



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Plataformas diagnósticas para a análise de processos alérgicos e
contaminantes alergênicos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e
Dermatophagoides sp

CLAUDINEY DE FREITAS ALVES

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Jair Pereira Cunha Júnior

Uberlândia – MG
2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Plataformas diagnósticas para a análise de processos alérgicos e
contaminantes alergênicos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e
Dermatophagoides sp

CLAUDINEY DE FREITAS ALVES

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Jair Pereira Cunha Júnior

Tese apresentada à Universidade Federal
de Uberlândia como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Doutor em
Genética e Bioquímica.

Uberlândia – MG
2018

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

A474p
2018 Alves, Claudiney de Freitas, 1983
 Plataformas diagnósticas para a análise de processos alérgicos e
 contaminantes alergênicos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e
 Dermatophagoides sp [recurso eletrônico] / Claudiney de Freitas Alves.
 - 2018.

 Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
 Coorientador: Jair Pereira Cunha Júnior.
 Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.5006>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.

 1. Genética. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962, (Orient.). II.
 Cunha Júnior, Jair Pereira, 1974, (Coorient.). III. Universidade Federal
 de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 IV. Título.

CDU:577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE REUNIÃO

Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa: Tese de Doutorado, nº08/2018- PPGGB

Local: Uberlândia/MG

Data: 17/12/2018

Hora de início: 14:00h

Discente: Claudiney de Freitas Alves

Matrícula: 11423GBI002

Título do Trabalho: Plataformas diagnósticas para a análise de processos alérgicos e contaminantes alergênicos.

Área de concentração: Genética

Linha de pesquisa: Biologia Molecular

Projeto de Pesquisa de vinculação: Edital MEC/MCTI/CAPES/CNPQ/FAPs 03/2014 Programa Ciências sem Fronteiras – Bolsas no país modalidade pesquisador visitante especial – PVE.

Aos dezessete dias do mês de dezembro de dois mil e dezoito, às 14:00 horas no Anfiteatro bloco 4T, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano, Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira, Prof. Dr. Jair Pereira Cunha Júnior, Prof. Dr. Robinson Sabino Silva e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a): APROVADO (A). Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17 horas e 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/12/2018, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jair Pereira da Cunha Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/12/2018, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) Substituto(a) do Magistério Superior**, em 17/12/2018, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lúcio Roberto Cançado Castellano, Usuário Externo**, em 17/12/2018, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **DAVID NASCIMENTO SILVA TEIXEIRA, Usuário Externo**, em 17/12/2018, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0715063** e o código CRC **C5E19539**.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Plataformas diagnósticas para a análise de processos alérgicos e
contaminantes alergênicos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e
Dermatophagoides sp

CLAUDINEY DE FREITAS ALVES

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (IBTC)

Examinadores Internos: Prof. Dr. Jair Pereira Cunha Júnior (ICBIM)
Prof. Dr. Robinson Sabino Silva (ICBIM)

Examinadores Externos: Prof. Dr. Lúcio Roberto C. Castellano (UFPB)
Prof. Dr. David Nascimento S. Teixeira (UFTM)

Data da Defesa: 17 / 12 / 2018.

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

*Aos meus amados pais **Hilda & Hiron** que
foram minha força nos momentos difíceis e
com amor incondicional, me apoiaram e
incentivaram a nunca desistir dos meus
sonhos.*

*À minha irmã **Vanessa Beatriz** que sempre
apoiou meu esforço e com todo carinho me
ajudou nesta trajetória.*

*E a todos que acreditam que o esforço, os
erros e acertos são o caminho para as
grandes vitórias.*

*A vocês, que sempre confiaram na minha
capacidade, dedico este trabalho.*

*"Até hoje os cientistas discutem como a vida começou. Até hoje não se tem certeza de onde viemos. Os filósofos ainda querem entender quem somos. E existem umas duzentas teorias para onde vamos. Se a orientação sexual é definida pela genética. Porque você boceja quando alguém boceja. Os biólogos querem entender como os pássaros migram. E os nutricionistas se o ovo faz mal à saúde. Os economistas querem explicar a crise. E os cientistas como o cérebro funciona. - **Não são as respostas que movem o mundo, são as perguntas...**"*

Canal Futura

"Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo. Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo. Continue, quando todos esperam que desistas. Não deixe que enferruje o ferro que existe em você. Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você. Quando não conseguir correr através dos anos, trote. Quando não conseguir trotar, caminhe. Quando não conseguir caminhar, use uma bengala. Mas nunca se detenha."

Madre Teresa de Calcutá

Agradecimentos

A Deus, Pai todo poderoso, pela oportunidade que me foi dada, por sempre me proteger e dar força para seguir em frente e vencer todas as dificuldades em que me encontrar. Senhor eu sei que tu me sondas e sei também que me conhecesses e abençoa meu caminho.

À minha família, Hilda, Hiron e Vanessa, mamãe e papai os senhores me deram não somente a vida, mas toda a base dos meus princípios que me sustentam na caminhada da vida. E o principal, vocês acreditaram em mim. O amor de vocês é fundamental.

Ao meu orientador, Professor Doutor Luiz Ricardo Goulart, agradeço pela confiança e oportunidade de realização deste trabalho, mesmo sabendo que os obstáculos seriam grandes. Por meu amadurecimento profissional, por toda a orientação e ensinamentos transmitidos que transcenderam a área acadêmica e, principalmente, por acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Marcelo H. Napimoga meu mentor na área da pesquisa, quem abriu as portas deste universo e me mostrou a importância da ciência e os caminhos a seguir.

Ao professor Dr. Javier Emílio Lazo Chica, por todas as oportunidades oferecidas e paciência que sem dúvidas me proporcionaram desenvolver minha tese de forma tranquila.

Aos técnicos de laboratório Luciana, Natássia e Valéria, pelos serviços prestados, atenção e auxílio de grande valia.

Aos meus colegas e amigos que passaram e os que ainda fazem parte do Laboratório de Nanobiotecnologia: Mariana, Sara, Isabela, Fabiana, Patrícia Lopes, Fabiane, Aline Teodoro, Hebreia, Tafarel, Lara, Patrícia Terra, Victor, Ester, Larissa, Ana Paula, Aline Gomes, Jéssica Souza, Paula, Mário, Cristiane, Emília, Kelem, Roberta, Ana Flávia, Cláudia e os outros que a memória não lembrar, pelos bons momentos vividos, amizade e disponibilidade em ajudar no que fosse preciso.

Aos meus colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, pelas conversas, auxílio nos momentos de dificuldades e pela amizade tão valiosa.

A todos meus amigos fora do âmbito acadêmico, em especial, Robson Humberto, Carlos Trindade, Camila Botelho, Wellington Francisco, Júlio César Pereira, João Pereira e Renata Balvedi que me acompanharam durante essa jornada com conselhos, opiniões, risadas e carinho. Com certeza a caminhada seria mais dura sem a presença de vocês.

Ao Prof. Dr. Jair P. Cunha Jr. pela grande contribuição e parceria neste trabalho, por toda disponibilidade, por todo conhecimento transmitido e sempre nos ajudar no que fosse preciso.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Janaína de Souza, por toda atenção, competência, carisma e ajuda prestada.

A todos os doutores, mestres e professores que me transmitiram um pouco de seu conhecimento, e mais além um pouco de si, sendo fundamentais para meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

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

À família e amigos por acreditarem na minha escolha, me ajudando e incentivando.

A todos os voluntários por terem aceitado participar desse estudo.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho e em minha caminhada até o momento.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XII
Lista de Abreviaturas.....	XIII
Apresentação.....	01
Presentation.....	04
CAPITULO I – Fundamentação teórica.....	07
1.1 Alergia.....	08
1.2 Atopia.....	08
1.3 Epidemiologia e as doenças alérgicas.....	09
1.4 Alérgenos.....	10
1.5 Ácaros.....	11
1.5.1 Nomenclatura dos alérgenos.....	13
1.5.2 Blomia sp.	14
1.5.3 <i>Dermatophagoides</i> sp.	16
1.6 Fisiopatologia das Reações Alérgicas.....	18
1.7 Diagnósticos das doenças alérgicas.....	23
1.7.1 Testes cutâneos.....	23
1.7.2 Testes quantitativos dos níveis séricos de IgE.....	24
2.0 Espectroscopia de Raman.....	25
3.0 Biossensores.....	29
4.0 Imunoglobulina Y.....	34
Referências.....	36

CAPÍTULO II - Novel Raman-SERS Spectroscopy with...	57
<i>Abstract</i>	58
1. Introduction.....	59
2. Materials and methods.....	60
3. Results and Discussions.....	62
4. Conclusions.....	63
References.....	67
CAPÍTULO III - Simple and effective electrochemical immunosensor...	70
<i>Abstract</i>	71
1. Introduction.....	72
2. Materials and methods.....	73
3. Results and Discussions.....	77
4. Conclusions.....	80
References.....	85

Lista de Figuras

Capítulo I – Fundamentação teórica

Figura 1	Taxonomia dos principais ácaros com relevância mundial.....	13
Figura 2	Vista frontal do <i>Blomia tropicalis</i> ampliada 200 vezes.....	14
Figura 3	Interações alérgeno-epiteliais.....	23
Figura 4	O teste “prick”.....	24
Figura 5	Gráfico obtido pelo efeito de Raman.....	28
Figura 6	Eventos que originam os dados de Raman Shift.....	29
Figura 7	Esquema de um biossensor com um transdutor de sinal.....	31
Figura 8	Eletrodo impresso comercializado ... e suas partes.....	34

Capítulo II – Novel Raman-SERS Spectroscopy with Magnetic Microparticles to Identify Atopic Patients

Figura 1	Schematic of sample preparation for RAMAM-SERS.....	64
Figura 2	Raman spectroscopy of allergic response.....	64
Figura 3	Principal peaks used to discriminate individuals.....	65
Figura 4	PCA analysis used to separate the samples.....	65
Figura 5	HCA analysis used to construct a dendogram.....	66
Figura 6	ELISA index for IgE – DPT.....	66
Figura 7	HCA analysis used to construct a dendogram.....	67

Capítulo III – Simple and sensitive electrochemical immunosensor for allergens detection

Figura 1	Evaluation of chicken immunization and validation... ..	81
Figura 2	Schematic of the immunosensor (right) and cyclic voltammograms... ..	82
Figura 3	Analysis of the behavior profile of the platform developed... ..	83
Figura 4	Specificity and limit of detection.....	84
Figura 5	ELISA test to determine the concentration of Blo t 5... ..	84

Lista de tabelas

Capítulo I – Fundamentação teórica

Tabela 1.	Classificação das Reações de Hipersensibilidades, de acordo com Coombs e Gell.....	19
------------------	--	----

Capítulo II – Novel Raman-SERS Spectroscopy with Magnetic Microparticles to Identify Atopic Patients

Tabela 1.	Description of groups used for PCA and HCA analysis.....	61
------------------	--	----

Capítulo III – Simple and sensitive electrochemical immunosensor for allergens detection

Tabela 1.	Results from proposed immunosensor for Blo t 5 detection in real samples.....	85
------------------	---	----

Lista de abreviaturas

A	Ampere
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> (Célula Apresentadora de Antígeno)
B.	<i>Blomia</i>
Blo t 5	Antígeno de <i>Blomia tropicalis</i> do grupo 5
rBlo t 5	Antígeno de <i>Blomia tropicalis</i> do grupo 5 recombinante
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina do Soro Bovina)
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
C	Coulomb
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
D.	<i>Dermatophagoides</i>
DC	Células Dendríticas
Der p 1	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
D.O.	Densidade Óptica
Dpt	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DRP-110	Eletrodo de grafite <i>screen-printed</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
FcεRII	Receptor de baixa afinidade para IgE
Ferro-ferri	Ferrocianeto/ferricianeto de potássio
g	Gramas
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
HCl	Ácido clorídrico
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (Molécula de adesão intercelular 1)
IE	Índice ELISA
IFN-γ	Interferon-gamma
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG4	Imunoglobulina da classe G subclasse 4
IL	Interleucina

Ip	Corrente de pico
IPTG	Adição isopropil-d-tiogalactopiranosídeo
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
kDa	<i>KiloDalton</i> (Quilodalton)
LB	<i>Luria-Bertani</i>
M	Molar
mC	milicoulomb
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
ng	Nanogramas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> (Solução salina tamponada com fosfatos)
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
pH	Potencial hidrogeniônico
TCP	Teste Cutâneo de Puntura
TCR	<i>T cell receptor</i> (Receptor de células T)
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Fator de Transformação do Crescimento beta)
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
Treg	Linfócito T regulador
TSLP	Linfoietina Estromal Tímica
Tween 20	<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i> (Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano)
V	Volts
VC	Voltametria cíclica
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
°C	Graus Celsius
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros
μ m	Micrômetros

APRESENTAÇÃO

As doenças alérgicas, representam um importante problema de saúde pública e são frequentes na população em geral. Estas doenças têm aumentado de forma considerável ao longo das últimas décadas. Atualmente, as alergias, ditas pela mídia como: “mal do século”, representam o 4º grupo de doenças crônicas com alta prevalência e rápido crescimento mundial. Estas afetam cerca de 35-40% da população e são consideradas epidemias da civilização moderna. Este aumento exponencial se deve principalmente às mudanças de hábitos da vida moderna (Teoria da Higiene) e à poluição ambiental.

A alergia consiste de uma resposta exagerada do sistema imunológico, quando o indivíduo geneticamente predisposto (atópico), está exposto à presença de algum alérgeno. Estes estímulos (alérgenos) podem ser a presença de poeira, de fumaça, de algum componente medicamentoso, de cheiros fortes, de picadas de insetos, da ingestão de determinados alimentos, dentre outros que sejam capazes de provocar uma reação exacerbada do sistema imunológico. Esta reação tem como resultado a produção de níveis elevados de imunoglobulina E (IgE) com baixas doses de estímulos alergênicos que além de incômoda, pode oferecer risco de vida ao portador, visto que pode levar a choque anafilático.

As alergias são reações de hipersensibilidade do tipo I e atingem na sua heterogeneidade diferentes órgãos e sistemas, como a pele, as vias respiratórias e digestivas, como mencionado nos exemplos anteriores. Estas reações afetam de forma negativa a qualidade de vida dos indivíduos.

Em ambientes domésticos e de armazenagem, os ácaros são os principais causadores dessas reações. Os ácaros são animais microscópicos pertencem a uma subclasse de aracnídeos. Os ácaros de armazenamento se encontram principalmente em alimentos armazenados, cereais, farinhas, celeiros e feno. Contudo, estes ácaros também podem ser encontrados no pó doméstico e, assim sendo, a exposição a estes animais também pode ocorrer em casa, em especial em locais húmidos. Os ácaros mais estudados são do gênero *Dermatophagoides* e *Blomia*, visto que estes possuem alérgenos clinicamente relevantes para o desenvolvimento de alergias.

As dificuldades no diagnóstico e tratamento adequado constituem uma

realidade quando se fala de doenças alérgicas e representam dificuldades acrescidas para a qualidade de vida dos indivíduos. Tal diagnóstico pode ser feito por testes cutâneos ou pela mensuração dos níveis séricos de IgE específica. Contudo, estes métodos são dispendiosos e demoram muito tempo para indicar o resultado de uma amostra. Desta forma, o desenvolvimento de novos métodos de prevenção, detecção, diagnóstico e tratamento para doenças alérgicas fazem-se necessário.

A espectroscopia Raman é uma técnica promissora para aplicações biomédicas uma vez que não exige os sinais da água em seu resultado. Esta é uma técnica de espectroscopia vibracional rápida e não destrutiva, na qual um laser é focalizado em uma amostra. A técnica se baseia na interação dos fótons incidentes com as moléculas da amostra gerando um espalhamento inelástico de fótons com frequências e intensidades característica das moléculas na amostra. O espectro Raman resultante fornece uma impressão digital característica da composição molecular o que pode identificar as espécies da amostra.

Além de técnicas de diagnóstico preciso e rápido, o controle das manifestações alérgicas está baseado na redução à exposição alergênica.

O desenvolvimento de (imuno)biossensores eletroquímicos desperta a atenção da comunidade científica pois estes dispositivos, associados à seletividade das medidas eletroquímicas, têm permitido a medição de vários analitos importantes em diferentes áreas como na médica, farmacêutica, de alimentos e de meio ambiente. A demanda pelo desenvolvimento de instrumentos analíticos simples, rápidos, precisos, sensíveis, específicos, seletivos, de baixo custo e portáteis está crescendo e os (imuno)biossensores atendem a esses requisitos.

Almejando aprimorar as formas de diagnóstico e identificação de possíveis meios de exposição, com consequente melhoria do tratamento destas doenças, esta tese tem por objetivo identificar padrões específicos para cada tipo de antígeno usando anticorpos monoclonais, soro (Raman) e anticorpos policlonais (biossensor) que indicaram se o indivíduo é atópico ou não – atópico além de possíveis fontes de contaminação com os antígenos dos ácaros de *Blomia tropicalis*.

Para uma melhor compreensão deste trabalho, esta tese foi dividida em capítulos.

O Capítulo 1 refere-se à fundamentação teórica da tese. Nesse capítulo,

estão descritos os principais marcos relacionados ao desenvolvimento das doenças alérgicas. Esse capítulo também traz uma breve revisão sobre a epidemiologia da doença, uma apresentação de seus fatores de risco e menciona alguns métodos empregados no diagnóstico destas doenças.

O Capítulo 2 investiga o emprego da Técnica de Raman para determinar se o indivíduo é alérgico (atópico) ou não. Portanto, o objetivo deste capítulo é investigar o soro de diferentes pacientes em busca de evidências que os enquadre em doentes ou não, analisando os espectros obtidos com a técnica de Raman.

E, por fim, o Capítulo 3 que investiga a utilização dos imunossensores eletroquímicos como uma alternativa futura para identificação de amostras contaminadas com alérgenos de ácaros. Portanto, o objetivo deste capítulo é expor de maneira detalhada a utilização de imunossensores eletroquímicos com imunoglobulina Y policlonal para *Blomia tropicalis* – Blot 5.

PRESENTATION

The Allergic diseases represent a major public health problem and are common in the general population. These diseases have increased considerably over the last decades. Today, allergies, mediated as "evil of the century," represent the fourth group of chronic diseases with high prevalence and rapid global growth. These affect about 35-40% of the population and are considered epidemics of modern civilization. This exponential increase is mainly due to changes in habits of modern life (Hygiene Theory) and to environmental pollution.

The allergy consists of an exaggerated response of the immune system, when the genetically predisposed individual (atopic), is exposed to the presence of some allergen. These stimuli (allergens) can be the presence of dust, smoke, some drug component, strong smells, insect bites, in ingestion of certain foods, among others that are capable of provoking an exacerbated reaction of the immune system. This reaction results in the production of high levels of immunoglobulin E (IgE) with low doses of allergenic stimuli that can be life threatening to the wearer, as it can lead to anaphylactic shock.

The Allergies are type I hypersensitivity reactions and reach in their heterogeneity different organs and systems, such as skin, respiratory and digestive tracts, as mentioned in the previous examples. These reactions negatively affect the quality of life of individuals.

In domestic and storage environments, the mites are the main cause of these reactions. Mites are microscopic animals belonging to a subclass of arachnids. Storage mites are found mainly in stored foods, cereals, flours, barns and hay. However, these mites can also be found in house dust and therefore exposure to these animals can also occur at home, especially in humid places. The mites most studied are of the genus *Dermatophagoides* and *Blomia*, since they have clinically relevant allergens for the development of allergies.

The difficulties in diagnosis and appropriate treatment are a reality when it comes to allergic diseases and represent an increased difficulty for the quality of life of individuals. Such diagnosis may be made by skin testing or by measuring serum levels of specific IgE. However, these methods are expensive and time-consuming to indicate the result of a sample. In this way, the development of new methods of

prevention, detection, diagnosis and treatment for allergic diseases are necessary.

Raman spectroscopy is a promising technique for biomedical applications since it does not exhibit water signals in its result. This is a fast and non-destructive vibrational spectroscopy technique in which a laser is focused on a sample. The technique is based on the interaction of the incident photons with the molecules of the sample generating an inelastic scattering of photons with frequencies and intensities characteristic of the molecules in the sample. The resulting Raman spectrum provides a fingerprint characteristic of molecular composition which can identify the species in the sample.

In addition to precise and rapid diagnostic techniques, the control of allergic manifestations is based on the reduction to allergenic exposure.

The development of electrochemical (immuno) biosensors arouses the attention of the scientific community because these devices, associated to the selectivity of the electrochemical measurements, have allowed the measurement of several important analytes in different areas such as medical, pharmaceutical, food and environmental. The demand for the development of simple, fast, accurate, sensitive, specific, selective, low cost and portable analytical instruments is growing and the (immuno) biosensors meet these requirements.

This thesis aims to identify specific patterns for each type of antigen using monoclonal antibodies, serum (Raman) and polyclonal antibodies (biosensor) that aim to improve the ways of diagnosis and identification of possible means of exposure, with consequent improvement of the treatment of these diseases. Indicated whether the individual is atopic or non - atopic in addition to possible sources of contamination with the mite antigens of *Blomia tropicalis*.

For a better understanding of this work, this thesis was divided into chapters.

Chapter 1 refers to the theoretical basis of the thesis. In this chapter, the main milestones related to the development of allergic diseases are described. This chapter also provides a brief review of the epidemiology of the disease, a presentation of its risk factors, and mentions some methods used to diagnose these diseases.

Chapter 2 investigates the use of the Raman technique to determine whether the individual is allergic (atopic) or not. Therefore, the objective of this chapter is to investigate the serum of different patients in search of evidence that frames them in

patients or not, analyzing the spectra obtained with the Raman technique.

Finally, Chapter 3 investigates the use of electrochemical immunoassays as a future alternative for the identification of samples contaminated with dust mite allergens. Therefore, the purpose of this chapter is to present in more detail the use of modified electrochemical immunosensors with polyclonal immunoglobulin Y for *Blomia tropicalis* - Blot 5 detection.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

CAPÍTULO I

Fundamentação Teórica

1.1 Alergia

Surgido em 1906, o termo “alergia”, derivado do grego *allos ergon*, o que significa “reação estranha”, foi empregado pelos pesquisadores Clemens Von Pirquet e Béla Schick para denominar uma manifestação clínica vinda da reação cutânea à tuberculina (doença do soro)(Simons 1994, Bidad, Nicknam et al. 2011, Igea 2013). Com os avanços científicos, o termo “alergia” sofreu alterações e redefinições. Na atualidade, o termo alergia é empregado como sinônimo de hipersensibilidade imediata, e é utilizado para designar uma reação imunológica exacerbada, mediada principalmente por anticorpos do tipo IgE e por manifestações clínicas celulares, em indivíduos, geneticamente predispostos, quando submetidos a determinados estímulo antigênicos (os alérgenos) e a cofatores ambientais que levam à sensibilização alérgica, em doses toleradas por indivíduos saudáveis(Johansson, Bieber et al. 2004, Siman, de Aquino et al. 2013, Konradsen, Fujisawa et al. 2015).

A sensibilização e o desenvolvimento da resposta alérgica são o resultado de complexas interações entre mecanismos ambientais, a natureza do antígeno, suas propriedades físicas, químicas, e genéticas que podem culminar em uma resposta inflamatória exacerbada(Cookson 1999, D'Amato, Baena-Cagnani et al. 2013). Estudos da atualidade demonstram que a predisposição genética à alergia está ligada a múltiplos genes(Cookson 2001, Arlian 2002).

Indivíduos propensos geneticamente a produzir anticorpos IgE em resposta a baixas doses de alérgenos, e que desenvolvem síndromes como asma, rinoconjuntivite ou dermatite são considerados indivíduos atópicos(Johansson, Hourihane et al. 2001).

1.2 Atopia

A atopia é uma propensão pessoal (ou familiar) para produzir anticorpos IgE em excesso, em resposta ao contato com alérgenos ambientais comuns, normalmente proteínas(F. Thomsen 2015).

O termo “atopia” foi empregado pela primeira vez por Coca e Cooke, em 1923 e vem sendo utilizado para descrever as manifestações clínicas da hipersensibilidade do tipo I com altos índices de IgE(Johansson, Hourihane et al. 2001). Contudo salientamos que esta denominação só deve ser utilizada quando o processo alérgico for desencadeado por anticorpos IgE, detectados no soro ou pela positividade de testes cutâneos(Johansson, Bieber et al. 2004). Duas ou mais formas clínicas de alergia (cutânea, respiratória, a alimentos) podem coexistir em um mesmo indivíduo, ao mesmo tempo ou em diferentes ocasiões no curso da doença(Johansson, Hourihane et al. 2001).

1.3 Epidemiologia e as doenças alérgicas

As doenças alérgicas afetam uma grande parcela da população mundial e constituem um importante problema de saúde pública. Nos últimos anos, a prevalência e a severidade destas doenças tem aumentado substancialmente(Yan Chua, Cheong et al. 2007, Siman, de Aquino et al. 2013, F. Thomsen 2015). Afetam a população de forma transversal, atingindo desde a criança nos primeiros meses de vida até os idosos(Ulambayar, Lee et al. 2019). A prevalência destas doenças tem aumentado significativamente ao longo dos últimos anos, tanto em países industrializados como naqueles em vias de desenvolvimento(Levetin and Van de Water 2001, Rad and Hamzezadeh 2008). Acredita-se que tal fato se deva ao aumento da urbanização, a mudanças no estilo de vida dos indivíduos, a um menor contato com antígenos no decorrer da vida (higiene pública) e a um aumento nos poluentes ambientais(Traidl-Hoffmann, Jakob et al. 2009, Platts-Mills and Commins 2013). A alergia é considerada uma doença moderna, porque vem se expandindo e está relacionada ao estilo de vida urbano(Johansson, M Sjögren et al. 2011).

De forma geral, as doenças alérgicas com maior prevalência na população mundial são a rinite alérgica, a asma brônquica e a dermatite atópica(Pinart, Albang et al. 2015, Peters, Koplin et al. 2017).

Estima-se que a dermatite atópica, caracterizada por prurido intenso e descamação da pele, atinja 10 a 15% na população(Aubert, Bernier et al. 2013, David Boothe, Tarbox et al. 2017) enquanto que a rinite alérgica e a asma brônquica,

têm prevalência de 5% a 30% em regiões desenvolvidas(Traidl-Hoffmann, Jakob et al. 2009).

De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde(OMS) revistos nos últimos 10 anos, estima-se que 235 milhões de pessoas de todas as etnias e idades, sejam portadoras de síndromes alérgicas, como a asma, e que cerca de 250.000 pessoas morrem prematuramente a cada ano como resultado desta doença crônica, mais comum entre as crianças(Di Lallo and Di Napoli 2011). Até 2025 há uma estimativa de crescimento da população mundial urbana de 45% para 59%, sugerindo aumentos significativos na prevalência da asma e das demais doenças alérgicas(Bousquet, Hooper et al. 2007).

No Brasil a asma entre crianças e adolescentes é uma das mais altas do mundo, com prevalência de 20%. E quando avaliamos os indivíduos na faixa de 18 a 54 anos este índice sobe para 23%(OMS, 2018). De acordo com o SUS, a asma é a doença alérgica que mata cerca de duas mil pessoas por ano no país e é uma das grandes causas de internação.

Ainda de acordo com dados da OMS, aproximadamente 30% dos habitantes do planeta têm algum tipo de intolerância à poeira doméstica, ao mofo, ao pólen de plantas e a outros milhares de alérgenos. A entidade estima que até o fim do século, metade da população humana sofrerá de algum tipo de alergia.

1.4 Alérgenos

Estamos expostos diariamente a várias moléculas, a maioria delas toleradas por nosso sistema imunológico, todavia algumas podem ser reconhecidas como patogênicas (antígenos) e desencadear reações diversas. Assim ocorre o contato com moléculas alergênicas. Estas podem ter natureza proteica, glicídica e lipídica. Havendo o contato com estas biomoléculas, ligantes dos anticorpos da classe IgE, são desencadeados mecanismos que levam às manifestações clínicas da alergia(Arlan 2002, Platts-Mills and Woodfolk 2011).

