



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

Érika Aguiar Lara Pereira

**“RESPOSTA ANTICÓRPICA DE IgE, IgG1 E IgG4 A
BLOMIA TROPICALIS EM PACIENTES ATÓPICOS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Uberlândia – MG
2002

SISBI/UFU



1000208323



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

mon
616-056.3
-P4367L
TES/MEM

Érika Aguiar Lara Pereira

**“RESPOSTA ANTICÓRPICA DE IgE, IgG1 E IgG4 A
BLOMIA TROPICALIS EM PACIENTES ATÓPICOS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Mestranda: Érika Aguiar Lara Pereira

Uberlândia – MG
2002

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia do núcleo de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação do Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi e com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico as honras desta vitória a Luci minha mãe, Isabella e Chrystina minhas irmãs e especialmente a Joanielson meu pai (*in memorium*). O apoio de vocês foi fundamental para a realização de mais esta etapa em minha vida.

Agradecimentos

À Deise Aparecida de Oliveira Silva, pela atenção, amizade, compreensão, apoio e dedicação a este trabalho.

Ao professor Dr. Ernesto Akio Taketomi, pela orientação deste trabalho e pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

À família Alves Pereira (Sr. Vicente, D. Ivone, Karla, Kássia, Christina e Philip) pelo carinho, amizade, apoio e por terem feito da casa de vocês meu segundo lar.

Às amigas Valeska, Janethe e Margarethe, pelos momentos que possibilitaram o enriquecimento da nossa amizade.

Ao Jair Júnior pelas grandes contribuições ao trabalho; à prof. Cida pela disponibilidade em ajudar sempre; à Aurélia pela atenção e pelo auxílio com as figuras; à Flávia e Rodrigo pelo apoio técnico e emocional na finalização deste trabalho.

À Fernanda, Adriano, Marta, Sandra, Mônica, Henrique, Cristina e aos demais amigos da pós-graduação.

Ao secretário do curso de pós-graduação, João Martins Neto pela prestatividade.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia, Max, Junão e Andréia pelos auxílios prestados.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SAPIÊNCIA SUPREMA

“Inteligente é quem outros conhece
Sapiente é quem se conhece a si mesmo,
Forte é quem outros domina,
Poderoso é quem se domina a si mesmo.
Ativo é quem muito trabalha,
Rico é quem vive contente.
Firme é quem vive em seu posto,
Eterno é quem supera a morte”.

(Lao-Tsé)

Resumo

Sensibilização a alérgenos domiciliares é o fator de risco mais importante associado a asma. Em países tropicais, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e *Blomia tropicalis* (Bt) são considerados relevantes ácaros da poeira domiciliar. Este estudo teve como objetivo avaliar a reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 à Bt entre pacientes atópicos de Uberlândia, MG. Cento e dez pacientes apresentando asma e/ou rinite alérgica (AR) e 33 indivíduos controles foram submetidos ao teste cutâneo com extratos de ácaros da poeira domiciliar e punção venosa para obtenção de soro para ELISA e *Immunoblotting*. A maioria (56,4%) dos pacientes AR foi positiva ao extrato Bt pelo teste cutâneo (grupo Bt+), embora 50,9% destes foram reativos a ambos ácaros (Bt e Dp) e 5,5% eram sensibilizados somente a Bt. ELISA-IgE detectou 39,1% e positividade com níveis de IgE significativamente maiores no grupo Bt+ do que nos grupos Bt- e controle. Níveis de IgG1 foram significativamente maiores em ambos grupos (Bt+ e Bt-) do que no grupo controle. IgG4 demonstrou diferença significativa entre os grupos Bt+ e Bt- e uma correlação positiva com IgE específica. Os principais componentes alergênicos reconhecidos pelos soros dos pacientes AR Bt+ foram as proteínas de 54, 66 e 68 kDa. Os pacientes AR Bt+ parecem estar preferencialmente sensibilizados a componentes de pesos moleculares mais altos em relação aos alérgenos de baixo peso molecular (11 – 15 kDa) predominantemente detectados em outros estudos. Proteínas ligantes de IgG4 demonstraram estreita semelhança com o perfil alergênico de IgE, enquanto proteínas ligantes de IgG1, particularmente de pesos moleculares mais altos (104, 68, 66 e 54), foram fortemente reconhecidas pelos soros dos três grupos estudados (Bt+, Bt- e controle), sugerindo que tais componentes alergênicos poderão ser avaliados como potenciais antígenos candidatos para estudos de exposição e sensibilização alergênicas e imunoterapia.

Summary

Sensitization to indoor allergens is the most important risk factor associated with asthma. In tropical countries, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) and *Blomia tropicalis* (Bt) are considered as clinically relevant house dust mites (HDMs). This study aimed to evaluate the IgE, IgG1, and IgG4 reactivity to Bt among Brazilian atopic patients. One hundred-ten patients presenting asthma and/or rhinitis (AR) and 33 control subjects were submitted to skin prick test (SPT) with HDM extracts and venipuncture for ELISA and Immunoblotting. The majority (56.4%) of AR patients had positive SPT to Bt extract (group Bt+), although 50.9% were reactive to both mites (Bt and Dp) and 5.5% were sensitized to Bt only. IgE-ELISA detected 39.1% positivity with significantly higher IgE levels in the group Bt+ than the Bt- and control groups. Levels of IgG1 were significantly higher in both Bt+ and Bt- groups than the control group. IgG4 showed significant difference between both Bt+ and Bt- groups and a positive correlation with specific IgE. The major allergenic components recognized by sera of Bt+ AR patients were the 54, 68, and 66 kDa proteins. Our Bt+ AR patients seem to be more frequently sensitized to high molecular weight (HMW) components than to the low molecular weight (11-15 kDa) allergens predominantly detected in other studies. IgG4-binding proteins closely resembled the IgE allergenic profile while IgG1-binding proteins, particularly the HMWs, were widely recognized by sera of all three groups, suggesting that these HMW antigenic components could be evaluated as potential candidate antigens for allergen exposure, sensitization, and immunotherapy studies.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Alérgenos	1
1.2. Ácaros da poeira domiciliar	3
1.2.1. <i>Blomia tropicalis</i>	4
1.2.2. Alérgenos de <i>B. tropicalis</i>	5
1.3. Exposição e sensibilização alergênicas	6
1.4. Atopia	7
1.5. Asma	8
1.5.1. Classificação	9
1.6. Rinite alérgica	10
1.7. O sistema imune e a resposta alérgica	11
1.7.1. Fisiopatologia	13
1.8. Imunoterapia	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Aspectos éticos	17
3.2. Seleção dos pacientes e indivíduos controles	17
3.3. Teste Cutâneo de Hipersensibilidade Imediata	18
3.4. Coleta de sangue	20
3.5. Preparo dos extratos alergênicos	20
3.6. Determinação da concentração protéica dos extratos alergênicos	21
3.7. ELISA para detecção de IgE específica a <i>Blomia tropicalis</i>	21
3.8. ELISA para detecção de IgG PAN, IgG1 e IgG4 específicas a <i>Blomia tropicalis</i>	23
3.9. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de inibição competitiva	24
3.10. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida	25
3.11. <i>Immunoblotting</i> para detecção de IgE, IgG1 e IgG4 anti- <i>Blomia tropicalis</i>	26
3.12. Análise estatística	27
3.13. Normas de biossegurança	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Teste Cutâneo	29
4.2. Concentração protéica dos extratos alergênicos	30
4.3. Níveis de IgE específica a <i>B. tropicalis</i>	30
4.4. Níveis de IgG PAN, IgG1 e IgG4 específicos a <i>B. tropicalis</i>	32
4.5. Correlação entre os níveis de IgE e IgG PAN, IgG1 ou IgG4 anti- <i>B. tropicalis</i>	34
4.6. Especificidade do ELISA para IgE, IgG1 e IgG4 anti- <i>B. tropicalis</i>	37
4.7. Resposta de IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes alergênicos de <i>B. tropicalis</i>	37
4.8. Frequência dos componentes antigênicos derivados de <i>B. tropicalis</i>	39
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
8. ANEXOS	58

1. Introdução

1.1 Alérgenos

Qualquer substância capaz de induzir uma resposta imune e causar alergia é um alérgeno em potencial. Exposição a um alérgeno pode ser através de inalação, ingestão, injeção ou contato com a pele ou mucosas (TERR, 1997a).

Sensibilização a um determinado alérgeno ambiental é o resultado de uma complexa inter-relação das propriedades físicas e químicas de um dado alérgeno, do modo e da quantidade de exposição, bem como dos fatores genéticos próprios do indivíduo exposto (TERR, 1997b).

Muitos alérgenos, por si só são fortes imunógenos, apresentando pesos moleculares acima de 10 kDa. Outros, porém, de pesos moleculares entre 1 e 6 kDa podem ou não ser imunógenos e, os abaixo de 1 kDa geralmente não são imunogênicos. Essas moléculas de baixo peso molecular são denominadas haptenos, e quando ligadas a moléculas maiores, chamadas carreadoras, passam a desempenhar papel imunogênico (BENJAMINI; LESKOWITZ, 1988).

Geralmente, de acordo com a natureza química, as proteínas são imunógenos eficazes, porém, variável conforme o peso molecular, configuração espacial da molécula, dose e via de entrada no organismo. Frequentemente, alérgenos são proteínas (geralmente glicoproteínas) ou haptenos que podem ligar-se a proteínas.

Mais importante, contudo, é a substância ser reconhecida como estranha. O sistema imune normalmente discrimina entre próprio e não próprio, tanto que somente moléculas estranhas ao organismo são imunogênicas (PARSLOW, 1997).

Os alérgenos são nomeados de acordo com um guia publicado em 1994 pela “World Health Organization / International Union of Immunologic Sciences / Allergen Nomenclature Sub-committee” (KING et al., 1995). O nome incorpora as três primeiras letras do gênero e a primeira letra da espécie a partir da qual o alérgeno é derivado (ou as duas primeiras para evitar ambiguidade), mais um numeral arábico (o qual pode ser usado para denotar alérgenos homólogos estruturalmente, porém de espécies diferentes). Por exemplo, alérgenos estruturalmente similares (antígenos do grupo 5) derivados de dois gêneros de ácaros diferentes (*Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus*) são designados Blo t 5 e Der p 5, respectivamente.

Aeroalérgenos, alérgenos transportados pelo ar, frequentemente estão associados a partículas (grãos de pólen, fezes de ácaros, secreções animais), e são comumente subdivididos em “indoor” (domiciliares) e “outdoor” (ao ar livre). São proteínas, relativamente pequenas, altamente solúveis em meio aquoso, o que permitem se dispersarem no muco e outros fluidos corporais (GALLI; LANTZ, 1999).

A poeira domiciliar consiste de partículas em suspensão de fontes orgânicas e inorgânicas. Segundo Seltzer (1994), a poeira doméstica é uma mistura de fibras vegetais, fibras de carpetes, partículas de móveis estofados, areia, terra, peças do vestuário, descamação humana, restos alimentares, resíduos químicos e produtos de vários microorganismos (bactérias, vírus e fungos) e macroorganismos (animais domésticos, insetos e aracnídeos).

1.2. Ácaros da poeira domiciliar

Bogdanov, em 1864, descreveu dois exemplares de ácaros, de ambos os sexos, isolados de peles curtidas, aos quais denominou *Dermatophagoides*, nomeando assim o gênero. Após essa primeira descrição, Trouessart, em 1897, descreveu a espécie *Dermatophagoides pteronyssinus*, com detalhes técnicos, consagrando assim a denominação final da espécie, que significa em grego “comedor de pele sem asas” (BAGGIO et al., 1989).

Desde então, vários estudos, realizados em diversas partes do mundo têm comprovado a hipótese da exposição alergênica a ácaros como fator decisivo para a sensibilização de indivíduos susceptíveis (SPORIK et al., 1990; ARRUDA et al., 1991; TUNNICLIFFE et al., 1999).

Alérgenos derivados de ácaros da poeira domiciliar têm sido reconhecidos como uma importante causa na indução da síntese de IgE e *Dermatophagoides* spp. (família Pyroglyphidae) constituem a fauna predominante na poeira domiciliar do mundo todo. A vigilância sanitária americana revelou em 1992 que, além de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, as espécies mais comuns de ácaros na fauna da poeira domiciliar foram *Blomia tropicalis* e *Euroglyplus maynei*. Em regiões tropicais e subtropicais, alérgenos produzidos por *Blomia tropicalis* são importantes causas da sensibilização mediada por IgE entre pacientes com asma e rinite alérgica. Estas regiões incluem alguns estados dos Estados Unidos (Tampa, FL; New Orleans, LA; Memphis-TN; Galveston, TX; Delray Beach e San Diego, CA), América Central e do Sul, Hong Kong, Japão, Taiwan, Índia, Espanha, Egito e Nigéria (ARRUDA; CHAPMAN, 1992).

Em 1993, um estudo multicêntrico por meio de testes alérgicos realizados nos países da América Latina, incluindo o Brasil, Venezuela e Colômbia,

confirmou a alta prevalência de sensibilização a ácaros, notavelmente *Blomia tropicalis*, em pacientes portadores de asma (FERNANDEZ-CALDAS et al., 1993).

1.2.1. *Blomia tropicalis*

Blomia tropicalis foi primeiramente descrito por Van Bronswijk et al. (1973), sendo inicialmente registrado como ácaro de estocagem. É um ácaro pequeno, medindo 230 a 465 μm , de forma globular, pertencente à família Glycyphagidae e distingue-se facilmente de outros ácaros da poeira domiciliar por apresentar um aspecto semelhante ao porco espinho, com longas antenas que saem do seu corpo (Figura 1).

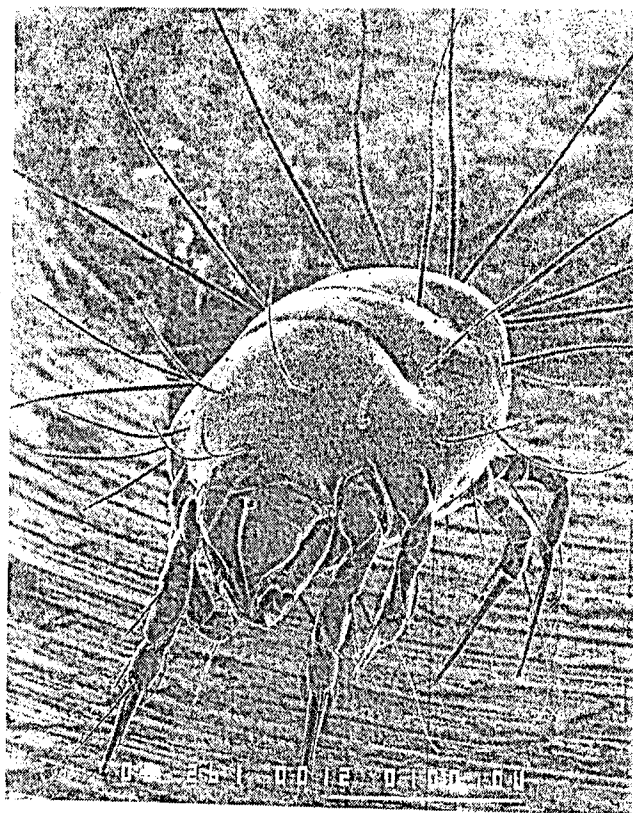


Figura 1: Eletronmicrografia de varredura de *Blomia tropicalis*, gentilmente cedida pelo Dr. Enrique Fernandez-Caldas, *University of South Florida*, Tampa, FL.
Adaptado por Arruda ; Chapman. Experimental ; Applied Acarology 16: 129-140, 1992.

