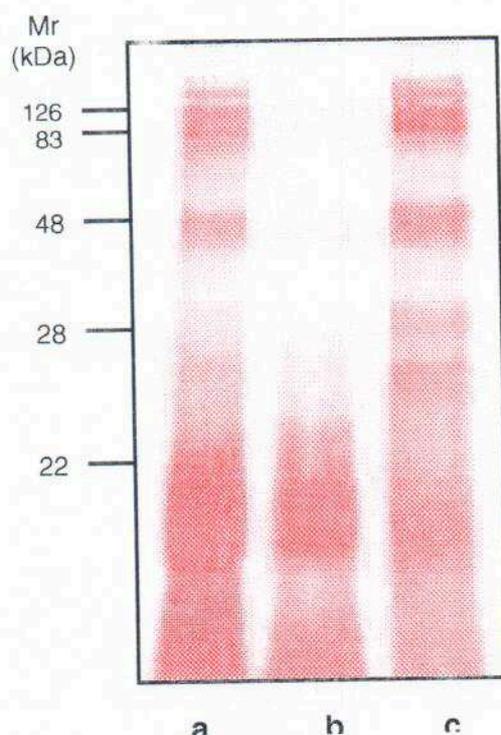


Figura 2. Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) de (a) Dpt, (b) Void e (c) ConA/Dpt. Coloração por nitrato de prata. *Mr*: massa molecular de referência, em kDa.

O Void apresentou bandas protéicas em menor intensidade que o extrato total, sendo algumas bandas fortemente coradas (17-20 kDa). A ConA/Dpt apresentou um perfil eletroforético com seis bandas principais, sendo elas de 104, 87, 48, 31, 25 e 26 kDa.

Em todas as amostras, foi observado um aglomerado de bandas de baixo peso molecular, de difícil identificação, com menor intensidade em ConA/Dpt.

4.6. Níveis de IgE específica

A determinação dos níveis de IgE sérica específica ao extrato bruto (anti-Dpt) e à fração ligante de ConA (ConA/Dpt) foi procedida pelo ensaio imunoenzimático convencional (ELISA).

A Figura 3 representa a distribuição dos níveis de IgE específica anti-Dpt e anti-ConA/Dpt, medidos em Índice ELISA (IE), nos três grupos analisados.

Todos os indivíduos do grupo I apresentaram níveis de IgE específica ao Dpt maiores que 1,0 (IE > 1,0). Entretanto, 4 (11,4%) indivíduos apresentaram valores inferiores a este (IE < 1,0) para ConA/Dpt.

Nenhum indivíduo do grupo II apresentou IgE específica anti-ConA/Dpt. Entretanto, somente um indivíduo mostrou valores limítrofes do *cut-off* (IE = 1,07) para o extrato total de Dpt.