Estes antígenos que desencadeiam a alergia estão distribuídos na natureza e são constituintes de diversos organismos, incluindo aqueles provenientes das plantas, dos animais e dos fungos(Galli, Maurer et al. 1999, Assarehzadegan, Shakurnia et al. 2013).

Os alérgenos podem ser estruturas minúsculas, como por exemplo, grãos de pólen, esporos de fungos, epitélio descamado de animais domésticos (cão e gato), fragmentos insetos (baratas), ácaros domiciliares, ou estão associados a estas partículas, cujas propriedades favorecem a sua sobrevivência ou dispersão. Estas moléculas alergênicas podem ser facilmente carregadas pelo ar e são denominadas aeroalérgenos(Ledford 1994, Assarehzadegan, Shakurnia et al. 2013).

Os aeroalérgenos quando inalados podem provocar manifestações alérgicas respiratórias. São constituídos por proteínas pequenas, com diâmetro entre 2 e 60 µm e peso molecular de 5-100 KDa, de alta solubilidade em meio aquoso, o que permite a sua dispersão no muco e outros fluídos corporais(Ledford 1994). O contato contínuo com estas partículas pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas(Douglass and O'Hehir 2006).

Os principais aeroalérgenos encontrados no ambiente *indoor* são os ácaros que constituem o pó doméstico, partículas do pelo e pele dos animais domésticos, os fungos e os excrementos das baratas. Já no ambiente *outdoor* este papel cabe ao pólen das plantas. A concentração de aeroalérgenos nos ambientes sofre influência da temperatura, humidade, assim como pela direção e velocidade do vento(D'Amato 2002, Assarehzadegan, Shakurnia et al. 2013).

1.5 Ácaros

Voorhost e colaboradores, em 1964, revelaram que os ácaros da poeira doméstica podem desencadear doenças alérgicas quando inalados(Raulf, Bergmann et al. 2015).

Todas as espécies de ácaros presentes no ambiente doméstico e capazes de induzir sensibilização mediada por IgE são chamados de "ácaros domésticos" – *House dust mites*(Fassio and Guagnini 2018, Miller 2018).

Estes insetos minúsculos são encontrados na poeira domiciliar e estão presentes em carpetes, cortinas, colchões, tapetes, móveis estofados, pelúcias que favorecem a sobrevivência desses organismos. Sua proliferação está intimamente ligada à temperatura e umidade do ar(Munir, Bjorksten et al. 1995, Zannou, Adebo et al. 2013).

As doenças alérgicas desencadeadas por alérgenos de ácaros incluem rinoconjuntivite alérgica, asma, dermatite atópica e outras doenças de pele(Nelson 2018).

Os ácaros da poeira domiciliar têm grande relação com as doenças alérgicas, principalmente com a asma. Estima-se que 2 µg de ácaro a cada grama de poeira domiciliar sejam necessárias para a sensibilização alérgica de um indivíduo. Para o desencadeamento da síndrome asmática, a concentração deve ser de aproximadamente 10 µg de ácaro a cada grama de poeira(Platts-Mills, Vervloet et al. 1997).

Considerados de maior importância médica e veterinária, os ácaros da subordem *Astigmata* são parasitos de aves e mamíferos e se alimentam de restos de pele ou penas de animais liberadas no ambiente(Arlan and Morgan 2003). Nesta subordem os ácaros pertencentes às famílias *Pyroglyphidae* e *Echimyopodidae* são fontes importantes de alérgenos(Chua, Cheong et al. 2007). A família *Pyroglyphidae*, tem como membros o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* e a família *Echimyopodidae*, o ácaro *Blomia tropicalis*(Fernández-Caldas, Puerta et al. , Arlian and Platts-Mills 2001, Wu, Yang et al. 2009). Estes espécimes de ácaro estão relacionados com aproximadamente 50% das manifestações clínicas respiratórias observadas no mundo, incluindo a asma e a rinite alérgica em pessoas que sejam geneticamente pré-dispostas(Arlan and Platts-Mills 2001). A figura 1 abaixo ilustra a taxonomia dos ácaros mais relevantes.

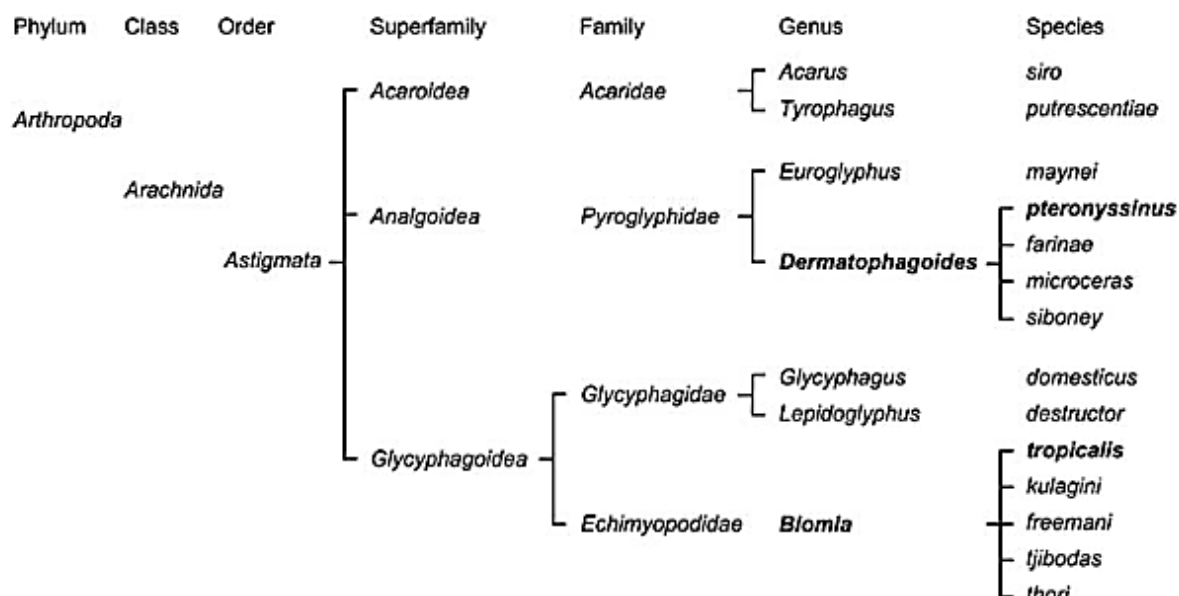


Figura 1: Taxonomia dos principais ácaros com relevância mundial(Chua, Cheong et al. 2007).

1.5.1 Nomenclatura dos alérgenos

A maioria dos alérgenos isolados foi colocada em grupos com base em sua caracterização cronológica e/ou homologia com alérgenos previamente purificados(Pomes, Davies et al. 2018).

Os alérgenos, em sua grande maioria, têm natureza proteica e pertencem a proteínas que podem exercer mecanismos imunopatológico similares ou compartilhar epítomos importantes que desencadeiem processos alérgicos. Sendo assim, foi proposto que a nomenclatura dos alérgenos já caracterizados seja unificada(King, Hoffman et al. 1995, Pomes, Davies et al. 2018).

Alérgenos purificados são nomeados de acordo com as três primeiras letras do gênero, a primeira letra da espécie e um número indicando o grupo em que são colocados, ou seja, de acordo com a ordem de descoberta e purificação. Assim, o primeiro alérgeno identificado de *D. pteronyssinus* foi denominado Der p 1 e pertence ao grupo 1(Traidl-Hoffmann, Jakob et al. 2009).

Os isoalérgenos são alérgenos com formas moleculares diferentes que possuem reatividade cruzada. Estes alérgenos podem ter propriedades bioquímicas e funções semelhantes, com alta similaridade entre a sequência de aminoácidos, sendo esta maior que 67%(Bessot and Pauli 2011).

Quando existem várias isoformas, elas têm que ser inseridas na denominação, por exemplo, Der p 1,0101 e Der p 1,0201. Os grupos mais bem estudados são o grupo 1 (Der p 1 e Der f 1) e o grupo 2 (Der p 2 e Der f 2). Eles são considerados alérgenos importantes com base na frequência de indivíduos sensibilizados e na quantidade de IgE específica (Chapman, Pomes et al. 2007).

A denominação do alérgeno não deve ser em itálico e possui um espaço entre cada um dos elementos, por exemplo: Der p 1, Bet v 1, Blo t 5 e Fel d 1 (King, Hoffman et al. 1995, Traidl-Hoffmann, Jakob et al. 2009).

Para manter a estrutura do sistema de nomenclatura, somente os alérgenos que possuírem reatividade maior que 5%, com IgE, são incluídos. Somado a isto, o alérgeno é dito “principal” quando mais de 50% dos indivíduos testados possuir reatividade com a IgE (Larsen and Lowenstein 1996, Arlian 2002).

1.5.2 *Blomia* sp.

A espécie de ácaro *Blomia tropicalis* foi originalmente identificada na década de 1970 e caracterizada como um ácaro de armazenamento por Van Bronswijk e Cock (van Bronswijk and de Cock 1974). Este ácaro em forma de glóbulo é especialmente encontrado em instalações de armazenamento de grãos e como contaminante de alimentos processados feitos a partir de grãos (Santos da Silva, Asam et al. 2017). A figura 2 mostra a vista frontal do *Blomia tropicalis* aumentado 200 vezes.



Figura 2: Vista frontal do *Blomia tropicalis* ampliada 200 vezes (Fernandez-Caldas and Lockey 2004).

Este ácaro tem maior incidência em climas tropicais. Contudo, pode ser encontrada em climas subtropicais, prevalecendo sobre a *Dermatophagoides* sp.(Arlan 2002, Chua, Cheong et al. 2007). Todavia, hoje em dia é bem aceito que *B. tropicalis* também constitua uma espécie muito importante de ácaros não exclusivamente, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo(Baqueiro, Carvalho et al. 2006, Santos da Silva, Asam et al. 2017). As duas espécies são importantes fontes de alérgenos indutores de alergia respiratórias(Bernardes, Moreira et al. 2010).

Testes imunológicos mostraram 25 bandas proteicas estão ligadas à IgE de indivíduos alérgicos (Chew, C Yi et al. 1999). Até agora, das 25 proteínas de ligação à IgE identificadas de *B. tropicalis*, 13 foram oficialmente reconhecidas e nomeadas pelo subcomitê de nomenclatura da União Internacional de Sociedades Imunológicas (IUIS) (Caraballo, Puerta et al. 1994). Essas proteínas são registradas no banco de dados de alérgenos ([www. Allergen.org](http://www.Allergen.org)), são elas Blo t 1, Blo t 2, Blo t 3, Blo t 4, Blo t 5, Blo t 6, Blo t 8, Blo t 10, Blo t 11, Blo t 12, Blo t 13, Blo t 19 e Blo t 21(Johansson, Schmidt et al. 1997, Santos da Silva, Asam et al. 2017). Entretanto, alérgenos adicionais foram descritos não apenas em *B. tropicalis*, mas também em outras espécies de ácaros(Caraballo, Puerta et al. 1994). Além disso, foram descritas isoformas para Blo t 1, Blo t 2 e Blo t 12, que também podem ter propriedades distintas de ligação a IgE ou de ativação de células T, como demonstrado para o homólogo de Blo t 2 de *D. pteronyssinus*(Zakzuk, Jiménez et al. 2009).

O Blo t 5 é o principal alérgeno da *B. tropicalis* e predominante nos indivíduos de países tropicais e subtropicais, a incidência deste antígeno ligada à IgE varia de 60 a 70%(Zakzuk, Jiménez et al. 2009, Guilleminault and Viala-Gastan 2017). A Blo t 5, possui 14 kDa e, cerca de 92% dos indivíduos alérgicos são sensibilizados por este(Carvalho Kdos, de Melo-Neto et al. 2013). O peptídeo sinal de Blo t 5 é constituído de 17 resíduos de aminoácidos seguido por uma proteína madura de 117 resíduos de aminoácidos, formando uma estrutura de 134 resíduos de aminoácidos(Chua, Cheong et al. 2007).

Além deste, Blo t 12, Blo t 13, Blo t 6, Blo t 4 e Blo t 10 sendo inferior a 10%, apresentam potencial alergênico. A Blo t 1 não parece ser um alérgeno importante ao contrário do que foi originalmente sugerido(Morgan, Arlian et al. 1996). A Blo t 21,

é uma proteína de 129 aminoácidos com 39% de sequência aa homologa à Blo t 1. Embora mais de 75% dos indivíduos alérgicos extratos de *B. tropicalis* são sensibilizados tanto Blo t 5 e Blo t 21, os dois alérgenos têm moderada reatividade cruzada. Isto é provavelmente devido a genes parálogos separados no início da evolução(Santos da Silva, Asam et al. 2017).

Esses desenvolvimentos foram possibilitados pela aplicação da tecnologia de DNA recombinante, que abriu novas possibilidades para o campo da alergia, levando não apenas à produção de alérgenos de ácaros domésticos purificados recombinantes, mas também à padronização de preparações baseadas em moléculas para diagnóstico e imunoterapia específica(Becker, Schleiderer et al. 2016).

Desde os primeiros dados de um alérgeno recombinante purificado de *B. tropicalis* (rBlo t 5) publicado em 1995 por Arruda e colaboradores(Arruda, Fernandez-Caldas et al. 1995), vários grupos de pesquisa produziram alérgenos de *B. tropicalis* na forma recombinante usando diferentes sistemas de expressão(Santos da Silva, Asam et al. 2017). Apesar dos avanços substanciais nas últimas décadas, o conhecimento sobre as propriedades bioquímicas e imunológicas desses 13 alérgenos de *Blomia* reconhecidos pelo IUIS foi derivado de previsões baseadas em dados publicados para outros alérgenos de ácaros homólogos e bem caracterizados(Ramos, Cheong et al. 2002, Zakzuk, Benedetti et al. 2014).

É digno de nota que um aumento na alergia a *B. tropicalis* foi observado nas últimas décadas, alterando as reatividades da imunoglobulina E (IgE) em todo o mundo(Zakzuk, Jiménez et al. 2009, Julia-Serda, Cabrera-Navarro et al. 2012, Carvalho Kdos, de Melo-Neto et al. 2013). Além disso, nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, a importância de *B. tropicalis* como causa de sensibilização foi demonstrada(Baqueiro, Carvalho et al. 2006, Macchiaverni, Ynoue et al. 2015) e até mesmo as respostas de IgE precoces a *B. tropicalis* foram relatadas(Macchiaverni, Ynoue et al. 2015). Portanto, os avanços no conhecimento sobre a alergenicidade do *B. tropicalis* e seu perfil de alérgenos reativos são imperativos para o planejamento de intervenções clínicas, bem como o diagnóstico de alergia a *B. tropicalis* e medidas preventivas.

1.5.3 *Dermatophagoides* sp.

Desde a descoberta do papel alergênico dos ácaros do gênero *Dermatophagoides* em meados da década de 1960, numerosas espécies têm sido descritas como a fonte de alérgenos capazes de sensibilizar e induzir sintomas alérgicos em indivíduos sensibilizados e geneticamente predispostos (Fernandez-Caldas, Puerta et al. 2014).

Os ácaros do gênero *Dermatophagoides* estão distribuídos no planeta de forma ampla e ocupam diferentes regiões, com diferentes condições climáticas, que vão desde temperadas a tropicais (Platts-Mills 2003, Nadchatram 2005). A vasta distribuição associada à potencialidade alergênica intrínseca destes ácaros tem sido demonstrada em vários estudos epidemiológicos que indicam estes como os principais agentes alergênicos em muitos países. Em regiões de clima temperado a tropical são encontrados principalmente ácaros da espécie *D. pteronyssinus* e em regiões mais secas são encontrados *D. farinae* (Platts-Mills 2003).

Os ácaros do gênero *Dermatophagoides* sp. apresentam diversas proteínas com potencial alergênico. Estas proteínas são caracterizadas e organizadas em grupos definidos segundo parâmetros de função molecular ou bioquímica, homologia das sequências proteicas e do peso molecular (O'Neil, Heinrich et al. 2006).

Nos ácaros da poeira domiciliar os principais alérgenos são do grupo 1 e 2. Os principais alérgenos encontrados em ácaros de armazenamento incluem proteínas de ligação a ácidos graxos, homólogos de tropomiosina e paramiosina, proteínas semelhantes a apolipoforina, α -tubulinas e outros pertencentes ao grupo 2, 5 e 7 (Luczynska 1998, Thomas and Smith 1998, C Bessot and Pauli 2011).

O alérgeno mais estudado dos *Dermatophagoides* é o Der p 1. Este alérgeno é uma glicoproteína com homologia de sequências e funções de tiol protease semelhantes às enzimas papaína, actinidina, bromelina e catepsinas B e H (Luczynska 1998, Bessot and Pauli 2011).

O Der p 1 pode aumentar a síntese de IgE clivando o receptor de baixa afinidade de IgE (CD23) na superfície de células B humanas (Hewitt, Brown et al. 1995). O Der p 1 também pode clivar a subunidade α do receptor da interleucina (IL)-2 (IL2R ou CD25) da superfície das células T e, como resultado, estas células apresentam proliferação diminuída e aumento da secreção de interferon- γ , que direciona a resposta imune para o perfil Th2. Foi demonstrado também que a

atividade da cisteína-protease do Der p 1 pode aumentar seletivamente a resposta IgE e que a atividade proteolítica deste induz as células T a produzirem mais IL-4 e menos interferon- γ (Ghaemmaghami, Robins et al. 2001). A atividade enzimática do Der p 1 e de outros alérgenos dos ácaros pode contribuir para a sua imunogenicidade, aumentando a permeabilidade das mucosas (Bessot and Pauli 2011, Fernandez-Caldas, Puerta et al. 2014).

A reatividade cruzada é uma característica imunológica importante e comum entre os ácaros. Atualmente, alérgenos nativos ou recombinantes purificados, mapeamento de epítomos, abordagens proteômicas e técnicas de proliferação de células T estão sendo usados para avaliar a reatividade cruzada (Chua, Cheong et al. 2007). Os ácaros contêm enzimas potentes capazes de degradar uma ampla gama de substratos. A maioria dos alérgenos de ácaros são enzimas. Avanços em genômica e biologia molecular melhorarão nossa capacidade de entender a genética de respostas específicas de IgE contra os ácaros (Fernandez-Caldas, Puerta et al. 2014). A prevenção e a imunoterapia com alérgenos são as duas únicas formas específicas de tratar doenças respiratórias e cutâneas induzidas por ácaros (Chapman, Pomes et al. 2007, Jutel and Akdis 2011, Bozek, Jakalski et al. 2018).

1.6 Fisiopatologia das reações alérgicas

As reações alérgicas, de acordo com a classificação de Gell e Coombs, 1963 (Tabela 1), também chamadas de reações do tipo I, hipersensibilidade do tipo I, hipersensibilidade anafilática ou de hipersensibilidade imediata, são assim denominadas porque se manifestam, de forma geral, minutos após o contato com o antígeno específico (Arosa, Santos et al. 2007, Averbek, Gebhardt et al. 2007, Murphy and Atwater 2018).

Estas manifestações estão intimamente relacionadas com a ativação de mecanismos imunológicos que desencadeiam a biossíntese de anticorpos da classe IgE, geração de linfócitos Th2 (T helper do tipo 2), mastócitos, basófilos e plaquetas (Varney, Jacobson et al. 1992, Akdis and Akdis 2015), gerando uma inflamação crônica caracterizada pelo intenso fluxo de eosinófilos e acúmulo de mastócitos nas lesões (Oboki, Ohno et al. 2008, Agache, Sugita et al. 2015).

Este mecanismo patogênico é compartilhado por doenças como a asma alérgica, rinite alérgica e dermatite atópica, síndromes que são derivadas da hiper-reatividade a antígenos ambientais (alérgenos) em indivíduos atópicos (Agache, Sugita et al. 2015, Akdis and Akdis 2015). Os tipos de hipersensibilidade são exemplificados na tabela 1.

Tabela 1 – Classificação das Reações de Hipersensibilidades, de acordo com Coombs e Gell 1963

HIPERSENSIBILIDADE	MEDIADA POR ANTICORPO	Tipo	Definição	Mecanismos	Exemplos clínicos
		I	Hipersensibilidade Imediata, mediada por imunoglobulina E	Os mastócitos e basófilos que são estimulados pelos alérgenos através da IgE ligada ao seu receptor de alta afinidade ficam ativados e degranulam, libertando mediadores tais como a histamina e mediadores lipídicos.	Asma, rinite, urticária, angioedema, anafilaxia
		II	Resposta Imune Humoral / Citotóxica	IgG e IgM ligam-se aos antígenos nas superfícies celulares levando à fagocitose ou à lise (citotoxicidade celular dependente de anticorpo).	Síndrome de Goodpasture, Doença hemolítica do recém-nascido, Anemia hemolítica auto-imune.
		III	Resposta Imune mediada por imuno-complexo e células T	Antígenos e anticorpos (IgG) formam complexos imunes que ligam e ativam o complemento.	Lúpus eritematoso sistêmico, doença do soro, glomerulonefrite aguda.
	MEDIADA POR CÉLULAS	IV	Hipersensibilidade tardia mediada por células T	Citotoxicidade mediada por linfócitos T sensibilizados.	Dermatite de contato, Rejeição de órgãos e Artrite reumatoide.

Fonte: AVERBECK et al., 2007; AROSA et al., 2007 (Adaptado).

A sensibilização do indivíduo a determinado alérgeno depende dos níveis aos quais ele é exposto e à genética individual, além é claro, do tempo de exposição ao mesmo (Segundo, Gomes et al. 2009).

É sabido que a exposição a alérgenos encontrados de ambientes *indoor* pode desencadear os sintomas de asma, rinite e eczema nos indivíduos que as têm.

Estudos apontam que o contato com altos níveis de alérgenos de barata, por exemplo, em ambientes domésticos é um fator de risco importante para a manifestação de sintomas em indivíduos alérgicos (Arruda, Vailes et al. 2001, Bessot and Pauli 2011). Muito se tem discutido sobre as condições de exposição aos alérgenos no desenrolar das respostas alérgicas e como estes alérgenos tem a capacidade de induzir respostas exacerbadas em determinado período ao invés de uma resposta imunológica normal ou, até mesmo, tolerogênica (Traidl-Hoffmann, Jakob et al. 2009).

No período de sensibilização, as células apresentadoras de antígenos (APCs) endocitam e processam os alérgenos. Depois de processados os epítopos alergênicos são apresentados às células T e induzem estas células à diferenciação em linfócitos Th2. Estes linfócitos são produtores das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Uma vez na presença destas citocinas, os linfócitos B adjacentes são induzidos a produzir anticorpos do tipo IgE ao invés de IgG (Holgate and Polosa 2008).

Cabe ressaltar que os linfócitos T *helper* (Th), constituídos pelos subtipos Th1 e Th2 possuem funções antagônicas e são responsáveis por manter a homeostasia do sistema imune, através do balanço de diferentes perfis de citocinas juntamente com as células T reguladoras (Treg). Assim sendo, o desequilíbrio deste balanço pode desencadear uma ativação excessiva de células do tipo Th1, podendo resultar no aparecimento de doenças autoimunes, ou quando esta balança pende para o tipo celular Th2 no aparecimento de doenças alérgicas (Holgate and Polosa 2008, Oboki, Ohno et al. 2008). Uma vez diferenciadas, estas células se deslocam dos tecidos periféricos para os órgãos linfoides secundários, onde secretam citocinas efetoras características de seu perfil (Kay 1991, Jutel and Akdis 2011).

No processo alérgico, a fase efetora se inicia pela ligação de IgEs circulantes nos receptores FcεRI presentes na superfície de basófilos ou mastócitos a um antígeno específico (alérgeno). Após esta ligação (IgE/FcεRI) ocorrem cascatas de sinalização intracelular que levam à liberação de mediadores inflamatórios como a histamina, os leucotrienos (LTC4, LTD4 e LTE4) e as prostaglandinas (PGD2) (Metzger and Nyce 1999).

Podemos deduzir então que os indivíduos não atópicos apresentam baixos níveis de IgE alérgeno-específicas e que indivíduos atópicos possuem altos níveis

de IgE alérgeno-específica, produzidos pelas células B, somado a mastócitos e eosinófilos com maior número de receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) em suas superfícies(Fujita, Meyer et al. 2012).

Decorridos estes eventos, fatores de transcrição amplificam as respostas Th2 no local pela produção de citocinas. Com o aumento dos mediadores inflamatórios ocorre aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema e contração de músculos lisos, que são responsáveis pela manifestação clínica da fase imediata das reações alérgicas, observadas nos primeiros 30 minutos após o contato alergênico(Metzger and Nyce 1999, Holgate and Polosa 2008, Ozdemir, Kucuksezer et al. 2016).

Simultaneamente à ação dos mediadores inflamatórios, há a liberação de citocinas (TNF-α), quimiocinas (CCL11, CCL5, MIP-1α e outras)(Gonzalo, Lloyd et al. 1996) e mediadores lipídicos (principalmente PAF, LTB 4, LTC 4 e PGE2)(Anwar, Walsh et al. 1994, Mould, Matthaei et al. 1997), por mastócitos e basófilos, que ocasionam o aumento da expressão de moléculas de adesão vascular. Estas moléculas, por sua vez, contribuem para o estabelecimento de infiltrado tecidual de células inflamatórias, constituído de linfócitos, neutrófilos, mononucleares e eosinófilos(Larché 2007). Estas últimas, são as células predominantes na fase tardia das reações alérgicas, com evolução para cronicidade, liberando citocinas e mediadores como leucotrienos, proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO)(Lundgren, Davey et al. 1991, Sarmiento, Espiritu et al. 1995), assim como aumento da expressão de moléculas de adesão (selectinas e integrinas) e seus receptores (como VLA-1, VLA-4, ICAM-1, VCAM1)(Anwar, Walsh et al. 1994) que amplificam o processo inflamatório(Bjornsdottir and Cypcar 1999, Larché 2007).

Ainda na fase tardia do processo alérgico, também ocorre a produção de IL-3, IL-5, GM-CSF, IL-8, RANTES, MIP1a e eotaxina que são cruciais para a produção/ativação de mastócitos e eosinófilos e predispõe a secreção de muco por células epiteliais(Blaser and Akdis 2004).

Estudos recentes demonstraram que, além dos mecanismos descritos, a linfopoietina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33 têm papel importante na estimulação inicial e no desenvolvimento da resposta imune do tipo Th2(Liao, Cao et al. 2015, Vannella, Ramalingam et al. 2016)

A IL-25 é secretada pelas células epiteliais frente a um alérgeno e pode ser considerada um iniciador da resposta imune alérgica, por levar à proliferação de eosinófilos, produção de TSLP e formação de muco (Fort, Cheung et al. 2001, Angkasekwinai, Park et al. 2007). A TSLP, nos humanos, é sintetizada principalmente por células epiteliais, mastócitos e basófilos, e é capaz de ativar células dendríticas mielóides (mDC). Quando as células mDC estão ativadas elas expressam MHC-II e moléculas acessórias, como OX-40L, responsáveis por ativar as células T e promover a diferenciação destas em células do tipo Th2 (Huston and Liu 2006). Inferimos assim que a TSLP está relacionada com as doenças alérgicas respiratórias, como asma, por induzir uma resposta do tipo Th2 (Ying, O'Connor et al. 2005, Watson and Gauvreau 2014). Liu (2006) mostrou que queratinócitos da pele de indivíduos com dermatite atópica também produzem a TSLP (Liu 2006).

A IL-33 contribui para a resposta alérgica, por estar ligada à ativação de basófilos. Esta citocina é responsável por induzir expansão de moléculas de adesão, como ICAM-I, e a sobrevivência de eosinófilos (Chow, Wong et al. 2010).

Com a descoberta de novas subpopulações de células T *helper*, como Th9, Th22, Th17 e Treg outros mecanismos que desencadeiam as respostas imunes foram identificados (Akdis and Akdis 2015).