Classificação taxonômica resumida de *B. tropicalis* segundo Colloff (1998):

Reino: Metazoa

Filo: Artropodea

Classe: Arachnida

Ordem: Acarina

Família: Glycyphagidae

Gênero: *Blomia*

Espécie: *B. tropicalis*

1.2.2. Alérgenos de *B. tropicalis*

Ao longo da década passada, os avanços da biologia molecular proporcionaram através de técnicas como a clonagem molecular, o desenvolvimento de alérgenos puros e quimicamente bem definidos, tornando-os importantes ferramentas no diagnóstico e na imunoterapia.

Até 1997, somente três alérgenos de *B. tropicalis* haviam sido clonados e caracterizados quanto às suas funções alergênicas. Estes alérgenos incluem o Blo t 5, o primeiro alérgeno de *B. tropicalis* a ser clonado, possui cerca de 40% de homologia na sequência de aminoácidos ao Der p 5, um alérgeno de 14 kDa de *D. pteronyssinus*. A prevalência de anticorpos IgE a Blo t 5 recombinante entre pacientes asmáticos foi de 45% (ARRUDA et al., 1995; CARABALLO et al., 1996); o Blo t 13 (previamente denominado Blo t 6) de peso molecular de 14,8 kDa, demonstrou baixa frequência (11%) de reatividade com IgE de soros de pacientes alérgicos *B. tropicalis* e 42% de identidade com a Sm14, uma proteína ligante de ácidos graxos (FABP) de *Schistosoma mansoni*, (CARABALLO et al., 1997); e o

Blo t 12 (previamente conhecido como Blo t 11a) cujo recombinante rBlo t 11a possui peso molecular de 14,2 kDa e demonstrou 50% de reatividade com IgE de soros de pacientes alérgicos a *B. tropicalis* (PUERTA et al., 1996).

Assim, os alérgenos de *Blomia tropicalis* até então reportados são proteínas de baixo peso molecular (14 – 15 kDa). Entretanto, recentemente, Ramos et al. (2001) identificaram o Blo t 11, um alérgeno cuja sequência primária possui 90% de homologia com o Der f 11, uma paramiosina de *D. farinae* de 98 kDa. O alérgeno recombinante produzido (rBlo t 11) demonstrou 52% de reatividade com IgE de soros de pacientes asmáticos reativos pelo teste cutâneo ao extrato de *B. tropicalis* (RAMOS et al., 2001).

1.3. Exposição e sensibilização alérgicas

Os estilos de vida têm sofrido dramática mudança durante os últimos 30 anos. Atualmente, a maioria dos indivíduos permanece até 20 horas em ambientes internos "domiciliares" (no interior de casas e estabelecimentos) (PLATTS-MILLS, 1994). Com este novo estilo de vida, muitas alterações têm ocorrido nos diferentes ambientes, ocasionadas pelo aumento da temperatura ambiental, diminuição da ventilação, utilização de carpetes e tapetes, presença de objetos decorativos que retêm a poeira bem como a utilização de condicionadores de ar. Todos estes fatores podem ocasionar aumento na quantidade de substâncias estranhas ou alérgenos que circulam nos ambientes de casa ou do trabalho e subseqüentemente são inalados pelos seus usuários. Conseqüentemente, estas alterações ambientais têm contribuído grandemente para aumentar a prevalência tanto da sensibilização alérgica como de doenças alérgicas respiratórias (asma e rinite). O aumento da prevalência destas doenças está associado com o alto grau de sensibilização a alérgenos domiciliares.

Acredita-se que a exposição alérgica exerça três importantes papéis no desenvolvimento da alergia respiratória: (a) a exposição a um dado alérgeno, particularmente na infância, induzirá em indivíduos geneticamente susceptíveis, o desenvolvimento de hipersensibilidade mediada por IgE; (b) em indivíduos susceptíveis, a exposição contínua ao alérgeno leva à hipersensibilidade das vias aéreas; e (c) muitos dos pacientes com hiperreatividade brônquica têm ataques recorrentes de obstrução aérea, que podem ser desencadeados por múltiplos fatores, como ar frio, fumaça de cigarro (passivo), estresse e variações diurnas (PLATTS-MILLS et al., 1984).

Iniciando-se com o estudo de Smith et al. (1969), tem-se evidenciado que a sensibilização a ácaros da poeira domiciliar está fortemente associada com asma em crianças de idade escolar. Vinte anos mais tarde, um estudo prospectivo realizado na Nova Zelândia (clima extremamente úmido) demonstrou que pela idade de 13 anos, 30% das crianças eram alérgicas a ácaros da poeira domiciliar e o risco relativo de ser alérgeno-específico para asma neste grupo foi de 6,7 (SEARS et al., 1989). Portanto, a sensibilização a ácaros da poeira domiciliar é um importante fator de risco para o desenvolvimento da asma brônquica (PLATTS-MILLS; CHAPMAN, 1987).

1.4. Atopia

Atopia refere-se à predisposição genética a responder imunologicamente a vários alérgenos de ocorrência natural quando inalados ou ingeridos, com uma contínua produção de imunoglobulina E (IgE) (TERR, 1997b). O estado atópico é reconhecido por testes cutâneos, presença de IgE alérgeno-específica, elevação dos níveis de IgE sérica total e presença de eosinófilos no sangue (COOKSON, 1999).

O termo atopia foi primeiramente empregado por Coca; Cooke em 1923 para descrever um grupo de doenças que apresentavam, em comum, um mecanismo fisiopatológico envolvendo reações de hipersensibilidade do tipo I, onde os indivíduos apresentavam testes cutâneos positivos para aeroalérgenos e história familiar de asma e/ou rinite e/ou dermatite atópica (ROITT et al., 1998).

Asma e rinite alérgicas são as manifestações mais comuns de doença clínica após exposição a alérgenos do meio ambiente, enquanto dermatite atópica é menos frequente. Duas ou mais formas clínicas de atopia podem coexistir no mesmo paciente e ao mesmo tempo, ou em diferentes tempos no curso da doença. A atopia pode ainda ser assintomática (TERR, 1997b).

1.5. Asma

A primeira referência à asma como uma doença é atribuída a Moses Maimonides em seu "Treatise on Asthma", do século XII (MAIMONIDES apud KALINER; McFADEN, 1988). Em 1662, Van Helmont reconheceu a sensibilidade das vias aéreas dos asmáticos a estímulos ambientais, como poeira e alimentos, a asma induzida emocionalmente e os efeitos do clima e do tempo (KALINER; McFADEN, 1988). Entretanto, como uma entidade clínica distinta, a asma somente foi definida em 1868 por Henry Hyde Salter que também a classificou como intrínseca e extrínseca (KALINER; McFADEN, 1988).

Como uma síndrome clínica das vias aéreas, a asma é caracterizada por obstrução reversível (ou não) do fluxo aéreo, espontaneamente ou com tratamento; inflamação da mucosa; hiperreatividade brônquica a estímulos variados; episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao acordar (GRAUNDENZ et al., 1999).

Como uma doença multifatorial, a asma está associada com fatores familiares, infecciosos, alergênicos, sócio-econômicos e ambientais (MANNINO et al., 1998). Contudo, a maioria dos casos de asma alérgica ocorre em indivíduos que exibem resposta de hipersensibilidade a alérgenos ambientais definidos (EVANS, 1993; GOLDSTEIN et al., 1994).

1.5.1. Classificação

Para fins didáticos, a asma pode ser classificada de acordo com a presença ou ausência de atopia.

A asma alérgica também é conhecida como asma atópica, imunológica ou asma extrínseca. Os pacientes geralmente apresentam história familiar de atopia e desenvolvem doença nos primeiros anos de vida. Outras manifestações de atopia, como rinite alérgica e eczema, podem coexistir. Os ataques de asma ocorrem durante ou após a exposição a alérgenos dependendo da sensibilidade alérgica particular de cada paciente. Testes cutâneos positivos são caracterizados pela presença de pápula e eritema, a concentração de IgE sérica total frequentemente está elevada, porém em alguns casos pode apresentar-se normal (TERR, 1997b).

A asma não alérgica também é conhecida como idiopática ou asma intrínseca. A obstrução brônquica recorrente ou crônica não está relacionada à exposição a alérgenos. Caracteristicamente, é desencadeada por exercícios físicos, infecções e outros fatores não relacionados à presença de IgE específica a um determinado antígeno. Testes cutâneos são negativos para os alérgenos usuais. Não há história pessoal ou familiar de doença alérgica (COCHRANE; REES, 1995).

Geralmente aparece na infância, podendo em alguns casos ocorrer durante a vida adulta, usualmente após uma infecção respiratória. A concentração de IgE sérica total é normal, contudo, eosinofilia sanguínea e no escarro pode ser encontrada (TERR, 1997b).

De acordo com Platts-Mills et al. (1995b), os casos de asma não alérgica representam menos de 2% dos asmáticos ou menos de 0,2% da população em geral pertencem a essa categoria.

1.6. Rinite alérgica

Assim como na asma, a rinite alérgica decorre de uma resposta de hipersensibilidade a alérgenos mediada por anticorpos IgE. Os alérgenos mais comuns envolvidos incluem pólenes, pêlos de animais, ácaros da poeira domiciliar, esporos de fungos e partículas de insetos (NACLERIO, 1995).

A rinite alérgica é caracterizada por um amplo quadro clínico com sintomas variando de congestão nasal, espirros, coriza, edema, irritação e prurido nasais, à observação de vias aéreas superiores desobstruídas, secas e de aspecto aparentemente normal. O desenvolvimento dessas condições nasais crônicas ou recorrentes pode resultar em complicações como sinusites, otites ou pólipos nasais (LIERL, 1995).

Outro aspecto importante na rinite alérgica é a predisposição genética. Segundo Lierl (1995), crianças cujos pais possuem história de asma e/ou rinite, têm 70% de chance de desenvolver uma dessas condições, enquanto aquelas onde somente um dos pais possui tais doenças as chances são em torno de 50%.

A rinite alérgica é uma doença que acomete mais de 30 milhões de americanos sem discriminar sexo, idade, raça ou condição sócio-econômica.

Ocupa o sexto lugar no ranking das doenças crônicas mais prevalentes entre a população americana, que gasta anualmente, bilhões de dólares para o tratamento da rinite (NACLERIO, 1995).

1.7. O sistema imune e a resposta alérgica

O desencadeamento de uma resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigênico e de várias etapas da resposta imunitária do hospedeiro. O processamento do alérgeno pela célula apresentadora de antígeno (APC) resulta na formação de peptídeos que são apresentados ao receptor da célula T (TCR) $CD4^+$ em associação com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II (MARONE, 1998). O reconhecimento do conjunto peptídeo/MHC II, por parte de uma célula T ($CD4^+$) com receptor específico (TCR) para o alérgeno, reforçado pela ligação das moléculas co-estimulatórias B7-2 (CD86) e CD28, leva à ativação da célula Th (T “helper” ou T auxiliadora) primária.

O sistema imune caracteriza-se por apresentar pelo menos dois tipos distintos de células T “helper”, Th1 e Th2.

O fenótipo Th1 primariamente é responsável pela imunidade a bactérias intracelulares, protozoários, vírus e produz $IFN-\gamma$ e $TNF-\beta$. Uma resposta imune típica de células Th1 específicas é caracterizada por respostas cutâneas de hipersensibilidade tardia e ativação de linfócitos B produtores de anticorpos IgG.

O fenótipo Th2 está associado com respostas imunes a alérgenos e helmintos. A célula Th2 ativada expressa ligante de CD40 e secreta IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, citocinas que auxiliam as células B a produzirem anticorpos IgE e IgG4 (Slunt et al., 1996). Além disso, IL-3, IL-5 e GM-CSF secretadas pelas células Th2

ativadas ativam eosinófilos, basófilos e mastócitos (GALLI; LANTZ, 1999). A IL-4 estimula a expressão de VCAM-1 (molécula-1 de adesão celular vascular) nas células endoteliais, resultando em aumento da ligação dos linfócitos, monócitos e especialmente eosinófilos (ABBAS et al., 1998). A IL-5 é um importante fator de crescimento seletivo para diferenciação terminal, ativação e manutenção dos eosinófilos nos tecidos, possivelmente inibindo a sua apoptose (Bousquet et al., 2000).

Entretanto, a presença de IFN- γ , produzido por células Th1 inibe a síntese de IgE pelas células B (HOWARTH, 1998). Uma variedade de outras citocinas e fatores têm sido implicados na modulação da síntese de IgE. IFN- γ , IFN- α , TNF- β , IL-8, IL-10 têm sido mostrados como inibidores da síntese de IgE em algumas circunstâncias, enquanto que sua estimulação com IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, TNF- α têm sido observada (WORM ; HENZ, 1997).

Eotaxina é o fator quimiotático mais estreitamente associado com a inflamação alérgica (GALLI; LANTZ, 1999). Eotaxina é uma quimiocina (citocina quimiotática) consistindo de uma grande família de citocinas, estruturalmente homólogas, que compartilham a capacidade de estimular o movimento leucocitário (quimiocinese) e dirigido (quimiotaxia) (ABBAS et al., 1998). MCP-1 ("monocyte chemoattractant protein" - 1), -2 e -4, MIP-1 α ("macrophage inflammatory protein" - 1 α) são indutoras da liberação de histamina de basófilos humanos. A eotaxina 2 induz a quimiotaxia de eosinófilos e basófilos e a liberação de histamina e leucotrieno C₄ (LTC₄) em basófilos primários. CCR3 é o receptor para eotaxina e outras quimiocinas do tipo CC (famílias de quimiocinas com 2 resíduos de cisteína adjacentes), presente em linfócitos Th2, eosinófilos e basófilos e está implicado na

migração dessas células para o sítio inflamatório (MARONE, 1998). Atualmente, admite-se que parte das diferenças funcionais entre Th1 e Th2 decorra de diferentes receptores para quimiocinas, o que permite diferentes rotas e padrões de migração. CCR3 é um importante receptor de fatores quimiotáticos para células Th2 e sua expressão possibilita diferenciar as células Th2 das outras células T (SALLUSTO et al., 1998).

1.7.1. Fisiopatologia

Mastócitos e basófilos expressam receptor de alta afinidade para o fragmento cristalizável das moléculas de IgE (FcεRI). Mais recentemente descobriu-se que outros tipos celulares como monócitos (MAURER et al., 1994), células dendríticas circulantes (MAURER et al., 1996), células de Langerhans (WANG et al., 1992) e eosinófilos (GOUNNI et al., 1994) também expressam receptor FcεRI.

A ligação de um antígeno a moléculas de IgE da superfície de mastócitos/basófilos gera despolarização da membrana celular, influxo de Ca^{++} extracelular e posterior liberação de Ca^{++} intracelular, culminando com a ativação de enzimas como miosina quinase e a fosfolipase A2, além da queda dos níveis intracelulares de AMP cíclico (ROITT et al., 1998).