No grupo III não houve valores de IE maiores ou iguais a 1 para ambas as

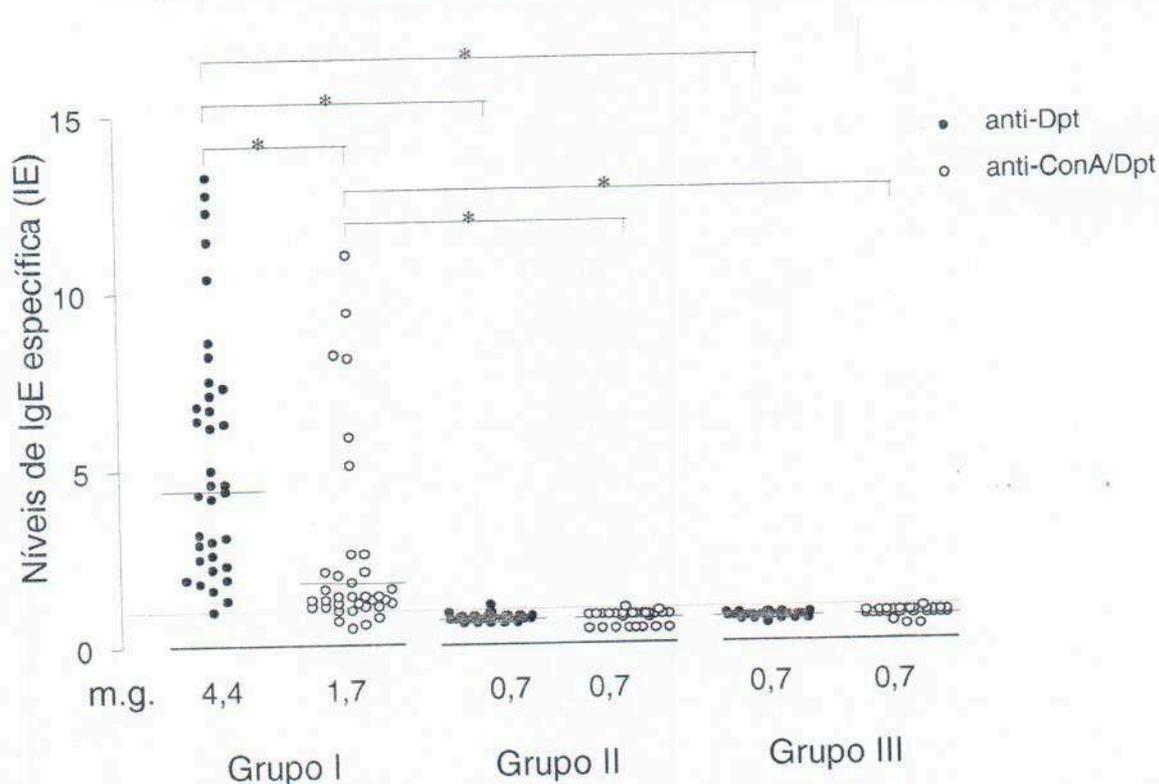


Figura 3. Níveis de IgE específica a alérgenos de *D. pteronyssinus* em extrato bruto (Dpt) e em fração ligante de concanavalina A (ConA/Dpt), expressos em índice ELISA (IE), determinados nos soros de 35 pacientes do Grupo I, 30 pacientes do Grupo II e 30 indivíduos do Grupo III. As barras horizontais indicam a média geométrica de cada grupo. m.g.: média geométrica. A linha pontilhada representa o limite de positividade da reação (IE = 1). * $p < 0,001$

reatividades dos anticorpos IgE.

As médias geométricas (m.g.) dos níveis de IgE específica frente ao Dpt e ConA/Dpt foram significativamente maiores ($p < 0,0001$) no grupo I (IE = 4,4 para Dpt e IE = 1,7 para ConA/Dpt), comparadas às médias do grupo II e III (IE = 0,7 para os demais valores). Entretanto, não houve diferença significativa entre níveis médios nos grupos II e III, em relação aos níveis de IgE específica ao extrato total bem como à fração ligante de ConA.

Todos os indivíduos do grupo III apresentaram níveis de IgE específica a Dpt e ConA/Dpt abaixo de 1,0 (IE < 1,0).

4.6.1. Tamanho das pápulas e níveis de IgE específica

O tamanho das pápulas frente ao extrato de *D. pteronyssinus* determinados pelo TCP foi comparado aos níveis de IgE específica nos indivíduos do Grupo I.

A Figura 4 mostra a distribuição das médias aritméticas das pápulas, em milímetros (mm), em relação aos níveis de IgE específica, em Índice ELISA (IE), anti-Dpt e anti-ConA/Dpt.

Não houve diferenças significativas entre o tamanho da pápula nas classes distintas e os níveis de IgE específica anti-Dpt e anti-ConA/Dpt.

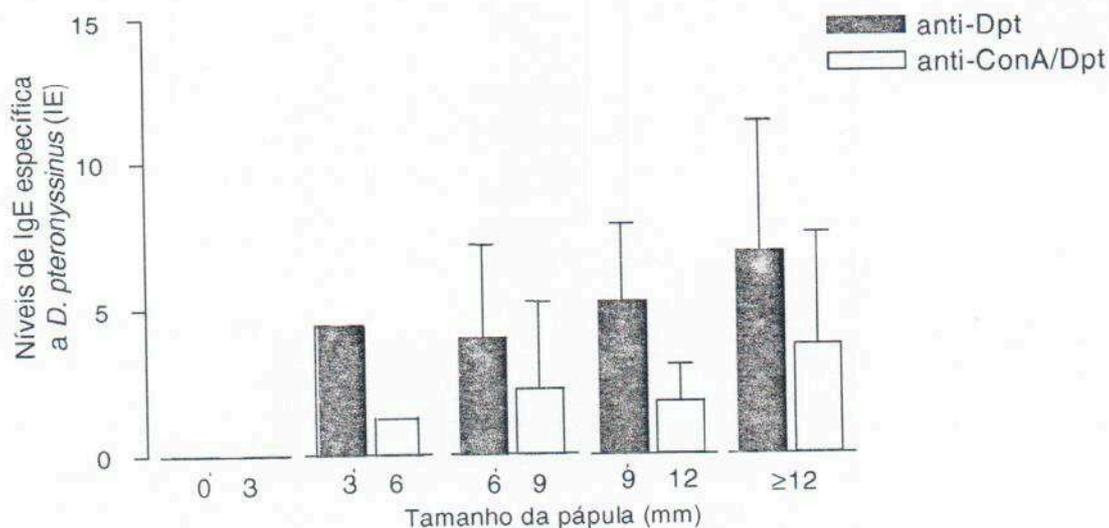


Figura 4. Níveis de IgE específica (IE) ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dpt) e fração ligante de ConA (ConA/Dpt) em relação ao tamanho da pápula (mm) em pacientes do Grupo I. As barras indicam a média aritmética das medidas de pápula e das linhas verticais posteriores indicam o desvio-padrão.

Não houve pacientes com tamanho de pápula menores que 3mm, uma vez que esse foi adotado como critério de positividade ao TCP. Desta forma, não há dados de níveis de IgE específica em pacientes com tamanho de pápula inferior a este. Além disso, somente um indivíduo apresentou tamanho de pápula que se encaixasse na classe representativa de 3 a 6mm, o que impossibilitou o cálculo do desvio-padrão nesta classe, como observado na figura.

