

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Anticorpos IgA, IgE e IgG4 específicos a
***Dermatophagoides pteronyssinus* e aos seus alérgenos**
principais, Der p 1 e Der p 2, em amostras de soro e saliva
de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos

Diego Oliveira Miranda

Uberlândia
Março - 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Anticorpos IgA, IgE e IgG4 específicos a
***Dermatophagoides pteronyssinus* e aos seus alérgenos**
principais, Der p 1 e Der p 2, em amostras de soro e saliva
de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre.

Diego Oliveira Miranda

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Co-orientadora: Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva

Uberlândia

Março – 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M672a Miranda, Diego Oliveira, 1983-
Anticorpos IgA, IgE e IgG4 específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* e aos seus alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2, em amostras de soro e saliva de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos / Diego Oliveira Miranda. - 2009.
62 f. : il.

Orientador: Ernesto Akio Taketomi.

Co-orientadora: Deise Aparecida de Oliveira Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

1. Rinite alérgica - Teses. 2. *Dermatophagoides pteronyssinus* - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Silva, Deise Aparecida de Oliveira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 616.211-002

*A minha mãe e minha querida irmã que são os alicerces da
minha vida.*

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de realizar mais um projeto na minha vida.

Aos pacientes e seus pais, cuja confiança em participar de um projeto de pesquisa tornou possível a realização deste estudo.

Ao Professor Dr. Ernesto Akio Taketomi pelos ensinamentos e confiança depositada.

À Professora Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, por toda atenção, sabedoria e humildade, que são indispensáveis para todos no laboratório.

À Profa. Dra. Janethe Deolina de Oliveira Pena, à Profa. Dra. Nívea de Macedo Oliveira Morales e ao Prof. Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo, pela composição da banca examinadora e, conseqüentemente, pela estimável contribuição na concretização deste trabalho;

À grande amiga Tatiana Carneiro de Resende, que sempre esteve presente, incentivando a realização de mais essa conquista.

Ao grande amigo Jorge Fernando Carísio Fernandes, cuja participação foi essencial durante as etapas deste estudo.

Aos demais amigos da alergia, Boscolli, Rafael, Leandro, Ronaldo, Priscila, Karine, Cristiane, Renato, Juliana, Lucas, Ana Carolina, Isabella, Laura, Julliane, Carolina, Carlos, Daniela, Danielle, e aos amigos do laboratório de Imunoparasitologia,

Dâmaso, Priscila, Ana Cláudia, Gabriele, Cristina, Celene, Mariana, Marina, Julliane,..., pelos momentos de alegria e aprendizado e por tornarem mais agradáveis às horas dos últimos anos.

Aos funcionários do laboratório de Imunologia, Marley, Max e Zilda pelo auxílio nos momentos necessários.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação: Elaine, pela presteza e atenção.