A exocitose de histamina e outros mediadores pré-formados promove aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema e contração de músculos lisos, fenômenos esses responsáveis pelas manifestações das reações de

hipersensibilidade do tipo I ou imediata, ocorrendo nos primeiros 30 minutos após a exposição alérgica (TERR, 1997a).

Nas doze horas que se sucedem, ocorre uma progressiva infiltração tecidual de células inflamatórias, como neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares em resposta a mediadores químicos (TERR, 1997a). Nos mastócitos, o resultado da ativação é a produção de mediadores lipídicos, como prostaglandinas D2 (PGD₂) ou leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTB₄) e a produção de grânulos secretores (ABBAS et al., 1998). Os principais mediadores da resposta tardia na hipersensibilidade imediata são as citocinas do tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13), os quimiotáticos celulares e as moléculas de adesão (GALLI; LANTZ, 1999).

1.8. Imunoterapia

Na atualidade, o tratamento hipossensibilizante de pacientes com alergia respiratória é realizado na prática clínica do mundo inteiro com extrato bruto de alérgenos, os quais produzem efeitos colaterais freqüentes e intensos devido à indução tanto de ações desejáveis (resposta protetora, Th1) como também de ações indesejáveis (resposta alérgica, Th2).

Durante a imunoterapia (IT) convencional, as concentrações séricas de IgE alérgeno-específicas aumentam inicialmente e a seguir, de modo lento e gradativo diminuem e atingem níveis mínimos ao longo dos meses (LICHTENSTEIN et al., 1973).

Dois modos de ação opostos foram atribuídos a IgG na alergia do tipo imediato. Uma pequena parte da IgG pode ter propriedades anafiláticas, apesar de não atribuir-se tais propriedades à IgG4. Além disso, as IgG1 e IgG3 alérgeno

específicas e não a IgG4, induzem a degranulação do eosinófilo por meio do receptor FcγRII (KANCKO et al., 1995).

Os anticorpos IgG induzidos pela IT podem atuar como bloqueadores de alérgenos. Essas observações sugerem a chamada teoria do “anticorpo bloqueador” que postula a competição entre IgG e IgE na ligação com alérgenos, bloqueando dessa forma a ativação de mastócitos dependentes de IgE (STAR ; WEINSTOCK, 1970; GOLDEN et al., 1982).

As subclasses de IgG podem ter efeitos diferentes sobre a resposta alérgica. Muitos estudos demonstraram que a IT induz aumentos marcantes dos níveis de IgG alérgeno-específica, particularmente IgG1 e IgG4. Os níveis basais de anticorpos IgG1, mas não os de IgG4, foram preditivos para o desenvolvimento da resposta tardia após a provocação com o alérgeno. O papel da IgG, em particular a secreção de anticorpos nos tecidos ou mucosas, requer mais estudos (Bousquet et al., 2000).

Vários pesquisadores têm atribuído uma atividade protetora às subclasses de IgG, principalmente IgG4, que é produzida como resultado de uma longa exposição antigênica e atua como um fator inibitório da reação de hipersensibilidade mediada por IgE. Desta forma, acredita-se que IgG4 poderia neutralizar o antígeno ou bloquear o anticorpo, melhorando, deste modo, a função da imunoterapia (Mori et al., 2001).

2. Objetivos

- 1) Avaliar a sensibilização alérgica ao ácaro *Blomia tropicalis*, individualmente ou concomitantemente a *Dermatophagoides pteronyssinus*, por intermédio da determinação dos níveis de IgE específica a *B. tropicalis* por ELISA, em pacientes com asma e/ou rinite alérgica de Uberlândia, MG.
- 2) Avaliar o perfil de reatividade de anticorpos IgG PAN e subclasses IgG1 e IgG4 específicas a *B. tropicalis* determinados por ELISA, em soros de pacientes asmáticos e/ou com rinite e indivíduos controles não atópicos.
- 3) Identificar as proteínas derivadas de *B. tropicalis* ligantes de anticorpos IgE, IgG1 ou IgG4 por meio de *immunoblotting*.

3. Material e Métodos

3.1. Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado sem restrições junto ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), órgão do Conselho Nacional de Saúde, subordinado ao Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos.

A concordância em participar da pesquisa era confirmada pela assinatura de um termo de consentimento (Anexo 1), estando os indivíduos cientes de todas as etapas de seu desenvolvimento. Em seguida, os indivíduos respondiam a uma breve ficha de identificação e a um questionário para maior conhecimento da sua história clínica (Anexo 2).

3.2. Seleção dos pacientes e indivíduos controles

Foram selecionados 110 pacientes atópicos, com idade variando de 18 a 60 anos, de ambos os sexos, com história clínica de sintomas de asma e/ou rinite alérgica (atual ou pregressa), residentes na cidade de Uberlândia, MG.

Todos os pacientes convocados foram atendidos na Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica da Disciplina de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU e relacionados para o estudo por meio de levantamento dos prontuários da Divisão de Arquivos Médicos (DIAME) do Hospital de Clínicas da UFU, no período de março a novembro de 2000, obedecendo aos critérios estabelecidos pelo "National Asthma Education Program" (SLY, 1997).

O grupo de indivíduos controles, denominados não atópicos, consistiu de 33 indivíduos sem sintomas ou histórico clínico de doenças alérgicas, especialmente

asma e/ou rinite, negativos aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para os extratos brutos de *Blomia tropicalis* (Bt) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp). Estes indivíduos, selecionados entre março e novembro de 2000, consistiram de alunos dos cursos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários da UFU e de membros da população de Uberlândia.

Todos os indivíduos foram submetidos aos seguintes critérios de exclusão da pesquisa:

- 1) Indivíduos com idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos;
- 2) Indivíduos em uso de drogas, por via oral ou tópica, anterior ao teste, conforme indicado abaixo:
 - Anti-histamínicos de primeira geração entre 24 e 72 horas antes do teste (BERNSTEIN; STORMS, 1995);
 - Corticosteróides sistêmicos, por tempo prolongado (> 20 mg/dia de prednisona ou equivalente por mais de 7 dias) (SLOTT ; ZWEIMAN, 1974);
 - Corticosteróides tópicos na 2ª a 3ª semanas anteriores ao teste cutâneo na área de realização do procedimento (PIPKORN et al., 1989);
- 3) Presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;
- 4) Recusa em participar do estudo.

3.3. Teste Cutâneo de Hipersensibilidade Imediata

A hipersensibilidade imediata foi determinada através do método de punctura. As concentrações dos extratos alergênicos para a realização do teste foram aquelas indicadas pelo fabricante, segundo normas internacionais ("Bayer Corporation", Spokane, Washington, EUA).

Para a realização do teste foram utilizados extratos alergênicos glicerinados padronizados de *B. tropicalis* (2 mg/mL; "University of South Florida", Tampa, Florida, EUA) e *D. pteronyssinus* (10.000 AU/mL; BAYER CO., EUA).

Realizou-se a anti-sepsia da face interna do antebraço com álcool a 70% e em seguida depositou-se 10 µL de cada extrato, mantendo-se uma distância de 3 cm um do outro. Sobre a gota depositada, fez-se a punctura com auxílio de uma lanceta de metal estéril (BAYER CO., EUA).

As pápulas foram medidas em milímetros com uma régua específica graduada em milímetros (MORROW DISPOSABLE/SKIN TEST NEEDLE ALLER GUARD®) nos seus dois diâmetros perpendiculares e o critério de positividade foi definido por uma pápula com diâmetro médio ≥ 3 mm após 15 minutos da realização do teste.

Em todos os testes, o controle positivo foi realizado com cloridrato de histamina (10 mg/mL) (BAYER CO., EUA) diluído em solução salina fisiológica com glicerol a 50%, sendo que esta solução também foi utilizada como controle negativo da reação (SQUILLACE et al., 1997).

Uma vez realizado o teste cutâneo de hipersensibilidade imediata, os pacientes foram classificados em grupos e subgrupos da seguinte forma:

- Grupo Bt+, pacientes atópicos reativos ao extrato de *B. tropicalis*;
- Grupo Bt-, pacientes atópicos não reativos ao extrato de *B. tropicalis*;
- Subgrupo Bt+/Dp+, pacientes atópicos reativos a ambos extratos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*;
- Subgrupo Bt+/Dp-, pacientes atópicos reativos ao extrato de *B. tropicalis* e não reativos ao extrato de *D. pteronyssinus*;

- Subgrupo Bt-/Dp+, pacientes atópicos não reativos ao extrato de *B. tropicalis* e reativos ao extrato de *D. pteronyssinus*;
- Subgrupo Bt-/Dp-, pacientes atópicos não reativos a ambos extratos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*;
- Grupo controle, indivíduos não atópicos e não reativos a ambos extratos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*;

3.4. Coleta de sangue

As amostras de sangue de todos os indivíduos, atópicos e não atópicos, foram obtidas na mesma ocasião da realização dos testes cutâneos de punctura, utilizando-se tubos de 13 mL e agulhas 25 x 8 mm (VACUTAINER® - PRECISION GLIDE/BECTON DICKSON VACUTAINER SYSTEMS, Franklin Lakes, NJ, EUA) para punção venosa na região do antebraço. Após a formação do coágulo, os tubos foram centrifugados a 800 g por 10 minutos. Os soros obtidos foram aliquotados e estocados a -20 °C até a realização dos testes sorológicos.

3.5. Preparação dos Extratos Antigênicos

Extratos de Bt e Dp foram obtidos a partir de cultivo dos ácaros *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* gentilmente cedidos pelo Dr. Federico Montealegre ("Ponce School of Medicine" – Ponce, Porto Rico, EUA).

Aproximadamente 200 g do cultivo de ácaros foram peneirados (GRANUTEST-TELASTEM PENEIRAS PARA ANÁLISE LTDA, ABNT 35, abertura em mm = 0,50 / TYLER 32) para separar os corpos e fezes dos ácaros do restante do material de cultivo. Após a separação, dez gramas de pó contendo ácaros foram misturadas a 50 mL de solução salina tamponada com borato (BBS)

0,1M pH 8,0 adicionada a um tablete de inibidores de proteases (COMPLETE™, ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim, Alemanha). Essa mistura foi exaustivamente macerada com nitrogênio líquido, sendo então distribuída em tubos cônicos de 50 mL e submetida à extração durante 18 horas a 4 °C sob agitação. Em seguida, o material foi centrifugado por duas vezes a 3000 g, a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 30.000 g a 4 °C durante 45 minutos.

O extrato antigênico total (sobrenadante final) obtido foi submetido à diálise (SPECTRA/POR® MWCO: 6-8.000; SPECTRUM MEDICAL INDUSTRIES INC., Houston, TX, EUA) contra solução salina tamponada com fosfatos 0,01M pH 7,2 (PBS) a 4 °C por 20 horas com pelo menos três trocas diárias.

Com o intuito de eliminar agregados produzidos durante o processo de diálise uma nova centrifugação foi realizada a 10.000 g a 4 °C por 30 minutos.

Os extratos foram aliquotados em volumes de um mL e estocados a -70 °C.

3.6. Determinação da concentração protéica dos extratos alergênicos

A concentração protéica dos extratos alergênicos foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando soroalbumina bovina como padrão protéico para a curva de calibração.

3.7. ELISA para detecção de IgE específica a *Blomia tropicalis*

Testes imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção de anticorpos IgE anti-*B. tropicalis* em amostras de soros de pacientes atópicos e não atópicos foram

realizados segundo técnica de ELISA convencional descrita por Silva et al., 2001, com algumas modificações.

Placas de microtitulação de alta afinidade, com 96 poços (CORNING LABORATORIES INC., New York, NY, EUA) foram sensibilizadas com o extrato total de *B. tropicalis* à concentração de 10 µg/mL em um volume de 50 µL/poço, diluído em tampão carbonato 0,06M pH 9,6 por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS adicionado de Tween 20 ("Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate" - SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis – MO, EUA) a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 200 µL/poço de solução de PBS-T acrescido de 1% de soroalbumina bovina (BSA; SIGMA) (PBS-T-BSA) por uma hora à temperatura ambiente.

Nas etapas subsequentes, solução de PBS-T-BSA foi utilizada como diluente e as placas foram lavadas com PBS-T após cada etapa da reação.

As amostras de soros foram diluídas a 1:2 e incubadas a 37 °C por duas horas em câmara úmida. Em todas as placas foram realizados controles da reação consistindo de um controle do soro, onde apenas diluente foi adicionado e três soros controles negativos. Subseqüentemente, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgE-humana biotilada (KIRKEGAARD E PERRY LABORATORIES INC., Gaithersburg, Maryland, EUA) na diluição de 1:500. As placas foram incubadas por uma hora a 37 °C. Em seguida, o conjugado estreptavidina-peroxidase (SIGMA) foi adicionado às placas na diluição de 1:500 e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após o último ciclo de lavagens, adicionou-se o substrato enzimático consistindo de solução de 2,2'-diazino do ácido etilbenzotiazolino sulfônico

(ABTS; SIGMA) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% água oxigenada (H₂O₂; SIGMA).

Os valores da densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de ELISA (TITERTEK MULTISKAN PLUS MKII, FLOW LABORATORIES, McLean, VA, EUA) a 405 nm.

Os títulos de IgE foram expressos arbitrariamente como índice ELISA (IE) de acordo com a seguinte fórmula proposta por Nahm et al. (1998):

$$IE = DO_{\text{amostra}} - DO_{\text{diluente}} / DO_{\text{negativo}} - DO_{\text{diluente}}$$

DO_{amostra}: densidade óptica média obtida de cada amostra de soro

DO_{negativo}: densidade óptica média obtida de soros controles negativos

DO_{diluente}: densidade óptica média obtida de diluente (controle sem soro)

O ponto de corte dos índices ELISA (IE) foi calculado a partir da média dos índices ELISA obtidos dos soros de indivíduos controles acrescida de (3) três desvios padrões.

3.8. ELISA para detecção de IgG PAN, IgG1 e IgG4 específicas a *Blomia tropicalis*

Placas de microtitulação de alta afinidade (CORNING LABORATORIES INC., New York, NY, EUA) foram sensibilizadas por 18 horas a 4 °C com o extrato total de *B. tropicalis* (10 µg/mL). As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-BSA por uma hora à temperatura ambiente. Nas etapas subsequentes, foi usado PBS-T-BSA como diluente e as placas foram lavadas com PBS-T após cada etapa da reação. As amostras de soros foram diluídas 1:10 (IgG pan) e 1:5 (IgG1 e IgG4) e incubadas a 37 °C por uma hora em câmara úmida.

Em todas as placas foram realizadas curvas controles consistindo de diluições duplas seriadas de um soro (indivíduo G.A.O.S.) arbitrariamente designado como contendo 1000 U/mL de IgG pan, IgG1 e IgG4 específicas a *B. tropicalis*.

Subseqüentemente, foram incubados os respectivos anticorpos secundários consistindo de anti-IgG humana peroxidase (1:1000), anti-IgG1 humana biotinilada (1:200) e anti-IgG4 humana biotinilada (1:1000) (SIGMA) por uma hora a 37 °C. Na etapa final, o conjugado estreptavidina-peroxidase foi adicionado na diluição de 1:500 (para as placas de IgG1 e IgG4) durante 30 minutos à temperatura ambiente.