As células Th17, estimuladas pelas citocinas IL-1 β e IL-6 / IL-23, também têm sido associadas às reações de hipersensibilidade imediata. O aumento das citocinas (IL-17) produzidas por esta subpopulação tem sido associado ao aumento da gravidade das doenças alérgicas e na manutenção do status pró-inflamatório em indivíduos atópicos (Oboki, Ohno et al. 2008).

Em contrapartida a estes mecanismos inflamatórios, evidências sugerem que as células Tregs, caracterizadas pela expressão do fator de transcrição FOXP3 e secreção de IL-10 e TGF- β , inibem a resposta Th2 (e Th1), exercendo um papel importante na inibição e no desenvolvimento de doenças alérgicas (Akdis 2006, Fujita, Meyer et al. 2012). Por isso, as estratégias terapêuticas para aplicação nas doenças alérgicas têm explorado o uso de antígenos modificados, seja para induzir células Th1 produtoras de IFN- γ que inibe as células Th2 ou mesmo células Tregs, com produção de IL-10 e/ou TGF- β (Nouri-Aria 2009, Rodriguez-Perea, Arcia et al. 2016). A figura 3 a seguir mostra alguns dos processos celulares que ocorrem na alergia.

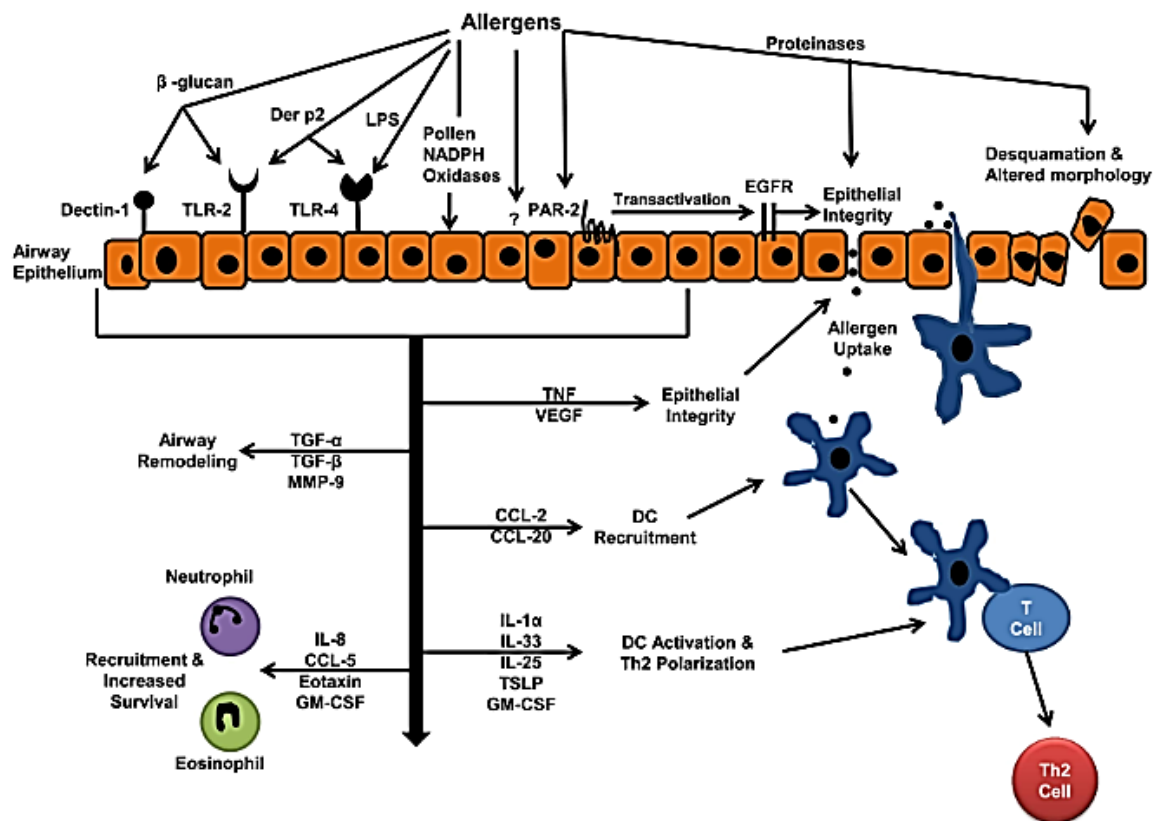


Figura 3; Interações alérgeno-epiteliais: efeitos sobre mediadores liberados pelo epitélio, por interações com o alérgenos, sensibilização ao estímulo e inflamação alérgica das vias aéreas. As interações de aeroalergênicas com o epitélio resultam em aumento da permeabilidade epitelial, o que facilita a entrada e captação de alérgenos pelas células dendríticas (DCs). Interações entre as células DC e a resposta imune Th2. Esses mediadores também desenvolvem inflamação recrutando células inflamatórias para as vias aéreas(Gandhi and Vliagoftis 2015).

1.7 Diagnóstico das doenças alérgicas

O diagnóstico das doenças alérgicas é baseado na história típica de sintomas alérgicos do indivíduo somado a testes de diagnóstico. Estes testes podem ser *in vivo* (testes cutâneos de puntura – TCP e intradérmico) e/ou *in vitro* (determinação dos níveis de IgE específica em soro - ELISA), ambos dirigidos à detecção de IgE circulante ou acoplada às células. Estas análises têm grande relevância, pois possibilitam a identificação da sensibilização do indivíduo frente a um painel de alérgenos, sendo uma das ferramentas mais utilizadas na rotina clínica(Bousquet,

Hooper et al. 2007, Bousquet 2008, Bessot and Pauli 2011, Bousquet, Heinzerling et al. 2012).

1.7.1 Testes cutâneos

Sendo de alta especificidade e sensibilidade os testes cutâneos de puntura (TCP), baseados na hipersensibilidade imediata, são de simples e rápida execução, além de apresentarem baixo custo quando comparados aos testes laboratoriais (*In vitro*) que quantificam a IgE sérica específica (Bousquet 2008). Entretanto, somente os testes cutâneos não são capazes de diagnosticar a doença alérgica. Isto porque estes testes apenas determinam a presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos na superfície de mastócitos e basófilos da derme, ou seja, não têm a capacidade de diagnosticar a doença alérgica (Turkeltaub and Gergen 1989, Bousquet 2008, Bousquet, Heinzerling et al. 2012).

Este método *in vivo* é dependente do processo de apresentação do alérgeno (antígeno) e da produção e ligação das IgE alérgeno-específica nos receptores FcεRI presentes na superfície dos mastócitos residentes na pele. Uma vez que a ligação das IgE ao receptor FcεRI seja suficiente há a liberação de mediadores vasoativos que levam à formação de eritema e inchaço local. A histamina, mediador de maior concentração, causa coceira no local da puntura, juntamente com vasodilatação e extravasamento plasmático, o que produz a pápula (Williams, Ahlstedt et al. 2003, Griffiths, El-Shanawany et al. 2017). A figura 4 ilustra o exame cutâneo para determinar a quais antígenos o indivíduo é alérgico.



Figura 4: O teste “*prick*” é geralmente realizado no antebraço com alérgenos padronizados. Na técnica, os alergênicos usados com a lancetas são projetados

para fornecer resultados consistentes que indiquem para qual alérgeno o indivíduo é sensível (Douglass and E O'Hehir 2006).

1.7.2 Testes quantitativos dos níveis séricos de IgE

Os testes quantitativos dos níveis séricos de IgE (*in vitro*) são usados para confirmação do teste cutâneo ou quando o indivíduo não pode ser submetido ao teste cutâneo de punção, quer seja pela presença de lesões cutâneas, ingestão de medicamentos interferentes, história de reações anafiláticas ou quando o teste cutâneo possa oferecer riscos de reações sistêmicas (teste à venenos de insetos). Assim como nos testes cutâneos, um resultado positivo não é suficiente para o diagnóstico, sendo indispensável uma correlação com os sintomas clínicos (Mastrandrea, Serio et al. 1997, Kim and O'Gorman 2004, Prussin and Metcalfe 2006).

É sabido que as doenças alérgicas, assim como as parasitárias levam ao aumento dos níveis de IgE sérica (Cruz, Cooper et al. 2017, Drinic, Wagner et al. 2017). Diante deste fato, a quantificação de IgE sérica não é usada para o diagnóstico de processos alérgicos, sendo mais relevante quantificar os níveis de IgE sérica específica para determinado alérgeno, o que é de grande valia para o diagnóstico de pacientes atópicos (Bernstein and Storms 1995, Mastrandrea, Serio et al. 1997, Dykewicz and Fineman 1998).

Os níveis de IgE alérgeno-específicos dependem da dimensão e do tempo de exposição, ao alérgeno ou aos alérgenos que reagem de forma cruzada. Em casos de alergia ao pólen de plantas, os níveis de exposição chegam ao pico em quatro semanas (estação polínica) e decrescem de forma gradativa até a estação de pólen seguinte. Muitos indivíduos expostos a estas condições apresentam resultados positivos aos alérgenos, mas nenhuma manifestação clínica. Todavia, como regra geral, quanto mais positivo o resultado do teste, maiores serão os riscos de desenvolver sintomas (Prussin and Metcalfe 2006).

Com a expansão das doenças alérgicas, o maior objetivo é criar alternativas que contribuam para a diminuição das respostas imunológicas exacerbadas frente aos alérgenos (Bousquet, Lockey et al. 1998, Valenta and Coffman 2011). Uma vez diagnosticada, a alergia é tratada com uma conduta terapêutica que pode incluir a

redução à exposição alergênica, uso de medicamentos, como corticoides, anti-histamínicos e anti-inflamatórios, ou ainda, mais recente, o uso de imunoterapia específica com alérgenos (SIT), que consiste na administração de quantidades gradualmente crescentes de alérgenos(Huggins and Looney 2004).

2.0 Espectroscopia de Raman

A técnica da espectroscopia de Raman vem ganhando destaque no âmbito das análises biomédicas por ser um método não invasivo e não destrutivo de se adquirir informações específicas da composição molecular de diferentes amostras biológicas, fornecendo o que se pode definir como uma “impressão digital” das moléculas contidas na mesma, pela visualização das bandas de Raman adquiridas pela vibração molecular(Downes and Elfick 2010, Elfick, Downes et al. 2010, Butler, Ashton et al. 2016, Johnston, Taylor et al. 2016).

A técnica está fundamentada no fenômeno do espalhamento inelástico da luz (radiação), demonstrado em 1928 pelos pesquisadores Raman e Krishnan, que fazendo o uso de um telescópio para focar a radiação solar na amostra, perceberam a existência de uma radiação espalhada com frequência que divergia daquela da radiação incidente(Raman and Krishnan 1928, Singh Dr 2002). O efeito Raman pode ser provocado na região UV, na região visível ou na região próxima do infravermelho NIR(Johnston, Taylor et al. 2016).

Quando uma radiação monocromática visível ou infravermelha próxima de um laser incide sobre uma amostra ela provoca transições vibracionais discretas no estado eletrônico das moléculas(Demtröder 2003, Herrero 2008).

As transições vibracionais podem desencadear dois tipos de eventos, o espalhamento elástico, descoberto em 1881 pelo matemático e físico inglês John William Strutt, também conhecido como o Barão de Rayleigh e o espalhamento inelástico ou de Raman. Este último, dividido em dois modos, o Stokes e o anti-Stokes(Singh Dr 2002, Herrero 2008).

A radiação leva os níveis de energia vibracional da molécula, que à temperatura ambiente se encontra em um estado eletrônico fundamental, a um estado de colisão de alta energia e de vida curta (estado virtual transitório), que retorna a um estado de energia mais baixo pela emissão de um fóton. Este estado

recebe esta denominação porque não é um orbital molecular original da molécula, ele existe somente enquanto há a incidência do laser na amostra (Demtröder 2003, Herrero 2008, Johnston, Taylor et al. 2016).

O espalhamento da luz pode acontecer quando há variações nas energias vibracional, rotacional ou eletrônica dos compostos da amostra. Se uma radiação monocromática atinge a superfície de uma amostra, uma parte desta é refletida enquanto outra é absorvida. Desta transmitida através da superfície, uma fração é absorvida na forma de calor e outra é retransmitida na forma de luz espalhada (Demtröder 2003, Herrero 2008, Johnston, Taylor et al. 2016).

Quando o fóton espalhado regressa ao estado fundamental e apresenta a mesma energia do fóton incidente temos o espalhamento do tipo elástico, ($\Delta E = h\nu_0 - h\nu' = 0$) e este fóton não trará informações analíticas sobre a amostra (Demtröder 2003, Herrero 2008, Johnston, Taylor et al. 2016).

Uma vez que a frequência da radiação espalhada for menor que a frequência da radiação incidente, o processo de espalhamento absorve energia, que é retirada do campo de radiação e transformada no meio espalhador, ($\Delta E = h\nu_0 - h\nu' > 0$). Esse espalhamento é chamado de Stokes. Todavia, se a radiação espalhada tiver frequência maior que a da radiação incidente, o processo de espalhamento cedeu energia, que foi retirada do meio espalhador e transformada em energia no campo de radiação ($\Delta E = h\nu_0 - h\nu' < 0$). Esse espalhamento é denominado anti-Stokes. Como o conjunto de moléculas do primeiro estado vibracional excitado tende a ser menor à temperatura ambiente, as linhas anti-Stokes apresentam intensidades muito menores quando comparadas às linhas Stokes (Demtröder 2003, Herrero 2008, Johnston, Taylor et al. 2016).

Quando o laser atinge a amostra, seu campo elétrico oscilante imprime deslocamentos nos íons constituintes, gerando momentos de dipolos oscilantes que influem na suscetibilidade elétrica e, por consequência, na polarização das moléculas da amostra - variação da polarizabilidade da molécula (Demtröder 2003, Herrero 2008).

O espalhamento inelástico só acontece se houver uma variação da polarizabilidade (α) e das vibrações moleculares em torno da posição de equilíbrio. A polarizabilidade é referida como a medida da facilidade de deformação da nuvem eletrônica frente a uma perturbação, que no caso do espalhamento inelástico

consiste no campo elétrico (E^{\rightarrow}) da radiação incidente, levando a um momento de dipolo induzido (P^{\rightarrow}), onde $P^{\rightarrow} = \alpha E^{\rightarrow}$ (Demtröder 2003, Ferraro 2003, Herrero 2008).

O deslocamento Raman, medido em cm^{-1} , corresponde à diferença na frequência dos fótons incidentes e dos fótons espalhados. Portanto, o espectro obtido pelo método de Raman consiste em um gráfico da intensidade da luz dispersa em função do deslocamento da frequência (cm^{-1}) do comprimento de onda de excitação do laser, como exemplificado na figura 5 (Ferraro 2003, Herrero 2008).

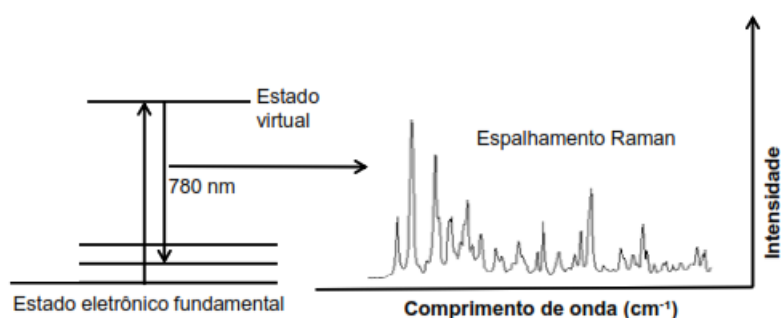


Figura 5: Gráfico obtido pelo efeito de Raman em que Y representa a intensidade da luz dispersa e X o deslocamento da frequência.

A intensidade das linhas do espectro de Raman são, no máximo, 0,001 % da potência do laser. Por este motivo, poderia ser mais difícil captar e medir as bandas de Raman, entretanto, como o que se mensura é a radiação espalhada que se encontra nas regiões do visível ou do infravermelho próximo, tal processo é possível com facilidade, porque para estas regiões já foram desenvolvidos detectores mais sensíveis. Uma vez mensurada a energia da radiação espalhada, é feito o cálculo da diferença entre esta e a do fóton incidente, dando origem ao deslocamento Raman. Em alguns equipamentos, as bandas Rayleigh e anti-Stokes são suprimidas por filtros e somente as bandas Stokes são exibidas (Ferraro 2003).

Para facilitar a compreensão da técnica de Raman, deve-se considerar os fótons emitidos pelo laser como partículas e não como ondas. A figura 6, a seguir exemplifica o esquema de formação das ondas e como o laser atinge a amostra.

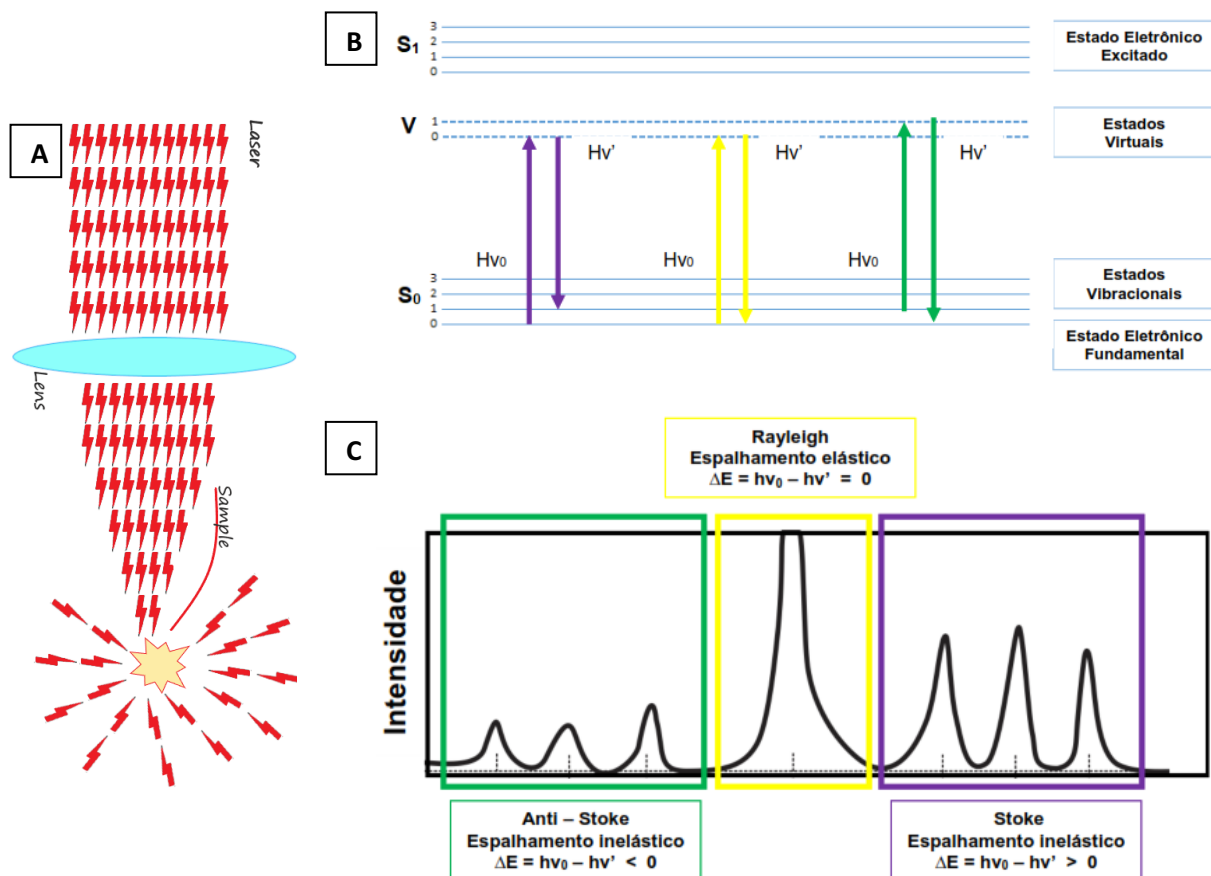


Figura 6: Eventos que originam os dados de Raman Shift. (A) representação esquemática da incidência dos fótons sobre a amostra com seu consequente espalhamento. (B) Representação dos três tipos de espalhamento obtidos quando é incidida uma radiação monocromática sobre a amostra. Em azul, o ramo Stokes; em amarelo, o espalhamento Rayleigh; em verde, o ramo anti-Stokes. (C) Espectro de espalhamento Raman esperado.

Por serem constituídas, principalmente, de proteínas, as amostras de origem biológica apresentam uma alta complexidade molecular e sensibilidade a fatores extrínsecos que podem ocasionar a desnaturação de suas estruturas, como a temperatura, pH e potência da radiação. Assim sendo, não foram estudadas de forma ampla nos primórdios da utilização da espectroscopia de Raman, antes da década de 60 (Butler, Ashton et al. 2016). Outros fatores intrínsecos da técnica, como a pouca intensidade do espalhamento (aproximadamente 1 em cada 10^8 fótons é espalhado de forma inelástica) aliado à baixa capacidade de detecção dos

instrumentais, levavam ao uso de fontes de radiação muito intensas que podiam levar à degradação da amostra(Sheppard 2006).

Com o avanço das tecnologias eletrônicas e o uso de lasers como fonte de radiação monocromática de alta intensidade, sistemas de detecção mais eficientes foram desenvolvidos e as amostras biológicas ganharam campo dentro das aplicações da espectroscopia de Raman(Manoharan, Baraga et al. 1992, Vandenabeele 2010). Contudo, a técnica de espalhamento começou a ser utilizada de forma expressiva em estudos *in vitro*, por exemplo, de tecidos oculares e musculares, somente na década de 70 e a partir deste período a técnica começou a ser utilizada também na clínica médica, por exemplo, na análise de sangue(Larsson and Hellgren 1974) e na identificação de fármacos após sua metabolização(Rahaman and Morris 1976, Ozaki, Mizuno et al. 1987).

As vantagens da espectroscopia de Raman abrangem pouca ou nenhuma preparação da amostra, somada a uma análise não destrutiva e rápida, realizada em poucos minutos.

3.0 Biossensores

Os processos biológicos e bioquímicos têm um papel muito importante na medicina, biologia e biotecnologia. No entanto, é muito difícil converter diretamente os dados biológicos em sinais elétricos(Mehrotra 2016). Para superar esta barreira foram desenvolvidos os biossensores que nos últimos anos, graças ao aprimoramento de técnicas e dispositivos, vem ganhando espaço na análise de processos biológicos e químicos(Ronkainen, Brian Halsall et al. 2010).

O primeiro biossensor foi descrito em 1962 por Clark e Lyons que imobilizaram a glicose oxidase (GOD) em uma membrana amperométrica de diálise semipermeável na superfície de um eletrodo de oxigênio, o qual detectava o consumo de oxigênio sob altos potenciais de redução e, assim, era capaz de determinar a concentração de glicose diretamente em uma amostra(Nambiar and Yeow 2011, Sassolas, Blum et al. 2012). Eles descreveram como tornar os sensores eletroquímicos (pH, polarográficos, potenciométricos ou condutométricos) mais inteligentes, adicionando transdutores de enzimas como sanduíches nas membranas fechadas(Nambiar and Yeow 2011).

A partir desta descoberta, vários tipos de biossensores têm sido desenvolvidos com o objetivo de melhorar e diversificar as análises de diversas áreas como, por exemplo, da medicina, da indústria alimentos e de fármacos, oferecendo resultados mais imediatos e específicos(Klos-Witkowska 2016, Mehrotra 2016).

De acordo com a proposta recente da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), o biossensor é definido como: “Um dispositivo integrado independente que é capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa específica usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com um elemento transdutor. Um biossensor deve ser claramente distinguido de um sistema bioanalítico, que requer etapas adicionais de processamento, como a adição de reagentes”(Thevenot, Toth et al. 2001).

O biossensor é um dispositivo composto por dois elementos, um bioreceptor que é um elemento biológico sensível imobilizado (por exemplo, enzima, sonda de DNA, anticorpo) que reconhece o analito (por exemplo, substrato enzimático, DNA complementar, antígeno) (Figura 7). Embora anticorpos e oligonucleotídeos sejam amplamente empregados, as enzimas são, de longe, os elementos comumente usados nos biossensores e um transdutor que é usado para converter sinal (bio) químico resultante da interação do analito com o bioreceptor em um sinal (eletro) eletrônico. A intensidade do sinal gerado é direta ou inversamente proporcional à concentração do analito. Transdutores eletroquímicos são frequentemente usados para desenvolver biossensores. Esses sistemas oferecem algumas vantagens, como baixo custo, design simples e pequenas dimensões. Os biossensores também podem ser baseados em detecção gravimétrica, calorimétrica ou óptica(Sassolas, Blum et al. 2012).

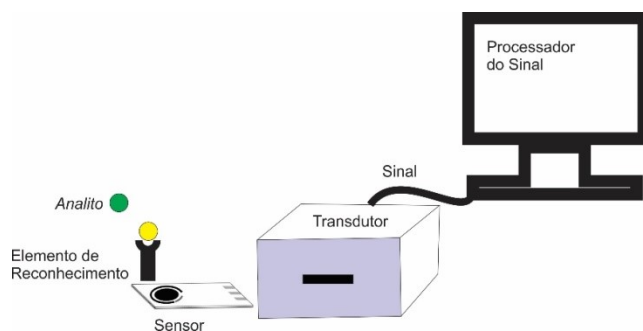


Figura 7 – Esquema de um biossensor com um transdutor de sinal.

Os biossensores são categorizados de acordo com os princípios básicos de transdução de sinal e reconhecimento dos elementos biológicos. De acordo com os elementos de transdução, os biossensores podem ser classificados como sensores eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos e térmicos(Thevenot, Toth et al. 2001, Sassolas, Blum et al. 2012). Os biossensores eletroquímicos também são classificados como sensores potenciométricos, amperométricos, condutimétricos, impedimétrico ou carga iônica (ou efeito de campo)(Thevenot, Toth et al. 2001, Sassolas, Blum et al. 2012).

Os biossensores eletroquímicos são os mais desenvolvidos e empregados na área de análises clínicas e biológicas e estão baseados em eletrodos quimicamente modificados com materiais biológicos imobilizados, por exemplo, no eletrodo com streptovidina. A principal vantagem destes biossensores eletroquímicos é que eles podem detectar materiais sem danificar o sistema(Arora, Sindhu et al. 2011), além disto, podem medir moléculas não polares que não respondem à maioria dos dispositivos de medição, serem específicos devido ao sistema imobilizado usado neles, possuírem tempo de resposta curto (tipicamente menos de um minuto), serem práticos, sensíveis, confiáveis além de terem baixo custo e permitirem determinações analíticas em uma ampla faixa de concentração(Thevenot, Toth et al. 2001, Paixao, Lowinsohn et al. 2006). Por exemplo, um biossensor eletroquímico pode ser usado para detectar *Salmonella* e *E. coli* O157: H7 em menos de 90 min(Arora, Sindhu et al. 2011).

Dentre os vários modelos de biossensores, podemos mencionar os imunossensores que apresentam como característica fundamental o uso de anticorpos ou componentes do sistema imune com alta afinidade e especificidade da ligação afim de capturar o alvo, os enzimáticos que tem como princípio a interação da enzima com o substrato, biossensores magnéticos que conseguem detectar nano ou micropartículas magnéticas entre outras variações baseadas nas moléculas adequadas de biorecepção, no método de imobilização destas e nas características do transdutor(Akyilmaz, Yorganci et al. 2010, Heli, Sattarahmady et al. 2016, Klos-Witkowska 2016, Mehrotra 2016).

A diferença entre os biossensores e os sensores físicos ou químicos é que seu elemento de reconhecimento é biológico.

A reação bioeletroquímica investigada gera uma corrente mensurável (detecção amperométrica), um potencial mensurável ou um acúmulo de carga (detecção potenciométrica) ou uma mudança de condutividade mensurável de um meio (detecção condutométrica) entre os eletrodos. Quando a corrente é medida em um potencial constante, isso é chamado de amperometria. Se uma corrente elétrica é medida enquanto variações controladas do potencial estão sendo aplicadas, isso é chamado de voltametria(Koyun, Ahlatcioglu Özerol et al. 2012).