4.6.2. Correlação entre os níveis de IgE específica anti-Dpt e anti-ConA/Dpt

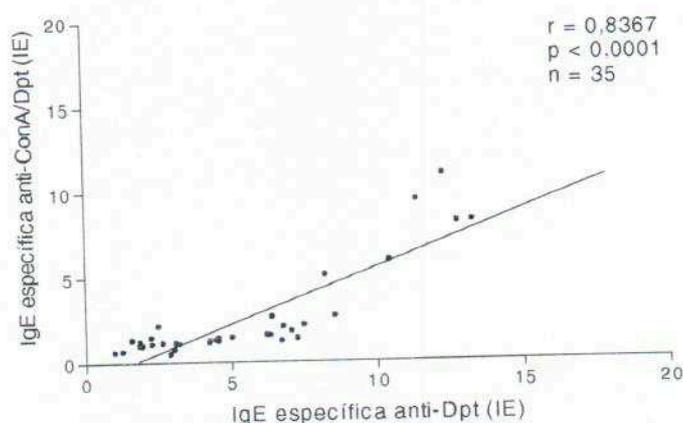


Figura 5. Correlação entre os níveis de IgE específica a alérgenos de extrato bruto (Dpt) e de fração ligante de concanavalina A (ConA/Dpt), expressos em índice ELISA (IE), determinados nos soros de 35 pacientes do Grupo I.

A correlação entre os níveis de IgE específica a Dpt e ConA/Dpt foi analisada através dos valores de Índices ELISA obtidos dos indivíduos analisados.

A Figura 5 mostra a reta de regressão linear para os valores de IgE específica do Grupo I. Houve significativa correlação positiva entre estes níveis ($r = 0,8367$, $p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

O Teste Cutâneo de Puntura (TCP) tem sido utilizado como método de diagnóstico para análise do quadro de hipersensibilidade imediata, onde o critério de positividade é baseado no tamanho das pápulas (Maiores que 3 mm) obtidos para os diferentes alérgenos, comparando-se com a do controle negativo (solução salina). Neste estudo, os indivíduos foram avaliados quanto à reatividade cutânea aos extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*.

Do total de indivíduos, a grande maioria (68,4%) apresentou quadro clínico de asma e/ou rinite alérgica, sendo que destes pacientes, 53,8% apresentaram TCP positivo a *D. pteronyssinus* e *D. farinae*. Esses dados sugerem que a exposição a estes ácaros pode ser considerada um importante fator para desencadeamento da resposta alérgica em indivíduos predispostos, como já relatado por Arlian (1996). Considerando este fato, Sopelete et al. (2000) detectaram níveis maiores ou iguais a 2 µg de alérgenos dos grupos 1 e 2 de *D. farinae* por grama de poeira nas residências de Uberlândia-MG, constituído este a principal acarofauna nesta cidade.

Dentre os pacientes sintomáticos, oito foram asmáticos e 57 apresentaram sintomas de rinite alérgica, indicando que esta última pode ser a doença alérgica

mais freqüente dentre a população do Triângulo Mineiro, como também observado por Berger (2003).

Dentre os pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*, diagnosticados pelo quadro clínico e TCP (Grupo I), vale ressaltar que todos (100%) também foram positivos a *D. farinae* e 31 (88,6%) foram positivos concomitantemente a alérgenos de *B. tropicalis*. De acordo com estudos comparativos, alguns alérgenos destas duas espécies (*D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*) podem apresentar até 33% de reatividade cruzada, devido à homologia observada entre alguns destes compostos (ARRUDA et al., 1997; CARABALLO et al., 1998). Esta sensibilização concorrente tem complicado a avaliação do papel de *B. tropicalis* nestes pacientes, particularmente em regiões onde há predominância de ambos os ácaros. De acordo com nossos estudos prévios (MEDEIROS JR et al., 2002), detectamos um número elevado deste ácaro em amostras de poeira domiciliar de nossa região, em contrastes com os níveis baixos ou indetectáveis do alérgeno Blo t 5 por ELISA de duplo anticorpo, em estudo realizado por Luczynska et al. (1989).

Desta forma, estudos posteriores utilizando ensaios de inibição competitiva deverão ser conduzidos com a finalidade de verificar se há evidências desta reatividade cruzada entre alérgenos de *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*, o que esclareceria a alta prevalência de indivíduos reativos a ambos os alérgenos neste estudo.

Extratos alergênicos constituem uma mistura heterogênea de proteínas, glicoproteínas e componentes não alergênicos. Segundo Roque-Barreira (1998), as lectinas são proteínas que possuem alta afinidade e especificidade por carboidratos. Desta forma, a concanavalina A pode apresentar um mecanismo de interação com alérgenos glicosilados. Estudos utilizando a ConA em isolamento de alérgenos de ácaros não tem sido muito evidenciados e um dos primeiros estudos envolvendo fracionamento cromatográfico com esta lectina foi realizado por Stewart e Turner (1980), através da caracterização das diferentes isoformas do alérgeno Der p 4.

Utilizando a cromatografia de afinidade de ConA-Sepharose para fracionar o extrato de Dpt e metil- α -D-manopiranosídeo como eluente, os componentes que apresentaram maior afinidade com essa lectina foram detectados por SDS-PAGE

como proteínas de peso molecular variável, com predomínio de bandas de alto peso molecular, sugerindo que esses alérgenos podem apresentar sítios de glicosilação.