A reação foi revelada por meio da adição de 2,2'-diazino do ácido etilbenzotiazolino sulfônico (ABTS; SIGMA) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% água oxigenada (H₂O₂; SIGMA).

A leitura foi realizada a 405 nm em leitor de ELISA (TITERTEK MULTISKAN PLUS MKII, FLOW LABORATORIES, McLean, VA, EUA).

Os resultados foram expressos em unidades/mL (U/mL) calculadas de acordo com as curvas controles anteriormente referidas. O limiar de sensibilidade de cada reação foi calculado pela média obtida dos limites de sensibilidade de cada curva para IgG PAN e subclasses IgG1 e IgG4.

3.9. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de Inibição Competitiva

A especificidade antigênica do ELISA para IgE, IgG1 e IgG4 foi avaliada utilizando um ensaio de inibição competitiva como descrito por Smith et al. (1998). Foram realizadas diluições duplas seriadas de 100 a 1×10^{-10} µg/mL dos extratos de Bt e Dp ou toxóide tetânico (TT, controle negativo) em solução diluente de PBS-T-BSA. Cada diluição dos antígenos foi misturada 1:1 com uma diluição (1:5) de um

soro predeterminado e então incubadas por 18 horas a 4 °C. O soro incubado somente com diluente foi utilizado como controle positivo.

Em seguida, as misturas antígenos-soro foram testadas por ELISAs para IgE, IgG1 e IgG4 como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em porcentagens de inibição da reação em relação à ausência do antígeno inibidor e calculados como se segue: $[1,0 - (\text{DO amostra} / \text{DO controle positivo})] \times 100$.

3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para evidenciar os principais componentes antigênicos do extrato total de *B. tropicalis* foi empregada a técnica de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 12 % (SDS-PAGE), em condições desnaturantes e não redutoras segundo Laemmli (1970).

Para o gel de separação, foi utilizado: Tris-HCl (Hydromethyl aminomethane, SIGMA) a 0,375 M, pH 8,8; SDS a 0,1%; EDTA (Ácido etilenodiamino-tetra-acético, QUIMIBRÁS IND. QUÍMICA AS, Rio de Janeiro, RJ) a 2 mM; solução de acrilamida a 29% e bis-acrilamida a 1% (PHARMACIA-LKB, Uppsala, Suécia); Temed (N,N,N,N-tetrametil-aminometano, PHARMACIA-LKB) a 0,125% e PSA (Persulfato de amônio, PHARMACIA-LKB) a 0,125%.

Para o gel de empilhamento, foi utilizado: Tris-HCl a 0,125 M, pH 6,8; SDS a 0,1%; EDTA a 2 mM; solução de acrilamida/bis-acrilamida a 5%; Temed a 0,125% e APS a 0,125%.

O tampão eletrodo ou de corrida (pH 8,3) consistiu de glicina (SIGMA) a 0,19 M, Tris a 0,025 M, SDS a 0,075% e EDTA a 1,95 M.

As amostras foram diluídas em 10% de Tampão de Amostra (Tris-HCl 0,1M pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2%, glicerol a 20%) (SIGMA) e submetidas a aquecimento a 100 °C em banho-maria durante 5 minutos.

Em seguida 200µL da amostra foram aplicados no gel paralelamente aos seguintes padrões de peso molecular: fosforilase b (97 kDa), soro albumina bovina (67 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29kDa) e α -lactalbumina (14 kDa) (SIGMA) para todas as eletroforeses. A migração das proteínas foi realizada em corrente de 20 mA e voltagem de 100V (SISTEMA LKB PHARMACIA, Uppsala, Suécia) por aproximadamente uma hora e trinta minutos.

Para evidenciar a migração das proteínas, utilizou-se a coloração com nitrato de prata, segundo o método de Friedman (1982), no qual os polipeptídeos se destacam em tons de amarelo a ferrugem.

3.11. "Immunoblotting" para detecção de IgE, IgG1 e IgG4 anti-*Blomia tropicalis*

Imediatamente após a separação eletroforética, os componentes protéicos foram transferidos para membranas de nitrocelulose (0,45 µm, MILLIPORE, Bedford, Mass., EUA) embebidas em tampão de transferência (glicina a 0,04 M, tris a 0,05 M, SDS a 0,04 % e metanol a 20%) utilizando sistema semi-úmido de transferência (MULTIPHOR II ELECTROPHORESIS UNIT, PHARMACIA LKB, Uppsala, Suécia) conforme a técnica descrita por Towbin et al. (1979). A corrente utilizada foi de 0,8 mA por cm² do gel durante 2 h. O sucesso da transferência foi

confirmado pela visualização das frações pré-coradas do padrão de peso molecular sobre a membrana de nitrocelulose.

As membranas eletrotransferidas foram cortadas em tiras de 0,3 cm de largura e acondicionadas em placas adequadas para “immunoblotting” e bloqueadas em solução de PBS-T a 0,05 % acrescida de leite desnatado (MOLICO, NESTLÉ, São Paulo, Brasil) a 5% por 2 horas à temperatura ambiente, para bloquear sítios inespecíficos ligantes de proteínas.

Os procedimentos de lavagens das tiras de nitrocelulose, realizados após cada etapa da reação, consistiram de 6 ciclos de 5 minutos com solução de PBS-T.

Subseqüentemente, as tiras foram incubadas com amostras de soros diluídas em solução de PBS-T acrescida de leite desnatado a 1% (PBS-TM), em diluições de 1:2 para IgE e 1:10 para IgG1 e IgG4 por 24 h a 4 °C sob agitação lenta.

Em seguida, as tiras foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgE humana biotinilada (1:500), anti-IgG1 humana biotinilada (1:250) e anti-IgG4 humana biotinilada (1:500) diluídos em PBS-TM por 18 h a 4 °C.

Após novas lavagens, as tiras foram incubadas com o conjugado estreptavidina-peroxidase diluído a 1:500 em PBS-TM por 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente às lavagens finais, as bandas protéicas foram visualizadas pela adição do substrato enzimático 3,3' – tetrahidrocloro de diaminobenzidina (SIGMA FASTTM -DAB-PEROXIDASE TABLET).

Como controle da reação, foram omitidos, em duas tiras de nitrocelulose para cada placa, anticorpos primários ou secundários, i.e., substituindo-os somente pelo diluente PBS-TM.

Visualizadas as bandas protéicas, interrompeu-se a reação com lavagens em água destilada. Os pesos moleculares aparentes das mesmas foram estimados por

regressão linear, segundo o padrão de peso molecular de referência, a partir de cálculo da mobilidade relativa (R_f).

3.12. Análise Estatística

Para todos os cálculos estatísticos, o “software GraphPad Prism” versão 3.0 (GRAPHPAD SOFTWARE, INC.) foi utilizado.

Análise estatística consistiu na determinação de médias geométricas (mg) dos níveis de anticorpos específicos a *B. tropicalis* e as diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste não paramétrico de “Mann-Whitney”.

A correlação entre os níveis de IgE e IgG ou subclasses (IgG1 e IgG4) específicos a *B. tropicalis* foi determinada nos soros de pacientes reativos ao teste cutâneo (Bt+) e ELISA-IgE positivos. Os coeficientes de correlação foram determinados utilizando-se os testes de correlação de “Pearson” para IgG1 e IgG4, ou “Spearman” para IgG, visto que os dados assumiram distribuição Gaussiana e não Gaussiana, respectivamente.

As frequências das bandas antigênicas reconhecidas por diferentes classes ou subclasses de anticorpos séricos foram submetidas a análises comparativas entre duas proporções pela estatística Z.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.13. Normas de biossegurança

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes bem como as utilizações de equipamentos foram realizadas de acordo com as normas de biossegurança (CHAVES-BORGES; MINEO, 1997).

4. Resultados

4.1. Teste Cutâneo

Um total de 143 indivíduos (110 atópicos e 33 indivíduos saudáveis) foi submetido ao teste cutâneo de hipersensibilidade imediata. Nenhum dos indivíduos não atópicos (grupo controle) demonstrou reação positiva aos extratos de ácaros testados (Bt e Dp).

Os resultados do teste cutâneo para *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* nos 110 pacientes atópicos estão sumarizados na Tabela 1.

Sessenta e dois (56,4%) pacientes foram reativos ao extrato de *B. tropicalis* pelo TC (Bt+), dos quais 56 (50,9%) apresentaram, concomitantemente, reatividade cutânea a ambas espécies de ácaros (Bt e Dp) e somente 6 (5,5%) indivíduos foram positivos a um único ácaro (Bt) individualmente.

Por outro lado, dos 48 (43,6%) pacientes negativos ao extrato de *B. tropicalis* pelo TC (Bt-), 14 (12,7%) foram reativos somente a *D. pteronyssinus* (Bt-/Dp+) e 34 (30,9%) demonstraram nenhuma reatividade a ambos ácaros (Bt-/Dp-).

Tabela 1. Resultados do teste cutâneo de hipersensibilidade imediata (TC) a *B. tropicalis* (Bt) e/ou *D. pteronyssinus* (Dp) em 110 pacientes atópicos.

Resultados TC	Número (%)
Bt +	62 (56,4)
Bt + / Dp +	56 (50,9)
Bt + / Dp -	6 (5,5)
Bt -	48 (43,6)
Bt - / Dp +	14 (12,7)
Bt - / Dp -	34 (30,9)

(+): Positivo; (-): Negativo

4.2. Concentração protéica dos extratos alergênicos

A concentração protéica do extrato Bt foi de 1.800 µg/mL e do extrato Dp de 2.300 µg/mL, determinadas segundo o método de Bradford (1976).

4.3. Níveis de IgE específica a *B. tropicalis*

A Figura 2 mostra os níveis de IgE específica a *B. tropicalis* expressos em índice ELISA (IE) em soros de pacientes atópicos e indivíduos controles segundo a reatividade cutânea aos ácaros.

Dos 62 pacientes reativos a *Blomia tropicalis* (grupo Bt+) pelo teste cutâneo, 39 (62,9%) soros foram ELISA-IgE positivos (IE > 5,0). Em contraste, dentre 48 pacientes não reativos a Bt pelo teste cutâneo (grupo Bt-), 44 (91,6%) soros apresentaram IE abaixo do ponto de corte (IE < 5,0) contra 4 (8,3%) soros positivos para ELISA-IgE. Além disso, os 33 soros de indivíduos não atópicos (grupo controle) foram considerados negativos para ELISA-IgE (IE < 5,0), como demonstrado na Figura 2A. As médias geométricas dos níveis de ELISA-IgE a *B. tropicalis* foram significativamente maiores no grupo Bt+ (IE = 11) quando comparada ao grupo Bt - (IE = 0,9) ou ao grupo controle (IE = 0,8) ($p < 0,0001$).

Níveis de ELISA-IgE específica a *B. tropicalis* em soros de pacientes atópicos de acordo com a reatividade cutânea a duas espécies de ácaros (Bt e Dp), individualmente ou concomitantemente, estão ilustrados na Figura 2B.

De 56 pacientes reativos a ambas espécies (Bt+/Dp+), 37 (66,1%) soros apresentaram níveis de ELISA-IgE a *Blomia* acima do ponto de corte. Em contraste, nos 6 pacientes com reatividade cutânea somente para Bt (grupo Bt+/Dp-), dois (33,3%) soros foram positivos para ELISA-IgE.

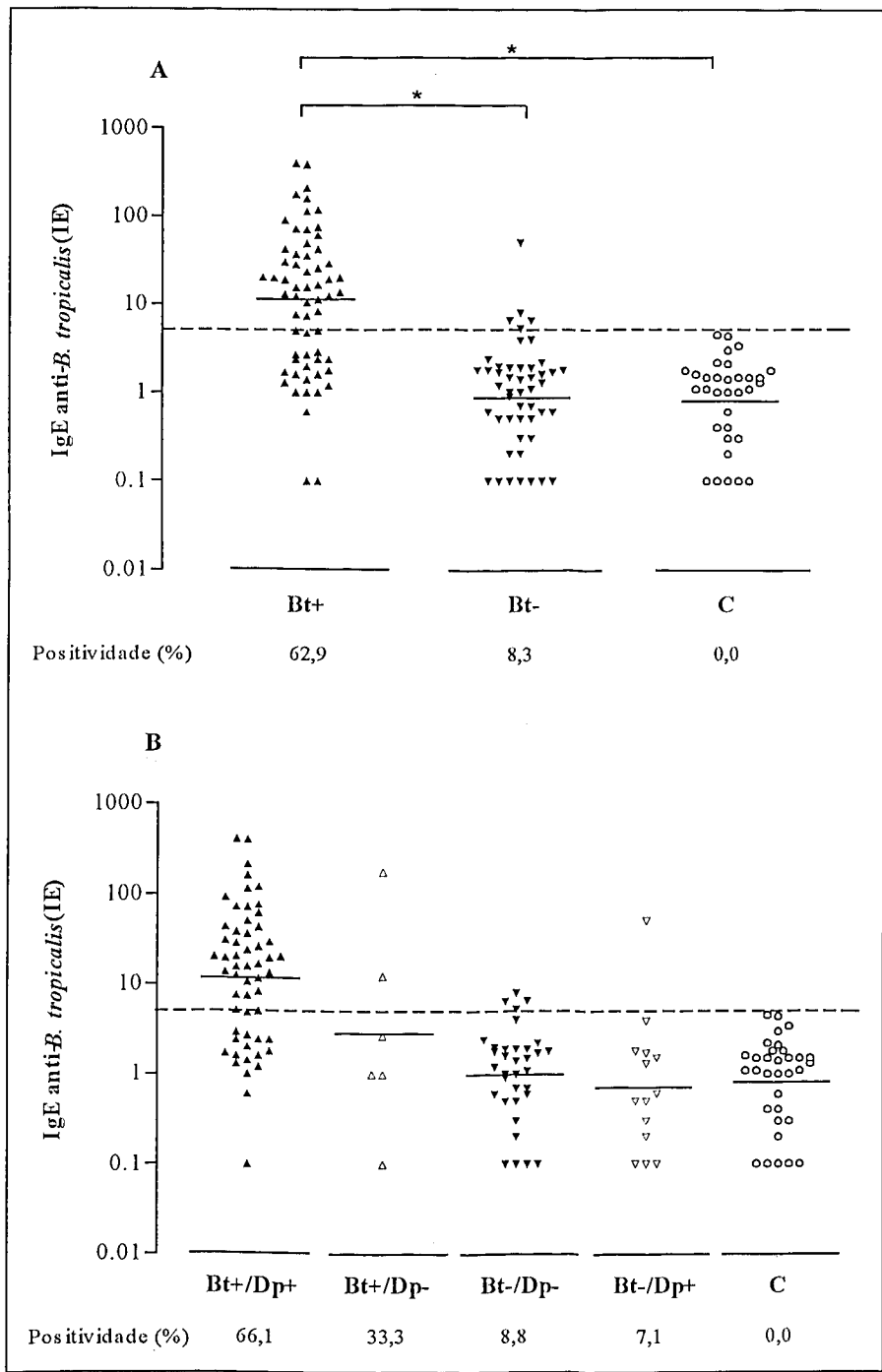


Figura 2: Níveis séricos de IgE anti-*B. tropicalis* determinados em índice ELISA (IE) nos grupos e subgrupos de pacientes e indivíduos controles de acordo com a reatividade cutânea a *B. tropicalis* (Bt) e/ou *D. pteronyssinus* (Dp). **(A)** Pacientes com teste cutâneo positivo a Bt (Bt+, n = 62) e teste cutâneo negativo a Bt (Bt-, n = 48) e indivíduos controles (C, n = 33). **(B)** Pacientes com teste cutâneo positivo a ambos ácaros concomitantemente (Bt+/Dp+, n = 56), teste cutâneo positivo a um único ácaro individualmente (Bt+/Dp-, n = 6; Bt-/Dp+, n = 14), teste cutâneo negativo a ambos ácaros (Bt-/Dp-, n = 34) e indivíduos controles (C, n = 33). A linha pontilhada indica o ponto de corte da reação (IE = 5,0). As barras horizontais representam as médias geométricas obtidas para cada grupo. * p < 0,0001.

