



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fração ligante de ConA isolada de extrato bruto de
Dermatophagoides farinae reconhecida por anticorpos IgE
específicos em pacientes atópicos

Leandro Hideki Ynoue

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 - 2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fração ligante de ConA isolada de extrato bruto de
Dermatophagoides farinae reconhecida por anticorpos IgE
específicos em pacientes atópicos

Leandro Hideki Ynoue

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 - 2003

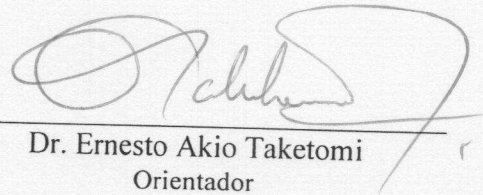


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS


Fração ligante de ConA isolada de extrato bruto de
Dermatophagoides farinae reconhecida por anticorpos IgE
específicos em pacientes atópicos

Leandro Hideki Ynoue

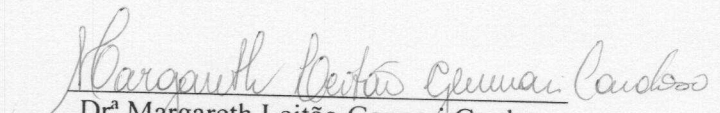
Aprovado pela Banca Examinadora em 25/07/03 Nota 100



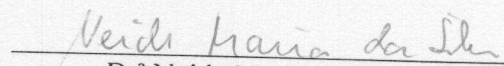
Dr. Ernesto Akio Taketomi
Orientador



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



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



Dr.^a Neide Maria da Silva
Membro da Banca Examinadora

Uberlândia, 25 de julho de 2003.

Agradecimentos

Ao professor Ernesto Akio Taketomi, pela competência, seriedade, paciência e por seus ensinamentos ao longo desse período;

Aos demais mestres da disciplina de imunologia que sempre se encontravam dispostos a atender as dúvidas;

À equipe de alergia com os quais pude contar a qualquer hora, e que demonstraram ser amigos de verdade;

Aos professores Federico Monte Alegre e Sun-Sang J. Sung pela doação de material essencial para a realização do trabalho;

Às professoras Neide e Margareth pela gentileza de participarem da etapa final do trabalho, estando presentes na banca examinadora;

Aos meus grandes amigos do Curso de Biologia, principalmente aos Los Coleópteros, pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos;

À minha família por estarem presentes nos momentos em que mais precisei deles, demonstrando sua preocupação, carinho e incentivo;

À todas as pessoas que participaram da minha vida e deixaram comigo algo que jamais irei esquecer, o meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

RESUMO.....	01
SUMMARY.....	02
INTRODUÇÃO.....	03
MÉTODOS.....	04
Seleção de indivíduos.....	04
Teste Cutâneo de Puntura (TCP).....	05
Preparação do extrato antigênico.....	05
Cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A - Sepharose.....	06
SDS-PAGE.....	06
ELISA para detecção de IgE específica.....	06
Análise estatística.....	07
RESULTADOS.....	07
DISCUSSÃO.....	09
CONCLUSÕES.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
Tabela 1.....	14
Figura 1.....	15
Figura 2.....	16
Figura 3.....	17
Figura 4.....	18
Figura 5.....	19

RESUMO - OBJETIVO. Investigar a reatividade de anticorpos séricos IgE aos antígenos glicosilados derivados da fração ligante de Concanavalina A do extrato bruto de *Dermatophagoides farinae* em pacientes com alergia respiratória a ácaros da poeira domiciliar.

MÉTODOS. Um total de 95 pacientes foi submetido ao teste cutâneo de puntura (TCP) e divididos em grupos de acordo com o histórico clínico e reatividade cutânea: 35 pacientes com rinite e/ou asma e TCP positivo (Grupo I), 30 pacientes portadores de rinite e/ou asma e TCP negativo (Grupo II) e 30 indivíduos controles (Grupo III). Sangue foi coletado para análise de IgE sérica específica a alérgenos de *D. farinae*. O extrato do ácaro foi fracionado por cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A-Sepharose.

RESULTADOS. Os valores de IgE específica do Grupo I apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação aos outros grupos. Os níveis de IgE específicos anti-Df e anti-ConA/Df mostraram uma correlação significativa positiva ($r = 0,7334$) no Grupo I. Não houve associação significativa entre os valores de pápula e os níveis de IgE específicos. Entretanto, adicionalmente, observou-se uma discreta associação entre maiores valores de medida da pápula com maiores níveis de IgE específica anti-Df e anti-ConA/Df.

CONCLUSÃO. Os resultados sugerem que a fração ConA/Df é constituída de importantes componentes alergênicos glicosilados, uma vez que os anticorpos IgE presentes no soro de pacientes atópicos apresentaram alta reatividade, tanto ao Df quanto a ConA-Df. Alérgenos potencialmente glicosilados de Df podem ser considerados como um importante fator de sensibilização alergênica e ser empregados na terapia hiposensibilizante.

UNITERMOS: *Dermatophagoides farinae*. Concanavalina A. Alergia. Poeira domiciliar.

SUMMARY

CONA BINDING FRACTION ISOLATED FROM *DERMATOPHAGOIDES FARINAE* EXTRACT RECOGNIZED BY SPECIFIC IGE ANTIBODY IN ATOPIC PATIENTS

OBJECTIVE. Investigate the serum IgE antibody reactivity by glycosilated antigens components of Concanavalin A binding fraction from *Dermatophagoides farinae* extract in house dust mite allergic patients.

METHODS. A total of 95 patients were submitted to the skin prick test (SPT) and divided in groups according to the clinic history and the skin reactivity: 35 patients with rhinitis and/or asthma and positive SPT (Group I), 30 patients with rhinitis and/or asthma and negative SPT (Group II) and 30 controls subjects (Group III). Blood was collected for analysis of serum *D. farinae* IgE. The mite extract was fractionated by Concanavalin A-Sepharose in affinity chromatography column.