Segundo Kamamoto et al. (2002), alguns dos alérgenos de *D. pteronyssinus* que apresentam sítios de glicosilação potenciais são Der p 1 (25 kDa), Der p 4 (57 kDa), Der p 7 (22 kDa) e Der p 8 (26 kDa). No presente estudo, algumas destas proteínas foram encontradas na fração ConA/Dpt, sugerindo que estes alérgenos apresentam afinidade com a lectina em estudo.

O fato de alérgenos glicosilados serem até cem vezes mais imunogênicos que os não glicosilados, como relatado por Agnes, Tan e Jordens (1998), pode sugerir que a fração ConA/Dpt constitui uma das porções alergênicas mais importantes do extrato total de Dpt. Seguindo esta suposição, estudos futuros deverão ser conduzidos para confirmar a presença de sítios glicosilados nesta fração, esclarecendo aspectos importantes sobre sua composição bioquímica e imunogenicidade.

O ensaio imunoenzimático (ELISA) tem sido utilizado como uma das principais técnicas *in vitro* de diagnóstico de alergias, de forma complementar ao TCP. Assim é largamente aplicado devido a certas inconveniências demonstradas pelo diagnóstico *in vivo*, como em pacientes com lesões dermatológicas no local do teste, em uso de medicação anti-histamínica ou corticoterapia e risco iminente de reações sistêmicas. O fato de ter sido excluído deste estudo os pacientes que se enquadram nestes parâmetros fez com que o TPC se tornasse uma ferramenta mais confiável na determinação da presença ou ausência de anticorpos IgE nos indivíduos analisados. Entretanto, a quantificação destes anticorpos só foi possível através de ELISA.

Considerando a importância deste imunoensaio na avaliação da sensibilização a *D. pteronyssinus* em pacientes com alergia respiratória, um estudo realizado por Silva et al. (2001) reportou adaptações desta técnica na detecção de anticorpos IgE específicos aos alérgenos principais Der p 1 e Der p 2 deste ácaro, denominado ELISA reverso. Dentre as adaptações, a sensibilização da placa de poliestireno com anticorpos monoclonais ao invés do alérgeno (ELISA convencional) foi crucial para uma maior sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos IgE específicos. Em outro estudo, Trombone et al. (2002), relatando o uso de um

ensaio designado de ELISA quimérico, no qual se utiliza um anticorpo quimérico apresentando a porção Fc ϵ humana e a porção Fab murina, demonstrou ser altamente específico na detecção destas imunoglobulinas. No presente estudo, optamos inicialmente pela utilização de um método mais simples e rápido (ELISA convencional). Entretanto, estudos utilizando ELISA reverso para detecção de anticorpos IgE aos alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) poderão ser futuramente conduzidos para melhor caracterizar estas frações glicosiladas.

A análise dos resultados deste imunoensaio permitiu verificar que os níveis séricos de IgE detectados em pacientes caracterizados como alérgicos a *D. pteronyssinus* (Grupo I) foram significativamente maiores que aqueles encontrados em pacientes do Grupo II e III (não alérgicos a este ácaro). Além disso, através da comparação dos dados do TCP e ELISA para detecção de IgE nos pacientes do Grupo I, observou-se que indivíduos que apresentaram alta reatividade cutânea (tamanho de pápulas maiores que 12 mm) apresentaram elevados níveis de IgE específica anti-Dpt e anti-ConA/Dpt. Esses resultados comprovam que o ELISA pode ser uma ferramenta adicional no diagnóstico de alergia a *D. pteronyssinus*.

Uma forte correlação positiva foi encontrada entre os níveis de IgE específica a Dpt e ConA/Dpt, sugerindo que esta fração é também reconhecida por soros de pacientes alérgicos a Dpt. Esta significativa correlação mostra o papel da fração ligante de ConA como uma importante porção dentre os alérgenos de *D. pteronyssinus*. Desta forma, estudos futuros utilizando *Immunoblotting* serão necessários para melhor caracterizar os componentes alergênicos desta fração, permitindo que esses dados possam ser úteis fundamentalmente no tratamento hipossensibilizante de pacientes com alergia respiratória causada por este ácaro.

6. CONCLUSÕES

- Os níveis séricos de IgE específica ao extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e sua fração ligante de Concanavalina A (ConA/Dpt), determinados por ELISA, em pacientes alérgicos demonstraram ser este um importante ácaro envolvido na sensibilização alérgica destes pacientes.
- Anticorpos IgE dos pacientes com rinite e/ou asma alérgicos ao referido ácaro reconheceram de forma significativa a fração ligante de Concanavalina A (ConA/Dpt), por testes ELISA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

AGNES, M.C., TAN, A., JORDENS, R. Strongly increased efficiency of altered peptide ligands by mannosylation. **International Immunology**, v. 10, p. 1299, 1998.

ALMEIDA, K. C.; PEREIRA, E. A. L.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; MONTEALEGRE, F., SUNG, J. S.S.; TAKETOMI, E. A. Mannose-rich glycosylated components isolated from the House Dust Mite *Blomia tropicalis*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 109, s. 137, 2002.

ARLIAN, L.G. Biology and ecology of house dust mite, *Dermatophagoides* spp. and *Euroglyphus* spp., **Immunology and Allergy Clinics of North America**, Philadelphia, v. 9, p. 339-56, 1989.