Entre os pacientes com TC negativo a Bt, somente um (7,1%) do grupo Bt-/Dp+ (n = 14) e 3 (8,8%) do grupo Bt-/Dp- (n = 34), apresentaram níveis de IgE específica a Bt acima do ponto de corte (IE > 5,0). As médias geométricas dos níveis de IgE específica (IE) a Bt nos diferentes grupos (Bt+/Dp+ = 12; Bt+/Dp- = 2,9; Bt-/Dp+ = 0,7; Bt-/Dp- = 1,0; Controle = 0,8) não mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

4.4. Níveis de IgG PAN, IgG1 e IgG4 específicos a *Blomia tropicalis*

A Figura 3 mostra os resultados de ELISA obtidos na determinação dos níveis de IgG PAN (Fig. 3A), IgG1 (Fig. 3B) e IgG4 (Fig. 3C) específicas a *Blomia tropicalis*.

As médias dos limites de sensibilidade de cada análise foram 0,8 U/mL para IgG PAN, 5,0 U/mL para IgG1 e 10,0 U/mL para IgG4.

Como demonstrado na Figura 3A, os pacientes atópicos reativos a Bt pelo teste cutâneo (Bt+) tiveram níveis de IgG PAN específica (595 U/mL) significativamente maiores quando comparados aos soros de indivíduos controles não atópicos (330 U/ml) ($p < 0,05$). Em contraste, pacientes não reativos a Bt pelo teste cutâneo (Bt-) não mostraram diferença significativa para os níveis de IgG PAN (440 U/mL) em relação aos pacientes Bt+ e aos indivíduos controles ($p > 0,05$).

Entretanto, níveis de IgG1 específica a Bt (Fig. 2B) não mostraram diferenças significativas entre os grupos de pacientes atópicos Bt+ (52 U/mL) e Bt- (43 U/mL), porém, foram significativamente mais altos do que aqueles encontrados nos soros dos indivíduos controles (29 U/mL) ($p < 0,005$).

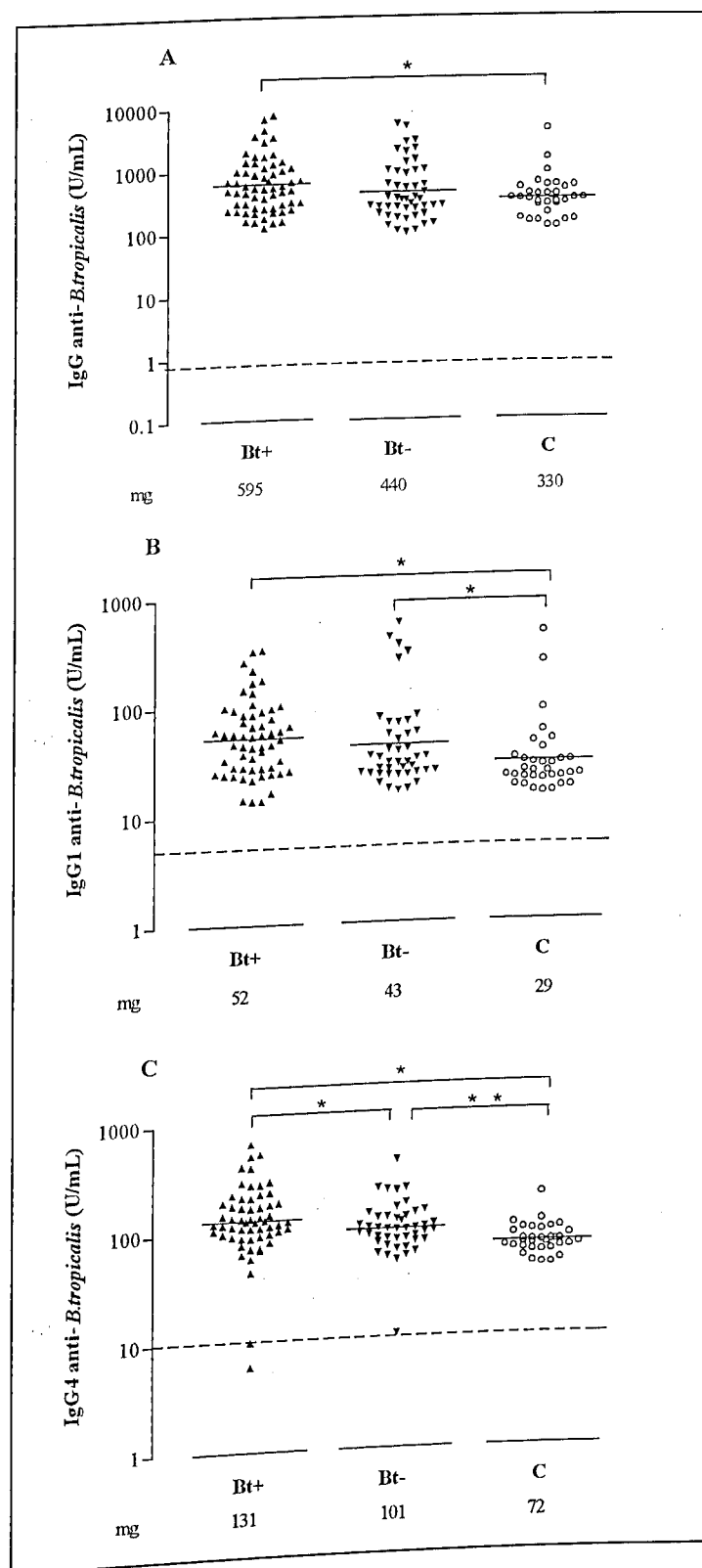


Figura 3: Níveis séricos de anticorpos IgG PAN (A), IgG1 (B) e IgG4 (C) anti-*B. tropicalis* determinados por ELISA e expressos em unidades por mililitro (U/mL) em pacientes com teste cutâneo positivo a Bt (Bt+, n = 62) e teste cutâneo negativo a Bt (Bt-, n = 48) e indivíduos controles (C, n = 33). A linha pontilhada indica a média do limite de detecção de cada ensaio (0,8 U/mL para IgG PAN, 5 U/mL para IgG1 e 10 U/mL para IgG4). As barras horizontais representam as médias geométricas obtidas para cada grupo. * p < 0,005, ** p < 0,0001.

Por outro lado, as médias dos níveis de IgG4 específica a Bt (Fig. 3C) encontradas no grupo Bt+ (131 U/mL) foram significativamente superiores a aquelas obtidas para os grupos Bt- (101 U/mL) e controle (72 U/mL) ($p < 0,005$). Além disso, os pacientes do grupo Bt- apresentaram níveis de IgG4 significativamente maiores do que os indivíduos controles ($p < 0,0001$).

Como ilustrado na Figura 4 (4A, 4B, 4C), os níveis de ELISA-IgG PAN, -IgG1 e -IgG4 específicas a *B. tropicalis* em soros de pacientes atópicos de acordo com a reatividade cutânea a duas espécies de ácaros (Bt e Dp), individualmente ou concomitantemente, não demonstraram diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

4.5. Correlação entre os níveis de IgE e IgG PAN, IgG1 ou IgG4 anti-*B. tropicalis*

A correlação entre os níveis de IgE e IgG PAN ou subclasses IgG1 e IgG4 anti-*B. tropicalis* foi analisada em soros de pacientes com reatividade cutânea ao extrato Bt (grupo Bt+) e com ELISA-IgE positivo. Como demonstrado na Figura 5C, uma importante correlação positiva ($r = 0,5521$; $p < 0,0005$) foi encontrada somente entre os anticorpos IgE e IgG4 anti-*B. tropicalis*.

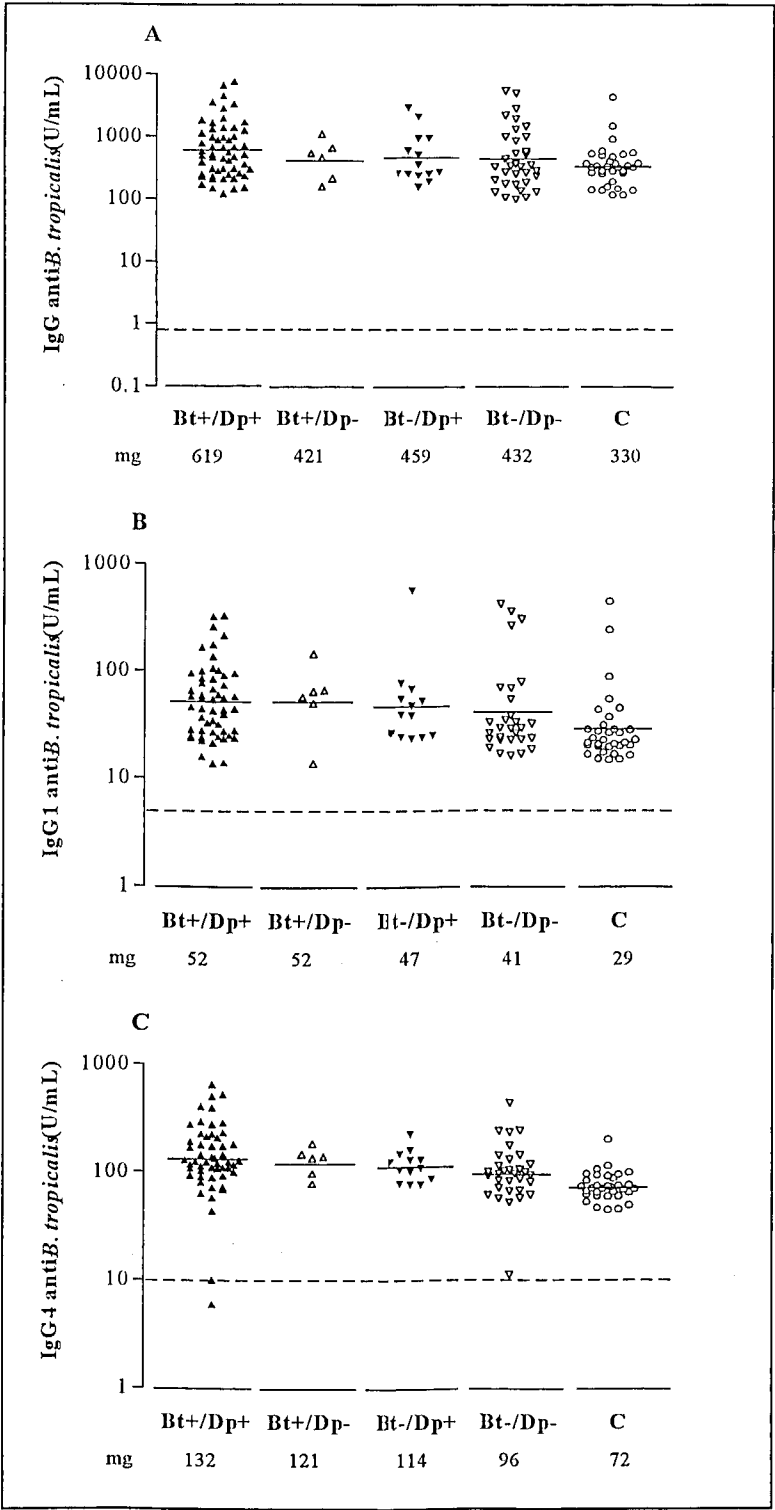


Figura 4: Níveis séricos de anticorpos IgG PAN (A), IgG1 (B) e IgG4 (C) anti-*B. tropicalis* determinados por ELISA e expressos em unidades por mililitro (U/mL) nos subgrupos de pacientes e indivíduos controles de acordo com a reatividade cutânea a *B. tropicalis* (Bt) e/ou *D. pteronyssinus* (Dp). Bt+/Dp+ (n = 56) pacientes com teste cutâneo positivo a ambos ácaros concomitantemente; Bt+/Dp- (n = 6), Bt-/Dp+ (n = 14) pacientes com teste cutâneo positivo a um único ácaro individualmente; Bt-/Dp- (n = 34) pacientes com teste cutâneo negativo a ambos ácaros; C (n = 33) indivíduos controles. A linha pontilhada indica a média do limite de detecção de cada ensaio (0,8 U/mL para IgG PAN, 5 U/mL para IgG1 e 10 U/mL para IgG4). As barras horizontais representam as médias geométricas obtidas para cada grupo.

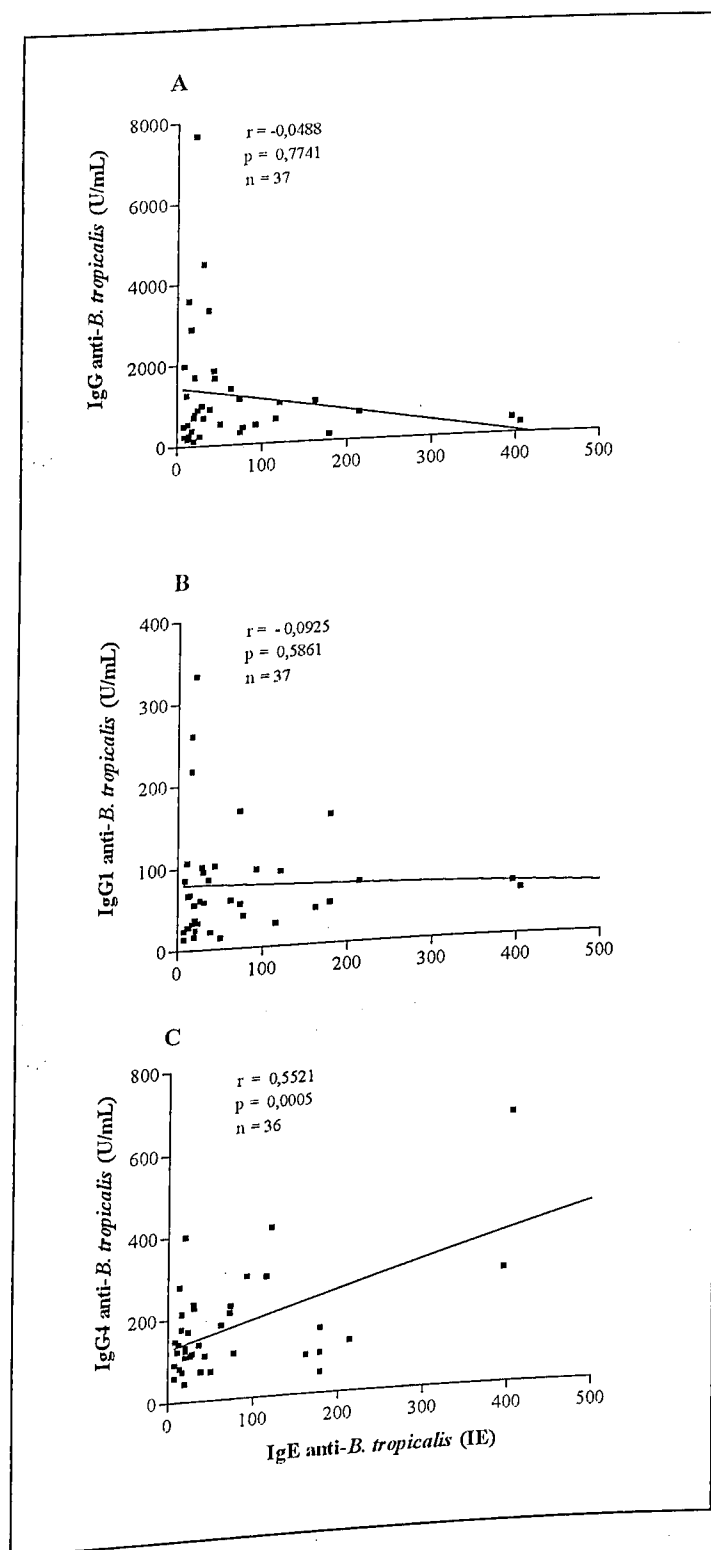


Figura 5: Correlação entre os níveis de IgE anti-*B. tropicalis* versus anticorpos IgG PAN (A), IgG1 (B) e IgG4 (C), determinada em soros de pacientes com reatividade cutânea a *B. tropicalis* (grupo Bt+) e IgE sérica positiva no ELISA.