RESULTS. The Group I specific IgE levels showed significant difference ($p < 0,001$) comparing to the other Groups. The levels of specific IgE anti-Df and anti-ConA/Df revealed a positive significant correlation ($r = 0,7334$; $p < 0,0001$) in Group I. Do not exist a significant association between the size of wheals and the levels of specific IgE. However, in addition, was observed that the higher wheals values showed a discreet association comparing with the levels of specific IgE anti-Df and anti-ConA/Df.

CONCLUSION. The results suggests that the fraction ConA/Df is constituted of important glycosilated allergenic components, in spite of the IgE antibody present in the serum of atopic patients showed high reactivity to Df as much as ConA-Df. Allergens potentially glycosilated from Df can be considered as a important factor of allergenic sensitization and potential in hiposensitization therapy.

KEYWORDS: *Dermatophagoides farinae*. Concanavalin A. Allergy. House dust.

INTRODUÇÃO

Alterações nos costumes e a presença de móveis e utensílios que provocam um aumento da poluição doméstica têm contribuído para a maior prevalência de doenças alérgicas. A maior permanência das pessoas no ambiente doméstico ou em ambientes fechados contendo particularmente carpetes, cortinas, brinquedos de pelúcia e a presença constante ou não de animais domésticos, são fatores que contribuem para o aumento de alérgenos inaláveis derivados desses produtos¹.

A exposição de um indivíduo alérgico a um determinado alérgeno poderá dar origem à hipereatividade brônquica e causar asma. A resposta alérgica ocorre quando um antígeno ativa uma resposta imune com síntese de IgE específica, a qual sensibilizará os mastócitos. Estes, após um segundo contato com o antígeno, irão liberar mediadores pré-formados como histamina, proteases e mediadores lipídicos, como leucotrienos e prostaglandinas, produzindo uma reação inflamatória aguda com sintomas de asma ou rinite. Entretanto muitos indivíduos sensibilizados não apresentam sintomas e possuem mínima ou nenhuma hipereatividade brônquica, sob condições ambientais com níveis relativamente baixos de alérgenos. Portanto, a quantidade de alérgenos necessária para causar hipereatividade brônquica é muito variável². Além da exposição, vários estudos têm relatado que os fatores genéticos constituem um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da asma³. Os principais aspectos que diferenciam a inflamação alérgica dos outros tipos de inflamação são a síntese de IgE, ativação de mastócitos dependente de IgE e infiltração da mucosa brônquica com linfócitos e eosinófilos⁴. O desencadeamento de uma resposta alérgica depende da natureza dos estímulos antigênicos. Dentre eles, alérgenos derivados de ácaros da poeira domiciliar são um importante fator na indução da síntese de IgE.

Ácaros da família Pyroglyphidae (*Dermatophagoides* spp.) são as principais fontes de alérgenos na poeira doméstica⁵. Três espécies, *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *D. microceras*, têm sido reconhecidas como as mais prevalentes⁶, embora *Blomia tropicalis*, em áreas tropicais e subtropicais, tem sido relatada como importante fonte de alérgeno domiciliar⁷. Além disso, Sopelete et al.⁸, em um estudo de prevalência de alérgenos de ácaro em amostras de poeira domiciliar de Uberlândia, MG, relatam que *D. farinae* foi a espécie predominante dentre as casas analisadas, sugerindo que estudos

adicionais deveriam ser realizados em demais regiões brasileiras para caracterizar a importância desta espécie na sensibilização alérgica. Até o presente momento, mais de quinze proteínas de *D. farinae* foram identificadas como alérgenos potenciais. A maioria desses alérgenos são proteínas de peso molecular baixo ou glicoproteínas com estrutura diversa e funções biológicas distintas⁹. Dentre eles, Kawamoto et al.¹⁰ relataram que Der f 1, Der f 7, Der f 11, Der f 15 e Der f 17 são alérgenos glicosilados.

O uso da lectina Concanalina A (ConA), originária do feijão *Canavalia ensiformes*, em fracionamento de alérgenos de ácaros da poeira domiciliar não tem sido muito investigado. Almeida et al.¹¹ identificaram componentes glicosilados em extrato de *Blomia tropicalis*, onde a reatividade dos anticorpos IgE de pacientes alérgicos foi analisada por ELISA e *Immunoblotting*, observando-se uma correlação positiva entre os níveis de anticorpos IgE e componentes ligantes de Concanalina A.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a reatividade de anticorpos séricos IgE aos antígenos derivados da fração ligante de Concanalina A do extrato bruto de *Dermatophagoides farinae*, em pacientes com alergia a ácaros da poeira domiciliar.

MÉTODOS

Um total de 95 indivíduos foi submetido ao TCP e divididos em três grupos distintos de acordo com o histórico clínico e reatividade cutânea ao alérgeno testado. O Grupo I de pacientes com asma e/ou rinite alérgica e positivos ao TCP para *Dermatophagoides farinae* (n = 35); o Grupo II consistiu de pacientes com asma e/ou rinite alérgica e negativos ao TCP a *D. farinae* (n = 30) e o Grupo III compreendeu indivíduos saudáveis e negativos ao TCP (n = 30).

Seleção de indivíduos

Sessenta e cinco indivíduos, de ambos os sexos, com idade de 18 a 54 anos, foram selecionados e atendidos no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. Todos os indivíduos responderam a um questionário clínico segundo os critérios adotados pelo *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC, 1998)¹². Um total de 30 indivíduos controles sem história clínica de doença

atópica e negativos ao teste cutâneo a diferentes alérgenos inaláveis foram também recrutados. Indivíduos que estavam em tratamento com corticoesteróides, tópicos ou sistêmicos, ou anti-histamínicos de primeira ou segunda geração foram excluídos do estudo. Os pacientes assinaram um termo de consentimento, onde foram esclarecidos sobre todos os procedimentos adotados, podendo desistir a qualquer momento, sem acarretar prejuízo ou constrangimento.