ARLIAN, L.G. Immunology of scabies. In: Wikel, S.(ed) **Immunology of host-parasitic arthropods relationships**. Wallingford, UK, CAB International, p.232-258, 1996.

ARLIAN, L.G.; MORGAN, M.S.; HOUCK, M.A. Allergenicity of the mite *Hemisarcoptes cooremani*, **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v. 83, p. 529-532, 1999.

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

ARLIAN, L.G.; PLATTS-MILLS, T.A.E. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, n.107, v.3, p.406-413, 2001.

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

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

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

BEASLEY, R. The burden of asthma with specific reference to the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 109, S482-489, 2002.

BECKER, J.W.; REEKE, G.N.; WANG-Jr, J.L.; CUNNINGHAM, B.A.; EDELMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides, **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, p.1513-1524, 1975.

BERGER, W.E. Overview of allergic rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v.90 (suppl.3), p.7-12, 2003.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins), **Science**, Washington, v. 119, p.419, 1954.

CAMELO-NUNES, I.C.; WANDALSEN, G.F.; MELO, K.C.; NASPITZ, C.K.; SOLÉ, D. Prevalência de asma e de sintomas relacionados entre escolares de São Paulo, Brasil: 1996 a 1999 – Estudo da atividade brônquica entre adolescentes asmáticos e não asmáticos – “International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v.24, n.3, 2001.

CELLA, M.; EUGERING, A.; PINET, V.; PIETERS, J.; LANZAVECCHIA, A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. **Nature**, London, v. 388, p. 782-787, 1997.

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

CHUA, K.Y.; DOYLE, C.R.; SIMPSON, R.J. TURNER, K.J.; STEWART, G.A.; THOMAS, W.R. Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p II by IgE plaque immunoassay. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, Basel, v. 91, p. 118-123, 1990.

CHUA, K.Y.; STEWART, G.A.; THOMAS, W.R.; OVERINGTON, J.P.; KALSHEKER, N.A. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p I. Homology with cysteine proteases. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 167, p. 175-182, 1988.

COCA, A.F.; COOKE, R.A. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 8, p. 163-182, 1923.

COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, London, v. 102 suppl, 25, 1999.

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

CUMMINGS, R.D. Lectins are tools for glycoconjugate purification and characterization. In: **Glyco-sciences, status and perspectives**. Edited by Gabius, H.J.; Gabius, S. Chapter 10. Weinheim: Chapman & Hall, p.191-199, 1997.

DÂNGELO, J.G.; FATTINI, C.A. **Anatomia Sistêmica e Segmentar** – para o estudante de medicina, 2 ed., Atheneu, Belo Horizonte, p.351, 1998.

DIXON, H.B.F. Defining a lectin, **Nature**, London, v. 292, p.192, 1981.

EAACI, Allergen standartization and skin tests. EAACI Position Paper. **Allergy**, Copenhagen, 1993, 48 Suppl. 14: 48-82.

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

GALVÃO, C.E.S; KALIL, J.; CASTRO, F.F.M. Sensibilização a aeroalérgenos em dois grupos escolares nas zonas rural e urbana de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v.25, n.1, 2002.

GELL, P.G.H.; COOMBS, R.R.A. **Clinical aspects of immunology**. 2 ed. Oxford: Blackwell, 1968, p.575-596.

GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T. SHARON, N. What should be called a lectin?, **Nature**, London, v. 285, p.66, 1980.

HALES, B.J.; SHEN, H.D.; THOMAS W.R. Cytokine responses to Der p 1 and Der p 7: house dust mite allergens with different IgE-binding activities. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 30, p. 927-933, 2000.

HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C.F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution, **Biochemistry**, New York, v. 11, p.4910-4919, 1972.

HART, B.J. Life cycle and reproduction of house-dust mites: enviromental factors nfluencing mite populations, **Allergy**, Copenhagen, v. 53, p. 13-17, 1998.

HOFFJAN, S.; OBER, C. Present status on the genetic studies of asthma. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 14, p. 709-717, 2002.

HOWLAND, K.C.L AUSUBEL, L.J.; LONDON, C.A.; ABBAS, A.K. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, p. 4465-4470, 2000.

HUMBLES, A.A.; LU, B.; NILSSON, C.A.; LILLY, C.; ISRAEL, E.; FUJIWARA, Y.; GERARD, N.P.; GERARD, C. A role for C3a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma. **Nature**, London, v. 406, p. 998-1001, 2000.

ISAAC, Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. **Lancet**, London, v. 351, p. 1225-13232, 1998.

ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. Physicochemical properties of reaginic antibody. 1. Association of reaginic activity with an immunoglobulin other than gammaA- or gammaG- globulin. **Journal of Allergy**, St. Louis, 37:169-185, 1966.

JOHANSON, S.G.O.; O'B-HOURUHANE, J.; BOUSQUET, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; DREBORG, S.; 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**, Copenhagen, v. 56, p. 813-824, 2001.

JUTEL, M.; WAKANABE, T.; AKDIS, M.; BLASER, AKDIS, C. Immune regulation by histamine. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 14, p. 735-740, 2002.