Os estudos bioeletroquímicos são realizados com células eletroquímicas, compostas por três tipos de eletrodos.

O eletrodo de referência que como a própria designação diz serve de referência para os demais eletrodos(Koyun, Ahlatcioglu Özerol et al. 2012).

O eletrodo auxiliar (Contador) em um sistema de dois eletrodos, quando uma corrente ou potencial conhecido é aplicado entre os eletrodos de trabalho e os auxiliares, as outras variáveis podem ser medidas. O eletrodo auxiliar funciona como um cátodo sempre que o eletrodo de trabalho estiver operando como um ânodo e vice-versa. O eletrodo auxiliar geralmente tem uma área superficial muito maior que a do eletrodo de trabalho. A meia reação que ocorre no eletrodo auxiliar deve ocorrer com rapidez suficiente para não limitar o processo no eletrodo de trabalho. O potencial do eletrodo auxiliar não é medido contra o eletrodo de referência, mas ajustado para equilibrar a reação que ocorre no eletrodo de trabalho. Esta configuração permite que o potencial do eletrodo de trabalho seja medido contra um eletrodo de referência conhecido. O eletrodo auxiliar é muitas vezes fabricado a partir de materiais eletricamente inertes, como ouro, platina ou carbono(Koyun, Ahlatcioglu Özerol et al. 2012).

O eletrodo de trabalho é o eletrodo no qual a reação ocorre em um sistema eletroquímico. Em um sistema eletroquímico com três eletrodos, o eletrodo de trabalho pode ser referido como catódico ou anódico, isto depende da reação que ocorre no mesmo se é uma redução ou uma oxidação. Existem muitos tipos de eletrodos de trabalho, por exemplo, o eletrodo de carbono vítreo, eletrodo de tela impressa, eletrodo de Pt, eletrodo de ouro, eletrodo de prata, eletrodo de pasta de carbono, eletrodo de pasta de nanotubo de carbono etc(Koyun, Ahlatcioglu Özerol et al. 2012). A figura 8 a seguir mostra a imagem de um eletrodo impresso adquirido comercialmente.

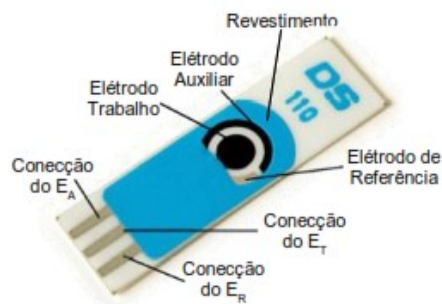


Figura 8: Eletrodo impresso comercializado pela empresa DropSens e suas partes.

Os eletrodos impressos em tela são preparados com tintas de depósito no substrato do eletrodo (vidro, plástico ou cerâmica) na forma de filmes finos. Diferentes tintas podem ser usadas para obter diferentes dimensões e formas de biossensores. Células eletroquímicas impressas em tela são amplamente utilizadas para o desenvolvimento de biossensores amperométricos, porque esses biossensores são baratos e podem ser produzidos em grandes escalas. Isso pode ser potencialmente usado como sensor descartável que diminui as chances de contaminação e evita a perda de sensibilidade (Mohanty and Kougianos 2006, Turiel and Martin-Esteban 2010).

Para detectar o alvo a estrutura do eletrodo de trabalho deve ser específica para tal. Para isto, utilizamos várias moléculas de bioreconhecimento que possuem capacidade de ligação específica e em alguns casos (enzimas) atividade biocatalítica, dentre estas podemos citar as enzimas, os anticorpos, os ácidos nucleicos, células e microrganismos (Koyun, Ahlatcioglu Özerol et al. 2012). Estes elementos devem ser imobilizados na superfície do eletrodo e, adsorção, microencapsulação, aprisionamento, fixação covalente e métodos de reticulação são os mais conhecidos (Mohanty and Kougianos 2006, Koyun, Ahlatcioglu Özerol et al. 2012).

4.0 Imunoglobulina Y

A imunoglobulina (Ig) Ys é produzida por galinhas e outras aves, répteis e anfíbios. Sua função é semelhante à das IgGs de mamíferos. Esta imunoglobulina

está presente no soro das aves e é passado para o embrião através da gema do ovo(Warr, Magor et al. 1995).

A evidência da transferência de IgYs da galinha para gema do ovo para proteção do embrião foi relatada pela primeira vez há mais de 100 anos. Nas aves, a gema do ovo é o reservatório das IgYs circulantes, que entram na circulação embrionária quando o embrião está se desenvolvendo, uma vez que o mesmo não fica interligado à mãe pelo cordão umbilical(Carlander, Stalberg et al. 1999). Estas IgYs fornecem proteção por um tempo muito curto (cerca de 2 semanas), e seus níveis no sangue dos filhotes diminuem rapidamente após uma semana da eclosão, quando eles começam a sintetizar seus próprios anticorpos(Svendsen, Crowley et al. 1995, Gadde, Rathinam et al. 2015).

Acredita-se que IgY atue ligando-se às bactérias ou vírus, levando à sua eliminação através do intestino e prevenindo a replicação bacteriana ou disseminação do vírus(Abbas, El-Kafrawy et al. 2018).

As IgYs são altamente estáveis em pH 5,7-7,6 e até 60°C em condições aquosas, e podem conservar atividade de ligação ao antígeno na presença de pepsina em pH 4-6, o que as tornam candidatas para muitas aplicações(Davalos-Pantoja, Ortega-Vinuesa et al. 2000, Jaradat and Marquardt 2000).

As IgY, foram reconhecidas não apenas como uma excelente fonte de anticorpos policlonais, mas também como produtoras de vários antígenos com diferentes aplicações terapêuticas(Xu, Li et al. 2011). O uso de galinhas como hospedeiro de imunização para produção de anticorpos fornece número de vantagens sobre os métodos de produção usando mamíferos, tais como não-invasivo, de baixo custo e alto rendimento(Borges, Silva et al. 2018).

Galinhas imunizadas para a produção de anticorpos IgY podem permitir a produção eficiente de grandes quantidades de anticorpos(Gottstein and Hemmeler 1985).

Referências

Abbas, A. T., S. A. El-Kafrawy, S. S. Sohrab and E. I. A. Azhar (2018). "IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections" Hum Vaccin Immunother: 1-12, <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>, PMID:30230944, PMCID:PMC6363154.

Agache, I., K. Sugita, H. Morita, M. Akdis and C. A. Akdis (2015). "The Complex Type 2 Endotype in Allergy and Asthma: From Laboratory to Bedside." Curr Allergy Asthma Rep **15**(6): 29, <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0529-x>, PMID:26141574.

Akdis, C. A. and M. Akdis (2015). "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens." World Allergy Organ J **8**(1): 17, <https://doi.org/10.1186/s40413-015-0063-2>, PMID:26023323, PMCID:PMC4430874.

Akdis, M. (2006). "Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more." Curr Opin Immunol **18**(6): 738-744, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.06.003>, PMID:17023149.

Akita, E. M. and S. Nakai (1993). "Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain." J Immunol Methods **160**(2): 207-214, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90179-B](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90179-B).

Akyilmaz, E., E. Yorganci and E. Asav (2010). "Do copper ions activate tyrosinase enzyme? A biosensor model for the solution." Bioelectrochemistry **78**(2): 155-160, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.09.007>, PMID:19840905.

Angkasekwina, P., H. Park, Y. H. Wang, Y. H. Wang, S. H. Chang, D. B. Corry, Y. J. Liu, Z. Zhu and C. Dong (2007). "Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses." J Exp Med **204**(7): 1509-1517, <https://doi.org/10.1084/jem.20061675>, PMID:17562814, PMCID:PMC2118650.

Anwar, A. R., G. M. Walsh, O. Cromwell, A. B. Kay and A. J. Wardlaw (1994). "Adhesion to fibronectin primes eosinophils via alpha 4 beta 1 (VLA-4)." Immunology **82**(2): 222-228, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1414808>, PMID: 7927493; PMCID: PMC1414808.

Arias-Irigoyen, J., M. Lombardero, C. Arteaga, J. A. Carpizo and D. Barber (2007). "Limited IgE cross-reactivity between Dermatophagoides pteronyssinus and Glycyphagus domesticus in patients naturally exposed to both mite species." J Allergy Clin Immunol **120**(1): 98-104, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.02.028>, PMID:17412407.

Arlian, L. (2002). Arthropod allergens and human health, Annual Review of Entomology **47**:1, 395-433 <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145224>, PMID:11729080.

Arlian, L. G. and M. S. Morgan (2003). "Biology, ecology, and prevalence of dust mites." Immunol Allergy Clin North Am **23**(3): 443-468, [https://doi.org/10.1016/S0889-8561\(03\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0889-8561(03)00005-5).

Arlian, L. G. and T. A. Platts-Mills (2001). "The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease." J Allergy Clin Immunol **107**(3 Suppl): S406-413, <https://doi.org/10.1067/mai.2001.113670> , PMID:11242601.

Arora, P., A. Sindhu, N. Dilbaghi and A. Chaudhury (2011). "Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens." Biosens Bioelectron **28**(1): 1-12, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.06.002> , PMID:21763122.

Arosa, F. A., S. G. Santos and S. J. Powis (2007). "Open conformers: the hidden face of MHC-I molecules." Trends Immunol **28**(3): 115-123, <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.002> , PMID:17261379.

Arruda, L. K., E. Fernandez-Caldas, C. K. Naspietz, F. Montealegre, L. D. Vailes and M. D. Chapman (1995). "Identification of Blomia tropicalis allergen Blo t 5 by cDNA cloning." Int Arch Allergy Immunol **107**(1-3): 456-457, <https://doi.org/10.1159/000237080> , PMID:7613213.

Arruda, L. K., L. D. Vailes, V. P. Ferriani, A. B. Santos, A. Pomes and M. D. Chapman (2001). "Cockroach allergens and asthma." J Allergy Clin Immunol **107**(3): 419-428, <https://doi.org/10.1067/mai.2001.112854> , PMID:11240940.

Artemyev, D. N., V. P. Zakharov, I. L. Davydkin, J. A. Khristoforova, A. A. Lykina, V. N. Konyukhov and T. P. Kuzmina (2016). "Measurement of human serum albumin concentration using Raman spectroscopy setup." Optical and Quantum Electronics **48**(6): 337, <https://doi.org/10.1007/s11082-016-0610-2>..

Assarehzadegan, M. A., A. Shakurnia and A. Amini (2013). "The most common aeroallergens in a tropical region in Southwestern Iran." World Allergy Organ J **6**(1): 7, <https://doi.org/10.1186/1939-4551-6-7> , PMID:23663517, PMCID:PMC3651228.

Aubert, H., C. Bernier, M. Debons, J. M. Chavigny, S. Barbarot and J. F. Stalder (2013). "[Atopic dermatitis of the child]." Rev Prat **63**(9): 1271-1281, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24422300> , PMID: 24422300.

Averbeck, M., C. Gebhardt, F. Emmrich, R. Treudler and J. C. Simon (2007). "Immunologic Principles of Allergic Disease." JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft **5**(11): 1015-1027, <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2007.06538.x> , PMID:17976144.

Baas, J. M. A. (1995). "A Guide to the Complete Interpretation of Infrared Spectra of Organic Structures. N.P.G. Roeges. John Wiley, Chichester, 1994. 340 pp., £45.00. ISBN 0-471-93998-6." Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas **114**(3): 114-114, <https://doi.org/10.1002/recl.19951140311>.

Baqueiro, T., F. Carvalho, C. Freitas Rios, N. Maria dos Santos and N. Alcantara-Neves (2006). "Dust Mite Species and Allergen Concentrations in Beds of Individuals Belonging to Different Urban Socioeconomic Groups in Brazil", Journal of Asthma, **43**:2, 101-105, <https://doi.org/10.1080/02770900500497958>, PMID:16517425.

Becker, S., T. Schleiderer, M. F. Kramer, M. Haack, S. Vrtala, Y. Resch, C. Lupinek, R. Valenta and M. Gröger (2016). Real-Life Study for the Diagnosis of House Dust Mite Allergy - The Value of Recombinant Allergen-Based IgE Serology", Int Arch Allergy Immunol, **170**(2):132-7. <https://doi.org/10.1159/000447694>., PMID: 27505432.

Bernardes, C. T., P. F. Moreira, M. C. Sopenete, F. A. Vieira, S. S. Sung, D. A. Silva and E. A. Taketomi (2010). "IgE cross-reactivity between *Lolium multiflorum* and commercial grass pollen allergen extracts in Brazilian patients with pollinosis." Braz J Med Biol Res **43**(2): 166-175, <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010005000004>, PMID:20098843.

Bernstein, I. L. and W. W. Storms (1995). "Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint Task Force on Practice Parameters for the Diagnosis and Treatment of Asthma. The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology and the American College of Allergy, Asthma and Immunology." Ann Allergy Asthma Immunol **75**(6 Pt 2): 543-625, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8521115/>, PMID: 8521115.

Bessot, J. C. and G. Pauli (2011). "Mite allergens: an overview." Eur Ann Allergy Clin Immunol **43**(5): 141-156, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22145250/>, PMID: 22145250.

Bidad, K., M. H. Nicknam and R. Farid (2011). "A review of allergy and allergen specific immunotherapy." Iran J Allergy Asthma Immunol **10**(1): 1-9, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21358009/>, PMID: 21358009.

Bjornsdottir, U. S. and D. M. Cypcar (1999). "Asthma: an inflammatory mediator soup." Allergy **54 Suppl 49**: 55-61, <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1999.tb04389.x>, PMID:10422749.

Blaser, K. and C. A. Akdis (2004). "Interleukin-10, T regulatory cells and specific allergy treatment." Clin Exp Allergy **34**(3): 328-331, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.01909.x>, PMID:15005723.

Borges, I. P., M. F. Silva, F. M. Santiago, L. S. de Faria, A. F. Junior, R. J. da Silva, M. S. Costa, V. de Freitas, K. A. G. Yoneyama, E. A. V. Ferro, D. S. Lopes, R. S. Rodrigues and V. de Melo Rodrigues (2018). "Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* venom." Int J Biol Macromol **112**: 333-342, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.178>, PMID:29391226.

Bousquet, J. (2008). "Strategies to treat allergic disease." Drugs Today (Barc) **44 Suppl B**: 25-27, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19221614/>, PMID: 19221614.

Bousquet, J., L. Heinzerling, C. Bachert, N. G. Papadopoulos, P. J. Bousquet, P. G. Burney, G. W. Canonica, K. H. Carlsen, L. Cox, T. Haahtela, K. C. Lodrup Carlsen, D. Price, B. Samolinski, F. E. Simons, M. Wickman, I. Annesi-Maesano, C. E. Baena-Cagnani, K. C. Bergmann, C. Bindslev-Jensen, T. B. Casale, A. Chiriac, A. A. Cruz, R. Dubakiene, S. R. Durham, W. J. Fokkens, R. Gerth-van-Wijk, O. Kalayci, M. L. Kowalski, A. Mari, J. Mullol, L. Nazamova-Baranova, R. E. O'Hehir, K. Ohta, P. Panzner, G. Passalacqua, J. Ring, B. Rogala, A. Romano, D. Ryan, P. Schmid-Grendelmeier, A. Todo-Bom, R. Valenta, S. Woehrl, O. M. Yusuf, T. Zuberbier, P. Demoly, A. Global, N. Asthma European, R. Allergic and A. its Impact on (2012). "Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens." Allergy **67**(1): 18-24., <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02728.x>, PMID:22050279.

Bousquet, J., R. Lockey and H. J. Malling (1998). "Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper." J Allergy Clin Immunol **102**(4 Pt 1): 558-562, [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70271-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70271-4).

Bousquet, P. J., R. Hooper, M. Kogevinas, D. Jarvis and P. Burney (2007). "Number of allergens to be tested to assess allergenic sensitization in epidemiologic studies: results of the European Community Respiratory Health Survey I." Clin Exp Allergy **37**(5): 780-787, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02714.x>, PMID:17456226.

Bozek, A., M. Jakalski, M. Jonska-Golus, A. Filipowska-Gronska, J. Jarzab and G. Walter Canonica (2018). "Prolonged effect of allergen sublingual immunotherapy to grass pollen." Hum Vaccin Immunother: 1-6, <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1496770>, PMID:30183483, PMCID:PMC6343611.

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

Brauchle, E. and K. Schenke-Layland (2013). "Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues." Biotechnol J **8**(3): 288-297, <https://doi.org/10.1002/biot.201200163>, PMID:23161832 PMCID:PMC3644878.

Brett, A. M. O. B., C. M. A. (1996). Eletroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações. Coimbra, Livraria Almedina, ISBN:9724009726 9789724009728 Número OCLC: 847307011, 471 pages

Butler, H. J., L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-White, N. J. Fullwood, B. Gardner, P. L. Martin-Hirsch, M. J. Walsh, M. R. McAinsh, N. Stone and F. L. Martin (2016). "Using Raman spectroscopy to characterize biological materials." Nat Protoc **11**(4): 664-687, <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.036>, PMID:26963630.

C Bessot, J. and G. Pauli (2011). "Mite allergens: An overview", Eur Ann Allergy Clin Immunol. **43**(5):141-56, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22145250/>, PMID: 22145250.

Caraballo, L., L. Puerta, B. Alfaro and L. Moreno (1994). "Identification of allergens from *Blomia tropicalis*." *Clinical & Experimental Allergy*, **24**: 1056-1060
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1994.tb02743.x>, PMID:7874604.

Carlander, D., J. Stalberg and A. Larsson (1999). "Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective." *Ups J Med Sci* **104**(3): 179-189,
<https://doi.org/10.3109/03009739909178961>, PMID:10680951.

Carvalho Kdos, A., O. P. de Melo-Neto, F. B. Magalhaes, J. C. Ponte, F. A. Felipe, M. C. dos Santos, G. dos Santos Lima, A. A. Cruz, C. S. Pinheiro, L. C. Pontes-de-Carvalho and N. M. Alcantara-Neves (2013). "Blomia tropicalis Blo t 5 and Blo t 21 recombinant allergens might confer higher specificity to serodiagnostic assays than whole mite extract." *BMC Immunol* **14**: 11, <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-11>, PMID:23445659 PMCID:PMC3605308.

Chapman, M. D., A. Pomes, H. Breiteneder and F. Ferreira (2007). "Nomenclature and structural biology of allergens." *J Allergy Clin Immunol* **119**(2): 414-420,
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.11.001>, PMID:17166572.

Chew, F., F. C Yi, K. Y. Chua, E. Fernandez-Caldas, L. K. Arruda, M. Chapman and B. w. Lee (1999). "Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*", *Clinical & Experimental Allergy*, **29**: 982-988. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00543.x>, PMID:10383600 .

Choo-Smith, L. P., H. G. Edwards, H. P. Endtz, J. M. Kros, F. Heule, H. Barr, J. S. Robinson, Jr., H. A. Bruining and G. J. Puppels (2002). "Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation." *Biopolymers* **67**(1): 1-9, <https://doi.org/10.1002/bip.10064>, PMID:11842408.

Chow, J. Y., C. K. Wong, P. F. Cheung and C. W. Lam (2010). "Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33: implications for allergic inflammation." *Cell Mol Immunol* **7**(1): 26-34,
<https://doi.org/10.1038/cmi.2009.106>, PMID:20029461 PMCID:PMC4003257.

Chua, K. Y., N. Cheong, I. C. Kuo, B. W. Lee, F. C. Yi, C. H. Huang and L. N. Liew (2007). "The *Blomia tropicalis* allergens." *Protein Pept Lett* **14**(4): 325-333,
<https://doi.org/10.2174/092986607780363862>, PMID:17504089.

Cookson, W. (1999). "The alliance of genes and environment in asthma and allergy." *Nature* **402**, (Suppl. B) B5-10, <https://doi.org/10.1038/35037002>, PMID:10586889.

Cookson, W. O. C. M. (2001). "The genetics of atopic dermatitis: Strategies, candidate genes, and genome screens." *Journal of the American Academy of Dermatology* **45**(1, Supplement): S7-S9, <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.117026>, PMID:11423863.

Cruz, A. A., P. J. Cooper, C. A. Figueiredo, N. M. Alcantara-Neves, L. C. Rodrigues and M. L. Barreto (2017). "Global issues in allergy and immunology: Parasitic

infections and allergy." *J Allergy Clin Immunol* **140**(5): 1217-1228, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.005>, PMid:29108604.

D'Amato, G. (2002). "Outdoor air pollution, climate and allergic respiratory diseases: evidence of a link." *Clin Exp Allergy* **32**(10): 1391-1393, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2002.01519.x>, PMid:12372114.

D'Amato, G., C. E. Baena-Cagnani, L. Cecchi, I. Annesi-Maesano, C. Nunes, I. Ansotegui, M. D'Amato, G. Liccardi, M. Sofia and W. G. Canonica (2013). "Climate change, air pollution and extreme events leading to increasing prevalence of allergic respiratory diseases." *Multidiscip Respir Med* **8**(1): 12, <https://doi.org/10.1186/2049-6958-8-12>, PMid:23398734 PMCID:PMC3598823.

Davalos-Pantoja, L., J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-Gonzalez and R. Hidalgo-Alvarez (2000). "A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles." *J Biomater Sci Polym Ed* **11**(6): 657-673, <https://doi.org/10.1163/156856200743931>, PMid:10981680.

David Boothe, W., J. A. Tarbox and M. B. Tarbox (2017). "Atopic Dermatitis: Pathophysiology." *Adv Exp Med Biol* **1027**: 21-37, https://doi.org/10.1007/978-3-319-64804-0_3, PMid:29063428.

Demtröder, W. (2003). Laser Raman Spectroscopy. . *Laser Spectroscopy. Advanced Texts in Physics*. Springer. Berlin, Heidelberg Springer, Berlin, Heidelberg: 499-530, <https://doi.org/10.1007/978-3-662-05155-9>.

Di Lallo, D. and A. Di Napoli (2011). "Information systems in neonatology and health planning." *J Matern Fetal Neonatal Med* **24 Suppl 1**: 101-103, <https://doi.org/10.3109/14767058.2011.607575>, PMid:21942605.

Dingari, N. C., G. L. Horowitz, J. W. Kang, R. R. Dasari and I. Barman (2012). "Raman spectroscopy provides a powerful diagnostic tool for accurate determination of albumin glycation." *PLoS One* **7**(2): e32406, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032406>, PMid:22393405 PMCID:PMC3290592.

Douglass, J. A. and R. E. O'Hehir (2006). "1. Diagnosis, treatment and prevention of allergic disease: the basics." *Med J Aust* **185**(4): 228-233, <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2006.tb00539.x>, PMid:16922672.

Downes, A. and A. Elfick (2010). "Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine." *Sensors (Basel)* **10**(3): 1871-1889, <https://doi.org/10.3390/s100301871>, PMid:21151763 PMCID:PMC3000600.

Drinic, M., A. Wagner, P. Sarate, C. Zwicker, E. Korb, G. Loupal, R. Peschke, A. Joachim, U. Wiedermann and I. Schabussova (2017). "Toxoplasma gondii tachyzoite-extract acts as a potent immunomodulator against allergic sensitization and airway inflammation." *Sci Rep* **7**(1): 15211, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15663-4>, PMid:29123241 PMCID:PMC5680314.

Dykewicz, M. S. and S. Fineman (1998). "Executive Summary of Joint Task Force Practice Parameters on Diagnosis and Management of Rhinitis." Ann Allergy Asthma Immunol **81**(5 Pt 2): 463-468, [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)63152-3](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)63152-3).

Elfick, A. P., A. R. Downes and R. Mouras (2010). "Development of tip-enhanced optical spectroscopy for biological applications: a review." Anal Bioanal Chem **396**(1): 45-52, <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3223-9>, PMID:19876621.

F. Thomsen, S. (2015). "Epidemiology and natural history of atopic diseases.", European Clinical Respiratory Journal, **2**:1, <https://doi.org/10.3402/ecrj.v2.24642>, PMID:26557262 PMCID:PMC4629767.

Fassio, F. and F. Guagnini (2018). "House dust mite-related respiratory allergies and probiotics: a narrative review." Clin Mol Allergy **16**: 15, <https://doi.org/10.1186/s12948-018-0092-9>, PMID:29946225 PMCID:PMC6006752.

Fernandez-Caldas, E. and R. F. Lockey (2004). "Blomia tropicalis, a mite whose time has come." Allergy **59**(11): 1161-1164, <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00727.x>, PMID:15461595.

Fernandez-Caldas, E., L. Puerta and L. Caraballo (2014). "Mites and allergy." Chem Immunol Allergy **100**: 234-242, <https://doi.org/10.1111/all.12304>, PMID:24467839.

Ferraro, J. R. (2003). Basic Theory. Introductory Raman spectroscopy. London: 1-95, <https://doi.org/10.1016/B978-012254105-6/50004-4>.

Ferreira Junior, A., F. M. Santiago, M. V. Silva, F. B. Ferreira, A. G. Macedo Junior, C. M. Mota, M. S. Faria, H. H. Silva Filho, D. A. Silva, J. P. Cunha-Junior, J. R. Mineo and T. W. Mineo (2012). "Production, characterization and applications for Toxoplasma gondii-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins." PLoS One **7**(7): e40391, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040391>, PMID:22808150 PMCID:PMC3395712.

Fort, M. M., J. Cheung, D. Yen, J. Li, S. M. Zurawski, S. Lo, S. Menon, T. Clifford, B. Hunte, R. Lesley, T. Muchamuel, S. D. Hurst, G. Zurawski, M. W. Leach, D. M. Gorman and D. M. Rennick (2001). "IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo." Immunity **15**(6): 985-995, [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00243-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00243-6).

Franzolin, M. R. and D. Baggio (2000). "[Mite contamination in polished rice and beans sold at markets]." Rev Saude Publica **34**(1): 77-83, <https://doi.org/10.1590/S0034-89102000000100014>, PMID:10769365.

Fujita, H., N. Meyer, M. Akdis and C. A. Akdis (2012). "Mechanisms of immune tolerance to allergens." Chem Immunol Allergy **96**: 30-38, <https://doi.org/10.1159/000331868>, PMID:22433368.

Gadde, U., T. Rathinam and H. S. Lillehoj (2015). "Passive immunization with hyperimmune egg-yolk IgY as prophylaxis and therapy for poultry diseases--A

- review." *Anim Health Res Rev* **16**(2): 163-176, <https://doi.org/10.1017/S1466252315000195>, PMID:26568433.
- Galli, S. J., M. Maurer and C. S. Lantz (1999). "Mast cells as sentinels of innate immunity." *Curr Opin Immunol* **11**(1): 53-59, [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)80010-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)80010-7)
- Gandhi, V. D. and H. Vliagoftis (2015). "Airway epithelium interactions with aeroallergens: role of secreted cytokines and chemokines in innate immunity." *Front Immunol* **6**: 147, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00147>, PMID:25883597 PMCID:PMC4382984.
- Ghaemmaghami, A., A. Robins, L. Fairclough, H. Sewell and F. Shakib (2001). "Human T cell subset commitment determined by the intrinsic property of antigen: The proteolytic activity of the major mite allergen Der p 1 conditions T cells to produce more IL-4 and less IFN- γ ," *Eur. J. Immunol.*, **31**: 1211-1216 [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200104\)31:4<1211::AID-IMMU1211>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200104)31:4<1211::AID-IMMU1211>3.0.CO;2-R)
- Goldman, E. R., I. L. Medintz and H. Mattoussi (2006). "Luminescent quantum dots in immunoassays." *Anal Bioanal Chem* **384**(3): 560-563, <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0212-5>, PMID:16344927.
- Gonzalo, J. A., C. M. Lloyd, L. Kremer, E. Finger, A. C. Martinez, M. H. Siegelman, M. Cybulsky and J. C. Gutierrez-Ramos (1996). "Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors." *J Clin Invest* **98**(10): 2332-2345, <https://doi.org/10.1172/JCI119045>, PMID:8941651 PMCID:PMC507684.
- Gopinath, S. C., T. H. Tang, M. Citartan, Y. Chen and T. Lakshmipriya (2014). "Current aspects in immunosensors." *Biosens Bioelectron* **57**: 292-302, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.029>, PMID:24607580.
- Gottstein, B. and E. Hemmeler (1985). "Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis." *Z Parasitenkd* **71**(2): 273-276, <https://doi.org/10.1007/BF00926279>, PMID:4039510.
- Granato, D., J. S. Santos, G. B. Escher, B. L. Ferreira and R. M. Maggio (2018). "Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective." *Trends in Food Science & Technology* **72**: 83-90, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.006>.
- Griffiths, R. L. M., T. El-Shanawany, S. R. A. Jolles, C. Selwood, A. G. Heaps, E. M. Carne and P. E. Williams (2017). "Comparison of the Performance of Skin Prick, ImmunoCAP, and ISAC Tests in the Diagnosis of Patients with Allergy." *Int Arch Allergy Immunol* **172**(4): 215-223, <https://doi.org/10.1159/000464326>, PMID:28456812.