Teste Cutâneo de Puntura (TCP)

Os pacientes foram submetidos ao TCP, segundo a técnica de Ownby¹³, utilizando extratos dos ácaros *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, aplicando-se uma gota do extrato alergênico sobre a pele, seguida de uma pequena punção com lanceta apropriada (Aiko, Rio de Janeiro, Brasil). Como controle positivo foi utilizada a histamina (IPI/ASAC Brasil, São Paulo, Brasil) e solução salina como controle negativo (IPI/ASAC Brasil, São Paulo, Brasil). A leitura foi feita após 15 minutos, através da determinação do valor médio da pápula em sentido ortogonal, sendo que o resultado foi considerado positivo para uma pápula maior ou igual a 3 mm que o controle negativo¹⁴. Em paralelo, foi realizada a coleta de sangue dos pacientes para posterior análise *in vitro* dos níveis séricos de IgE específica.

Preparação do extrato antigênico

A extração das proteínas do ácaro *D. farinae* foi realizada de acordo com Kumar et al.¹⁵ com modificações. Uma alíquota de 20 g de ácaro em cultivo (cedido pelo Prof. Dr. Federico Montealegre - Ponce University of Medicine, Porto Rico, Estados Unidos) foi macerada em nitrogênio líquido, e adicionada de 75 mL de éter etílico, incubando-se por 24 horas a 4°C. Após evaporação total do éter, a amostra foi diluída em solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2, (PBS) contendo inibidores de proteases (PMSF 1 mM, Benzamidina 1mM, Aprotinina 0,2 %, Leupeptina 1mM - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e incubada 18 horas a 4°C em agitação orbital. Após dois ciclos de centrifugação a 3.000 g durante 15 minutos a 4°C e um ciclo a 30.000 g por 45 minutos a 4°C o sobrenadante foi coletado, e dialisado contra PBS em sistema Amicon (W.R. Grace & Co., Beverly, EUA), utilizando membrana YM10 (*cut-off* 10 kDa). Ao término da concentração e diálise, o material retido foi considerado como o

O ensaio de cromatografia foi realizado utilizando extrato total de *Dermatophagoides farinae* (Df) à concentração protéica total de 45 mg em coluna de afinidade de ConA - Sepharose.

A Figura 1 apresenta o perfil cromatográfico deste ensaio. 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 apresentou densidade óptica (D.O.) máxima de 1,953. As amostras contidas nos tubos de número 1 e 2 não apresentaram valores de absorbância legíveis pelo espectrofotômetro, portanto foram excluídas do gráfico. O segundo pico representa a fração ligante de ConA (ConA/Df), eluída através da adição de metil- α -D-manopiranosídeo. As amostras dos tubos de 1 a 13 do *Void* e dos tubos 42 a 54 de ConA/Df foram misturadas e, posteriormente, dialisadas e concentradas, sendo que a massa final obtida foi de aproximadamente 4 mg/mL para o *void* e 0,2 mg/mL para ConA/Df.

A Figura 2 mostra o perfil das bandas nestas amostras com as respectivas massas moleculares de referência (Mr). No extrato total (Df), foram detectadas um grande espectro de bandas, principalmente com peso molecular estimado de 107, 92, 80, 63, 53, 34, 30, 28, 23 e 16 kDa. As principais bandas visualizadas no *Void* correspondem a 107, 92, 23 e 16 kDa. A ConA/Df apresentou um perfil eletroforético com bandas de 104, 77, 71, 28, 22, 15 e 10 kDa.

O ensaio imunenzimático ELISA foi utilizado para quantificar os níveis de IgE específica ao extrato bruto (anti-Df) e à fração ligante de ConA (anti-ConA/Df). A Figura 3 representa a distribuição dos níveis de IgE específica anti-Df e anti-ConA/Df, medidos em Índice ELISA (IE), nos três grupos analisados. Todos os indivíduos do grupo I apresentaram níveis de IgE específica ao Df maiores ou iguais a 1,0 ($IE \geq 1,0$). Enquanto que 32 (91,4 %) dos indivíduos apresentaram valores de IE positivos para a fração ConA/Df. No grupo II, nenhum indivíduo apresentou IgE específica anti-ConA/Df acima do *cut-off* ($IE = 1,0$). Entretanto, 2 (6,7 %) indivíduos apresentaram IgE específica anti-Df acima deste ponto ($IE = 1,2$ e $IE = 1,3$). Todos os níveis de IgE específica nos indivíduos do grupo III apresentaram valores de IE inferiores a 1,0. A média geométrica dos níveis de IgE específicos anti-Df e anti-ConA/Df foram significativamente maiores no grupo I (3,6 e 2,7 para anti-Df e anti-ConA/Df,

respectivamente), comparado aos demais grupos (Grupo II: 0,7 e 0,8 para anti-Df e anti-ConA/Df, respectivamente; Grupo III: 0,8 para ambos), apresentando diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os níveis de IgE específica do Grupo I em relação aos demais grupos.

A Figura 4 mostra a distribuição dos níveis médios de IgE específicos em relação aos valores das pápulas nos indivíduos do grupo I, divididos em classes distintas. Não houve associação significativa entre os valores de pápula e os níveis de IgE específicos. Entretanto, adicionalmente, observou-se uma discreta associação entre maiores valores de medida da pápula com maiores níveis de IgE específica anti-Df e anti-ConA/Df. Entretanto, os níveis de IgE específicos anti-Df e anti-ConA/Df mostraram uma correlação significativa positiva ($r = 0,7334$; $p < 0,0001$) no Grupo I, como demonstrado na Figura 5.