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

KIKUCHI, Y.; KAPLAN, A.P. A role of C5a in augmenting IgG-dependent histamine release from basophils in chronic urticaria. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 109, p. 114-118, 2002.

KING, T.P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D.G.; PLATTS-MILLS, T.A.E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature, **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.25, p.27-37, 1995.

KOCOUREK, J.; HOREJSI, V. Defining a lectin, **Nature**, London, v.290, p.188, 1981.

KUMMAR, S. S.; SINGH, B. P.; GANDAL, S.V. Characterization of cogon grass (*Imperata cylindrica*) pollen extract and preliminary analysis of grass group 1, 4 and 5 homologues using monoclonal antibodies to *Phleum pratense*. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 117, p. 174, 1998.

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

LEBRUN, P.H.; VAN IMPE, G.; GEORGES-GRIDELET, D.S.; WAUTHY, G.; ANDRE, H.M. The life strategies of mites. In: SCHUSTER, R.; MUROHY, P.W. **The acari: reproduction, development and life-history strategies**. London: Chapman & Hall, 554 p. (p.3-22).

LLOYD, K.O.; BITOON, M.A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Spotothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.107 (3), p.663-671, 1971.

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

LUCZYNSKA, C.M.; ARRUDA, L.K.; PLATTS-MILLIS T.A.E.; MILLER, J.D.; LOPEZ, M.; CHAPMAN, M.D. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, Der p I and Der f I. **Journal of Immunological Methods**, New York, v. 118, p. 278-235, 1989.

MEDEIROS JR., M.; TAKETOMI, E.A.; SILVA, D.A.O.; TERRA, A.S.; FIGUEIREDO, J.P.; ALMEIDA, M.C.; AMORIM, W.W.; PINHO, R.S.; ARAÚJO, M.I.; CARVALHO, E.M. Association between mite allergen (Der p I, Der f I, Blo t 5) levels and microscopic identification on skin prick test among asthmatic subjects. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 129(3), p.237-241, 2002.

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

PETERSEN, A.; SCHRAMM, G.; SCHLAAK, M. Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p1 of timothee grass pollen. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 28, p. 315, 1998.

PLATTS-MILLS, T.A.E.; CHAPMAN, M.D. Dust mites: immunology, allergic disease, and enviromental control. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v.80, p.755-775, 1987.

PLATTS-MILLS, T.A.E.; CHAPMAN, M.D.; SQUILLACE, S.P.; SPORIK, R.B.; CALL, R.S.; HEYMANN, P.W. The role of allergens. In: **Asthma: Physiology, Immunopharmacology, and Treatment**. Fourth International Symposium, chapter 3, Academic Press, 1993, p.27-39.

PLATTS-MILLS, T.A.E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W.R.; AALBERSE, R.C.; CHAPMAN, M.D. Indoor allergens and asthma: report of the third international workshop, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, 100 (suppl):S1-S24, 1997.

PUSZTAI, A. Plant lectins. **Cambridge University Press**, Cambridge, p.293, 1991.

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

ROBBIE-RYAN, M.; BROWN, M.A. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 14, p. 728-733, 2001.

ROQUE-BARREIRA, M.C. **Lectinas em imunologia**: de ferramentas a protagonistas. Tese de livre-docência. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1998.

RULLO, V.E.V.; RIZZO, M.C.; ARRUDA, L.K.; SOLÉ, D.; NASPITZ, C.K. Daycare centers and schools as sources of exposure to mites, cockroach, and endotoxin in the city of São Paulo, Brazil. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v.110, n.4, 2002.

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

SALLUSTO, F.P.; SCHAERLI, P.; LOETSCHER, C.; SCHANIEL, D.; LEING, C.R.; MACKAY, S. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 28, p. 2760-2769, 1998.

SEARS, M.R.; HERVISON, G.P.; HOLDAWAY, M.D. The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite, and cat dander in the development of childhood asthma. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.19, p.419-424, 1989.

SILVA, D.A.O.; GERVÁSIO, A.M.; SOPELETE, M.C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L.K.; CHAPMAN, M.D.; SUNG, S.S.J.; TAKETOMI, E.A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v.86, p.545-550, 2001.

SILVA, D.A.; SILVA, N.M.; MINEO, T.W.; PAJUABA NETO, A.A.; FERRO, E.A.; MINEO, J.R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dog experimentally injected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 107 (3), p. 181-95, 2002.

SMITH, J.M.; DISNEY, M.E.; WILLIAMS, J.D. Clinical significance of skin reactions to mite extracts in children with asthma. **British Medical Journal**, Edinburgh, v.1, p.723, 1969.

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

STEINEMANN, A.; STRYER, L. Aecessibility of the carbohydrate moiety of rhodopsin. **Biochemistry**, New York, v.12 (8), p.1499-1502, 1973.

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

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

TAKAFUJI, S.; NAKAGAWA, T. Air pollution and allergy. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 10, p. 5-10, 2000.

TAXONOMY BROWSER (*Dermatophagoides pteronyssinus*) – Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6956>>. Acesso em 28 abr 2003.

TERR, A.I. The atopic diseases. In: STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLow, T.G. **Medical Immunology**, 9 ed, Stamford: Appleton & Lange, 1997, 900 p. p.389-388.