Guilleminault, L. and C. Viala-Gastan (2017). "[Blomia tropicalis: A house dust mite in the tropics]." *Rev Mal Respir* **34**(8): 791-801, <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2016.10.877>, PMID:28502519.

Haka, A. S., K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari and M. S. Feld (2005). "Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(35): 12371-12376, <https://doi.org/10.1073/pnas.0501390102>, PMID:16116095 PMCID:PMC1194905.

Hauser, M., A. Roulias, F. Ferreira and M. Egger (2010). "Panallergens and their impact on the allergic patient." *Allergy Asthma Clin Immunol* **6**(1): 1, <https://doi.org/10.1186/1710-1492-6-1>, PMID:20298513 PMCID:PMC2830198.

Heli, H., N. Sattarahmady, G. R. Hatam, F. Reisi and R. D. Vais (2016). "An electrochemical genosensor for Leishmania major detection based on dual effect of immobilization and electrocatalysis of cobalt-zinc ferrite quantum dots." *Talanta* **156-157**: 172-179, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.065>, PMID:27260450.

Herrero, A. M. (2008). "Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems." *Crit Rev Food Sci Nutr* **48**(6): 512-523, <https://doi.org/10.1080/10408390701537385>, PMID:18568857.

Hewitt, C. R., A. P. Brown, B. J. Hart and D. I. Pritchard (1995). "A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases." *J Exp Med* **182**(5): 1537-1544, <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1537>, PMID:7595223 PMCID:PMC2192194.

Holgate, S. T. and R. Polosa (2008). "Treatment strategies for allergy and asthma." *Nat Rev Immunol* **8**(3): 218-230, <https://doi.org/10.1038/nri2262>, PMID:18274559.

Huang, Z., A. McWilliams, H. Lui, D. I. McLean, S. Lam and H. Zeng (2003). "Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer." *Int J Cancer* **107**(6): 1047-1052, <https://doi.org/10.1002/ijc.11500>, PMID:14601068.

Huggins, J. L. and R. J. Looney (2004). "Allergen immunotherapy." *Am Fam Physician* **70**(4): 689-696, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15338781/>, PMID: 15338781.

Hughes, A. M. (1976). The mites of stored food and houses. London :, H.M.S.O., ISBN: 0112409091 9780112409090, OCLC: 2979401, 400 pags.

Hussein, A. H. and W. Elawamy (2015). "Quantitation of Blomia tropicalis allergen Blo t 5 in cereal and cereal-based foods consumed in the Nile Delta, Egypt." *Am J Trop Med Hyg* **93**(1): 194-197, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0837>, PMID:25870423 PMCID:PMC4497896.

Huston, D. P. and Y. J. Liu (2006). "Thymic stromal lymphopoietin: a potential therapeutic target for allergy and asthma." *Curr Allergy Asthma Rep* **6**(5): 372-376, <https://doi.org/10.1007/s11882-996-0006-7>, PMID:16899198.

Igea, J. M. (2013). "The history of the idea of allergy." *Allergy* **68**(8): 966-973, <https://doi.org/10.1111/all.12174>, PMid:23889361.

Jaradat, Z. and R. Marquardt (2000). "Studies on the Stability of Chicken IgY in Different Sugars, Complex Carbohydrates and Food Materials.", *Food and Agricultural Immunology*, **12**:4, 263-272, <https://doi.org/10.1080/09540100020008137>.

Johansson, E., M. Schmidt, S. G. O. Johansson, L. Machado, S. Olsson and M. van Hage-Hamsten (1997). "Allergenic crossreactivity between *Lepidoglyphus destructor* and *Blomia tropicalis*." *Clinical & Experimental Allergy*, **27**: 691-699, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1997.tb01198.x>

Johansson, M., Y. M Sjögren, J.-O. Persson, C. Nilsson and E. Sverremark-Ekström (2011). "Early Colonization with a Group of Lactobacilli Decreases the Risk for Allergy at Five Years of Age Despite Allergic Heredity.", *PLoS One*. **6**(8):e23031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023031>, PMid:21829685 PMCID:PMC3148229.

Johansson, S. G., J. O. Hourihane, J. Bousquet, C. Bruijnzeel-Koomen, S. Dreborg, T. Haahtela, M. L. Kowalski, N. Mygind, J. Ring, P. van Cauwenberge, M. van Hage-Hamsten, B. Wuthrich and E. n. t. force (2001). "A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force." *Allergy* **56**(9): 813-824, <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2001.00002.x-i1>, <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.t01-1-00001.x>, PMid:11551246.

Johansson, S. G. O., T. Bieber, R. Dahl, P. S. Friedmann, B. Q. Lanier, R. F. Lockey, C. Motala, J. A. Ortega Martell, T. A. E. Platts-Mills, J. Ring, F. Thien, P. Van Cauwenberge and H. C. Williams (2004). "Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**(5): 832-836, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.591>, PMid:15131563.

Johnston, J., E. N. Taylor, R. J. Gilbert and T. J. Webster (2016). "Improved molecular fingerprint analysis employing multi-branched gold nanoparticles in conjunction with surface-enhanced Raman scattering." *Int J Nanomedicine* **11**: 45-52, <https://doi.org/10.2147/IJN.S93222>, PMid:26730189 PMCID:PMC4694665.

Julia-Serda, G., P. Cabrera-Navarro, O. Acosta-Fernandez, P. Martin-Perez, M. A. Garcia-Bello and J. Anto-Boque (2012). "Prevalence of sensitization to *Blomia tropicalis* among young adults in a temperate climate." *J Asthma* **49**(4): 349-354, <https://doi.org/10.3109/02770903.2012.672611>, PMid:22486531.

Jutel, M. and C. A. Akdis (2011). "Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy." *Allergy* **66**(6): 725-732, <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02589.x>, PMid:21466562 .

Jutel, M. and C. A. Akdis (2011). "T-cell subset regulation in atopy." *Curr Allergy Asthma Rep* **11**(2): 139-145, <https://doi.org/10.1007/s11882-011-0178-7>, PMid:21271314 PMCID:PMC3047206.

Karlsson, M., H. Kollberg and A. Larsson (2007). "Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage." World's Poultry Science Journal **60**(3): 341-348, <https://doi.org/10.1079/WPS200422>.

Kay, A. B. (1991). "Lymphocytes in asthma." Respiratory Medicine **85**(2): 87-90, [https://doi.org/10.1016/S0954-6111\(06\)80283-0](https://doi.org/10.1016/S0954-6111(06)80283-0).

Kim, J. S. and M. R. O'Gorman (2004). "Common in vitro tests for allergy and immunology." Allergy Asthma Proc **25**(4 Suppl 1): S57-58, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15515384/>, PMID: 15515384.

King, T. P., D. Hoffman, H. Lowenstein, D. G. Marsh, T. A. Platts-Mills and W. Thomas (1995). "Allergen nomenclature." Allergy **50**(9): 765-774, <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1995.tb01222.x>, PMID:8546275.

Klos-Witkowska, A. (2016). "The phenomenon of fluorescence in immunosensors." Acta Biochim Pol **63**(2): 215-221, https://doi.org/10.18388/abp.2015_1231, PMID:27192088.

Konradsen, J. R., T. Fujisawa, M. van Hage, G. Hedlin, C. Hilger, J. Kleine-Tebbe, E. C. Matsui, G. Roberts, E. Rönmark and T. A. E. Platts-Mills (2015). "Allergy to furry animals: New insights, diagnostic approaches, and challenges." Journal of Allergy and Clinical Immunology **135**(3): 616-625, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.026>, PMID:25282018.

Koyun, A., E. Ahlatcioglu Özerol and Y. İpek (2012). Biosensors and Their Principles, <https://doi.org/10.5772/48824>, PMID:22451026.

Larché, M. (2007). Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma., Chest., **132**(3):1007-14, doi: 10.1378/chest.06-2434. PMID: 17873195.

Larsen, J. N. and H. Lowenstein (1996). "Allergen nomenclature." J Allergy Clin Immunol **97**(2): 577-578, [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(96\)70301-9](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(96)70301-9)

Larsson, A., D. Carlander and M. Wilhelmsson (1998). "Immune response in chicken with different amounts of antigen." Food Agricult Immunol **10**: 29-36, <https://doi.org/10.1080/09540109809354966>

Larsson, A. and J. Sjoquist (1990). "Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **13**(4): 199-201, [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(90\)90088-B](https://doi.org/10.1016/0147-9571(90)90088-B).

Larsson, K. and L. Hellgren (1974). "A study of the combined Raman and fluorescence scattering from human blood plasma." Experientia **30**(5): 481-483, <https://doi.org/10.1007/BF01926305>, PMID:4833665.

Ledford, D. K. (1994). "Indoor allergens." J Allergy Clin Immunol **94**(2 Pt 2): 327-334, <https://doi.org/10.1053/ai.1994.v94.a56012>.

Lei, Y., V. Boinapally, A. Zoltowska, M. Adner, L. Hellman and G. Nilsson (2015). "Vaccination against IL-33 Inhibits Airway Hyperresponsiveness and Inflammation in a House Dust Mite Model of Asthma." *PLoS One* **10**(7): e0133774, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133774>, PMID:26214807 PMCID:PMC4516261.

Lemos, A. J. G., R. P. A. Balvedi, V. R. Rodvalho, L. O. Resende, A. C. H. Castro, S. Cuadros-Orellana, J. M. Madurro and A. G. Brito-Madurro (2017). "Immunosensor assembled on polymeric nanostructures for clinical diagnosis of C-reactive protein." *Microchemical Journal* **133**: 572-576, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.026>.

Levetin, E. and P. Van de Water (2001). Environmental contributions to allergic disease, *Curr Allergy Asthma Rep.* **1**(6):506-14. <https://doi.org/10.1007/s11882-001-0059-6>, PMID:11892080.

Liao, B., P. P. Cao, M. Zeng, Z. Zhen, H. Wang, Y. N. Zhang, C. Y. Hu, J. Ma, Z. Y. Li, J. Song, J. X. Liu, L. Y. Peng, Y. Liu, Q. Ning and Z. Liu (2015). "Interaction of thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and their receptors in epithelial cells in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps." *Allergy* **70**(9): 1169-1180, <https://doi.org/10.1111/all.12667>, PMID:26095319.

Lin, J., R. Chen, S. Feng, J. Pan, Y. Li, G. Chen, M. Cheng, Z. Huang, Y. Yu and H. Zeng (2011). "A novel blood plasma analysis technique combining membrane electrophoresis with silver nanoparticle-based SERS spectroscopy for potential applications in noninvasive cancer detection." *Nanomedicine* **7**(5): 655-663, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.01.012>, PMID:21333756.

Liu, Y. J. (2006). "Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation." *J Exp Med* **203**(2): 269-273, <https://doi.org/10.1084/jem.20051745>, PMID:16432252 PMCID:PMC2118215.

Luczynska, C. M. (1998). "Identification and quantification of mite allergens." *Allergy* **53**(48 Suppl): 54-57, <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb04998.x>, PMID:10096809.

Lundgren, J. D., R. T. Davey, Jr., B. Lundgren, J. Mullol, Z. Marom, C. Logun, J. Baraniuk, M. A. Kaliner and J. H. Shelhamer (1991). "Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion." *J Allergy Clin Immunol* **87**(3): 689-698, [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(91\)90390-A](https://doi.org/10.1016/0091-6749(91)90390-A).

Macchiaverni, P., L. H. Ynoue, C. Arslanian, V. Verhasselt and A. Condino-Neto (2015). "Early Exposure to Respiratory Allergens by Placental Transfer and Breastfeeding." *PLoS One* **10**(9): e0139064, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139064>, PMID:26398234 PMCID:PMC4580413.

Manoharan, R., J. J. Baraga, M. S. Feld and R. P. Rava (1992). "Quantitative histochemical analysis of human artery using Raman spectroscopy." *J Photochem Photobiol B* **16**(2): 211-233, [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)80009-K](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)80009-K).

Mastrandrea, F., G. Serio, A. Minardi, G. Coradduzza, N. Rossi, G. Scarcia, G. Maietta, A. Iacobelli, C. Lamanna and A. Tursi (1997). "IgE responses to

Dermatophagoides pteronyssinus native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy." Allergy **52**(11): 1115-1119, <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1997.tb00185.x>, PMID:9404565.

Matthews, Q., A. Jirasek, J. J. Lum and A. G. Brolo (2011). "Biochemical signatures of in vitro radiation response in human lung, breast and prostate tumour cells observed with Raman spectroscopy." Phys Med Biol **56**(21): 6839-6855, <https://doi.org/10.1088/0031-9155/56/21/006>, PMID:21971286.

McKenna, O. E., C. Asam, G. R. Araujo, A. Roulias, L. R. Goulart and F. Ferreira (2016). "How relevant is panallergen sensitization in the development of allergies?" Pediatr Allergy Immunol **27**(6): 560-568, <https://doi.org/10.1111/pai.12589>, PMID:27129102 PMCID:PMC5006871.

Mehrotra, P. (2016). "Biosensors and their applications - A review." J Oral Biol Craniofac Res **6**(2): 153-159, <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>, PMID:27195214 PMCID:PMC4862100.

Metzger, W. J. and J. W. Nyce (1999). "Oligonucleotide therapy of allergic asthma." J Allergy Clin Immunol **104**(2 Pt 1): 260-266, [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70361-1](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70361-1).

Miller, J. D. (2018). "The Role of Dust Mites in Allergy." Clin Rev Allergy Immunol., **57**, 312–329, <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8693-0>, PMID:29936683.

Miranda, D. O., D. A. Silva, J. F. Fernandes, M. G. Queiros, H. F. Chiba, L. H. Ynoue, R. O. Resende, J. D. Pena, S. S. Sung, G. R. Segundo and E. A. Taketomi (2011). "Serum and salivary IgE, IgA, and IgG4 antibodies to Dermatophagoides pteronyssinus and its major allergens, Der p1 and Der p2, in allergic and nonallergic children." Clin Dev Immunol **2011**: 302739, <https://doi.org/10.1155/2011/302739>, PMID:22007250 PMCID:PMC3189464.

Miyashita, M., T. Shimada, H. Miyagawa and M. Akamatsu (2005). "Surface plasmon resonance-based immunoassay for 17beta-estradiol and its application to the measurement of estrogen receptor-binding activity." Anal Bioanal Chem **381**(3): 667-673, <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2952-z>, PMID:15662513.

Mohanty, S. and E. Kougiannos (2006). Biosensors: A Tutorial Review., IEEE Potentials, **25**, no. 2, pp. 35-40, March-April 2006, <https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009>

Morgan, M. S., L. G. Arlian and E. Fernandez-Caldas (1996). "Cross-allergenicity of the house dust mites Euroglyphus maynei and Blomia tropicalis." Ann Allergy Asthma Immunol **77**(5): 386-392, [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)63337-6](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)63337-6).

Mould, A. W., K. I. Matthaei, I. G. Young and P. S. Foster (1997). "Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice." J Clin Invest **99**(5): 1064-1071, <https://doi.org/10.1172/JCI119234>, PMID:9062365 PMCID:PMC507915.

- Munir, A. K., B. Bjorksten, R. Einarsson, A. Ekstrand-Tobin, C. Moller, A. Warner and N. I. Kjellman (1995). "Mite allergens in relation to home conditions and sensitization of asthmatic children from three climatic regions." *Allergy* **50**(1): 55-64, <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1995.tb02483.x>, PMID:7741189.
- Murphy, L. (2006). "Biosensors and bioelectrochemistry." *Curr Opin Chem Biol* **10**(2): 177-184, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.023>, PMID:16516536.
- Murphy, P. B. and A. R. Atwater (2018). Dermatitis, Allergic Contact. *StatPearls*. Treasure Island (FL), Murphy PB, Atwater AR, Mueller M. Allergic Contact Dermatitis. [Updated 2020 Nov 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532866/>.
- Nadchatram, M. (2005). "House dust mites, our intimate associates." *Trop Biomed* **22**(1): 23-37, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16880751/>, PMID: 16880751.
- Naik, M. T., C. F. Chang, I. C. Kuo, C. C. Kung, F. C. Yi, K. Y. Chua and T. H. Huang (2008). "Roles of structure and structural dynamics in the antibody recognition of the allergen proteins: an NMR study on *Blomia tropicalis* major allergen." *Structure* **16**(1): 125-136, <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.10.022>, PMID:18184590.
- Nambiar, S. and J. T. Yeow (2011). "Conductive polymer-based sensors for biomedical applications." *Biosens Bioelectron* **26**(5): 1825-1832, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.046>, PMID:21030240.
- Nelson, H. S. (2018). "Immunotherapy for house-dust mite allergy." *Allergy Asthma Proc* **39**(4): 264-272, <https://doi.org/10.2500/aap.2018.39.4145>, PMID:30095391.
- Nevin, A., I. Osticioli, D. Anglos, A. Burnstock, S. Cather and E. Castellucci (2007). "Raman spectra of proteinaceous materials used in paintings: a multivariate analytical approach for classification and identification." *Anal Chem* **79**(16): 6143-6151, <https://doi.org/10.1021/ac070373j>, PMID:17620009.
- Nouri-Aria, K. T. (2009). "Foxp3 expressing regulatory T-cells in allergic disease." *Adv Exp Med Biol* **665**: 180-194, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1599-3_14, PMID:20429425.
- O'Neil, S. E., T. K. Heinrich, B. J. Hales, L. A. Hazell, D. C. Holt, K. Fischer and W. R. Thomas (2006). "The chitinase allergens Der p 15 and Der p 18 from *Dermatophagoides pteronyssinus*." *Clin Exp Allergy* **36**(6): 831-839, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02497.x>, PMID:16776685.
- Oboki, K., T. Ohno, H. Saito and S. Nakae (2008). "Th17 and allergy." *Allergol Int* **57**(2): 121-134, <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-07-160>, PMID:18427165.
- Ozaki, Y., A. Mizuno, K. Itoh and K. Iriyama (1987). "Inter- and intramolecular disulfide bond formation and related structural changes in the lens proteins. A Raman spectroscopic study in vivo of lens aging." *J Biol Chem* **262**(32): 15545-15551, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47760-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47760-5).

Ozdemir, C., U. Kucuksezer, M. Akdis and C. Akdis (2016). Mechanisms of Aeroallergen Immunotherapy. Immunology and Allergy Clinics of North America, **36**, Issue 1, Pages 71-86, ISSN 0889-8561, ISBN 9780323416948, <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.08.003>, PMid:26617228.

Paixao, T. R., D. Lowinsohn and M. Bertotti (2006). "Use of an electrochemically etched platinum microelectrode for ascorbic acid mapping in oranges." J Agric Food Chem **54**(8): 3072-3077, <https://doi.org/10.1021/jf052874g>, PMid:16608233.

Palyvos, N. E., N. G. Emmanouel and C. J. Saitanis (2008). "Mites associated with stored products in Greece." Exp Appl Acarol **44**(3): 213-226, <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9145-y>, PMid:18379887.

Pauly, D., P. A. Chacana, E. G. Calzado, B. Brembs and R. Schade (2011). "IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation." J Vis Exp(51), <https://doi.org/10.3791/3084>, PMid:21559009 PMCID:PMC3197133.

Pawankar, R., G. W. Canonica, S. T. Holgate and R. F. Lockey (2012). "Allergic diseases and asthma: a major global health concern." Curr Opin Allergy Clin Immunol **12**(1): 39-41, <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32834ec13b>, PMid:22157151.

Peters, R. L., J. J. Koplin, L. C. Gurrin, S. C. Dharmage, M. Wake, A. L. Ponsonby, M. L. K. Tang, A. J. Lowe, M. Matheson, T. Dwyer, K. J. Allen and S. HealthNuts (2017). "The prevalence of food allergy and other allergic diseases in early childhood in a population-based study: HealthNuts age 4-year follow-up." J Allergy Clin Immunol **140**(1): 145-153 e148, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.02.019>, PMid:28514997.

Pinart, M., R. Albang, D. Maier, E. Duran-Tauleria, G. Mena, E. Gimeno-Santos, I. Sola, J. Garcia-Aymerich, S. Guerra, R. T. Stein, M. Benet, K. H. Carlsen, M. Herr, B. Jacquemin, I. Momas, I. Pin, F. Ranciere, H. A. Smit, R. Varraso, X. Bonfill, T. Keil, J. Bousquet and J. M. Anto (2015). "Systematic Review on the Definition of Allergic Diseases in Children: The MeDALL Study." Int Arch Allergy Immunol **168**(2): 110-121, <https://doi.org/10.1159/000442414>, PMid:26657241.

Platts-Mills, T. A. (2003). "Allergen avoidance in the treatment of asthma and rhinitis." N Engl J Med **349**(3): 207-208, <https://doi.org/10.1056/NEJMp030082>, PMid:12867602.

Platts-Mills, T. A., D. Vervloet, W. R. Thomas, R. C. Aalberse and M. D. Chapman (1997). "Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop." J Allergy Clin Immunol **100**(6 Pt 1): S2-24, [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70292-6](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70292-6).

Platts-Mills, T. A. E. and S. P. Commins (2013). "Emerging antigens involved in allergic responses." Current Opinion in Immunology **25**(6): 769-774, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.09.002>, PMid:24095162 PMCID:PMC3984453.

Platts-Mills, T. A. E. and J. A. Woodfolk (2011). "Allergens and their role in the allergic immune response." *Immunological Reviews* **242**(1): 51-68, <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01021.x>, PMID:21682738.

Pomes, A., J. M. Davies, G. Gadermaier, C. Hilger, T. Holzhauser, J. Lidholm, A. L. Lopata, G. A. Mueller, A. Nandy, C. Radauer, S. K. Chan, U. Jappe, J. Kleine-Tebbe, W. R. Thomas, M. D. Chapman, M. van Hage, R. van Ree, S. Vieths, M. Raulf, R. E. Goodman and W. I. A. N. Sub-Committee (2018). "WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language." *Mol Immunol* **100**: 3-13, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.003>, PMID:29625844 PMCID:PMC6019191.

Prussin, C. and D. D. Metcalfe (2006). "5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." *J Allergy Clin Immunol* **117**(2 Suppl Mini-Primer): S450-456, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.11.016>, PMID:16455345.

Rad, H. and A. Hamzezadeh (2008). Allergic disease in 6- 7-year-old schoolchildren in Urmia, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J.* **14**(5):1044-53, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19161076/>, PMID: 19161076.

Rahaman, M. S. and M. D. Morris (1976). "Determination of adrenaline and noradrenaline by resonance Raman spectrometry." *Talanta* **23**(1): 65-66., [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(76\)80016-1](https://doi.org/10.1016/0039-9140(76)80016-1).

Raman, C. V. and K. S. Krishnan (1928). "A New Type of Secondary Radiation." *Nature* **121**: 501, <https://doi.org/10.1038/121501c0>.

Ramos, J., N. Cheong, B. w. Lee, K. Yan Chua, C. Nge, L. Wah and C. K Yan (2002). cDNA Cloning and Expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* Allergen Homologous to Paramyosin., *Int Arch Allergy Immunol* **126**:286-293. <https://doi.org/10.1159/000049525>, PMID:11815735.

Raulf, M., K. C. Bergmann, S. Kull, I. Sander, C. Hilger, T. Bruning, U. Jappe, H. Musken, A. Sperl, S. Vrtala, E. Zahradnik and L. Klimek (2015). "Mites and other indoor allergens - from exposure to sensitization and treatment." *Allergo J Int* **24**(3): 68-80, <https://doi.org/10.1007/s40629-015-0049-1>, PMID:26120549 PMCID:PMC4479455.

Rodrigues, R. M., M. C. Sopenete, D. A. Silva, J. P. Cunha-Junior, E. A. Taketomi and J. M. Costa-Cruz (2004). "Strongyloides ratti antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**(1): 89-93, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000100016>, PMID:15057354.

Rodriguez-Perea, A. L., E. D. Arcia, C. M. Rueda and P. A. Velilla (2016). "Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents." *Clin Exp Immunol* **185**(3): 281-291, <https://doi.org/10.1111/cei.12804>, PMID:27124481 PMCID:PMC4991523.

Ronkainen, N., H. Brian Halsall and W. R Heineman (2010). "Electrochemical biosensors", Chem. Soc. Rev., **39**, 1747-1763, <https://doi.org/10.1039/b714449k>, PMid:20419217.

Rotariu, L., F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault and C. Bala (2016). "Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective", TrAC Trends in Analytical Chemistry, **79**, 80-87, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.017>

Sanchez-Borges, M. and E. Fernandez-Caldas (2015). "Hidden allergens and oral mite anaphylaxis: the pancake syndrome revisited." Curr Opin Allergy Clin Immunol **15**(4): 337-343, <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000175>, PMid:26110684.

Sanchez-Borges, M., R. Suarez-Chacon, A. Capriles-Hulett, F. Caballero-Fonseca, V. Iraola and E. Fernandez-Caldas (2009). "Pancake syndrome (oral mite anaphylaxis)." World Allergy Organ J **2**(5): 91-96, <https://doi.org/10.1186/1939-4551-2-5-91>, <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3181a0db50>, PMid:23283016
PMCID:PMC3651046.

Santos da Silva, E., C. Asam, P. Lackner, H. Hofer, M. Wallner, C. Silva Pinheiro, N. M. Alcantara-Neves and F. Ferreira (2017). "Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules." Int Arch Allergy Immunol **172**(4): 203-214, <https://doi.org/10.1159/000464325>, PMid:28456805 PMCID:PMC5472214.

Sarmiento, E. U., B. R. Espiritu, G. J. Gleich and L. L. Thomas (1995). "IL-3, IL-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiate basophil mediator release stimulated by eosinophil granule major basic protein." J Immunol **155**(4): 2211-2221, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7543541/>. PMID: 7543541.

Sassolas, A., L. J. Blum and B. D. Leca-Bouvier (2012). "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors." Biotechnol Adv **30**(3): 489-511, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>, PMid:21951558.

Schwarzkopf, C., C. Staak, I. Behn and M. Erhard (2001). Immunisation. Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY-Technology. R. Schade, I. Behn, M. Erhard, A. Hlinak and C. Staak. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 25-64, https://doi.org/10.1007/978-3-662-04488-9_3.

Segundo, G. R., F. A. Gomes, K. P. Fernandes, R. Alves, D. A. Silva and E. A. Taketomi (2009). "Local cytokines and clinical symptoms in children with allergic rhinitis after different treatments." Biologics **3**: 469-474, <https://doi.org/10.2147/BTT.S7011>, PMid:19851472.

Sheppard, N. (2006). The Historical Development of Experimental Techniques in Vibrational Spectroscopy. Handbook of Vibrational Spectroscopy. e. J. M. C. a. P. R. Griffiths, <https://doi.org/10.1002/0470027320.s0101>.