DISCUSSÃO

Os ácaros da poeira domiciliar apresentam papel importante na sensibilização alérgica, sendo considerado um dos grandes fatores de risco para desenvolvimento de alergias respiratórias, incluindo a asma. O ácaro *Dermatophagoides farinae* constitui uma das principais fontes de alérgenos na poeira domiciliar na cidade de Uberlândia, MG, como reportado por Sopelete et al.²⁰ Altos níveis ($> 2\mu\text{g}$ de Der f 1/g de poeira) destes alérgenos, particularmente foram encontrados nas residências, confirmando a sua importância na sensibilização alérgica por ácaros da poeira domiciliar.

O extrato alérgico é constituído de proteínas e glicoproteínas, além de outros compostos. A concanavalina A é uma lectina ligante de manose, apresentando alta afinidade por compostos glicosilados que contem estes sacárides. Esta lectina vem sendo muito utilizada para isolamento de fração glicosilada de vários antígenos de agentes infecciosos, tais como Almeida et al.¹¹ Entretanto, para alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, há poucos relatos na literatura sobre sua aplicação. Em ácaros da espécie *Dermatophagoides pteronyssinus*, o alérgeno glicosilado Der p 4 foi purificado em coluna de afinidade utilizando esta lectina para caracterização físico-química de suas isoformas²¹.

Neste estudo, a concanavalina A foi utilizada para isolar alérgenos glicosilados de *D. farinae*, utilizando metil- α -D-manopiranosídeo como sacarídeo eluente. Na análise

em SDS-PAGE, esta fração ligante (ConA/Df) apresentou um perfil protéico de bandas predominantemente de alto peso molecular (104, 77, 71 kDa), sendo evidenciadas também, bandas de baixo peso (28, 22, 15 e 10 kDa). Segundo Kawamoto et al.¹⁰, as proteínas que apresentam sítios de glicosilação da espécie *D. farinae* são Der f 1 (25 kDa), Der f 7 (22 kDa), Der f 11 (83 kDa), Der f 15 (61 kDa) e Der f 17 (40 kDa). O fato de algumas destas proteínas estarem presentes na fração ConA/Df pode sugerir que estes compostos glicosilados apresentam afinidade pela concanavalina A e segundo Agnes et al.²², podem ser até cem vezes mais imunogênicos do que partes não glicosiladas. Desta forma, estudos posteriores visando a caracterização destes compostos glicosilados e a reatividade de células T a estes compostos devem ser conduzidos para melhor conhecimento de suas propriedades imunogênicas.

De acordo com os resultados, os níveis de anticorpos IgE específicos à fração ligante de concanavalina A (anti-ConA/Df) no soro de pacientes com alergia respiratória foram significativamente maiores nos pacientes do Grupo I comparado aos demais grupos, como também ocorreu para IgE anti-Df. Além disso, a correlação significativamente positiva entre níveis de IgE detectados pelo extrato total Df e ConA/Df mostra que a fração ConA/Df é amplamente reconhecida por soros de pacientes atópicos.

Estudos envolvendo a reatividade de anticorpos IgE a diferentes bandas de ConA/Df, por *Immunoblotting* deverão ser realizados para identificação dos alérgenos glicosilados imunodominantes, o que permitirá esclarecer diversos aspectos quanto à reatividade entre alérgenos ligantes de concanavalina A e anticorpos IgE, bem como seu perfil na imunogenicidade e imunoterapia da doença alérgica.

CONCLUSÕES

Os níveis de IgE específicos à fração ligante de concanavalina A se correlacionaram com os níveis destes anticorpos específicos ao extrato bruto, onde em pacientes alérgicos a *Dermatophagoides farinae* estes níveis foram mais altos comparados aos não alérgicos.

Alérgenos potencialmente glicosilados de Df podem ser considerados como um importante fator de sensibilização alérgica.

A fração ConA/Df é constituída de vários componentes alergênicos glicosilados, uma vez que os anticorpos IgE presentes no soro de pacientes atópicos apresentam alta reatividade tanto ao Df quanto a ConA/Df.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Platts-Mills TAE. Estimation of allergen concentration in indoor environments: Prediction of health-related effects. In: Gammage RB, Berben BA (ed.) Indoor air and human health. 2n ed. Boca Raton: CRC Press, 1996.p.197-210.
2. Chapman MD, Heymann PW, Sporik RB, Platts-Mills TAE. Monitoring allergen exposure in asthma: new treatment strategies. *Allergy* 1995;50:29-33.
3. Barnes KC, Marsh DG. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today* 1998;19:325-32.
4. Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Robinson DS, Irani AM, Schwartz LB, et al. Immunohistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis. Identification of activated T lymphocytes, eosinophils and neutrophils. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:170-6.
5. Voorhorst T, Spieskma FTM, Varekamp H, Leupen MJ, Lyklema AW. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces. *J Allergy* 1967;39:325-39.
6. Heymann PW, Chapman MD, Aalberse RC, Fox JW, Platts-Mills TAE. Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:1055-67.
7. Thomas WR, Smith W. House-dust-mite allergens. *Allergy* 1998;53:821-32.