4.6. Especificidade do ELISA para IgE, IgG1 e IgG4 anti-*Blomia tropicalis*

A especificidade do ELISA para IgE, IgG1 e IgG4 anti-*Blomia tropicalis* foi demonstrada através de testes de inibição competitiva utilizando extratos solúveis de Bt ou Dp ou toxoide tetânico (TT) como antígeno irrelevante (Fig.6). Todos os três ensaios para IgE, IgG1 e IgG4 foram inibidos de forma dose-dependente com concentrações crescentes do extrato solúvel Bt. Entretanto, a especificidade do ELISA foi confirmada somente para IgG1, uma vez que os extratos Dp ou TT apresentaram inibição irrelevante (Fig. 6B).

Reatividade cruzada com extrato de Dp foi observada no ELISA para IgE específica (Fig. 6A) somente quando alta concentração do inibidor (100 µg/mL do extrato Dp solúvel) foi utilizada.

Por outro lado, ELISA para IgG4 específica demonstrou curvas de inibição paralelas quando foram utilizados ambos os extratos Bt e Dp mesmo em baixíssimas concentrações dos antígenos inibidores (Fig.6C).

4.7. Resposta de IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes alergênicos de *B. tropicalis*

Os componentes protéicos do extrato Bt separados por SDS-PAGE e corados por nitrato de prata estão ilustrados na figura 7.

Um amplo espectro de frações protéicas foi visualizado no extrato Bt, com massas moleculares relativas variando de 14 a 104 kDa.

Para determinar a resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 por “immunoblotting”, foram selecionados soros de 49 pacientes atópicos reativos a *B. tropicalis* pelo teste cutâneo (Bt+), 23 soros de pacientes atópicos não reativos a Bt pelo teste cutâneo (Bt-) e 22 soros de indivíduos saudáveis (grupo controle).

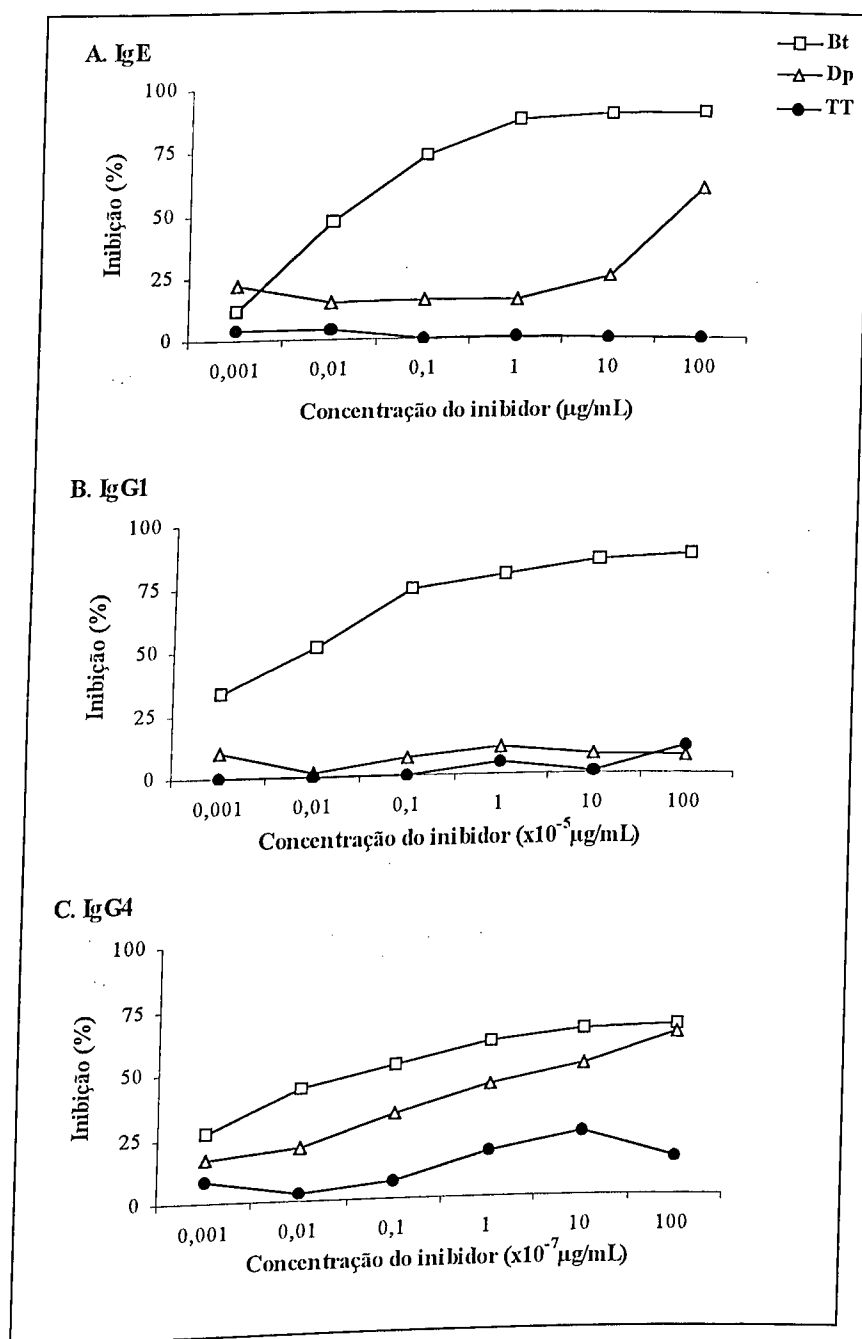


Figura 6: Especificidade do ELISA para os anticorpos IgE (A), IgG1 (B) e IgG4 (C) anti-*B. tropicalis* utilizando ensaios de inibição competitiva. Extratos de *B. tropicalis* (Bt) e *D. pteronyssinus* (Dp) ou toxoide tetânico (TT, controle negativo) foram submetidos a diluições duplas seriadas de 100 a 1×10^{-10} μg/mL em solução diluente de PBS-T-BSA e incubados com um soro pré-determinado. As misturas antígenos-soro foram analisadas nos ELISAs para IgE, IgG1 e IgG4 anti-*B. tropicalis*. O soro incubado somente com diluente foi utilizado como controle positivo. Porcentagem de inibição foi calculada a partir da seguinte fórmula: $[1,0 - (DO \text{ amostra} / DO \text{ controle positivo})] \times 100$.

Três “immunoblots” representativos para cada classe e subclasse de anticorpos nos diferentes grupos de indivíduos estão ilustrados na figura 7.

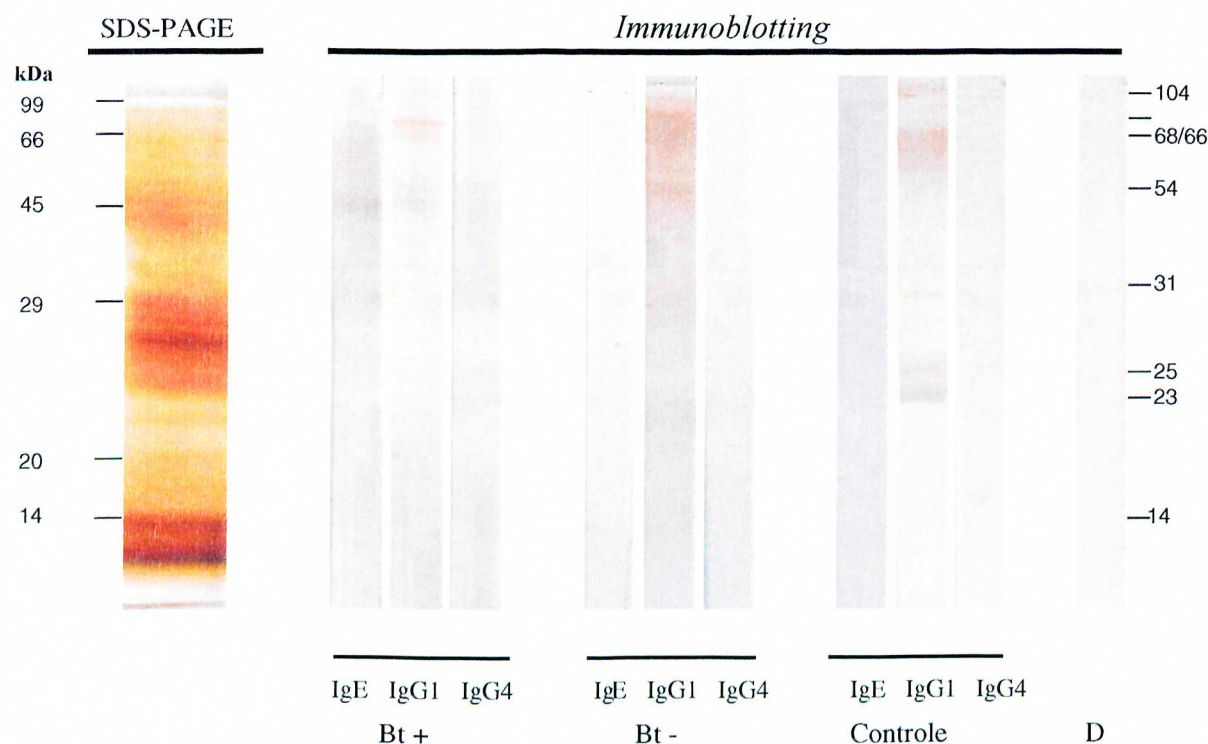


Figura 7: Perfis eletroforético (SDS-PAGE) e antigênico (“immunoblotting”) do extrato de *B. tropicalis*. Três “immunoblots” representativos para cada grupo de pacientes (Bt+, Bt- e Controle) de acordo com a reatividade dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 à *B. tropicalis*. D representa o controle da reação somente com diluente. Os padrões de peso molecular (kDa) estão indicados à esquerda.

4.8. Frequência dos componentes antigênicos derivados de *B. tropicalis*

As frequências dos componentes antigênicos reconhecidos pelos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 estão demonstrados nas figuras 8A, 8B e 8C respectivamente.

Entre 49 soros de pacientes do grupo Bt+ selecionados para detecção das proteínas ligantes de IgE por meio de “immunoblotting” (IB-IgE), 33 amostras foram positivas para ELISA-IgE, e 30 destas mostraram reatividade a diversos componentes antigênicos de *B. tropicalis*, enquanto nenhuma proteína ligante de IgE foi demonstrada nos 16 soros negativos em ELISA-IgE.

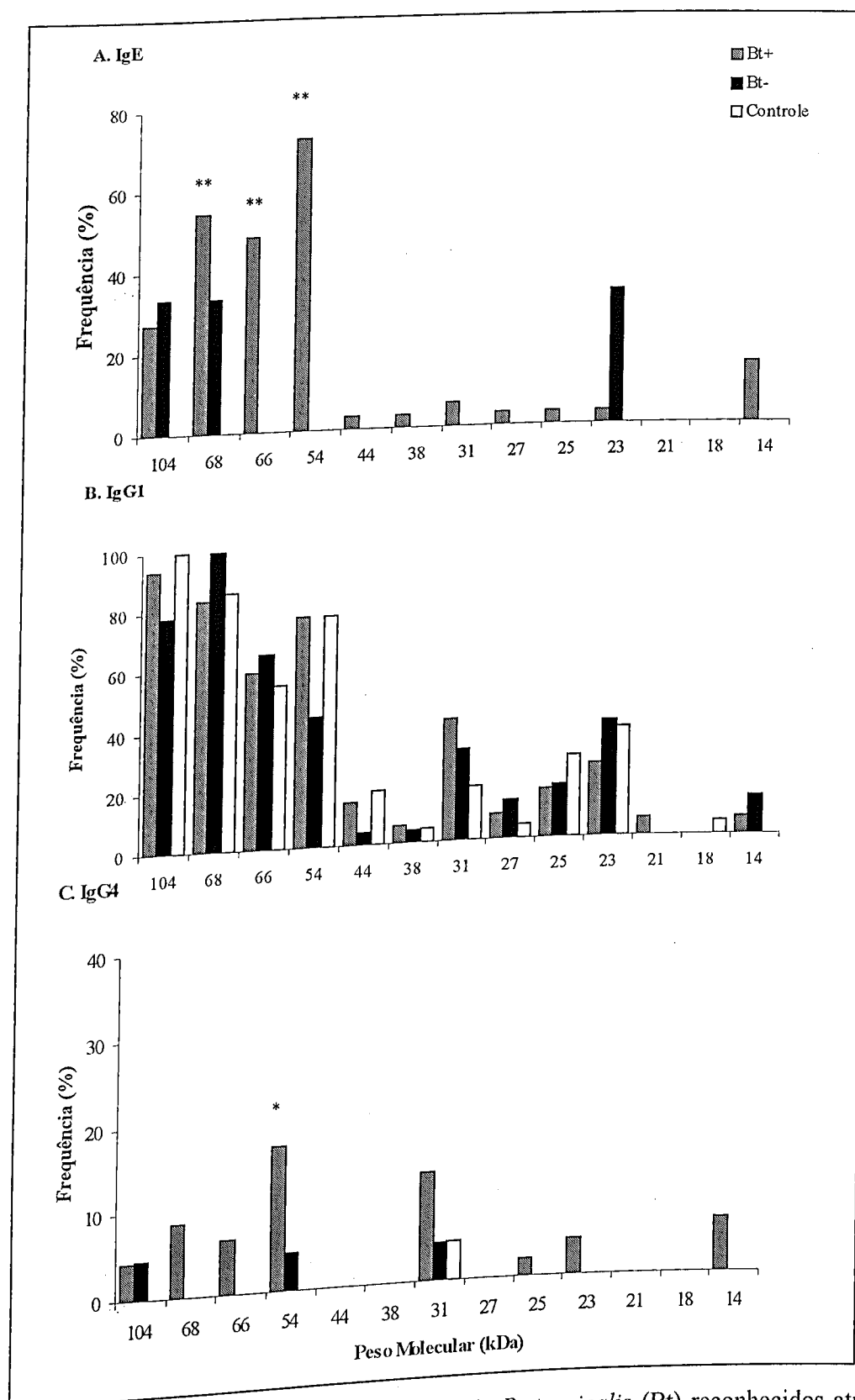


Figura 8: Frequência (%) de componentes antigênicos de *B. tropicalis* (Bt) reconhecidos através de "immunoblotting" por anticorpos IgE (A), IgG1 (B) e IgG4 (C) entre soros que apresentaram, de "immunoblotting" por anticorpos IgE (A), IgG1 (B) e IgG4 positivos no ELISA, nos grupos de pacientes com teste cutâneo respectivamente, IgE, IgG1 e IgG4 positivos no ELISA, nos grupos de pacientes com teste cutâneo positivo Bt (Bt+), teste cutâneo negativo a Bt (Bt-) e indivíduos controles. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Em contraste, dos 23 soros de pacientes do grupo Bt-, três foram positivos e 20 negativos em ELISA-IgE, com alguma reatividade sendo detectada em dois soros positivos e nenhuma reatividade em soros não reativos por IB-IgE

Todos os 22 soros dos indivíduos controles foram negativos para ELISA-IgE e IB-IgE.