Siman, I. L., L. M. de Aquino, L. H. Ynoue, J. S. Miranda, A. C. Pajuaba, J. P. Cunha-Junior, D. A. Silva and E. A. Taketomi (2013). "Allergen-specific IgG antibodies

purified from mite-allergic patients sera block the IgE recognition of Dermatophagoides pteronyssinus antigens: an in vitro study." Clin Dev Immunol **2013**: 657424, <https://doi.org/10.1155/2013/657424>, PMid:24069042 PMCID:PMC3771262.

Simons, F. E. R. (1994). "Ancestors of Allergy." New York, NY: Global Medical Communications Ltd. ISBN 13: 9780963938862, ISBN 10: 096393886x, Hardcover; New York: Global Medical Communications, 1994; ISBN-13: 978-0963938862. (Bergmann K-C, Ring J (eds): History of Allergy. Chem Immunol Allergy. Basel, Karger, 2014, vol 100, pp 54-61 <https://doi.org/10.1159/000358503>).

Simpson, A., R. Green, A. Custovic, A. Woodcock, L. K. Arruda and M. D. Chapman (2003). "Skin test reactivity to natural and recombinant Blomia and Dermatophagoides spp. allergens among mite allergic patients in the UK." Allergy **58**(1): 53-56, <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.23354.x>, PMid:12580807.

Singh Dr, R. (2002). C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect., Phys. perspect. **4**, 399–420, <https://doi.org/10.1007/s000160200002>.

Svendsen, L., A. Crowley, L. H. Ostergaard, G. Stodulski and J. Hau (1995). "Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk." Lab Anim Sci **45**(1): 89-93, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7752622/>, PMID: 7752622.

Tanaka, M. and R. J. Young (2006). "Review Polarised Raman spectroscopy for the study of molecular orientation distributions in polymers." Journal of Materials Science **41**(3): 963-991, <https://doi.org/10.1007/s10853-006-6595-7>.

Tansil, N. C. and Z. Gao (2006). "Nanoparticles in biomolecular detection." Nano Today **1**(1): 28-37, [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(06\)70020-2](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(06)70020-2).

Thevenot, D. R., K. Toth, R. A. Durst and G. S. Wilson (2001). "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification." Biosens Bioelectron **16**(1-2): 121-131, [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4).

Thomas, W. R., B. J. Hales and W. A. Smith (2010). "House dust mite allergens in asthma and allergy." Trends Mol Med **16**(7): 321-328, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.04.008>, PMid:20605742.

Thomas, W. R. and W. Smith (1998). "House-dust-mite allergens." Allergy **53**(9): 821-832, <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb03987.x>, PMid:9788682.

Thomsen, S. F. (2015). "Epidemiology and natural history of atopic diseases." Eur Clin Respir J **2**, <https://doi.org/10.3402/ecrj.v2.24642>, PMid:26557262 PMCID:PMC4629767.

Traidl-Hoffmann, C., T. Jakob and H. Behrendt (2009). "Determinants of allergenicity." J Allergy Clin Immunol **123**(3): 558-566, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.003>, PMid:19152966.

Turiel, E. and A. Martin-Esteban (2010). "Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review." *Anal Chim Acta* **668**(2): 87-99, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.019>, PMID:20493285.

Turkeltaub, P. C. and P. J. Gergen (1989). "The risk of adverse reactions from percutaneous prick-puncture allergen skin testing, venipuncture, and body measurements: data from the second National Health and Nutrition Examination Survey 1976-80 (NHANES II)." *J Allergy Clin Immunol* **84**(6 Pt 1): 886-890, [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(89\)90384-9](https://doi.org/10.1016/0091-6749(89)90384-9).

Ulambayar, B., S. H. Lee, E. M. Yang, Y. M. Ye and H. S. Park (2019). "Association Between Epithelial Cytokines and Clinical Phenotypes of Elderly Asthma." *Allergy Asthma Immunol Res* **11**(1): 79-89, <https://doi.org/10.4168/aair.2019.11.1.79>, PMID:30479079 PMCID:PMC6267184.

Valenta, R. and R. L. Coffman (2011). "Current strategies for allergen-specific immunotherapy at its centenary." *Curr Top Microbiol Immunol* **352**: v-vi, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22145167/>, PMID: 22145167.

Van Bronswijk, J. E. and A. W. de Cock (1974). "The genus *Blomia* Oudemans (Acari : Glycyphagidae). II. Comparison of its species." *Acarologia* **15**(3): 490-505, disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4446909/>, PMID: 4446909.

Vandenabeele, P. (2010). "Raman spectroscopy." *Anal Bioanal Chem* **397**(7): 2629-2630, <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3872-8>, PMID:20544181.

Vannella, K. M., T. R. Ramalingam, L. A. Borthwick, L. Barron, K. M. Hart, R. W. Thompson, K. N. Kindrachuk, A. W. Cheever, S. White, A. L. Budelsky, M. R. Comeau, D. E. Smith and T. A. Wynn (2016). "Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis." *Sci Transl Med* **8**(337): 337ra365, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf1938>, PMID:27147589.

Varney, V. A., M. R. Jacobson, R. M. Sudderick, D. S. Robinson, A. M. Irani, L. B. Schwartz, I. S. Mackay, A. B. Kay and S. R. Durham (1992). "Immunohistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis. Identification of activated T lymphocytes, eosinophils, and neutrophils." *Am Rev Respir Dis* **146**(1): 170-176, <https://doi.org/10.1164/ajrccm/146.1.170>, PMID:1626799.

Vogel, P., S. M. Bosco and N. J. Ferla (2014). "Mites and the implications on human health." *Nutr Hosp* **31**(2): 944-951, PMID: 25617585, <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.7772>.

Wan, Y., Y. Su, X. Zhu, G. Liu and C. Fan (2013). "Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics." *Biosensors and Bioelectronics* **47**: 1-11, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.02.045>, PMID:23542064.

Wang, J., D. Lin, J. Lin, Y. Yu, Z. Huang, Y. Chen, J. Lin, S. Feng, B. Li, N. Liu and R. Chen (2014). "Label-free detection of serum proteins using surface-enhanced

Raman spectroscopy for colorectal cancer screening." *J Biomed Opt* **19**(8): 087003, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.8.087003>, PMID:25138208.

Warr, G. W., K. E. Magor and D. A. Higgins (1995). "IgY: clues to the origins of modern antibodies." *Immunol Today* **16**(8): 392-398, [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5).

Watson, B. and G. M. Gauvreau (2014). "Thymic stromal lymphopoietin: a central regulator of allergic asthma." *Expert Opin Ther Targets* **18**(7): 771-785, <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.915314>, PMID:24930783.

Williams, P. B., S. Ahlstedt, J. H. Barnes, L. Soderstrom and J. Portnoy (2003). "Are our impressions of allergy test performances correct?" *Ann Allergy Asthma Immunol* **91**(1): 26-33 [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62054-6](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62054-6).

Wold, S., K. Esbensen and P. Geladi (1987). "Principal component analysis." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2**(1): 37-52, [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9).

Wu, J., F. Yang, Z. Liu, G. Wu and P. Ran (2009). "The alimentary canal of *Blomia tropicalis* (Acari: Astigmata: Echymopodidae): the application of three-dimensional reconstruction technology." *Exp Appl Acarol* **47**(3): 215-224, <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9208-0>, PMID:19015940.

Xu, Y., X. Li, L. Jin, Y. Zhen, Y. Lu, S. Li, J. You and L. Wang (2011). "Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review." *Biotechnol Adv* **29**(6): 860-868, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.003>, PMID:21787857
PMCID:PMC7126572.

Yan Chua, K., N. Cheong, K. I-Chun, B. w. Lee, F. Cheng Yi, C.-H. Huang and L. Nyin Liew (2007). The *Blomia tropicalis* Allergens., *Protein & Peptide Letters* **14**: 325. <https://doi.org/10.2174/092986607780363862>, PMID:17504089.

Ying, S., B. O'Connor, J. Ratoff, Q. Meng, K. Mallett, D. Cousins, D. Robinson, G. Zhang, J. Zhao, T. H. Lee and C. Corrigan (2005). "Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity." *J Immunol* **174**(12): 8183-8190, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.12.8183>, PMID:15944327.

Zakzuk, J., I. Benedetti, E. Fernandez-Caldas and L. Caraballo (2014). "The influence of chitin on the immune response to the house dust mite allergen Blo T 12." *Int Arch Allergy Immunol* **163**(2): 119-129, <https://doi.org/10.1159/000356482>, PMID:24335274.

Zakzuk, J., S. Jiménez, N. Cheong, L. Puerta, B. w. Lee, K. Y Chua and L. Caraballo (2009). Immunological characterization of a Blo t 12 isoallergen., *Clin Exp Allergy*. **39**(4):608-16, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03193.x>, PMID: 19226278.

Zannou, I. D., H. O. Adebo, E. Zannou and K. Hell (2013). "Mites associated with stored grain commodities in Benin, West Africa." Exp Appl Acarol **61**(4): 449-470, <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9714-6>, PMid:23793792.

Capítulo II

Novel Raman-SERS Spectroscopy with Magnetic
Microparticles to Identify Atopic Patients

*Este capítulo está formatado de acordo com as normas da revista *Biosensors and Bioelectronics* com algumas modificações para a Dissertação.

Novel Magnetic Microparticle-based SERS to Identify Atopic Allergic Patients

Claudiney de Freitas Alves¹, Mario Machado Martins¹, Jair Pereira Cunha-Júnior², Waldomiro Borges Neto³, Lucas Gustavo da Costa³, Ernesto Akio Taketomi², Renata P. Alves-Balvedi¹, Robinson Sabino-Silva⁴, Luiz Ricardo Goulart¹

¹Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil.

²Laboratory of Allergy and Clinical Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

³Laboratory of Chemometry of Triangulo Mineiro, Institute of Chemistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil.

⁴Laboratory of Integrative Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

Abstract

Raman spectroscopy is a non-destructive photonic technology that requires very small sample size. It has been used to detect diseases and specific molecules in laboratorial conditions, but no Raman sensors have been successfully applied in the field or in routine tests. Currently, all Raman strategies demand specific preparations for photonic readouts, and the technology suffers with sensitivity problems due to the great environmental influence and requirement of special conditions for detection. In order to improve Raman detection, we have used magnetic microparticles not only to enrich the target, but also to use it as an enhancer for SERS (Surface Enhancement Raman Spectroscopy) detection. Our aim was to provide a proof-of-concept to identify atopic allergic patients with a SERS strategy using anti-IgE bound to magnetic beads for IgE capture under the exposure of broad and specific allergens. Briefly, our novel method was able to differentiate atopic from non-atopic patients, and may become an important field tool for allergy diagnosis in the near future.

Keywords: Raman-SERS Spectroscopy, Allergic, Biosensor, Atopic patients

Introduction

The world population is exposed every day to thousands of harmless allergens found in various sources including animals and plants (Hauser, Roulias et al. 2010). However, in genetically predisposed individuals (atopy), the immune system reacts inappropriately and these allergens provoke immune reactions mediated by IgE (Siman, de Aquino et al. 2013, Thomsen 2015, McKenna, Asam et al. 2016). Allergic diseases, such as asthma and rhinitis, are a global health problem and often result from failure of the immune tolerance against natural exposure to various environmental allergens (Thomas, Hales et al. 2010, Thomsen 2015). Among allergens, house dust mites (HDM) stand out in the role of inducing allergic respiratory diseases in the form of aero-allergens (Lei, Boinapally et al. 2015). Numbers of the World Allergy Organization (WAO) indicate that 30% to 40% of the world population suffers from allergic diseases and incidence worldwide is reaching epidemic proportions (Pawankar, Canonica et al. 2012). In this way, efforts to improve immunological assays are underway to increase the detection limit using other methodologies for the acquisition of results such as plasmon resonance (Miyashita, Shimada et al. 2005), quantum dots (Goldman, Medintz et al. 2006) and Raman spectroscopy (Goldman, Medintz et al. 2006, Artemyev, Zakharov et al. 2016).

Raman spectroscopy is a technology used in physics and chemistry based on the vibration of molecules by laser sources, which has been gaining space in biomedicine. This technique is able to provide information about the chemical composition of a sample through true biochemical imprints (Tanaka and Young 2006). Each molecule has a unique "fingerprint" of Raman peaks at well-defined frequencies. Biomolecules contain a variety of molecular bonds (for example, C-H, C = C, O-H, aromatic ring) which are all excitable (Downes and Elfick 2010). The technique is sensitive enough to detect changes in the chemical composition of samples and has been used to identify and differentiate various pathogenic microorganisms found in bloodstream infections (Choo-Smith, Edwards et al. 2002) to discriminate healthy tissue from diseased tissue through several chemical changes resulting from the disease (Huang, McWilliams et al. 2003) to diagnose lesions of *ex vivo* breast cancer with 94% sensitivity and 96% specificity (Haka, Shafer-Peltier et al. 2005) and the study of blood proteins (Artemyev, Zakharov et al. 2016). Raman spectroscopy provides information on the structure of the sample without damaging it (non-invasive / non-destructive mode) (Brauchle and Schenke-Layland 2013).

In order to differentiate and categorize group samples, PCA (principal component analysis) and HCA (hierarchical component analysis) analyses have been used using Raman shift peaks among individuals. The aim is to reduce the dimensionality of the data set, but preserving the largest possible amount of information (variance). This reduction is done by calculating new orthogonal variables between them, the principal components (PC), thus, a matrix of data X is decomposed into two smaller matrices considering the scores (S), weights (W), and the residual matrix (E), which refers to the non-modeled part of the original data. PCs are formed based on the criterion of maximum variance, thus, the first PCA determines the largest variance of the original data possible, and the subsequent PCAs, the largest variance not captured by the previous PCA (Wold, Esbensen et al. 1987). The second PCA consists of a process of decreasing the original data matrix in one dimension. This analysis calculates the distances between all samples, using the Euclidean distances, and the two samples with greater proximity (similarity) are united, and then

seen by the model as one, hence the decrease in the initial dimensionality. As a result, the HCA plots a graph in the form of a dendrogram, where the x-axis corresponds to the degree of similarity, (the nearer the origin the connection is, the more similar the linked samples are), and the y-axis represents the samples (Granato, Santos et al. 2018).

Our goal in this investigation was to study the spectral characteristics of the IgE and antigens of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) and *Blomia tropicalis* (Blo t 5) associated with allergic responses using a magnetic capturing system for surface enhancement Raman spectroscopy (SERS), which is discussed herein.

Materials and Methods

Sample and Skin Prick Test (SPT).

Five patients with age range from 18 to 60, with clinical history of allergy (atopic group), were recruited by the Laboratory of Allergy and Clinical Immunology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil. As inclusion criteria, patients presented positive skin prick test (SPT) to at least one allergen extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) from a panel of standardized aeroallergens (FDA Allergenic Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The exclusion criteria were positive results for the rheumatoid factor assay (Bio Látex FR, Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brazil), the use of anti-histamines in the previous week to the skin test, and previous or current immunotherapy. Five healthy matched subjects (18 to 60 years old) were selected based on the absence of clinical history or symptoms of allergic rhinitis, and negative SPT to a panel of standardized aeroallergens (non-atopic group). In parallel, blood samples were collected from all individuals, and the serum was stored at -20°C until serological assays. The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia (approval number 322/08), and written informed consents were obtained from all participants.

Measurement of Dpt-Specific IgE

All serum samples were assessed by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring IgE levels to Dpt with modifications (Miranda, Silva et al. 2011). Briefly, microtiter plates were coated with Dpt extract (2 µg/well; Hollister-Stier Laboratories, Spokane, WA, USA), blocked with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) containing 0.05% Tween 20 and 1% bovine serum albumin (PBS-T-BSA), and then incubated with serum samples diluted 1:2 for 2 hours at 37°C. After washing, plates were incubated with biotinylated secondary antibodies as anti-human IgE (1:1.000; Kirkegaard and Perry Laboratories Inc. (KPL), Gaithersburg, MD, USA), for 1 hour at 37°C and subsequently with streptavidin peroxidase (1:1.000; Sigma). The assay was developed with ABTS-peroxidase substrate system (KPL), and optical density (OD) values were determined at 405 nm. Antibody levels were expressed as ELISA index (EI) according to the following formula: $EI = OD \text{ test sample} / \text{cutoff}$, where the cutoff was established as the mean OD value of negative control sera plus 3 standard deviations. EI values >1.2 were considered to be positive in order to exclude borderline reactivity values close to EI = 1.0 (Rodrigues, Sopenete et al. 2004).

Sample Preparation and Acquisition of Raman Spectra

All samples were submitted to the following procedure for the acquisition of RAMAN spectra. Briefly, we assembled a system with 3-micron magnetic beads functionalized with streptavidin (B) as capturing system and SERS enhancer (Figure 1). In a polypropylene tube of, 2 μL of magnetic beads ($1:10^5$) and 2 μL of biotinylated anti-IgE ($1:10^6$; Kirkegaard and Perry Laboratories Inc. (KPL), Gaithersburg, MD, USA) were added and incubated for 30 minutes at room temperature. After this, 2 μL of patient sample ($1:10$) was added and incubated for 30 minutes at room temperature. After washing, the complex was diluted in phosphate buffer (PB) (2 $\mu\text{L}/998 \mu\text{L}$) and placed into an aluminum dish for RAMAN measurements. In another stage of the analysis, we have added and incubated the specific antigens: Der p 1 (D1) (0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, recombinant protein) and Blo t 5 (B5) (0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, recombinant protein) for 30 minutes at room temperature. All samples were analyzed in an aluminum dish after a 4-hour lyophilization.

Measurements were performed at room temperature using a Raman Systems R3000 spectrometer (Ocean Optics, Dunedin, FL) with a 785-nm laser diode, a spectral resolution of 8cm^{-1} , and a laser power of 90 mW. Measurements were made with a fiber-optic probe with a spacer that kept the laser distance x sample constant. Spectrum acquisition was performed in the dark. The acquisition time was set to 60 seconds and the average of three spectra was taken as the final measurement. The measurements were performed in the 200 to 1500 cm^{-1} spectral range, and the instrument was calibrated using the alcohol 70% curve every day before each round of measurements.

Data Analysis

The data acquired in RAMAN spectroscopy were corrected with the insertion of a baseline by the Origin® software (Version 9, Company, Local). Other parameters such as intensity, spectrum position and peaks were also determined with the Origin® 9 software. ELISA indexes were calculated using the GraphPad Prism® 6 software. The data were transported to MATLAB environment, version R2015a and processed using the PLS toolbox package 8.62. The analyzes were performed in two stages, A1 and A2, composed by the following groups in table1.

Table 1 - Description of groups used for PCA and HCA analysis		
Analyze	Group	Description
A1	01	BEADS + ANTI_IgE + NEGATIVE SERUM
	02	BEADS + ANTI_IgE + POSITIVE SERUM
A2	03	BEADS + ANTI_IgE + POSITIVE SERUM – DER P 1
	04	BEADS + ANTI_IgE + POSITIVE SERUM – BLO T 5

Results and Discussions

Immunological responses of IgE to allergens have not been investigated by RAMAN spectroscopy, a vibrational technique that consists of capturing a signal generated by laser light that is focused on a sample. Sample molecules generate inelastic dispersion of photons with frequencies and intensities that are characteristics of specific chemical groups, resulting in a spectrum that is similar to a fingerprint for the molecular composition (Matthews, Jirasek et al. 2011).

Firstly, we have evaluated the Raman spectra for different sample states: liquid (not shown) and lyophilized. Lyophilization was chosen for Raman readouts because it showed better peaks in the samples. Then we have registered the Raman signals and spectral characteristics for allergens and immunoglobulin E from samples of atopic and non-atopic patients, as shown in Figure 2. We tested whether the presence of magnetic beads were able to enhance the Raman scattering (SERS, surface-enhanced Raman spectroscopy) (Figures 2A and 2B), which led us to demonstrate an important SERS response with the magnetic microparticles. All procedures were then carried out by SERS.

Figure 2 showed that the main Raman spectra peaks profiles remained virtually unchanged for the serum IgE. The Raman spectrum of a sample is a group of bands corresponding to transformation and stretching vibrations of the carbon bonds with other elements (Baas 1995, Artemyev, Zakharov et al. 2016). We were able to demonstrate that the IgE Raman spectrum profile was characterized by bands 562, 889, 940, 1068 and 1133 cm^{-1} . Alongside with these bands, we have also observed other bands that were characterized according to their vibration modes: 232 cm^{-1} (Xmetal-O), 407 cm^{-1} (S-C \equiv N bend), 562 cm^{-1} (-CO₂ rocking) 889, 940 cm^{-1} (stretching vibration mode of CC bond), 940 cm^{-1} (C—C stretching or tyrosine), 1068 cm^{-1} (O-P-O symmetric stretch or Carbonate CO₃), and 1133 cm^{-1} (C-CT stretch) as shown elsewhere (Nevin, Osticioli et al. 2007, Lin, Chen et al. 2011, Dingari, Horowitz et al. 2012, Wang, Lin et al. 2014). The bands within the 500–1200 cm^{-1} range presented higher Raman peak intensities while bands within the 200–500 cm^{-1} range presented approximately similar intensity and profiles with few exceptions. The Raman spectra of immunoglobulin IgEs and their specificity to allergens were analyzed as demonstrated in Figure 3. We have observed that the most variable band in the serum of atopic and non-atopic was the 940 cm^{-1} , which corresponds to the third peak from left to right.

Using PCA and HCA analysis to differentiate the peak intensity, we are able to separate the patients atopic and non-atopic in two groups, as showed in figure 3, 4 and 5. The PCA model was constructed using mean-center as pre-processing and 2 PC's, obtaining 99.27% of variance explained and indicated the optimal separation of the two groups (Figure 4). The HCA model was constructed using mean-center as pre-processing, Ward's Method as a link and Euclidean distance (Figure 5). These data demonstrated correlation with results obtained by the ELISA index (EI) (Figure 6).

After these tests, the allergens Der p 1 and Blo t 5 were inserted into the system (Figures 2 and 7). These data demonstrated that the serum of atopic patients recognized antigens when exposed to them, as shown by significant changes in the peak intensity. However, this variation was not able to separate the positive serum samples exposed to Der p 1 and Blo t 5 antigens, as showed in Figure 7.

We used the HCA model, constructed using mean-center as pre-processing, Ward's Method as a binding and Euclidean distance, to evaluate whether we could separate the atopic samples when exposed to the different antigens. We cannot discard the possibility of having different IgEs with different binding affinities or that the individual has been previously exposed to the antigen and has a higher concentration of antibodies to it. And the exposure to a new antigen may produce a response of the antibodies from the first exposure. This fact, added to the possible cross-reactions that can happen (once the species are close), could explain the appearance of individuals from one group to another in the hierarchical groupings.

Analyzing data from the literature about the resemblance of mite species, it is interesting to note that the group 1 of antigens (Blo t 1 and Der p 1), both identified as cysteine-proteases, have high reactivity to IgE (80% a 90%) (Chua, Cheong et al. 2007). Simpson et al. found that 12 out of 19 UK patients, naturally exposed to *Dermatophagoides pteronyssinus* but not to *Blomia tropicalis*, had positive skin test responses to this mite. The authors concluded that there was an IgE-mediated cross-reaction between allergens produced by *D pteronyssinus* and *B tropicalis* (Simpson, Green et al. 2003). Arias-Irigoyen and colleagues suggest that it is possible that the patients were naturally exposed to a different storage mite species, which was responsible for the positive skin responses to *B tropicalis* (Arias-Irigoyen, Lombardero et al. 2007). The specificity and affinity of the antibodies should also be taken into account since these properties are closely linked to the immune response and the formation of the antigen-antibody complex.

Our results showed the possibility of using Raman-SERS spectroscopy method for identify patients with allergic diseases caused by house dust mite species by specifically investigating the IgE peaks and PCA analysis. Besides detecting IgE responses in atopic patients, we have also shown a proof-of-concept by using a low-cost optical Raman unit with enhanced detection by magnetic microparticles (SERS), simply by establishing a magnetic capturing system. The novel proposed method may provide great opportunities for other disease diagnostics aiming specific antigens. Collection of Raman scattering signals can be improved by using this special Raman-SERS strategy with special holders under magnetic field to facilitate and enhance detection.

Conclusions

A novel Raman-SERS spectroscopy was developed to detect the presence of specific immunoglobulin E during an allergic response by using a magnetic microparticle. This new strategy showed great potential and efficiency in the analysis of different responses to allergens of atopic patients in serum, but may be used in other body fluids. We have generated an analytical system to interpret the Raman shifts and variations found in patients and controls using mainly a PCA analysis between samples with and without antigens, which was able to differentiate atopic patients from non-atopic ones. Our new strategy opens great opportunities for simplified field SERS sensors.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian funding agencies, CNPq, CAPES and FAPEMIG, for providing financial support to the National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology - INCT-Teranano (CNPq/CAPES/FAPEMIG, Grant # CNPq-465669/2014-0 and FAPEMIG-CBB-APQ-03613-17).

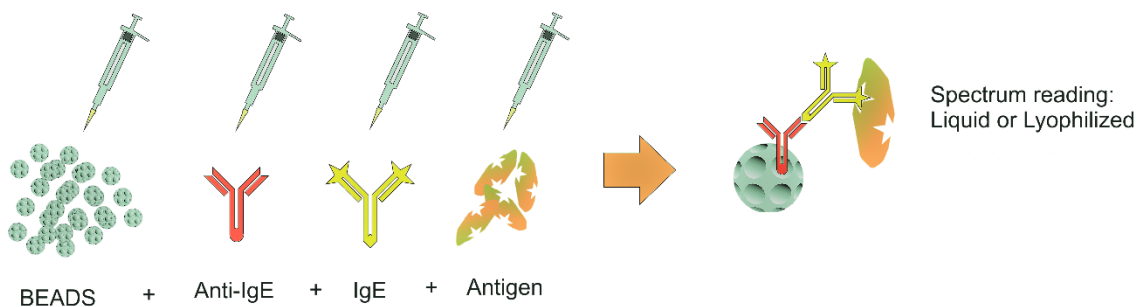


Figure 1: Schematic of sample preparation for RAMAM-SERS spectroscopy using magnetic microparticles.

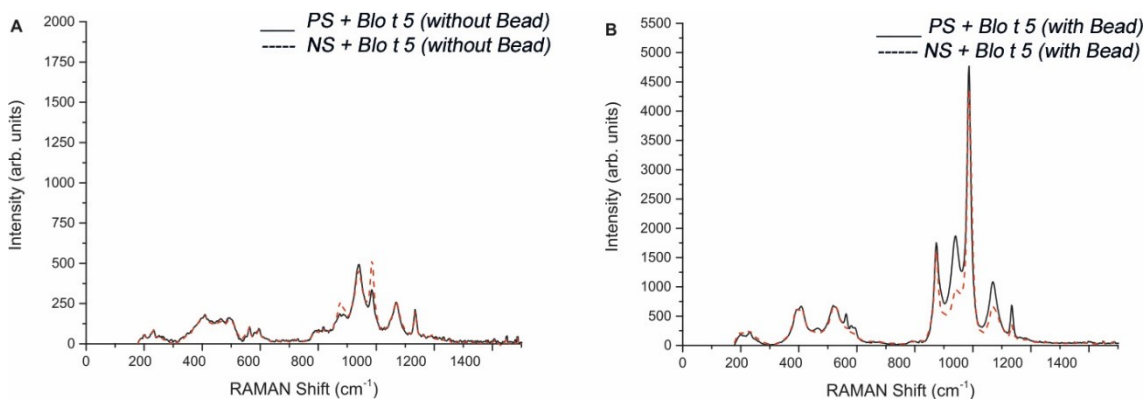


Figure 2: Raman spectroscopy of allergic response using Raman-SERS.. A - spectrum without beads; B – sample spectrum with beads coupling; All samples were lyophilized.