8. Sopenete MC, Silva DAO, Arruda LK, Chapman MD, Taketomi EA. *Dermatophagoides farinae* (Der f 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) allergen exposure among subjects living in Uberlândia, Brazil: Int Arch Allergy Immunol 2000;122:257-63.
9. Tsai L, Chao P, Shen H, Tang R, Chang T, Chang Z, et al. Isolation and characterization of a novel 98-kd *Dermatophagoides farinae* mite allergen. J Allergy Clin Immunol 1998;102:295-303.
10. Kawamoto S, Aki T, Yamashita M, Tategaki A, Fujimura T, Tsuboi S, Katsutani T, et al. Toward Elucidating the full Spectrum of Mite Allergens – State of the Art. J Biosci Bioeng 2002; 94:285-98.
11. Almeida KC, Gennari-Cardoso ML, Pereira EAL, Silva DAO, Cunha Jr JP, Montealegre F, et al. Mannose-rich glycosylated components isolated from the house dust mite *Blomia tropicalis* [Abstract]. J Allergy Clin Immunol 2002;109:S137.
12. International Study of Asthma and Allergies in Childhood – ISAAC Manual, Auckland (nz) / bochum (frg), 1992, 47p.
13. Ownby DR. Allergy testing: *in vivo* versus *in vitro*. Pediatr Clin North Am 1988;35:995-1009.
14. Kanceljak-Macan B, Macan J, Placec D, Klepac T, Milkovic-Kraus S. The 3 mm Skin Prick test (SPT) threshold criterion is not reliable for *Tyrophagus putrescentiae*: the re-evaluation of SPT criterion to dust mites. J Allergy 2002; 57:1187-90.
15. Kummar SS, Singh BP, Gandal, SV. 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*. Int Arch Allergy Immunol 1998; 117:174-9.

16. Lowry OH, Rosenbrough J, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin-pheol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
18. Friedman RD. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1982; 126:346-349.
19. Silva DAO, Gervásio AM, Sopelete MC, Arruda-Chaves E, Arruda LK, Chapman MD, et al. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86,545-50.
20. Sopelete MC, Silva DAO, Arruda LK, Chapman MD, Taketomi EA. *Dermatophagoides farinae* (Der f 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) allergen exposure among subjects living in Uberlândia, Brazil. *International Archives of Allergy and Immunology* 2000;122:257-63.
21. Stewart GA, Turner KJ. Physicochemical and immunochemical characterization of the high molecular weight allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* with particular reference to the tridacnin, Con-A and S107 reactive components. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1980;58:275-88.
22. Agnes MC, Tan A, Jordens R, Geluk A, Roep BO, Ottenhoff T, et al. Strongly increased efficiency of altered peptide ligands by mannosylation. *Int Immunol* 1998;10:1299-304.

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

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

a = média aritmética ± desvio-padrão (Df)

b = média aritmética ± desvio-padrão (Bt)

(+) Positivo; (-) Negativo

Figura 1 - Perfil cromatográfico do extrato total de *D. fariniae* (Df) em coluna de afinidade de Concanavalina A – Sepharose. O Void foi obtido pela eluição com PBS. Obteve-se o eluato ConA-Df pela adição de metil- α -D-manopiranosídeo 0,2M (linha pontilhada). Volume da coluna: 5,0 mL; amostra aplicada: 45 mg de Df em um volume de 3,0 mL.

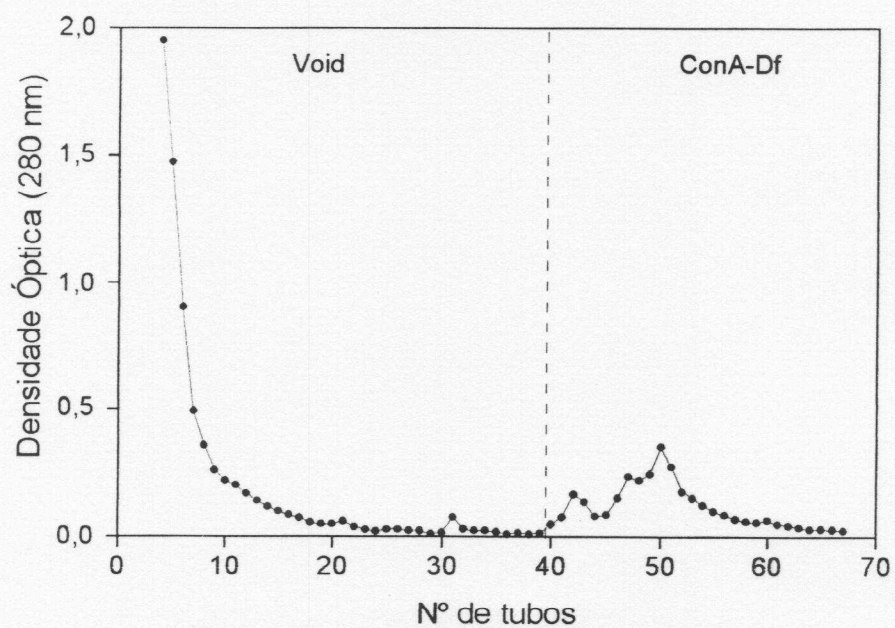


Figura 2 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12 %) de (a) Df, (b) *Void* e (c) ConA/Df. Coloração por nitrato de prata. Mr: massa molecular de referência, em kDa.

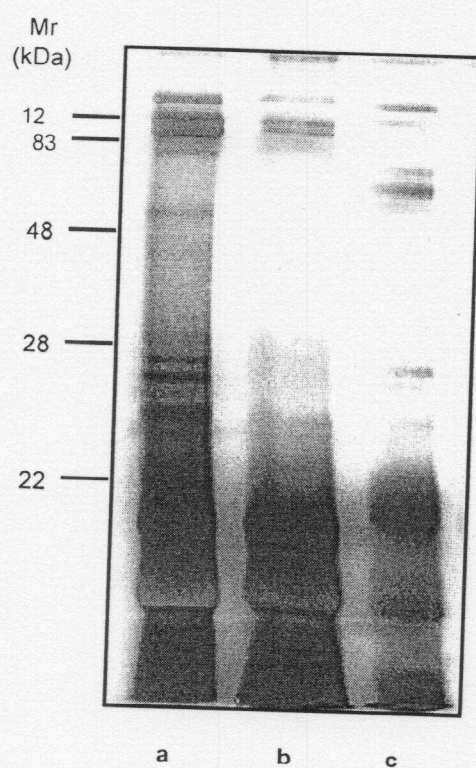


Figura 3 - Níveis de IgE específica a alérgenos de *D. farinae* em extrato bruto (Df) e em fração glicosilada obtida em coluna de Concanavalina A (ConA-Df), expressos em índice ELISA (IE), determinados nos soros de 35 pacientes do Grupo I, 30 pacientes do Grupo II e 30 indivíduos do Grupo III. As barras horizontais indicam a média geométrica de cada grupo. m.g.: média geométrica. * $p < 0,001$.