TROMBONE, A.P.F.; TOBIAS, K.R.C.; FERRIANI, V.P.L.; SCHUURMAN, J.; AALBERSE, R.C.; SMITH, A.M.; CHAPMAN, M.D.; ARRUDA, L.K. Use of a chimeric ELISA to investigate immunoglobulin E antibody responses to Der p 1 and Der p 2 in mite-allergic patients with asthma, wheezing and/or rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 32, p. 1323-1328, 2002.

VAN HAGE-HAMSTEN, M.; JOHANSON, S.G. HOGLUNG, S.; TULL, P. WIREN, A.; ZETTERSTROM, O. Storage mite allergy is common in a farming population. **Clinical Allergy**, Oxford, v. 15, p. 555-564, 1985.

VAN METRE JR., T. E.; ADKINSON JR., N. F. Immunotherapy for areoallergen disease. In: MIDDLETON, J. R.; REED, C. E. L; ELLIS, E. F. **Allergy: principles and practice**, St. Louis: Mosby, 1993. p.469-528.

VAN OORT, E. HEER, P.G.; van LEEUWEN, A.; DERKSEN, N.I.L.; MÜLLER, M.; HUVENEERS, S. AALBERSE, R.C. VAN REE, R. Maturation of *Pichia pastoris*-derived recombinant pro-Der p 1 induced by deglycosylation and by the natural cysteine protease Der p 1 from house dust mite. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 269, p. 671-679, 2002.

VOORHOST, R.; SPIELKSMA, F.M.T.; VAREKAMP, N.; LEUPEN, M.J.; LYKLEMA, A.W. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces: identify with the house dust mite allergen, **Journal of Allergy**, St. Lois, v. 39; p. 325-329, 1967.

WALTZI, M.G. Ultrastructure of the reproductive system of the house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari:Pyroglyphidae) with remarks on spermatogenesis and oogenesis, **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 16, p. 85-116, 1992.

WALZL, M.G. A comparison of the sclerotized parts of the reproductive organs of house-dust mites of the genus *Dermatophagoides* using scanning electron microscopy. In: SCHUSTER, R.; MUROHY, P.W. **The acari: reproduction, development and life-history strategies**. London: Chapman & Hall, 554 p. (p.3-22).

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

WEIS, W.I.; DICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v .65, p.441-473, 1996.

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

APÊNDICE 1

Universidade Federal de Uberlândia

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

Uberlândia, 02 de maio de 2002.

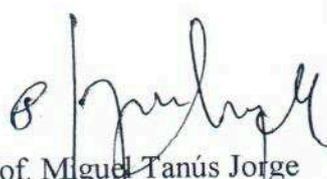
Processo nº 039/2002

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ernesto Akio Taketomi

PARECER:

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


Prof. Miguel Tanús Jorge
CEP/UFU

APÊNDICE 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Laboratório de Imunologia

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado **“Reatividade de anticorpos IgE de pacientes atópicos a antígenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) ligantes de Concanavalina A”**, cujo principal objetivo é fracionar proteínas alergênicas e avaliar suas reações com os anticorpos de indivíduos alérgicos.

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

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

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

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

Uberlândia, _____ de _____ de 200__.

ASSINATURA

TESTEMUNHA

APÊNDICE 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Laboratório de Imunologia

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

Nome: _____ Prontuário HC: _____

Data do questionário: ____ / ____ / ____

Idade: _____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Sexo: () masculino () feminino

Grau de escolaridade: () Ensino fundamental () Ensino Médio

() Ensino Superior e/ou pós-graduação

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

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

Questionário 1 (Módulo Asma)

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

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

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

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

- 4) Nos últimos 12 (doze) meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?
Nunca acordou com chiado ()
Menos de uma noite por semana ()
Uma ou mais noites por semana ()

- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?
() Sim () Não
- 6) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?
() Sim () Não
- 7) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?
() Sim () Não
- 8) Alguma vez na vida você teve asma?
() Sim () Não

Questionário 2 (Módulo Rinite)

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

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

- 6) Alguma vez na vida você teve rinite?
 Sim Não

Questionário 3 (Módulo Eczema)

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

Se a resposta foi não, passe para a questão 6.

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

Se a resposta foi não, passe para a questão 6.

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

- 4) Alguma vez essas manchas com coceira desapareceram completamente nos últimos 12 (doze) meses?
 Sim Não

- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa dessa coceira na pele?
Nunca nos últimos 12 (doze) meses
Menos de 1 noite por semana
Uma ou mais noites por semana

- 6) Alguma vez na vida você teve eczema?
 Sim Não

APÊNDICE 4

Quadro 1. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes do grupo I (com rinite e/ou asma, reativos a *D. pteronyssinus* pelo TCP).