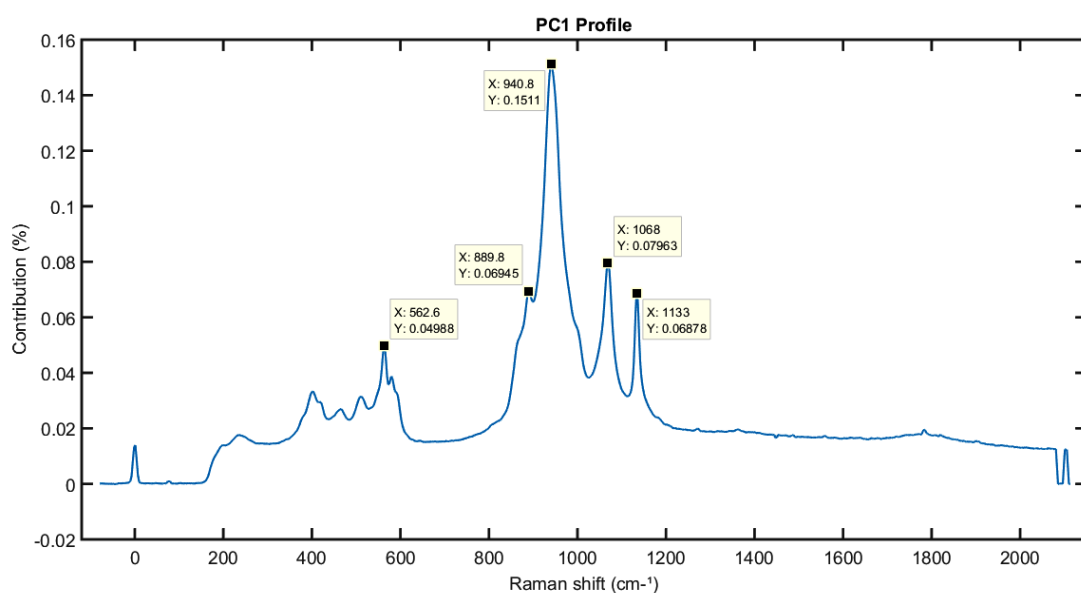


Figure 3: Principal peaks used to discriminate individuals using the Raman spectrum obtained from lyophilized samples.

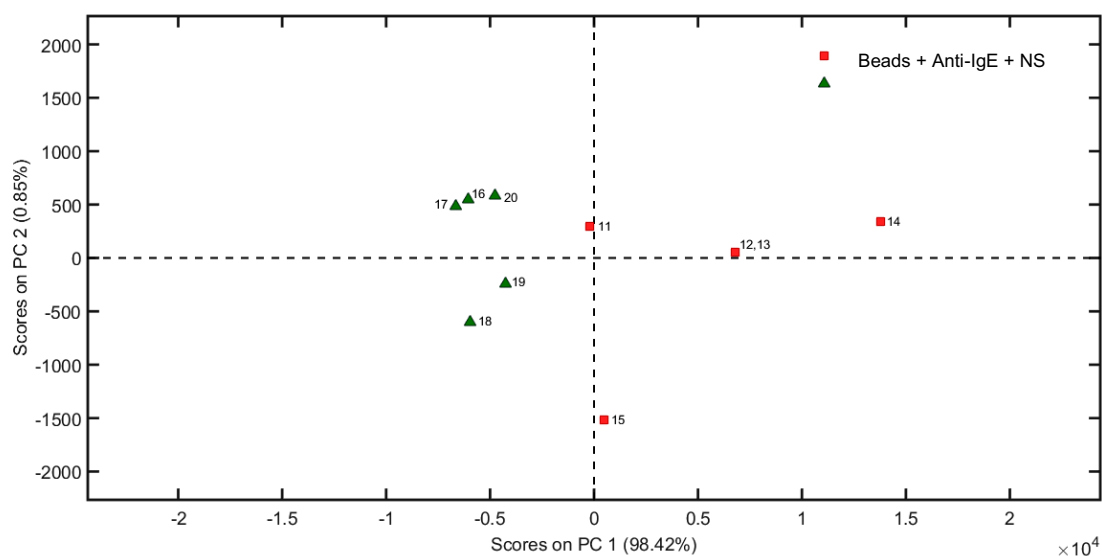


Figure 4: PCA analysis used to separate the samples into two groups: negative serum (NS) represented by red squares, and positive serum (PS) represented by green triangles.

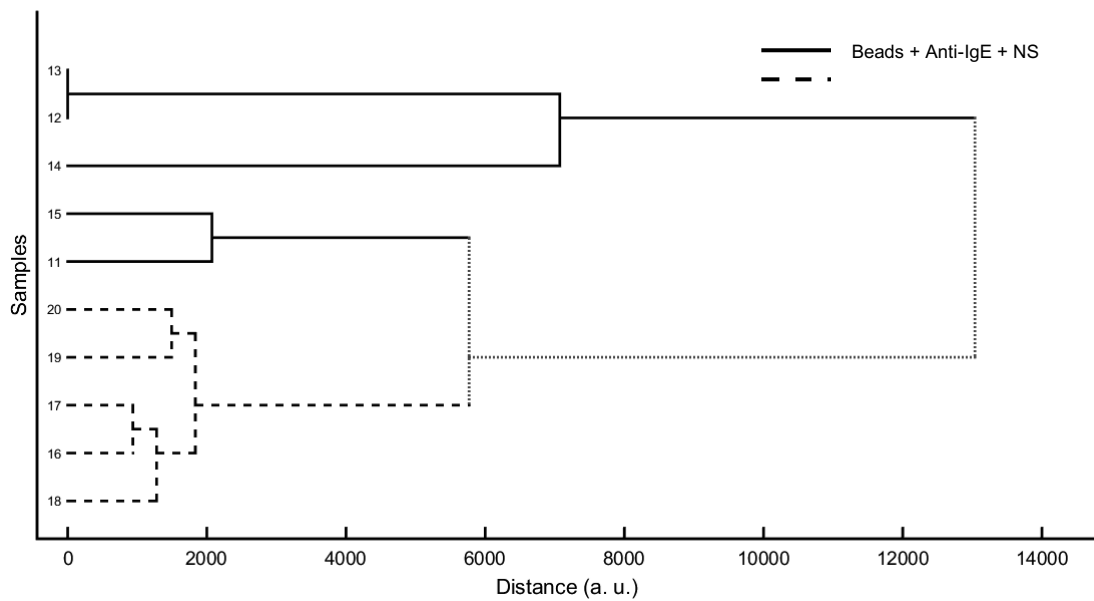


Figure 5: HCA analysis used to construct a dendrogram where the x-axis corresponds to the degree of similarity and the y-axis represents the samples. Line indicate negative serum (NS) and dotted line indicate positive serum (PS) samples.

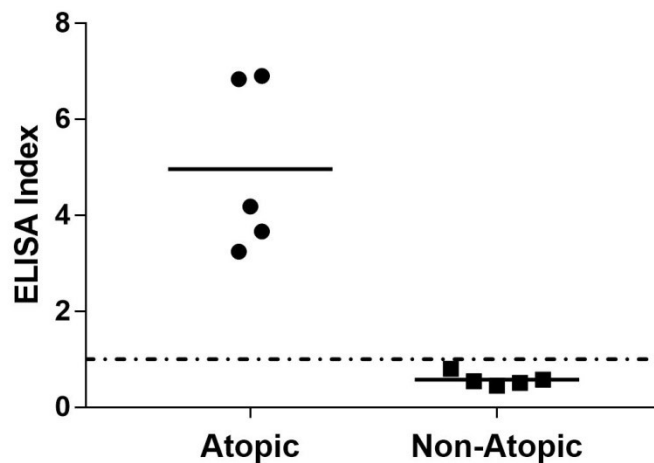


Figure 6: ELISA index for IgE – DPT. All samples were lyophilized. The circle corresponded to atopic and square to non-atopic individuals. The graph were made using GraphPad Prism software. The dotted line indicates the cut-off point (1.0).

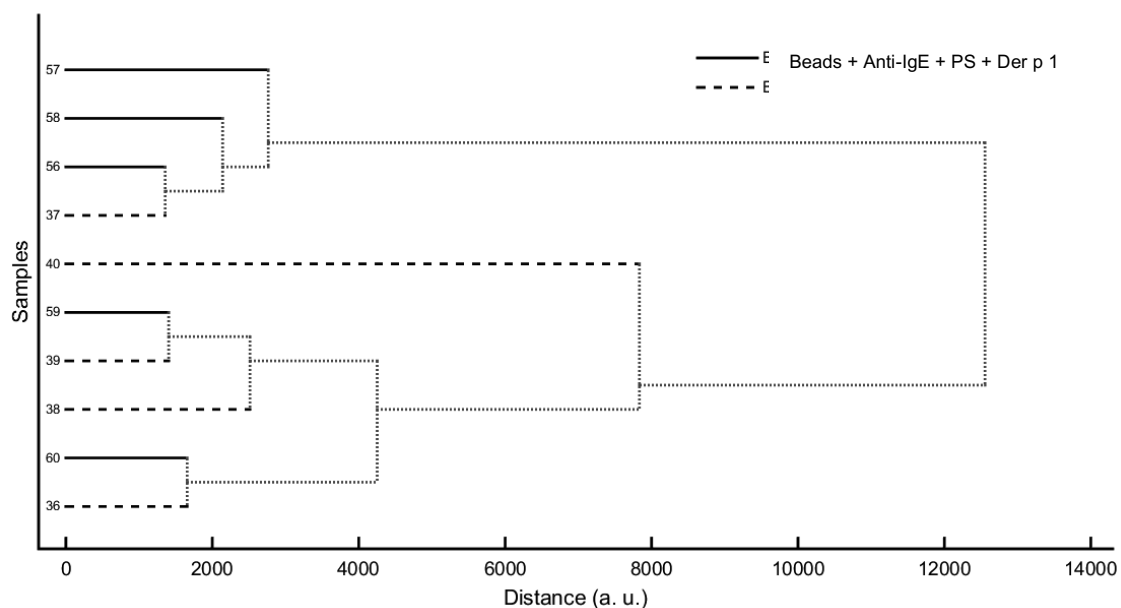


Figure 7: HCA analysis used to construct a dendrogram where the x-axis corresponds to the degree of similarity and the y-axis represents the samples. Line indicate serum positive (PS) for Der p 1 and dotted line indicate PS for Blo t 5.

References

1. Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;6(1):1. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-6-1>, PMid:20298513 PMCID:PMC2830198.
2. Siman IL, de Aquino LM, Ynoue LH, Miranda JS, Pajuaba AC, Cunha-Junior JP, et al. Allergen-specific IgG antibodies purified from mite-allergic patients sera block the IgE recognition of *Dermatophagoides pteronyssinus* antigens: an in vitro study. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:657424. <https://doi.org/10.1155/2013/657424>, PMid:24069042 PMCID:PMC3771262.
3. McKenna OE, Asam C, Araujo GR, Roulias A, Goulart LR, Ferreira F. How relevant is panallergen sensitization in the development of allergies? *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2016;27(6):560-8. <https://doi.org/10.1111/pai.12589>, PMid:27129102 PMCID:PMC5006871.
4. Thomsen SF. Epidemiology and natural history of atopic diseases. *European clinical respiratory journal*. 2015;2. <https://doi.org/10.3402/ecrj.v2.24642>, PMid:26557262 PMCID:PMC4629767.
5. Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. House dust mite allergens in asthma and allergy. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(7):321-8. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.04.008>, PMid:20605742.
6. Lei Y, Boinapally V, Zoltowska A, Adner M, Hellman L, Nilsson G. Vaccination against IL-33 Inhibits Airway Hyperresponsiveness and Inflammation in a House Dust Mite Model of Asthma. *PloS one*. 2015;10(7):e0133774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133774>, PMid:26214807 PMCID:PMC4516261.

7. Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF. Allergic diseases and asthma: a major global health concern. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2012;12(1):39-41. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32834ec13b>, PMID:22157151.
8. Miyashita M, Shimada T, Miyagawa H, Akamatsu M. Surface plasmon resonance-based immunoassay for 17beta-estradiol and its application to the measurement of estrogen receptor-binding activity. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005;381(3):667-73. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2952-z>, PMID:15662513.
9. Goldman ER, Medintz IL, Mattoussi H. Luminescent quantum dots in immunoassays. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2006;384(3):560-3. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0212-5>, PMID:16344927.
10. Artemyev DN, Zakharov VP, Davydkin IL, Khristoforova JA, Lykina AA, Konyukhov VN, et al. Measurement of human serum albumin concentration using Raman spectroscopy setup. *Optical and Quantum Electronics*. 2016;48(6):337. <https://doi.org/10.1007/s11082-016-0610-2>
11. Tanaka M, Young RJ. Review Polarised Raman spectroscopy for the study of molecular orientation distributions in polymers. *Journal of Materials Science*. 2006;41(3):963-91. <https://doi.org/10.1007/s10853-006-6595-7>
12. Downes A, Elfick A. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. *Sensors (Basel)*. 2010;10(3):1871-89. <https://doi.org/10.3390/s100301871>, PMID:21151763
PMCID:PMC3000600.
13. Choo-Smith LP, Edwards HG, Endtz HP, Kros JM, Heule F, Barr H, et al. Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation. *Biopolymers*. 2002;67(1):1-9. <https://doi.org/10.1002/bip.10064>, PMID:11842408.
14. Huang Z, McWilliams A, Lui H, McLean DI, Lam S, Zeng H. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *International journal of cancer*. 2003;107(6):1047-52. <https://doi.org/10.1002/ijc.11500>, PMID:14601068.
15. Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(35):12371-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501390102>, PMID:16116095 PMCID:PMC1194905.
16. Brauchle E, Schenke-Layland K. Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues. *Biotechnol J*. 2013;8(3):288-97. <https://doi.org/10.1002/biot.201200163>, PMID:23161832 PMCID:PMC3644878.
17. Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1987;2(1):37-52. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9).
18. Granato D, Santos JS, Escher GB, Ferreira BL, Maggio RM. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science & Technology*. 2018;72:83-90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.006>
19. Miranda DO, Silva DA, Fernandes JF, Queiros MG, Chiba HF, Ynoue LH, et al. Serum and salivary IgE, IgA, and IgG4 antibodies to Dermatophagoides pteronyssinus and its major allergens, Der p1 and Der p2, in allergic and nonallergic children. *Clinical & developmental immunology*. 2011;2011:302739. <https://doi.org/10.1155/2011/302739>, PMID:22007250 PMCID:PMC3189464.

20. Rodrigues RM, Sopelete MC, Silva DA, Cunha-Junior JP, Taketomi EA, Costa-Cruz JM. Strongyloides ratti antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):89-93. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000100016>, PMID:15057354.
21. Matthews Q, Jirasek A, Lum JJ, Brolo AG. Biochemical signatures of in vitro radiation response in human lung, breast and prostate tumour cells observed with Raman spectroscopy. *Physics in medicine and biology*. 2011;56(21):6839-55. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/56/21/006>, PMID:21971286.
22. Baas JMA. A Guide to the Complete Interpretation of Infrared Spectra of Organic Structures. N.P.G. Roeges. John Wiley, Chichester, 1994. 340 pp., £45.00. ISBN 0-471-93998-6. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. 1995;114(3):114-. <https://doi.org/10.1002/recl.19951140311>
23. Dingari NC, Horowitz GL, Kang JW, Dasari RR, Barman I. Raman spectroscopy provides a powerful diagnostic tool for accurate determination of albumin glycation. *PloS one*. 2012;7(2):e32406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032406>, PMID:22393405
PMCID:PMC3290592.
24. Wang J, Lin D, Lin J, Yu Y, Huang Z, Chen Y, et al. Label-free detection of serum proteins using surface-enhanced Raman spectroscopy for colorectal cancer screening. *Journal of biomedical optics*. 2014;19(8):087003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.8.087003>, PMID:25138208.
25. Lin J, Chen R, Feng S, Pan J, Li Y, Chen G, et al. A novel blood plasma analysis technique combining membrane electrophoresis with silver nanoparticle-based SERS spectroscopy for potential applications in noninvasive cancer detection. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2011;7(5):655-63. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.01.012>, PMID:21333756.
26. Nevin A, Osticioli I, Anglos D, Burnstock A, Cather S, Castellucci E. Raman spectra of proteinaceous materials used in paintings: a multivariate analytical approach for classification and identification. *Analytical chemistry*. 2007;79(16):6143-51. <https://doi.org/10.1021/ac070373j>, PMID:17620009.
27. Chua KY, Cheong N, Kuo IC, Lee BW, Yi FC, Huang CH, et al. The *Blomia tropicalis* allergens. *Protein Pept Lett*. 2007;14(4):325-33. <https://doi.org/10.2174/092986607780363862>, PMID:17504089.
28. Simpson A, Green R, Custovic A, Woodcock A, Arruda LK, Chapman MD. Skin test reactivity to natural and recombinant *Blomia* and *Dermatophagoides* spp. allergens among mite allergic patients in the UK. *Allergy*. 2003;58(1):53-6. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.23354.x>, PMID:12580807.
29. Arias-Irigoyen J, Lombardero M, Arteaga C, Carpizo JA, Barber D. Limited IgE cross-reactivity between *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Glycyphagus domesticus* in patients naturally exposed to both mite species. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(1):98-104. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.02.028>, PMID:17412407.

Capítulo III

Simple and sensitive electrochemical immunosensor for
allergens detection

*Este capítulo está formatado de acordo com as normas da revista *Biosensors and Bioelectronics* com algumas modificações para a Dissertação.

Simple and sensitive electrochemical immunosensor for allergens detection

Claudiney de Freitas Alves¹, Ana Flávia de Oliveira Notário¹, Jair Pereira Cunha-Júnior², Guilherme R. L. Souza³, Luiz Ricardo Goulart¹

¹Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil.

²Laboratory of Allergy and Clinical Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

³Laboratory of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

ABSTRACT

This is the first electrochemical immunosensor for detection of allergens in flour sources with important implications to allergic reactions, a worldwide disease that affect more than 25% of the world population. As a proof-of-concept, we have used the Blo t 5 allergen from *Blomia tropicalis*, and established electrochemical parameters to capture and detect the specific allergen using a polyclonal immunoglobulin Y. Detection was performed in portable potentiostat (EmStat) using a graphite screen-printed electrode, ferri/ferrocyanide as indicator and cyclic voltammetric analyses. We have established a calibration curve with serial dilutions of the allergen, and then assays were conducted with real samples. The novel immunosensor was able to discriminate between contaminated farinaceous samples from uncontaminated ones. The immunosensor was able to detect as low as 25 ng/mL, with a linear response between 5 and 500 µg/mL. The new biosensor shows great potential of detecting flour contamination in the field with high sensitivity, besides it shows the possibility to detect both pan allergens or allergen-specific targets, depending on the antibody probe used.

Keywords: Electrochemical immunosensor, Immunoglobulin Y, *Blomia tropicalis*, Blo t 5, Storage mite, Food contamination, Differential pulse voltammetry.

Introduction

Mites are tiny arthropods that have several sources of allergens capable of triggering immune processes mediated by immunoglobulin E (IgE) causing about 50% of allergic disease in atopic individuals (Arlian and Platts-Mills 2001, Vogel, Bosco et al. 2014). Although it is believed that the primary source of exposure to mite allergen is indoor environments, there is also evidence that exposure through ingestion of allergens is an important pathway capable of triggering immune reactions (Sanchez-Borges, Suarez-Chacon et al. 2009, Hussein and Elawamy 2015, Sanchez-Borges and Fernandez-Caldas 2015).

A member of the *Echimyopodidae* family, the species *Blomia tropicalis* is a mite found in several regions of the globe and many studies have reported the presence of this mite on different types of foodstuffs - contaminated raw or processed food (van Bronswijk and de Cock 1974, Franzolin and Baggio 2000, Santos da Silva, Asam et al. 2017). Several allergens have been identified in the extract of *Blomia tropicalis* and the most important of them is the specific antigen Blo t 5 (14 KDa)(Naik, Chang et al. 2008).

Contamination of food during storage by mites may cause significant loss of product quality, since these insects feed on the germ of the grains causing a decrease in the germination viability of seeds (Palyvos, Emmanouel et al. 2008), besides losses in the nutritional composition (Vogel, Bosco et al. 2014). In mammals can cause respiratory diseases, contact dermatitis, and also acute enteritis through ingestion of bacteria and fungi, which they are vectors (Hughes 1976, Vogel, Bosco et al. 2014).

Antibodies are highly specific molecules that bind and inactivate foreign substances, such as toxins or antigens, and because of this characteristic they have been used for therapeutics and diagnostics (Larsson and Sjoquist 1990, Karlsson, Kollberg et al. 2007).

The immunoglobulin (Ig) Y produced by amphibians, reptiles and birds, such as chickens, has similar function to mammalian IgGs, being passed to the embryo by the egg yolk (Warr, Magor et al. 1995, Carlander, Stalberg et al. 1999). These immunoglobulins are recognized as an excellent source of polyclonal antibodies for different applications (Abbas, El-Kafrawy et al. 2018). Phylogenetic distance between

birds and mammals allows the production of antibodies against highly conserved mammalian proteins (Larsson, Carlander et al. 1998) and in addition, avian antibodies recognize other epitopes than mammalian does, increasing the number of distinct antibodies, and consequently the possibility of binding (Larsson and Sjoquist 1990, Ferreira Junior, Santiago et al. 2012). Besides, immunization of chickens for antibody production has several advantages over mammalian production methods, such as non-invasiveness, low cost and high yield (Borges, Silva et al. 2018).

It is known that antibodies are ideal tools for the development of electroanalytical systems as a function of detecting specific biomolecules (Gopinath, Tang et al. 2014). These electrochemical immunosensors have presented several advantages over other detection systems, such as easy handling, high sensitivity, low cost, simple construction, and the possibility of automation and integration into compact analytical devices (Wan, Su et al. 2013, Lemos, Balvedi et al. 2017), but the promising clinical use (Rotariu, Lagarde et al. 2016, Lemos, Balvedi et al. 2017) is still to be proven in large scale and in field applications.

The present investigation aimed to develop an immunosensor to detect the *Blomia tropicalis* - Blo t 5 allergen in farinaceous sources by using IgY polyclonal antibodies, not only to improve sensitivity and real time detection in the field, but also to highlight the potential risk of exposure to allergens in flour sources used as food ingredients. The electrochemical response of the modified electrode with various Blo t 5 concentrations in different flour sources has led us to a successful immunosensor that will be further discussed herein.

Materials and Methods

Sample collection.

Stored farinaceous samples were collected from retail stores, barns and domestic houses obtained from two cities of Minas Gerais, Brazil (Uberlandia and Uberaba). The farinaceous sources are kept in open containers and on shelves exposed to the external environment. Samples were collected and kept in closed plastic bags until examination. Twelve flour samples of dry food for humans e animals were collected

as follows: wheat flour (1), whole wheat flour (1), flaked corn flour (1), corn flour (2), oat bran (1), soybean meal (2), corn bran (2), wheat bran (1) and poultry feed mix (1).

Preparation of the real samples for analysis.

All flour samples were previously homogenized, and 100 mg were added to 1 mL phosphate buffered saline (pH 7.4) and mixed vigorously for 2 hours on a shaker. The mixture was centrifuged for 10 minutes at 3.000 rpm and the supernatant was collected and kept at 4°C until used (Hussein and Elawamy 2015).

Blo t 5 recombinant allergen.

The bacterial coding sequence of the Blo t 5 allergen from the house dust mite *Blomia tropicalis* was selected using the data stored in the PubMed gene bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) whose access code is U59102. The allergen gene in question has a sequence of 537 bp and encodes a protein product of 134 amino acids. Pairs of primers were designed based on the published full-length DNA sequence of Blo t 5 (GenBank: U59102) for polymerase chain reaction (PCR) amplification flanked by the restriction enzyme sites for BamHI/XhoI, using the following primers' sequences: forward – CCCGGATCCATGAAGTTCGCCATCGTTC; and reverse – GGGCTCGAGTTATTGGGTTTGAATATC. The synthetic sequences were ligated to the pUC57 vector and sub-cloned into the pET28a expression vector (Millipore, Massachusetts, U.S.A.). The Blo t 5 amplicon were ligated to the pET28a expression vector and used for transforming DH-10 B-strain *Escherichia coli*. Constructs containing Blo t 5 were then used to transform BL21(DE3) *E. coli* BL21 (DE3)pLysS, generating His (histidine)-tagged proteins (His-rBlo t) after induction with 0.1 mM isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG). The recombinant proteins were subsequently purified by affinity chromatography using the Ni-NTA agarose resin (QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda; São Paulo, SP, Brazil), according to the manufacturer's protocol (Carvalho Kdos, de Melo-Neto et al. 2013). The concentration of the protein content was determined using the Bradford method (Bradford 1976).

Production of polyclonal antibody - Immunization of hens.

All procedures using experimental animals (hens, *Gallus gallus domesticus*) were conducted under the approval of the local Ethics Commission on Use of Animals – CEUA/UFG Protocol number 20/2012. Laying hens (*Gallus gallus domesticus*, Isa Brown lineage) were used for immunization protocols to induce the production of polyclonal antibodies. Hens (n = 4) were immunized 4 times, at 15-day intervals, with 200 µg of rBlo t 5. For the first immunization, the antigen sample were dissolved in 250 µL of PBS and an equal volume of Freund's complete adjuvant (Sigma-Aldrich Co., USA). The next immunizations were performed with the same antigens plus incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich Co., USA)(Schwarzkopf, Staak et al. 2001, Ferreira Junior, Santiago et al. 2012). The applications were conducted intramuscularly, in the pectoral muscle at different points. Blood samples were collected at 14-day intervals alternated with immunizations. Egg were collected weekly, and stored at 4°C until further processing (Ferreira Junior, Santiago et al. 2012).

Preparation of protein yolk extract and IgYs isolation.

The egg collections started one week before the first immunization and extended for another 7 weeks. For the isolation of Y-immunoglobulins from the yolk we used the protocol described elsewhere with adaptations (Pauly, Chacana et al. 2011). This method uses three solutions with different titers of 1x phosphate-saline buffer (PBS 1x) and polyethylene glycol (PEG). For a volume of 10 mL of yolk we added a solution PBS 1X + PEG 8000 at 5.25% (w/v) in the ratio of 2:1 and stirred for 10 minutes at 37°C. Thereafter, the mixture was centrifuged at 4°C for 30 minutes at 3900 xg. The solution is then filtered into a new tube. After this procedure we added a solution PBS 1X + PEG 8000 at 42.5% (w/v) in a ratio of 1:4. The solution was stirred for 10 minutes at 37°C and then centrifuged at 4 °C for 30 minutes at 3900 xg. The supernatant was then discarded and the precipitate resuspended carefully in 5 mL of 1X PBS and the final solution of PBS 1X + PEG 8000 at 24% (w/v) was added a ratio 1:1. The steps of mechanical agitation and centrifugation were then repeated.

The supernatant was discarded again and the precipitate was carefully dissolved in 3 mL of 1X PBS. The solution was dialyzed using Spectra/Por® dialysis membranes with a cut size of 12-14,000 kDa, to eliminate all residues of PEG. Subsequently, the samples obtained were purified by purification against sodium chloride solution (0.01 M NaCl) under magnetic stirring and refrigeration for 12 hours. Subsequently, saline was replaced by 1X PBS solution pH 7.4, which was dialyzed for four hours. The samples were then removed from the dialysis and stored in a tube to a final volume of 10 mL in 1X PBS solution pH 7.4 and stored in a freezer at -20 °C. Protein concentration was obtained by the Bradford method (Bradford 1976) and the purity of the preparations was investigated by one-dimensional electrophoresis in 16% (w/v) polyacrylamide gel, applying 10µg of sample per well. Protein bands were visualized by staining the gel with Coomassie Blue R250 (Sigma).

IgY Dot blot assay.