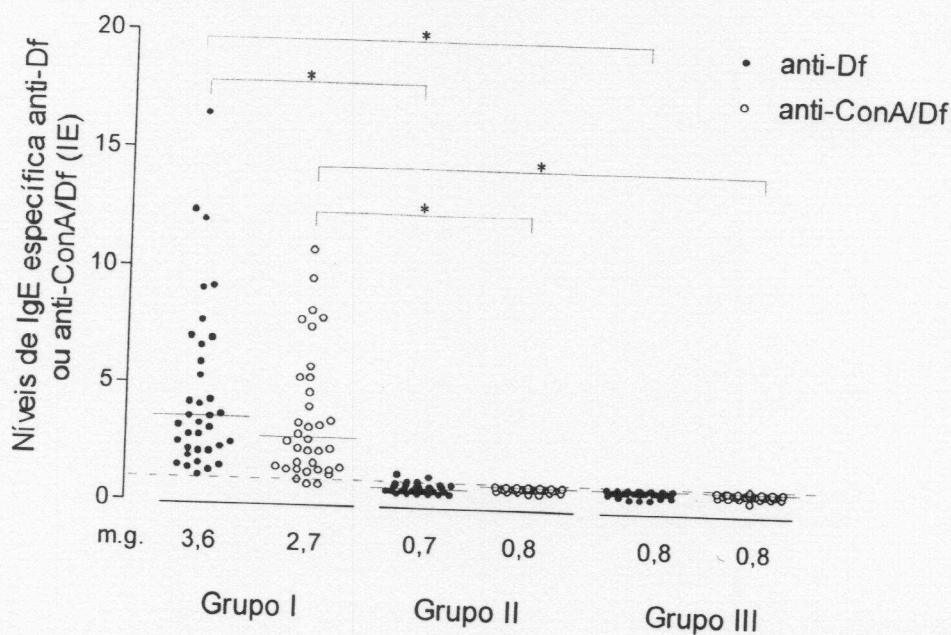


Figura 4 - Níveis de IgE específica (IE) ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Df) e fração ligante de ConA (ConA/Df) em relação ao tamanho da pápula (mm) em pacientes do Grupo I. As barras indicam a média aritmética das medidas de pápula e das linhas verticais posteriores indicam o desvio-padrão.

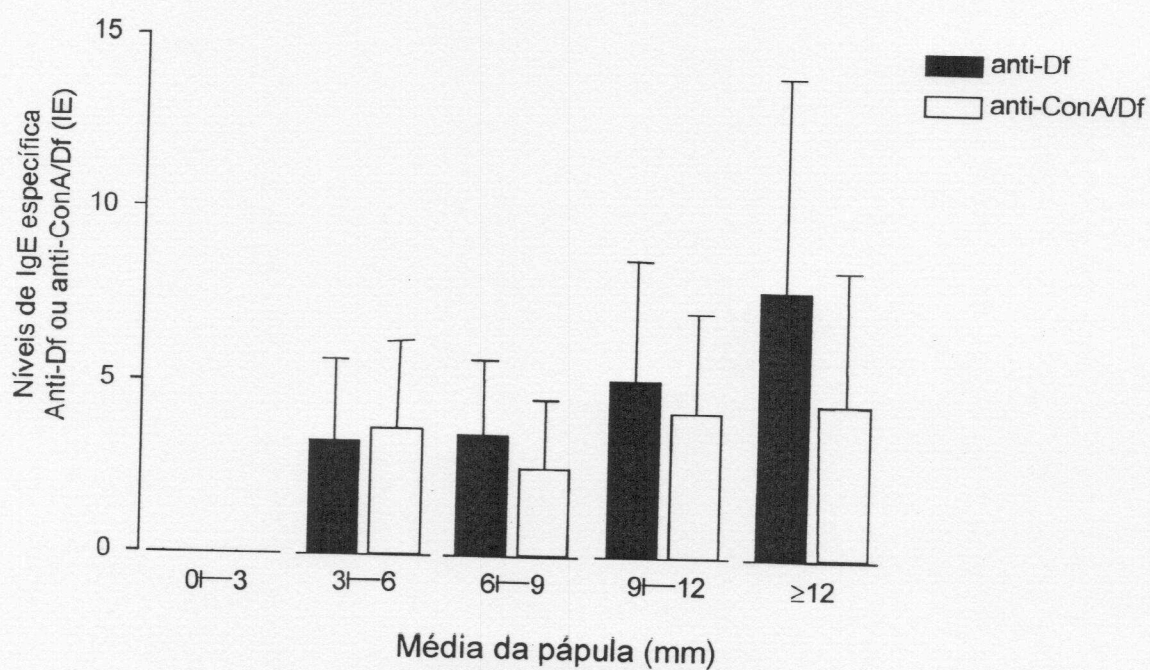
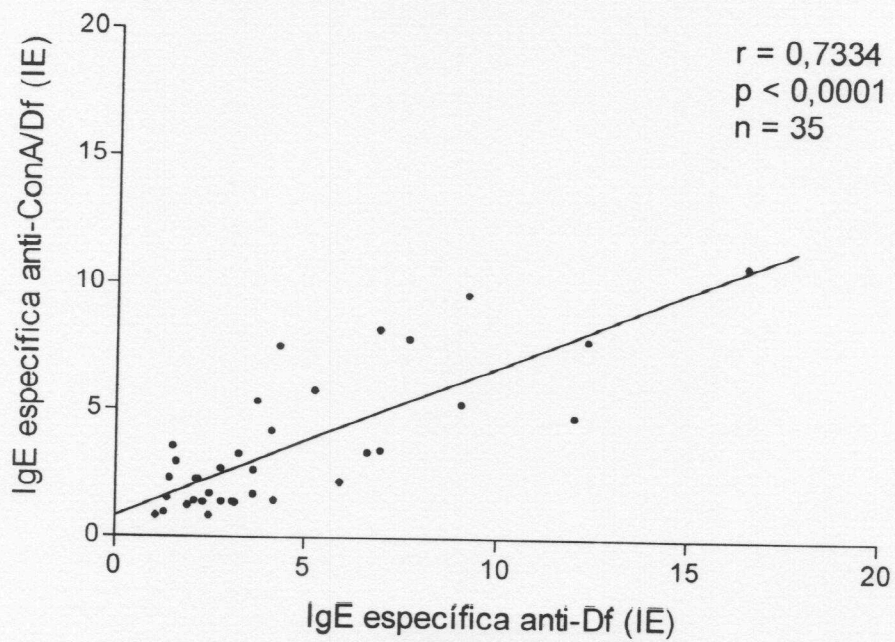