Grupo I						
Paciente	Sexo	Idade (anos)	TCP ^a (mm)	Diagnóstico clínico	IgE anti-Dpt ^b (IE)	IgE anti-ConA/Dpt ^c (IE)
1	M	23	13	rinite / asma	8,23	5,11
2	F	27	9	rinite / asma	7,06	1,78
3	F	29	7,5	rinite	11,38	9,45
4	M	23	14,5	asma	6,78	2,04
5	M	21	10,5	rinite	4,23	1,16
6	M	22	7,5	rinite	4,55	1,25
7	F	19	13,5	rinite	6,20	1,58
8	M	23	15,5	rinite / asma	7,48	2,14
9	F	37	8,5	rinite	4,26	1,26
10	F	33	5,5	rinite	4,43	1,29
11	F	22	11,5	rinite	6,71	1,22
12	F	38	7,5	rinite	1,83	1,00
13	M	26	10,5	rinite	4,55	1,40
14	M	23	7,5	rinite	2,48	2,13
15	M	21	14	rinite	12,29	10,98
16	F	24	7,5	rinite	1,93	0,98
17	M	42	7,5	rinite	2,26	1,07
18	F	20	10,5	rinite	3,09	1,14
19	F	23	17,5	rinite	12,76	8,15
20	M	28	10,5	rinite	1,58	1,31
21	F	21	10,5	rinite	10,43	5,93
22	F	27	8	rinite	3,21	1,07
23	F	21	9	rinite	1,85	1,21
24	F	18	9	rinite	8,55	2,65
25	F	20	10	rinite	6,33	1,56
26	M	21	12,5	rinite	13,28	8,20
27	F	41	9	rinite	2,24	1,44
28	F	20	11,5	rinite	2,61	1,12
29	M	18	10	rinite	7,26	1,37
30	M	20	9	rinite / asma	5,01	1,44
31	F	22	10,5	rinite	6,38	2,64
32	M	20	13,5	rinite	2,89	0,49
33	M	24	12	rinite	1,26	0,67
34	M	20	12,5	asma	0,99	0,64
35	F	18	12	rinite	3,03	0,76

a = Tamanho médio das pápulas (mm) obtido no teste cutâneo para *D. pteronyssinus* (TCP)

b = Níveis de IgE específica anti-Dpt, obtido por ELISA (IE = Índice de reatividade ELISA)

c = Níveis de IgE específica anti-ConA/Dpt, obtido por ELISA

Quadro 2. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes do grupo II (com rinite e/ou asma, não reativos a *D. pteronyssinus* pelo TCP).

Grupo II					
Paciente	Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico clínico	IgE anti-Dpt ^a (IE)	IgE anti-ConA/Dpt ^b (IE)
1	F	22	rinite	0,82	0,80
2	M	36	rinite / asma	0,90	0,77
3	F	34	rinite	0,77	0,88
4	F	24	rinite	0,72	0,78
5	F	32	rinite	0,83	0,78
6	F	41	rinite	0,76	0,77
7	F	26	rinite	0,86	0,82
8	F	26	rinite	0,86	0,82
9	F	21	rinite	0,80	0,78
10	F	44	rinite	1,07	0,76
11	F	53	rinite	0,84	0,77
12	M	28	rinite	0,71	0,73
13	F	27	rinite	0,80	0,77
14	F	19	rinite	0,82	0,77
15	F	38	rinite	0,71	0,80
16	M	20	rinite	0,76	0,76
17	F	36	rinite	0,77	0,79
18	F	29	rinite	0,84	0,68
19	F	44	rinite	0,73	0,83
20	F	18	rinite	0,75	0,77
21	F	48	rinite	0,68	0,97
22	F	22	rinite	0,69	0,78
23	F	28	rinite	0,69	0,42
24	F	50	rinite	0,73	0,44
25	F	18	rinite	0,64	0,41
26	F	46	rinite	0,57	0,42
27	F	30	rinite	0,58	0,41
28	F	23	rinite	0,58	0,42
29	F	24	rinite	0,63	0,42
30	F	47	rinite / asma	0,66	0,37

a = Níveis de IgE específica anti-Dpt, obtido por ELISA (IE = Índice de reatividade ELISA)

b = Níveis de IgE específica anti-ConA/Dpt, obtido por ELISA

Quadro 3. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes do grupo III (controle).

Grupo III				
<i>Paciente</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade (anos)</i>	<i>IgE anti-Dpt^a (IE)</i>	<i>IgE anti-ConA/Dpt^b (IE)</i>
1	F	39	0,76	0,72
2	M	20	0,80	0,84
3	M	32	0,71	0,83
4	M	21	0,80	0,72
5	F	54	0,61	0,69
6	F	22	0,74	0,66
7	F	27	0,67	0,78
8	F	26	0,67	0,78
9	M	32	0,81	0,79
10	F	33	0,70	0,74
11	F	18	0,68	0,79
12	F	35	0,68	0,70
13	F	18	0,69	0,76
14	F	21	0,65	0,82
15	F	20	0,68	0,79
16	F	44	0,69	0,82
17	M	19	0,75	0,78
18	F	30	0,68	0,76
19	F	21	0,64	0,74
20	M	18	0,66	0,75
21	F	45	0,73	0,83
22	F	51	0,69	0,78
23	F	22	0,71	0,76
24	F	24	0,73	0,74
25	F	22	0,82	0,87
26	F	35	0,71	0,73
27	F	22	0,71	0,71
28	F	22	0,54	0,54
29	M	53	0,60	0,43
30	F	18	0,56	0,42

a = Níveis de IgE específica anti-Dpt, obtido por ELISA (IE = Índice de reatividade ELISA)

b = Níveis de IgE específica anti-ConA/Dpt, obtido por ELISA