Deste modo, as frequências dos componentes antigênicos de *B. tropicalis* reconhecidos por IgE, IgG1 e IgG4 através de "immunoblotting", foram determinadas somente entre os soros que apresentaram, respectivamente, IgE, IgG1 e IgG4 positivos no teste ELISA, nos diferentes grupos (Bt+, Bt- e controle).

Como demonstrado na figura 8A, os principais componentes alergênicos reconhecidos por anticorpos IgE presentes nos soros de pacientes do grupo Bt+, foram as proteínas de 54, 68, 66 e 104 kDa, em ordem decrescente de frequência. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas somente para as três primeiras bandas anteriormente referidas quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$). Além disso, o alérgeno de 14 kDa também foi detectado exclusivamente neste grupo (Bt+), embora em menor frequência e sem diferença significativa entre os grupos. As proteínas de 104, 68 e 23 kDa também foram reconhecidas por soros de pacientes negativos ao teste cutâneo (grupo Bt-), porém positivos ao ELISA-IgE.

Anticorpos IgG4 reconheceram componentes antigênicos semelhantemente ao perfil reconhecido por IgE, embora em frequências mais baixas. A proteína de 54 kDa foi a mais frequente no grupo Bt+, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), seguida das proteínas de 31, 68, 66 e 14 kDa. Somente o componente de 31 kDa foi detectado no grupo controle, embora em baixa frequência (4,5%) (Figura 8C).

Por outro lado, observou-se um largo espectro de componentes antigênicos derivados de *B. tropicalis* ligantes de IgG1, como demonstrado na Figura 8B, com diversas bandas antigênicas sendo reconhecidas em altas frequências entre os diferentes grupos. Novamente, os quatro componentes antigênicos (104, 68, 66 e 54 kDa), anteriormente mencionados como ligantes de IgE e IgG4 foram também reconhecidos nas mais altas frequências como proteínas ligantes de IgG1.

5. Discussão

Nesse estudo, foram analisados vários aspectos referentes à resposta de anticorpos específicos IgE, IgG1 e IgG4 contra o ácaro da poeira domiciliar *Blomia tropicalis* em pacientes portadores de asma e/ou rinite alérgica e em indivíduos não atópicos. A maioria (56,4%) dos pacientes atópicos apresentou reatividade cutânea ao extrato Bt, embora 50,9% destes demonstraram teste cutâneo positivo a ambos ácaros (*B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*) e somente 5,5% foram positivos a *B. tropicalis* individualmente. Esta sensibilização concorrente tem dificultado a avaliação do papel de *B. tropicalis* para estes pacientes, particularmente em regiões onde as duas espécies dos ácaros referidos têm sido encontradas. De acordo com os nossos estudos prévios (MEDEIROS Jr. et al., 2002), um grande número do ácaro *B. tropicalis* tem sido encontrado nas amostras de poeira domiciliar das áreas urbana e rural de Salvador, BA, contrastando aos níveis baixíssimos ou até mesmo indetectáveis do alérgeno Blo t 5 determinado pelo ELISA sandwich (LUCZYNSKA et al., 1989). Este fato sugere que outros componentes alergênicos importantes, derivados do extrato de *B. tropicalis* poderiam estar presentes e ser reconhecidos por soros de pacientes atópicos, ou que a sensibilidade do teste ELISA para medir o alérgeno Blo t 5 deve ser melhor avaliada em ensaios futuros (MEDEIROS Jr. et al., 2002).

Por outro lado, os resultados do ELISA-IgE mostraram uma positividade menor entre os pacientes atópicos (43/110; 39,1%) em relação aos resultados do teste cutâneo, revelando 62,9% de positividade para IgE entre o grupo de pacientes Bt+ e 8,3% entre o grupo de pacientes Bt-. Estes resultados discordantes podem ser

explicados pelo emprego de diferentes métodos na avaliação da sensibilização, isto é, o teste cutâneo de hipersensibilidade imediata determina a presença de IgE específica ligada aos receptores Fc da superfície de mastócitos, enquanto o ELISA-IgE detecta a presença de anticorpos IgE específicos circulantes (DAHL et al., 1996). Entretanto, os resultados do ELISA-IgE permitiram verificar que os níveis séricos de IgE específica presentes nos soros dos pacientes atópicos Bt⁺ foram significativamente maiores que aqueles encontrados nos soros dos pacientes atópicos Bt⁻ e indivíduos controles, sugerindo que ELISA-IgE poderia ser considerado como uma ferramenta adicional na avaliação da sensibilização a *B. tropicalis* em pacientes portadores de alergia respiratória, especialmente asma e/ou rinite.

Além disso, ELISA-IgE demonstrou ser um teste relativamente específico quanto a possíveis reações cruzadas com extrato Dp, exceto para altas concentrações deste extrato, como demonstrado nos ensaios de inibição competitiva. Adicionalmente, dos 4 pacientes que foram positivos no ELISA-IgE no grupo Bt⁺, três deles também possuíam teste cutâneo negativo para o extrato Dp, reforçando assim, a especificidade do ELISA-IgE. Assim, Arruda et al. (1997), tem demonstrado haver 33% de reatividade cruzada de *B. tropicalis* com *D. pteronyssinus* e 43% de homologia na sequência primária entre os alérgenos Blo t 5 e Der p 5, sugerindo que várias proteínas de *B. tropicalis* ligantes de IgE poderiam ser parcialmente inibidas por *D. pteronyssinus*. Adicionalmente, Tsai et al. (1998), evidenciaram, através de resultados de inibição por *immunoblotting*, a existência de reatividade cruzada de anticorpos IgE entre *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*. Contudo, dois principais componentes alergênicos de *B. tropicalis* (14,3 e 27,3 kDa)

não foram inibidos por *D. pteronyssinus*. Desta maneira, a ausência de reatividade cruzada com tais componentes dos extratos Bt e Dp, indica que *B. tropicalis* possui alérgenos espécie-específicos relevantes. Recentemente, Chew et al. (1999), utilizando estudos de inibição com a metodologia FAST (Fluorescent Allergosorbent Test) e imunoeletroforese enzimática cruzada, confirmaram que alérgenos de *B. tropicalis* são diferentes e que possuem reatividade cruzada baixa a moderada com alérgenos de *D. pteronyssinus*. Avaliando conjuntamente, estes dados indicam que *B. tropicalis* pode exercer um papel importante na patogênese da asma e rinite em nossos pacientes, e que alérgenos de Bt deverão ser incluídos no diagnóstico e condutas terapêuticas de pacientes atópicos da nossa região.

No presente estudo, foram detectados anticorpos IgG e as subclasses IgG1 e IgG4 específicas a *B. tropicalis* nos três grupos estudados (Bt+, Bt- e controle), indicando que estes indivíduos foram expostos a estímulos antigênicos repetitivos por alérgenos de Bt por tempo prolongado. Entretanto, níveis de IgG PAN específicos a *B. tropicalis* foram significativamente superiores nos pacientes do grupo Bt+ do que nos indivíduos controles.

Adicionalmente, níveis de IgG1 contra *B. tropicalis* foram significativamente mais altos em ambos grupos de pacientes atópicos (Bt+ e Bt-), quando comparados ao grupo controle, porém, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os pacientes atópicos.

Em contraste, níveis de IgG4 anti-*B. tropicalis* mostraram diferença significativa entre ambos grupos Bt+ e Bt- de pacientes atópicos e também quando comparados aos indivíduos controles. Estes resultados indicam que anticorpos IgG4 específicos a *B. tropicalis* parecem discriminar entre pacientes atópicos com

resultados positivo (Bt+) e negativo (Bt-) ao teste cutâneo, o que também foi reforçado pela significativa correlação encontrada entre anticorpos IgE e IgG4 anti-*B. tropicalis* nos soros de nossos pacientes atópicos Bt+.

Por outro lado, anticorpos IgG1 anti-*B. tropicalis* foram incapazes de demonstrar tal distinção de reatividade entre os grupos estudados. Esses resultados estão em concordância com os dados de outros autores que encontraram uma forte correlação entre anticorpos IgE e IgG4 anti-*D. pteronyssinus* em pacientes atópicos (MERRET et al., 1984), sugerindo que a subclasse IgG4 poderia atuar mais como um anticorpo anafilático e amplificador da reação alérgica, do que como um anticorpo bloqueador.

Curiosamente, o teste ELISA para detecção de IgG1 mostrou ser altamente específico para *B. tropicalis* enquanto o ELISA-IgG4 revelou uma marcante reatividade cruzada com *D. pteronyssinus*, sugerindo assim, que estas duas subclasses de anticorpos poderiam estar reconhecendo epítomos diferentes na mesma fração protéica.

Nesse estudo, o extrato total Bt revelou um perfil eletroforético com mais de 20 proteínas após a coloração por nitrato de prata. Destas, pelo menos 11 diferentes proteínas ligantes de IgE com pesos moleculares variando de 14 a 104 kDa foram detectadas por *immunoblotting* utilizando soros de pacientes atópicos positivos tanto ao teste cutâneo quanto ao ELISA-IgE. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Tsai et al. (1998), que relataram 14 proteínas de *B. tropicalis* ligantes de IgE detectadas por *immunoblotting*, utilizando um sistema de revelação com substrato cromógeno similar ao nosso. Por outro lado, outros pesquisadores têm identificado 21 diferentes proteínas ligantes de IgE detectadas através de

radioimuno eletroforese cruzada (ARLIAN et al., 1993) e 25 antígenos detectados por *immunoblotting* utilizando análise de autoradiografia (CARABALLO et al., 1994) no extrato total de Bt. Estes resultados divergentes podem ser devido à menor sensibilidade dos métodos de revelação do *immunoblotting* por nós empregados, visto que não utilizamos isótopos radioativos.

A proteína de 54 kDa foi o principal componente alergênico reconhecido em mais de 70% dos soros dos pacientes atópicos positivos no teste cutâneo e no ELISA-IgE, embora outros dois componentes alergênicos, 68 e 66 kDa, também tenham sido detectados em frequências significativamente maiores em relação ao grupo controle.

Recentemente, Ramos et al. (2001), identificaram pela primeira vez um alérgeno de *B. tropicalis* de alto peso molecular (Blo t 11), uma proteína de 98 kDa com 52% de reatividade com IgE de soros de pacientes atópicos, contrastando com os resultados de outros dois grupos de pesquisadores (TSAI et al., 1998 e CARABALLO et al., 1994), que têm considerado como principais alérgenos, as proteínas de 14,3 e 11-13 kDa respectivamente. Assim sendo, nossos resultados demonstram que os pacientes deste estudo parecem estar preferencialmente sensibilizados a componentes alergênicos de pesos moleculares maiores. Portanto, essas três frações alergênicas (68, 66 e 54 kDa), deveriam ser posteriormente avaliadas para propostas diagnósticas em pacientes atópicos.

O perfil antigênico detectado no *immunoblotting* para IgG4, revelou uma estreita semelhança com o perfil alergênico do *immunoblotting* para IgE, demonstrando que a subclasse IgG4 reconheceu praticamente as mesmas proteínas que foram reconhecidas por anticorpos IgE nos soros dos pacientes atópicos do

grupo Bt+, sugerindo seu provável papel como um anticorpo que também pudesse mediar a reação alérgica.

Contudo, estudos de imunoterapia têm evidenciado um papel para IgG4 como anticorpo bloqueador das reações alérgicas, já que títulos de IgG4 específica mostraram-se aumentados durante a terapia com alérgenos específicos (AALBERSE et al., 1993). Portanto, estudos adicionais deverão ser conduzidos para melhor avaliar o perfil de reatividade de anticorpos IgE e das subclasses de IgG específicos anti-*B. tropicalis* em pacientes atópicos que estejam sob procedimentos imunoterapêuticos.

Por outro lado, proteínas ligantes de IgG1, particularmente as de pesos moleculares maiores (104, 68, 66 e 54 kDa), foram amplamente reconhecidas por soros de pacientes atópicos e indivíduos controles, sugerindo que estes componentes antigênicos deveriam também ser avaliados como potenciais antígenos candidatos em estudos de exposição, sensibilização e imunoterapia alérgicas.

6. Conclusões

1. Os níveis séricos de IgE específica ao extrato alergênico Bt determinados por ELISA nos soros de pacientes atópicos Bt+, demonstraram *Blomia tropicalis* é um importante ácaro envolvido na sensibilização alérgica de pacientes com asma e/ou rinite alérgica de Uberlândia, MG, embora a maioria destes pacientes apresentou sensibilização concorrente com *Dermatophagoides pteronyssinus*.
2. A sensibilização a *B. tropicalis* parece não ter demonstrado reatividade cruzada com *D. pteronyssinus* como determinado pelos testes de inibição competitiva por ELISA-IgE.
3. A presença de anticorpos IgG PAN e subclasses IgG1 e IgG4 específicas a *B. tropicalis* detectados por ELISA em soros de pacientes com asma e/ou rinite alérgica e indivíduos controles não atópicos, sugere exposição contínua a alérgenos de *B. tropicalis*.
4. Pacientes atópicos reativos ao teste cutâneo (Bt+) apresentaram níveis de IgG PAN, IgG1 e IgG4 significativamente superiores em relação aos indivíduos controles não atópicos. Além disso, somente os níveis de IgG4 específicos a Bt foram capazes de discriminar entre pacientes atópicos reativos (Bt+) e não reativos (Bt-) ao teste cutâneo, sugerindo um provável papel como anticorpo anafilático e amplificador da reação alérgica, do que como um anticorpo bloqueador.
5. Ensaios de *immunoblotting* identificaram diversos componentes protéicos ligantes de anticorpos IgE, IgG1 ou IgG4. No grupo Bt+, as proteínas de 68, 66 e 54 kDa ligaram-se aos três isotipos de anticorpos nas mais altas frequências, sugerindo que estes componentes antigênicos deveriam ser avaliados como potenciais antígenos candidatos em estudos de exposição, sensibilização e imunoterapia alérgicas.