Figura 5 - Correlação entre os níveis de IgE específica a alérgenos de extrato bruto de *D. farinae* (Df) e de fração glicosilada obtida em coluna de Concanavalina A (ConA-Df), expressos em índice ELISA (IE), determinados nos soros de 35 pacientes do Grupo I.



NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A Revista da Associação Médica Brasileira, indexada nas bases de dados Scielo, LILACS, MEDLINE, Chemical Abstracts e Qualis A/ Capes, tem por objetivo publicar artigos que contribuam para o conhecimento médico e que não tenham sido publicados em outros periódicos.

A Revista aceita para publicação Artigos Originais e Correspondências. Trabalhos de outra natureza poderão ser aceitos para publicação, dependendo da avaliação do Corpo Editorial. Além destes, a Ramb publicará ainda, sempre através de convite ao autor, as seguintes seções: Editorial, Atualização, Discussão de Caso, À beira do Leito, Comentários, Panorama Internacional e Diretrizes.

INFORMAÇÕES GERAIS

Os artigos e correspondências deverão ser enviados à:

Revista da Associação Médica Brasileira

Rua São Carlos do Pinhal, 324

01333-903 - São Paulo - SP

Os artigos poderão ser escritos em Português ou Espanhol, em linguagem fácil e precisa. Cada artigo, acompanhado de correspondência ao editor, deverá conter título do artigo, nome completo do(s) autor(es), instituição na qual o trabalho foi realizado e seção da Revista à qual ele se destina. Cada original deverá vir acompanhado de três vias, inclusive disquete em sistema PC, fotografias, gráficos, etc, além de carta solicitando que o artigo seja publicado na Ramb. O conteúdo do material enviado para publicação na Ramb não pode ter sido publicado anteriormente, nem submetido para publicação em outros veículos.

Todos os artigos publicados são revisados por membros do Conselho Editorial. A decisão sobre a aceitação do artigo para publicação ocorrerá, sempre que possível, no prazo de três meses a partir da data de seu recebimento. Os artigos publicados irão conter: data de recebimento, aceitação e meios de contato com o autor principal. Artigos recusados serão devolvidos ao autor.

Após comunicação de aprovação do artigo, o autor deverá enviar o trabalho gravado em disquete em sistema PC.

Quando da publicação, provas impressas serão enviadas aos autores, devendo ser revisadas e devolvidas no prazo de dois dias.

CORPO EDITORIAL

O Corpo Editorial da Ramb é composto pelo Editor Geral, Editores Associados, Editores Colaboradores e Conselho Editorial nas seguintes áreas: Clínica Médica, Clínica Cirúrgica, Saúde Pública, Pediatria, Ginecologia e Obstetrícia, Bioética, Economia da Saúde e Medicina Baseada em Evidências. O Corpo Editorial será responsável pela revisão e aceitação ou não dos artigos enviados à revista para publicação.

ESTILO E PREPARAÇÃO DOS TRABALHOS

O trabalho deverá ser redigido em corpo 12, numa só face do papel, no máximo em 20 laudas de 30 linhas cada, espaço 1.5 linha, com margem de 3cm de cada lado, no topo e no pé de cada página. Todas as páginas, exceto a do título, devem ser numeradas.

Página título

Deverá conter:

- a) título do trabalho, também na versão em inglês
- b) nome, sobrenome do autor e instituição a qual pertence o autor;
- c) nome e endereço da instituição onde o trabalho foi realizado;
- d) título resumido (não exceder 50 letras e espaços);
- e) Carta de apresentação, contendo assinatura de todos os autores, responsabilizando-se pelo conteúdo do trabalho, porém apenas um deve ser indicado como responsável pela troca de correspondência. Deve conter telefone, fax, e endereço para contato.
- f) Aspectos éticos - Carta dos autores revelando eventuais conflitos de interesse (profissionais, financeiros e benefícios diretos ou indiretos) que possam influenciar os resultados da pesquisa. Na carta deve constar ainda a data da aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição à qual estão vinculados os autores.

Notas de rodapé

Só as estritamente necessárias, devem ser assinaladas no texto e apresentadas em folha separada após a do resumo, com subtítulo *nota de rodapé*.