Dot blotting was then carried out to determine the quality of the extraction and the interaction of IgY antibodies to rBlo t 5. Briefly, the nitrocellulose membrane was incubated with 5 µl of the samples - rBlo t 5, IgY or anti-IgY (control) for 30 minutes followed by blocking with phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS 1x) and 5% (w / v) of lean dry milk for at least one hour at room temperature under stirring. After this the membrane was washed three times with 1x PBS and incubated with the IgY isolated from the egg yolk (1: 500) in 1x PBS and 1% (w / v) lean dry milk for one hour under stirring at room temperature . The next step was to wash the membrane twice with 1x PBS containing 0.05% Tween (PBS / T) and once with 1x PBS incubated with anti-IgY: HRP (1: 2000) monoclonal antibody (ABCAM, Cambridge, UK) at room temperature, protected from light, under stirring for one hour. The reaction was developed using H₂O₂ and diaminobenzidine (DAB) as substrate and chromogen, respectively (Sigma, St. Louis, MO, USA) and stopped under running water.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Detection of Blo t 5 in the samples were determinate by ELISA using the IgY purified (1:500) and anti-IgY: HRP (1: 2000) monoclonal antibody (ABCAM, Cambridge, UK)

as detection and TMB as developer. The reading was done at 450 nm and the results are expressed in $\mu\text{g/mL}$.

Antibody immobilization and antigen detection.

For antigen detection, the surface of bare graphite electrode was stabilized with carbon nanotubes and five cycles of cyclic voltammetry (CV) in a ferri/ferrocyanide solution. After this procedure the electrode was incubated with 5 μL of IgY anti-rBlo t 5 at a concentration of 1.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ for 45 minutes at room temperature, followed by three cycles of CV in ferri/ferrocyanide solution. The IgY-functionalized electrode was washed with ultra-pure water to remove excess of antibodies not incorporated onto the surface, and the dried electrode was ready to be used. The sample was placed onto the surface of the working electrode with a maximum volume of 5 μL , and incubated at room temperature until drying (5 min). The electrode was washed and submitted to electrochemical detection. The cyclic voltammetric readings were performed in a PBS solution, pH 6, containing 250 mM KCl, 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and 5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ with the EmStat Blue potentiostat (Palm Instrument BV, the Netherlands). CV measurements were performed in the potential range of -0.3 to 1 V at scan rate of 0.2 V/s. The electrochemical signal of the anti-IgY / rBlo t 5 electrode before and after interaction with the antibody was measured by CV and the difference between these two signals (ΔI) was considered as the immunosensor response at each antigen concentration. Figure 3 represents the modification of the electrode and the steps of manufacturing the immunosensor.

Results and discussion

Although analytical sciences have made great advances in chemical information, markers, systems, automation, and equipment miniaturization (Murphy 2006), very few electrochemical biosensors have reached the market, due to lack of sensitivity, reproducibility or even practicality. Our major aim was to develop a simple, sensitive and reproducible electrochemical immunosensor for allergens detection. The first goal was to develop an antibody that identified the Blo t 5 antigen, and for this, we have used hens immunized with rBlo t 5 to produce polyclonal IgY antibodies against

this recombinant antigen, which was used as a probe to capture the antigen in question (Akita and Nakai 1993).

The use of immunoglobulin Y technology in the production of polyclonal antibodies directed against antigens (dust mites) is a consolidate technique. This method provides an economical alternative for the generation of immunoreactants that are capable of detecting and monitoring allergens, for example. However, in order to use IgY antibodies as effective markers in biosensors, they need generate chemical or physical signals (Tansil and Gao 2006). After extraction, IgYs were tested for their specificity to the target by immuno-dot blot assay. The results showed that the extraction was efficient and the IgYs recognized the target (Figure 1B). The concentration of the solution was 1.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, according to the Bradford method.

Here, we conjugated IgY antibodies to the screen-printed electrodes to create a simple, rapid, sensitive, reproducible and economic immunobiosensor. The antibody immobilization is one of the most critical steps in the manufacture of electrochemical immunosensors, since a well-defined targeted surface with antibody can interfere on the detection performance of the system (Phal, Shatri et al. 2018). In order to improve the platform, we used proprietary technology based on mixed polymers to stabilize and modify the working electrode's surface.

The present investigation demonstrates for the first time the development of an electrochemical immunosensor for direct detection of allergen Blo t 5 in flour sources. In this approach, a polyclonal antibody (IgY) against the recombinant Blo t 5 (rBlo t 5), as a recognition element, was immobilized onto the surface of the modified electrode with carbon nanotubes. The interaction of antibody and rBlo t 5 antigen on the surface of the modified electrode was evaluated using cyclic voltammetry (CV) in the presence of ferri/ferrocyanide solution. The proposed immunosensor was used for determination of Blo t 5 in both standard and real flour samples. Details of the characterization and possible application of immunosensor were investigated as follows.

The electrochemical characterization of the immunosensor fabrication steps was investigated by using CV. Figure 2 shows the cyclic voltammograms of the sequential modification of the screen-printed graphite electrodes before and after immobilization of IgY and after capturing the Blo t 5 antigen. A schematic representation of the four steps used to construct the immunosensor is presented in Figure 2.

The Figure 2A shows a pair of well-defined reversible peaks assigned to the reversible one-electron redox reaction of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ was observed in case of bare graphite electrode. The voltammogram of modified electrodes presents more faradic currents and more peak separation (ΔE_p) between the oxidation and reduction waves in comparison with the bare graphite electrode (Figure 2B). The immobilization of the IgY at the working electrode resulted in a current peak increase (Figure 2C), which demonstrated the successful immobilization of antibody on the electrode surface. In fact, the immobilized IgY on the electrode surface can act as a slight conduct layer for the diffusion of redox couple towards the electrode surface, which cause an increase in the peak currents. Subsequently, when Blo t 5 antigen was captured, the peak current increased considerably due to the more conducting effect of the antigen-antibody complex at the electrode surface (Figure 2D). The immunosensor response (ΔI) for each Blo t 5 concentration was calculated using equation of $\Delta I = I - I_0$, where I is the reduction peak current of the immunosensor CV response after incubation with rBlo t 5 standard solutions or real samples in different concentrations. I_0 is the reduction peak current value of IgY response from the immunosensor. Figure 3A shows the different voltammograms obtained with the deposition of the used components in the electrode. We can see that the result obtained is very different and that the components have different separation peaks. In addition, we can see that the formation of the immunocomplex is capable of producing a faradaic current of greater intensity when compared to the isolated components. In Figure 3B, we can see that the sensor responds to different concentrations of antigen, presenting a good reproducibility of the results. The inset of Figure 3C shows the obtained calibration plot for the proposed immunosensor, which is described by the linear regression equation $Y = 1,365 \cdot 10^{-006} X + 0,001054$ ($R^2 = 0,98$), already in the Figure 3D we have the voltamograms of the concentrations used for the construction a calibration curve. The current peak for reversible systems is described by the Randles-Sevcik equation (Brett 1996). We used this to confirm modifications on the surface of the sensor, as shown in Figure 3E.

It is noticeable that the active area of the electrode, and consequently the electron flow, changed according to the electrode modification and the concentration of rBlo t 5. Figure 3F shows that the sensor is able to detect small concentrations of the

antigen and can be used to qualify samples as positive or negative for the presence of Blo t 5. Figure 4A shows the different voltamograms obtained with rBlo t 5 and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt). In this figure, it is observed a similarity between the voltamograms of Blo t 5 and Dpt, which may indicate a cross reaction with other species of mites.

In order to assess the feasibility of the proposed immunosensor for Blo t 5 detection in real flour samples (Figure 4B), the IgY electrode was employed to analyze the Blo t 5 concentrations in real contaminated samples, previously tested by ELISA (Figure 5). As shown in Table 1, the immunosensor was able to identify 92% (11 out of 12) of the flour samples. However, we cannot discard the possibility of a false positive test in ELISA. The results demonstrated that the proposed immunosensor is viable for Blo t 5 detection in real flour samples with an acceptable level of accuracy.

Conclusion

In this work, we developed for the first time a sensitive, simple and reproducible immunosensor for allergen detection. The stabilization and surface modification of the graphite electrode using a carbon nanotube-doped polymer and the antibody immobilization method led us to develop a very simple detection system of the IgY:Blo t 5 complex by cyclic voltammetry electrochemistry. We were able to detect as low as 25 ng/mL, with a linear response in the range of 5 to 500 µg/mL. Moreover, the immunosensor for Blo t 5 detection in real samples were in good agreement with ELISA, confirming the validity of the proposed immunosensor for allergen detection in real samples in field conditions. Therefore, a promising biosensing platform for antigen detection was developed and may be considered as a rapid, simple and cost-effective alternative method for field detection, which may also be used in the near future for detection of human and animal diseases and in environment contaminations.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian funding agencies: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, DF), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, Brasília, DF), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG), and PROPP-UFU (Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação - Federal University of Uberlândia).

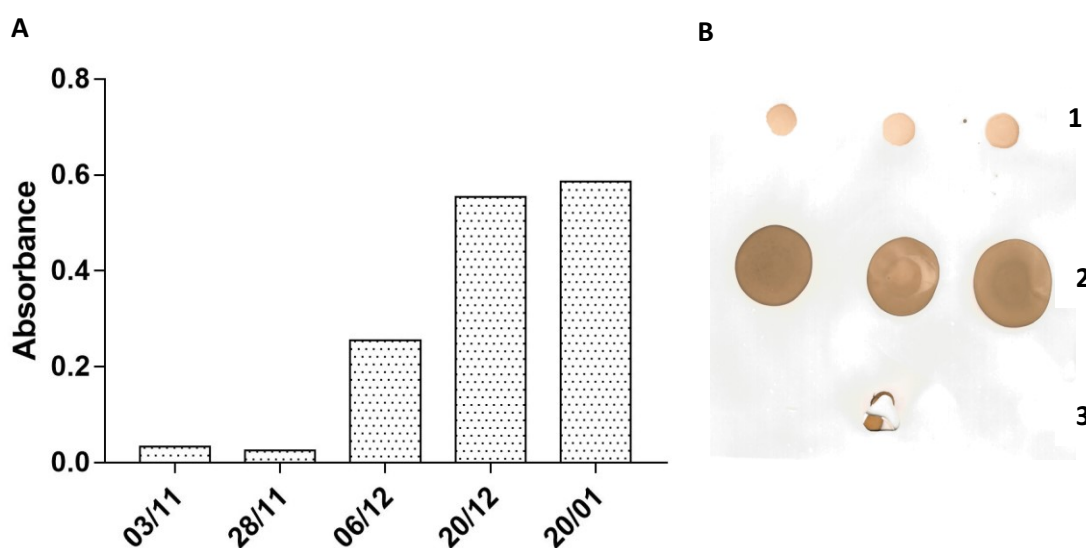


Figure 1: Evaluation of chicken immunization and validation of the extraction of the IgYs of the yolk. In “A” we have the absorbance of the blood samples obtained by ELISA anti-IgY throughout the process of immunization of chickens. In “B” we have the validation of the antibody extraction process. In line 1 we have Blo t 5 (5 μ l), in 2 we have IgY (10 μ l) and in 3 a control with anti-IgY (2 μ l). The presence of color indicates that the test was positive.

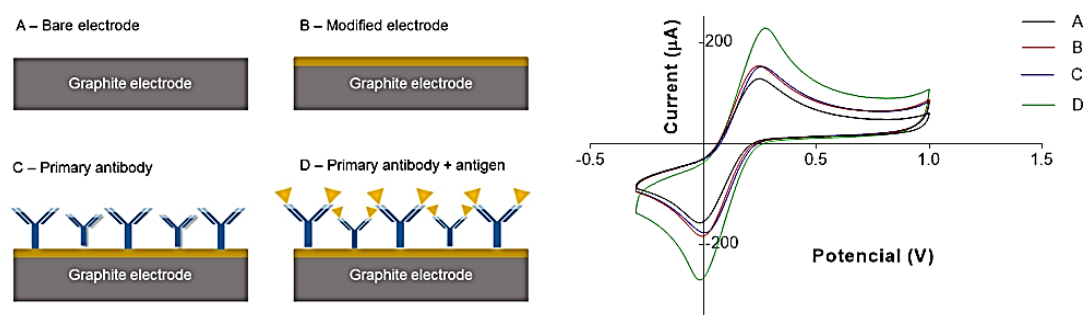


Figure 2: Schematic of the immunosensor (right) and cyclic voltammograms of the immunosensor in each step of immobilization (left): (A) bare graphite electrode - black; (B) modified electrode - red; (C) anti-IgY - blue and (D) with antigen rBlo t 5 - green. Scans performed in ferri/ferrocyanide, at 0,2 V/s scan rate.

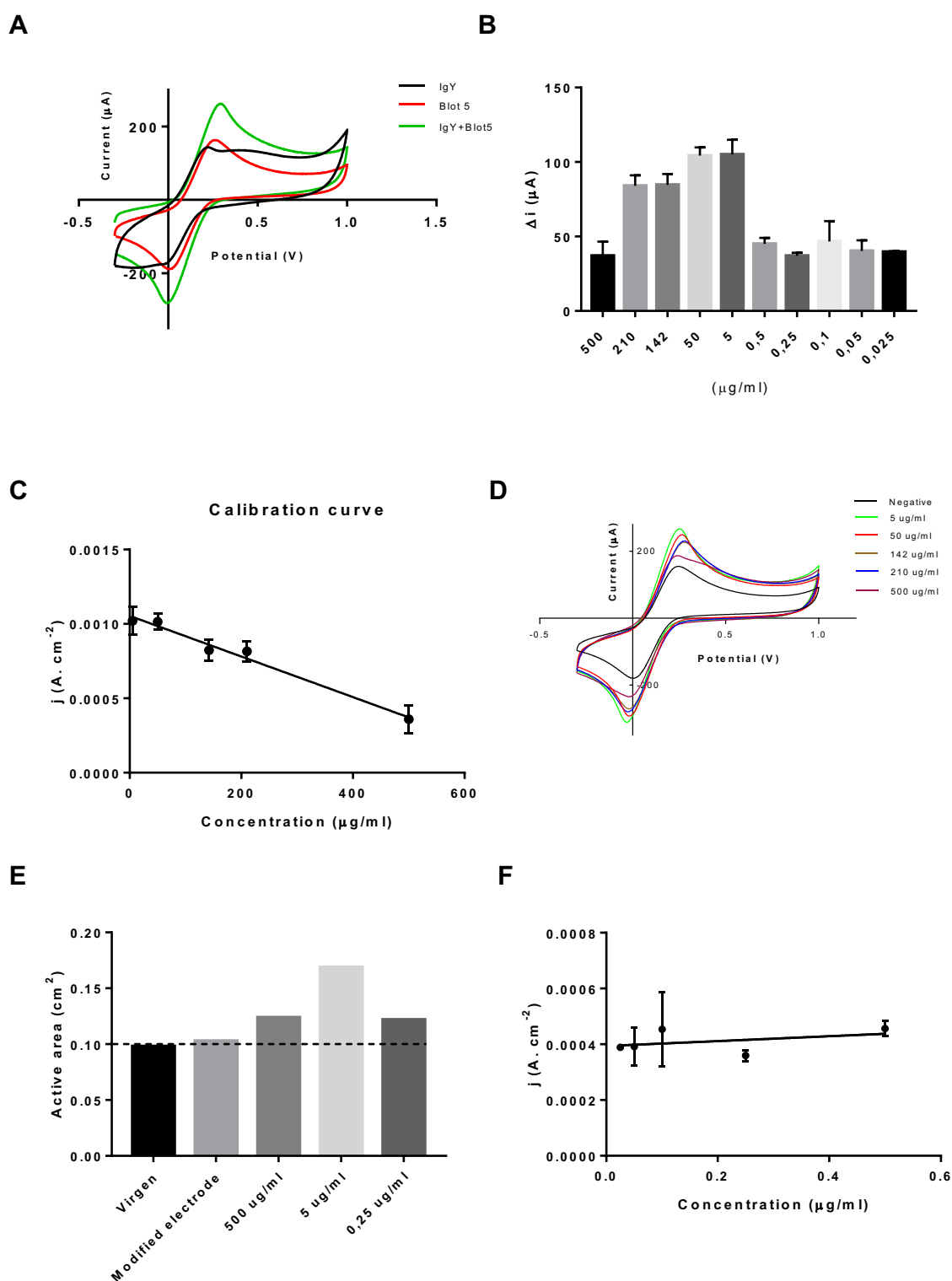


Figure 3: Analysis of the behavior profile of the platform developed. (A) Cyclic voltammogram of the different situations demonstrating a specific behavior for each of the isolated components and when in complex, (B) Current variation according to concentrations of rBiot 5, (C) Calibration curve for the range of 5 to 500 $\mu\text{g/mL}$,

linear behavioral range of the platform, (D) Cyclic voltammogram at concentrations ranging from 5 to 500 $\mu\text{g/mL}$, (E) Analysis of the active area of the electrode by the Randles-Sevicik theorem, (F) Behavior of the currents to the lowest concentrations.

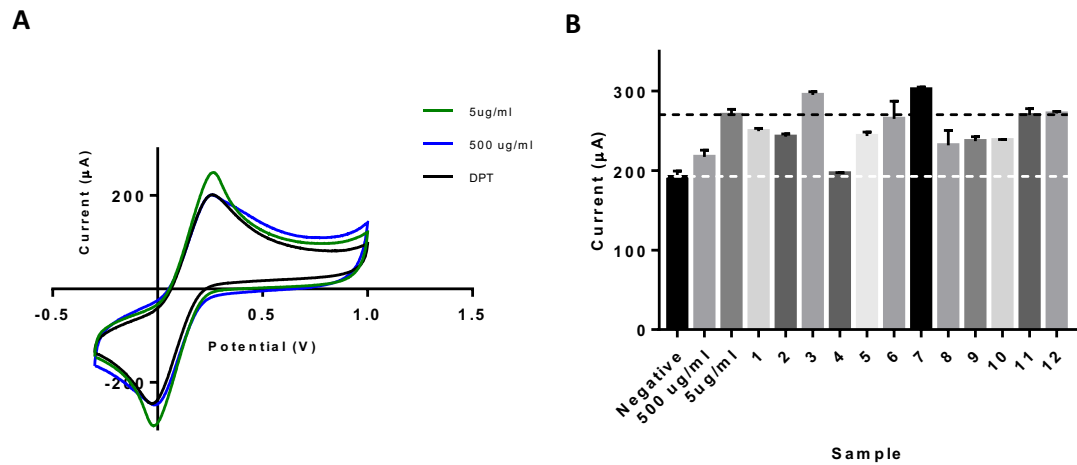


Figure 4: Specificity and limit of detection. In (A) three curves representative of the graph of cyclic voltammetry for specificity. In (B) a comparison with absolute mean values of current between the samples and the standard, the white dashed line represents the cut-off limit for the current taking into account the value of the negative and the black dashed line the detection limit of the curve for the minimum concentration.

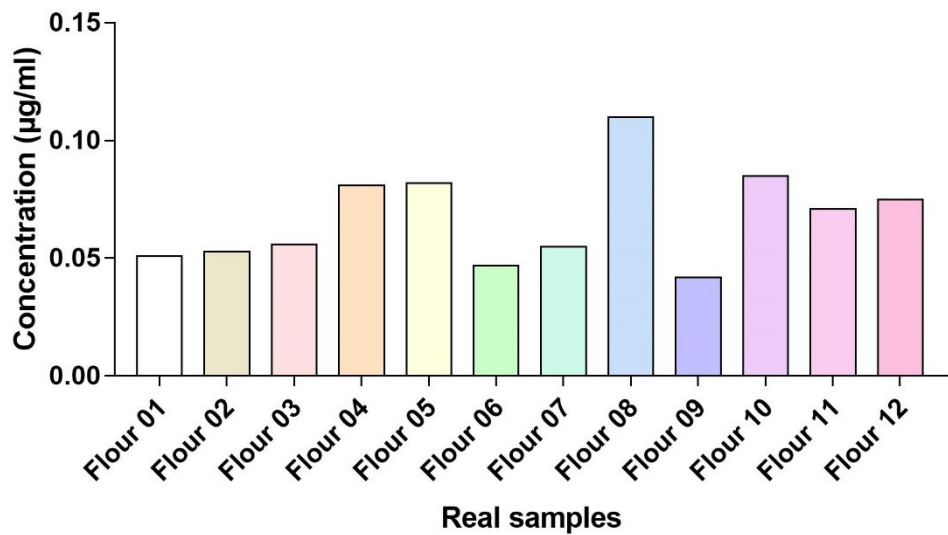


Figure 5: ELISA test to determine the concentration of Blo t 5 in flour samples collected from storage environments.

Table 1 - Results from proposed immunosensor for Blo t 5 detection in real samples

Sample	Electrochemical	Immunoassay (ELISA)
1	Positive	Positive
2	Positive	Positive
3	Positive	Positive
4	Negative	Positive
5	Positive	Positive
6	Positive	Positive
7	Positive	Positive
8	Positive	Positive
9	Positive	Positive
10	Positive	Positive
11	Positive	Positive
12	Positive	Positive

References

Abbas, A. T., S. A. El-Kafrawy, S. S. Sohrab and E. I. A. Azhar (2018). "IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections." *Hum Vaccin Immunother*: 1-12. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>, PMid:30230944 PMCID:PMC6363154.

Akita, E. M. and S. Nakai (1993). "Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain." *J Immunol Methods* **160**(2): 207-214. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90179-B](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90179-B).

Arlian, L. G. and T. A. Platts-Mills (2001). "The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease." *J Allergy Clin Immunol* **107**(3 Suppl): S406-413. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.113670>, PMid:11242601.

Borges, I. P., M. F. Silva, F. M. Santiago, L. S. de Faria, A. F. Junior, R. J. da Silva, M. S. Costa, V. de Freitas, K. A. G. Yoneyama, E. A. V. Ferro, D. S. Lopes, R. S. Rodrigues and V. de Melo Rodrigues (2018). "Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* venom." *Int J Biol Macromol* **112**: 333-342. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.178>, PMid:29391226.

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

Brett, A. M. O. a. B., C. M. A. (1996). *Eletroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações*. Coimbra, Livraria Almedina. ISBN: 9724009726 9789724009728

Número OCLC: 847307011, 471 pages

Carlander, D., J. Stalberg and A. Larsson (1999). "Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective." *Ups J Med Sci* **104**(3): 179-189. <https://doi.org/10.3109/03009739909178961>, PMID:10680951.

Carvalho Kdos, A., O. P. de Melo-Neto, F. B. Magalhaes, J. C. Ponte, F. A. Felipe, M. C. dos Santos, G. dos Santos Lima, A. A. Cruz, C. S. Pinheiro, L. C. Pontes-de-Carvalho and N. M. Alcantara-Neves (2013). "Blomia tropicalis Blo t 5 and Blo t 21 recombinant allergens might confer higher specificity to serodiagnostic assays than whole mite extract." *BMC Immunol* **14**: 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-11>, PMID:23445659 PMCID:PMC3605308.

Ferreira Junior, A., F. M. Santiago, M. V. Silva, F. B. Ferreira, A. G. Macedo Junior, C. M. Mota, M. S. Faria, H. H. Silva Filho, D. A. Silva, J. P. Cunha-Junior, J. R. Mineo and T. W. Mineo (2012). "Production, characterization and applications for Toxoplasma gondii-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins." *PLoS One* **7**(7): e40391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040391>, PMID:22808150 PMCID:PMC3395712.

Franzolin, M. R. and D. Baggio (2000). "[Mite contamination in polished rice and beans sold at markets]." *Rev Saude Publica* **34**(1): 77-83. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102000000100014>, PMID:10769365.

Gopinath, S. C., T. H. Tang, M. Citartan, Y. Chen and T. Lakshmipriya (2014). "Current aspects in immunosensors." *Biosens Bioelectron* **57**: 292-302. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.029>, PMID:24607580.

Hughes, A. M. (1976). The mites of stored food and houses. London :, H.M.S.O. ISBN: 0112409091 9780112409090, OCLC: 2979401, 400 pags.

Hussein, A. H. and W. Elawamy (2015). "Quantitation of Blomia tropicalis allergen Blo t 5 in cereal and cereal-based foods consumed in the Nile Delta, Egypt." *Am J Trop Med Hyg* **93**(1): 194-197. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0837>, PMID:25870423 PMCID:PMC4497896.

Karlsson, M., H. Kollberg and A. Larsson (2007). "Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage." *World's Poultry Science Journal* **60**(3): 341-348. <https://doi.org/10.1079/WPS200422>.

Larsson, A., D. Carlander and M. Wilhelmsson (1998). "Immune response in chicken with different amounts of antigen." *Food Agricult Immunol* **10**: 29-36. <https://doi.org/10.1080/09540109809354966>

Larsson, A. and J. Sjoquist (1990). "Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **13**(4): 199-201. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(90\)90088-B](https://doi.org/10.1016/0147-9571(90)90088-B)

Lemos, A. J. G., R. P. A. Balvedi, V. R. Rodovalho, L. O. Resende, A. C. H. Castro, S. Cuadros-Orellana, J. M. Madurro and A. G. Brito-Madurro (2017). "Immunosensor assembled on polymeric nanostructures for clinical diagnosis of C-reactive protein." *Microchemical Journal* **133**: 572-576. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.026>

Murphy, L. (2006). "Biosensors and bioelectrochemistry." *Curr Opin Chem Biol* **10**(2): 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.023>, PMID:16516536.

Naik, M. T., C. F. Chang, I. C. Kuo, C. C. Kung, F. C. Yi, K. Y. Chua and T. H. Huang (2008). "Roles of structure and structural dynamics in the antibody recognition of the allergen proteins: an NMR study on Blomia tropicalis major allergen." *Structure* **16**(1): 125-136. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.10.022>, PMID:18184590.

- Palyvos, N. E., N. G. Emmanouel and C. J. Saitanis (2008). "Mites associated with stored products in Greece." *Exp Appl Acarol* **44**(3): 213-226. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9145-y>, PMID:18379887.
- Pauly, D., P. A. Chacana, E. G. Calzado, B. Brembs and R. Schade (2011). "IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation." *J Vis Exp*(51). <https://doi.org/10.3791/3084>, PMID:21559009 PMCID:PMC3197133.
- Rotariu, L., F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault and C. Bala (2016). *Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.017>
- Sanchez-Borges, M. and E. Fernandez-Caldas (2015). "Hidden allergens and oral mite anaphylaxis: the pancake syndrome revisited." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **15**(4): 337-343. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000175>, PMID:26110684.
- Sanchez-Borges, M., R. Suarez-Chacon, A. Capriles-Hulett, F. Caballero-Fonseca, V. Iraola and E. Fernandez-Caldas (2009). "Pancake syndrome (oral mite anaphylaxis)." *World Allergy Organ J* **2**(5): 91-96. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-2-5-91>, <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3181a0db50>, PMID:23283016 PMCID:PMC3651046.
- Santos da Silva, E., C. Asam, P. Lackner, H. Hofer, M. Wallner, C. Silva Pinheiro, N. M. Alcantara-Neves and F. Ferreira (2017). "Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules." *Int Arch Allergy Immunol* **172**(4): 203-214. <https://doi.org/10.1159/000464325>, PMID:28456805 PMCID:PMC5472214.
- Schwarzkopf, C., C. Staak, I. Behn and M. Erhard (2001). *Immunisation. Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY-Technology*. R. Schade, I. Behn, M. Erhard, A. Hlinak and C. Staak. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 25-64. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04488-9_3
- Tansil, N. C. and Z. Gao (2006). "Nanoparticles in biomolecular detection." *Nano Today* **1**(1): 28-37. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(06\)70020-2](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(06)70020-2)
- Van Bronswijk, J. E. and A. W. de Cock (1974). "The genus *Blomia* Oudemans (Acari : Glycyphagidae). II. Comparison of its species." *Acarologia* **15**(3): 490-505. In: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4446909/>, PMID: 4446909.
- Vogel, P., S. M. Bosco and N. J. Ferla (2014). "Mites and the implications on human health." *Nutr Hosp* **31**(2): 944-951. PMID: 25617585, <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.7772>.
- Wan, Y., Y. Su, X. Zhu, G. Liu and C. Fan (2013). "Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics." *Biosensors and Bioelectronics* **47**: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.02.045>, PMID:23542064.
- Warr, G. W., K. E. Magor and D. A. Higgins (1995). "IgY: clues to the origins of modern antibodies." *Immunol Today* **16**(8): 392-398. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5)