- AALBERSE, R. C.; VAN MILLIGEN, F.; TAN, K Y.; STAPEL, S. O. Allergen-specific IgG4 in atopic disease. **Allergy**, v. 48, p. 559-569, 1993.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Cellular e Molecular**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. 469p.
- ARLIAN, L. G.; VYSZENSKI-MOBER, D.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Allergenicity of the mite *Blomia tropicalis*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 91, p.1042-1050, 1993.
- ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D. A review of recent immunochemical studies of *Blomia tropicalis* and *Euroglyphus maynei* allergens. **Experimental & Applied Acarology**, v. 16, p. 129-140, 1992.
- ARRUDA, L. K.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; NASPITZ, C. K.; MONTEALEGRE, F.; VAILES, L. D.; CHAPMAN, M. D. Identification of *Blomia tropicalis* allergen Blo t 5 by cDNA cloning. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 107, p. 456-457, 1995.
- ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; 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**, v. 21, p. 433-439, 1991.
- ARRUDA, L. K.; VAILES, L. D.; PLATTS-MILLIS, T. A. E.; CHAPMAN, M. D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; MONTEALEGRE, F.; LIN, K-L.; CHUA, K-Y.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 155, p. 343-350, 1997.
- BAGGIO, D.; AMBROZIO, J. L. C.; ANTILA, M. Ácaros ambientais e as manifestações alérgicas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 12, p. 56-58, 1989.
- BENJAMINI, E.; LESKOWITZ, S. Immunogens and antigens. In: **Immunology a short course**. New York: Alan R. Liss, 1988. 390p. p.31-42.
- BERNSTEIN, I. L.; STORMS, W. W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. **Annals of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 75, n. 6, p. 543-570, 1995.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Eletrphoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

- BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.F.; MALLING, H. J. Imunoterapia com alérgenos: vacinas terapêuticas para doenças alérgicas. **Revista Brasileira Alergia e Immunopatologia**, v. 23, p. 05-38, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARABALLO, L.; AVJIOGLO, A.; MARRUGO, J.; PUERTA, L.; MARSH, D. Cloning and expression of complementary DNA coding for na allergen with common antibody-binding specificities with three allergens of house dust mite *Blomia tropicalis*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 98, p.573-579, 1996.
- CARABALLO, L.; PUERTA, L.; JIMENEZ, S.; MARTINEZ, B.; MERCADO, B.; AVJIOGLO, A.; MARSH, D. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 112, p. 341-347, 1997.
- CARABALLO, L.; PUERTA, L.; MARTINEZ, B.; MORENO, L. Identification of allergens from *Blomia tropicalis*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 24, p. 1056-1060, 1994.
- CHEW, F. T.; YI, F. C.; CHUA, K. Y.; FERNANDEZ-CALDAS E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; LEE, B. W. Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, n. 7, p. 982-988, 1999.
- COCHRANE, G. M.; REES, P. J. **Atlas Colorido da Asma**. Barcelona: Mosby/Doyma Libros, 1995. v.1. 40 p.
- COLLOFF, M. J. Taxonomy and identification of dust mites. **Allergy**, v.53, p. 7-12, 1998. Supplement 48.
- COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, v. 402, p. 18-23, 1999.
- DAHL, M. Atopic dermatitis. In: **Clinical Immunodermatology**. 3rd ed. St Louis, MO: Mosby-Year Book, 1996. 345-352 p.

EVANS III, R. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. In: MIDDLETON, E. J.; REED, C. E.; ELLIS, E.F.; ADKINSON, N. F. J.; YUNINGER, W.; BUSSE, W. W. **Allergy: Principles and Practice**. St. Louis: Mosby-Year Book, 1993. v. 1, p. 1109-1136.

FERNANDEZ-CALDAS, E.; PUERTA, L.; MERCADO, D.; LOCKEY, R.; CARABALLO, L.; Mite fauna, *Der p I*, *Der f I* and *Blomia tropicalis* allergen levels in tropical environment. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 23, p. 292-297, 1993.

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.

GALLI, S. J.; LANTZ, C. S. Allergy. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. 1589p. p. 1127-1174.

GOLDEN, D. B.; MEYERS, D. A.; KAGEY-SOBOTKA, A.; VALENTINE, M. D.; LICHTENSTEIN, L. M. Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, p. 489-493, 1982.

GOLDSTEIN, R. A.; PAUL, W. E.; METCALFE, D. D.; BUSSE, W. W.; REECE, E. R. Asthma. **Annals of Internal Medicine**, v. 121, p. 698-708, 1994.

GOUNNI, A. S.; LAMKHLOUED, B.; OCHIAI, K.; TANAKA, Y.; LAPORTE, E.; CAPRON, A.; KINET, J. P.; CAPRON, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. **Nature**, v. 367, n. 6459, p. 183-187, 1994.

GRAUDENZ, G. S.; SANO, F.; CASTRO, F. F. M. Tratamento da asma. In: CASTRO, F. F. M.; CASTRO, M. L. **Corticosteróides nas alergias respiratórias**. São Paulo: Vivali, 1999. 148p. p. 79-89.

HOWARTH, P. H. A alergia está aumentando? Influências das primeiras fases da vida. **Clinical of Experimental Allergy**, v. 28, p. 5-10, 1998. Suplemento 6.

KALINER, M. A.; MCFADDEN, E. R. J. Bronchial asthma. In: **Immunological diseases**. SAMTER, M.; TALMAGE, M.; FRANK, M. M.; AUSTEN, K. F.; CLAMAN, H. N. Boston: Little Brown and Company, 1988. v. 2, p. 1067-1118

KANCKO, M.; SWANSON, M. C.; GLEICH, G. J.; KITA, H. Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2813-2821, 1995.

- KING, T. P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 25, p. 27-37, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LICHTENSTEIN, L.; ISHIZAKA, K.; NORMAN, P.; SOBOTKA, A.; HILL, B. IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and results of immunology the results of immunotherapy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, p. 472-482, 1973.
- LIERL, M. B. Allergy of upper respiratory tract. In: LAWLOR Jr., G. J.; FISCHER, T. J.; ADELMAN, D. C. **Manual of Allergy and Immunology**, 3 rd. ed. Boston: Little, Brown and Company, 1995. 590p. p. 94-102.
- 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 Immunological Methods**, v. 118, p. 278-235, 1989.
- MANNINO, H. J. Reproducibility of skin sensitivity using a quantitative skin prick test. **Allergy**, v. 40, p. 100-404, 1998.
- MARONE, G. Asthma: recent advances. **Immunology Today**, v. 19, n. 1, p. 5-9, 1998.
- MAURER, D.; FIEBIGER, E.; EBNER, C.; REININGER, B.; FISCHER, G. F.; WICHLAS, S.; JOUVIN, M. H.; SCHMITT-EGENOLF, M.; KRAFT, D.; KINET, J. P.; STINGL, G. Peripheral blood dendritic cells express FcεRI as complex composed of FcεRI-chains; and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 2, p. 607-616, 1996.
- MAURER, D.; FIEBIGER, E.; REININGER, B.; WOLFF-WINISKI, B.; JOUVIN, M. H.; KILGUS, O. KINET, J. P.; STINGL, G. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (FcεRI) on monocytes of atopc individuals. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 2, p. 745-750, 1994.
- 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**, 2002. No prelo.

MERRETT, J.; BARNETSON, R. St. C.; BURR, M. L.; MERRETT, T. G. Total and specific IgG4 antibody levels in atopic eczema. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 56, p. 645-652, 1984.

MORI, J. C.; PIRES, M. C.; GALVÃO, C. E. S.; MELLO, J. F.; MONTEALEGRE, F. Determination of *Blomia tropicalis*-specific IgE and IgG subclasses in atopic dermatitis patients. **Allergy**, v. 56, p. 180-184, 2001.

NACLERIO, R. M. The role of inflammation in rhinitis and otitis. In: 1995 International Conference Wednesday Afternoon Symposium 926, March 1, 1995, **The Total Airway: a Target for Allergy Therapy**. 1995. p. 7-8.

NAHM, D. H.; PARK, H. S.; KIM, C. W.; PARK, J. W.; HONG, C. S.; Seasonal variation of IgG subclass antibodies to house dust mite in sera from mite-sensitive asthmatic patients. **Annals of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 80, p. 411-415, 1998.

PARSLOW, T. G. Immunogens, antigens, & vaccines. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARNSLOW, T. G. **Medical Immunology**. 9.ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997. 900 p. p.74-82.

PIPKORN, U.; HAMMERLUND, A.; ENERBAECK, L. Prolonged treatment with topical corticosteroids results in an inhibition of the allergen-induced wheal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 19, p. 19-27, 1989.

PLATTS-MILLS, T. A. E. How environment affects patients with allergic disease: Indoor allergens and asthma. **Annals of Allergy**, v. 72, p. 381-384, 1994.

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

PLATTS-MILLS, T. A. E.; MITCHELL, E. B.; TOVEY, E. R. Airborne allergen exposure, allergen avoidance and bronchial hyperactivity. In: KAY, A. B.; AUSTEN, K. F.; LICHTENSTEIN, L. M. **Asthma: Physiology, Immunopharmacology and Treatment**. London: Academic Press Inc. 1984. 297-314p.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; SPORIK, R. B.; WHEATLEY, L. M.; HEYMANN, P. W. Is there a dose-response relationship between exposure to indoor allergens and symptoms of asthma? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 96, n. 4, p. 435-440, 1995b.

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

RAMOS, J. D. A.; NGE, C.; WAH, L. B.; YAN, C. K. cDNA cloning and epression of Blot 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 126, p. 186-193, 2001.

RIZZO, M. C.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLIS, T. A. E.; NASPITZ, C. K.; IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. **Annual of Allergy**, v. 71, p. 152-58, 1993.

ROIT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 5. ed. London: Mosby Internatioal, 1998. 433 p.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.;MACKAY, C. R. Chemokines and chemokine receptors in t-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. **Immunology Today**, v. 19, n. 12, p. 568-574, 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**, v. 19, p. 419-24, 1989.

SILVA, D. A. O.; GERVÁSIO, A. M.; SOPELETE, M.C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; SUN-SANG, J. S.; 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, & Immunology**, v. 86, p. 545-550, 2001.

SLOTT, I. R.; ZWEIMAN, B. A. Controlet study of the effect og corticosteroids on immediate skin test reactivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 54, p. 229-235, 1974.

SLY, R. M.; New guidelines for diagnosis and management of asthma. **Annals of Allergy**, v. 78, p. 427-437, 1997.

SMITH, A. M.; YAMAGUCHI, H.; PLATTS-MILLIS, T. A. E.; FU, S. M. Prevalence of IgG anti Der p 2 antibodies in children from high and low antigen exposure proups:

- Relationship of IgG and subclass antibody responses exposure and allergic symptoms. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 86, p. 102-109, 1998.
- SMITH, J. M.; DISNEY, M. E.; WILLIAMS, J. D. Clinical significance of skin reactions to mite extracts in children with asthma. **British Medical Journal**, v. 1, p. 723-726, 1969.
- SPORIK, R.; HOLGATE, S. T.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; COGSWELL, J. J. Exposure to house-dust mite allergen (Der p1) and the development to asthma in childhood. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 8, p. 502-507, 1990.
- SQUILLACE, S. P.; SPORIK, R. B.; RAKES, G.; COUTURE, N.; LAWRENCE, A.; MERRIAM, S.; ZHANG, J.; PLANTTS-MILLS, T. A. E. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, p. 1760-1764, 1997.
- STAR, M.; WEINSTOCK, M. Studies in pollen allergy. The relation between blocking antibody levels, and symp-tomatic relief following hyposensitization with allpyral in hay fever subjects. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 38, p. 514-521, 1970.
- TERR, A. I. Mechanisms of hypersensitivity. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Medical Immunology**. 9.ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997a. 900 p. p.376-388
- TERR, A. I. The atopic diseases. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Medical Immunology**. 9.ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997b. 900 p. p.389-408.
- TOWBIN, H.; STSEHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- TSAI, J-J.; WU, H. H.; SHEN, H-D.; HSU, E-L.; WANG, S-R.; Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 115, p. 144-149, 1998.
- TUNNICLIFFE, W. S.; FLETCHER, T. J.; HAMMOND, K.; ROBERTS, K.; CUSTOVIC, A.; SIMPSON, A.; WOODCOCK, A.; AYRES, J. G. Sensitivity and exposure to indoor allergens in adults with differing asthma severity. **The European Respiratory Journal**, v. 13, p. 654-659, 1999.

VAN BRONSWIJK, J. E. M. H.; DE COCK, A. W. A. M.; OSHIMA, S. The genus *Blomia* Oudemans (Acari: Glycyphagidae). I. Description of *Blomia tropicalis* sp. n. from house dust in tropical and subtropical regions. **Acarologia**, v. 15, p. 477-489, 1973.

WANG, B.; RIEGER, A.; KILGUS, O.; OCHIALI, K.; MAURER, D.; FODINGER, D.; KINET, J. P.; STINGL, G. Epidermal langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcεRI. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, p. 1353-1365, 1992.

WORM, M.; HEINZ, B. M. Molecular regulation of IgE synthesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 75, p. 440-447, 1997.

FU-00014687-4

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Anexo 1**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado: "Identificação das frações alergênicas e avaliação da resposta imune humoral a *Blomia tropicalis* entre pacientes atópicos", que será realizado nesta unidade estando ciente dos seguintes aspectos:

- realização de exames complementares tais como teste cutâneo com alérgenos inalantes.
- necessidade de coleta de sangue.

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 investigação.

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

Uberlândia, _____ de _____ de 2000.

TESTEMUNHA

TESTEMUNHA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Anexo 2**QUESTIONÁRIO**

Identificação:.....

Nome:.....

Fone:.....

Endereço:.....

Idade:..... Sexo:..... Profissão:.....

1) Já teve problema de rinite (espirros ou corrimento ou obstrução ou coceira no nariz) sem estar gripado ou resfriado ?

☐ SIM☐ NÃO

2) Qual o sintoma que mais lhe afeta ?

☐ espirros☐ coceira☐ coriza☐ obstrução☐ todos

3) Desde que idade?

☐ <1 ano☐ 1 - 4anos☐ 5 -12 anos☐ > 12 anos☐ ____ anos

4) Quantas vezes no último ano?

☐ 1-3☐ 4 - 12☐ > 12

5) Em que época do ano ocorreu?

☐ ano todo☐ verão☐ inverno

6) Qual o pior período do dia?

☐ dia todo☐ manhã☐ noite

7) Esse problema nasal já foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos ?

☐ SIM☐ NÃO

8) Quantas vezes no último ano suas atividades diárias foram atrapalhadas pela rinite e/ou asma?

☐ nenhuma☐ poucas☐ moderadamente☐ muitas

9) Faz uso de medicação contínua?

☐ NÃO☐ SIM

Quais:

10) Tem ou teve asma?

☐ NÃO☐ SIM

11) Tem ou teve equizema atópico (dermatite alérgica)?

☐ NÃO☐ SIM