ARTIGOS ORIGINAIS

Os artigos originais deverão conter, obrigatoriamente, *Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas*. Referências de "resultados não publicados" e "comunicação pessoal" devem aparecer, entre parênteses, seguindo o(s) nome(s) individual (is) no texto. Exemplo: Oliveira AC, Silva PA e Garden LC (resultados não publicados). O autor deve obter permissão para usar "comunicação pessoal".

ARTIGOS DE REVISÃO

Serão publicados somente artigos solicitados através de convite dos Editores Associados da Ramb. Tamanho máximo de 20 laudas. Devem conter obrigatoriamente Resumo, Summary, Unitermos e Keywords.

AGRADECIMENTOS

Apenas a quem colabore de modo significativo na realização do trabalho. Devem vir antes das Referências Bibliográficas.

RESUMO/SUMMARY

O resumo, com no máximo 250 palavras, deverá conter *objetivo, métodos, resultados e conclusões*. Após o resumo deverão ser indicados, no máximo, seis Unitermos (recomenda-se o vocabulário controlado do "Descritores em Ciências da Saúde", publicação da Bireme - Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (www.bireme.br/terminologiaensaude)). O *Summary* visa permitir a perfeita compreensão do artigo. Apresentado em folha separada, seguir o mesmo modelo do resumo: *Background, Methods, Results, Conclusions*. Deve ser seguido de *Key words*. Artigos escritos em português devem conter, na segunda página, dois resumos: um em português e outro em inglês (*Summary*). Artigos escritos em espanhol devem apresentar resumos em inglês (*Summary*) e português. O resumo deve identificar os objetivos, métodos, resultados e conclusões do trabalho e ser, preferencialmente, estruturado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências bibliográficas devem ser dispostas por ordem de entrada no texto e numeradas consecutivamente, sendo obrigatória sua citação.

Devem ser citados todos os autores, quando até seis; acima deste número, citam-se os seis primeiros seguidos de et al. O periódico deverá ter seu nome abreviado de acordo com a LIST OF JOURNALS INDEXED IN INDEX MEDICUS do ano corrente, disponível também *on-line* no site: www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html, ou, se não possível, a Associação de Normas Técnicas (ABNT).

Exemplos:

1. Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996;73:1006-12.
2. Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.
3. The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.
4. Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.
5. Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995.p.465-78.
6. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial on line] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from: URL:<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.
7. Leite DP. Padrão de prescrição para pacientes pediátricos hospitalizados: uma abordagem farmacoepidemiológica [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

As citações bibliográficas no texto devem ser numeradas com algarismos arábicos sobrescritos, na ordem em que aparecem no texto. Exemplo: Até em situações de normoglicemia⁶ ...

FIGURAS E TABELAS

Devem ser apresentadas apenas quando necessárias (no máximo de seis), para efetiva compreensão do texto e dos dados.

- a) As figuras, sempre em preto e branco, devem ser originais e de boa qualidade. As letras e símbolos devem estar na legenda.
- b) As legendas das figuras e tabelas devem permitir sua perfeita compreensão, independente do texto.
- c) As tabelas, com título e legenda, deverão estar em folhas individuais.
- d) Cada figura deverá conter, no verso, o nome do primeiro autor e o número da figura, e sua posição deverá ser indicada com seta. Figuras e tabelas, em folhas individuais, deverão ser numeradas separadamente, usando algarismo arábico, na ordem em que aparecem no texto.

ABREVIações / NOMENCLATURA

O uso de abreviações deve ser mínimo. Quando expressões extensas devem ser repetidas, recomenda-se que suas iniciais maiúsculas as substituam após a primeira menção. Esta deve ser seguida das iniciais entre parênteses. Todas as abreviações em tabelas e figuras devem ser definidas nas respectivas legendas. Apenas o nome genérico do medicamento utilizado deve ser citado no trabalho.

TERMINOLOGIA

Visando o emprego de termos oficiais aos trabalhos publicados, a Revista da Associação Médica Brasileira adota a Terminologia Anatômica Oficial Universal, aprovada pela Federação Internacional de Associações de Anatomistas (FIAA). As indicações bibliográficas para consulta são as seguintes: FCAT - IFAA (1998) - International Anatomical Terminology - Stuttgart - Alemanha - Georg Thieme Verlag ou CTA-SBA (2001) - Terminologia Anatômica - S. Paulo - Editora Manole.

SEÇÕES

À beira do Leito: Perguntas com respostas objetivas sobre condutas práticas.

Atualização: Relatam avanços aplicáveis na prática clínica em suas respectivas áreas. Características do texto: máximo de 120 linhas em corpo 12 em até 70 toques.

Comentários: seção destinada somente aos comentários sobre artigos originais. Poderá ser escrito por um profissional convidado ou pelos integrantes do Corpo Editorial. Características do texto: máximo de 29 linhas em corpo 12 e m até 70 toques.

Correspondência: Cartas contendo sugestões, comentários sobre trabalhos publicados, opiniões, dúvidas, perguntas, a fim de contar com a participação do leitor. Deverão conter no máximo de 40 linhas.

Diretrizes em Foco: Resumos ou trechos de normas ou recomendações a respeito da prática médica, como por exemplo: consensos e diretrizes elaborados por Sociedades de Especialidade, seguidos de comentários.

Editorial: Espaço dedicado à discussão de assuntos relevantes, abordando ou não artigos publicados na mesma edição. Serão escritos por membros do corpo editorial da Ramb ou sob convite a outros profissionais. Deverá ser digitado em corpo 12, até 70 toques, e conter no máximo 40 linhas.

Panorama Internacional: Resumos de artigos recentes e de relevância prática, seguidos de comentários.

Visando torná-los práticos e objetivos, os artigos/cartas das seções não poderão conter ilustrações ou gráficos. Somente se necessárias, as referências ou citações poderão ser incluídas, devendo estar dispostas ao final do artigo.