E a todos aqueles que porventura não mencionei e que contribuíram direta ou indiretamente para a execução ou elaboração deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ABTS	<i>2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid</i> (Ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico])
BSA	Soroalbumina bovina
CD	Marcador do tipo <i>Cluster of Differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
D.O.	Densidade óptica
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DP	Desvio padrão
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
et al.	E colaboradores
FcεRI	Receptor 1 de IgE de alta afinidade
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IE	Índice ELISA
IFN-γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG4	Subclasse 4 da Imunoglobulina da classe G
IL	Interleucina
M	Molar
mg	Miligrama
MG	Estado de Minas Gerais
m.g.	Média Geométrica
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Número de indivíduos
NK	Células Natural Killer
nm	Nanômetro
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA
pH	Potencial hidrogeniônico
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
UA/mL	Unidades Arbitrárias por mililitro
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da classificação atual da rinite alérgica, de acordo com duração e gravidade. 19
- Figura 2.** Níveis de anticorpos IgE específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro de indivíduos alérgicos (n = 72) e não-alérgicos (n = 14). Os dados são expressos em Índice ELISA (IE) e a média geométrica para cada alérgeno é indicada por barras horizontais. A linha pontilhada indica o *cut off* da reação (EI = 1,2). *** p < 0,0001 (teste de Mann-Whitney). 35
- Figura 3.** Correlação entre níveis de anticorpos IgE específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro de 72 indivíduos alérgicos. (A) IgE anti-Dpt vs anti-Der p 1; (B) IgE anti-Dpt vs anti-Der p 2, (C) IgE anti-Der p 1 vs anti-Der p 2. Os dados são expressos em Índice ELISA (IE). O coeficiente de correlação de Spearman (r) e a significância estatística também são indicados. 36
- Figura 4.** Níveis de anticorpos IgA específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro de indivíduos alérgicos (n = 72) e não-alérgicos (n = 14). Os dados são expressos em Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/mL) e a média geométrica para cada alérgeno é indicada por barras horizontais. *** p < 0,0001 (teste de Mann-Whitney). 38
- Figura 5.** Correlação entre níveis de anticorpos IgA específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro (A-C) e saliva (D-F) de 72 indivíduos alérgicos (●) e 14 não-alérgicos (○). Os dados são expressos em Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/mL) e a linha pontilhada indica uma correlação perfeita. Os coeficientes de correlação de Spearman (r) e a significância estatística também são indicados para crianças e adolescentes alérgicos (canto superior esquerdo) e não-alérgicos (canto inferior direito). 39

Figura 6. Níveis de anticorpos IgG4 específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro (A) e saliva (B) de c indivíduos alérgicos (n = 72) e não-alérgicos (n = 14). Os dados são expressos em Índice ELISA (IE) e a média geométrica para cada alérgeno é indicada por barras horizontais. A linha pontilhada indica o *cut off* da reação (EI = 1,2) e as porcentagens de amostras positivas para IgG4 contra cada alérgeno também são indicadas. * p < 0,05; ** p < 0,001; *** p < 0,0001 (teste de Mann-Whitney); # p < 0,05 entre grupos alérgicos e não-alérgicos para cada alérgeno (teste exato de Fisher). 41

Figura 7. Correlação entre níveis de anticorpos IgG4 específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro (A-C) e saliva (D-F) de 72 indivíduos alérgicos (●) e 14 não-alérgicos (○). Os dados são expressos em Índice ELISA (IE) e a linha pontilhada indica uma correlação perfeita. Os coeficientes de correlação Spearman (r) e a significância estatística também são indicados para crianças e adolescentes alérgicos (canto superior esquerdo) e não-alérgicos (canto inferior direito). 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos indivíduos do estudo.	34
Tabela 2. Correlação entre níveis séricos e salivares de IgA e IgG4 específicos ao extrato total de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos.	40
Tabela 3. Razão entre níveis séricos de IgG4 e IgE específicos ao extrato total de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos.	42

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Ácaros e alérgenos da poeira domiciliar	14
1.1.1 <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	14
1.1.2 Alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i>	15
1.2 Alergia e atopia	17
1.3 Rinite alérgica	17
1.3.1 Conceito e epidemiologia	17
1.3.2 Classificação	19
1.4 O sistema imune e a resposta alérgica	20
1.5 Fisiopatologia da resposta imune alérgica	21
1.6 Sensibilização em pacientes com alergia respiratória	22
1.6.1 Testes Cutâneos	22
1.6.2 Pesquisa de IgE sérica específica	23
1.7 Resposta de anticorpos IgA, IgE e IgG4 aos alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i>	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Aspectos éticos	27
3.2 Pacientes	27
3.3 Preparação dos extratos de ácaros	28
3.4 Teste cutâneo de puntura	29
3.5 Coleta de amostras de sangue	29
3.6 Coleta de amostras de saliva	29
3.7 Análise de anticorpos IgA específicos no soro e na saliva	30
3.8 Análise de anticorpos IgE específicos no soro e na saliva	31
3.9 Análise de anticorpos IgG4 específicos no soro e na saliva	32
3.10 Análise estatística	32
3.11 Normas de biossegurança	33

4 RESULTADOS	34
4.1 Características dos indivíduos do estudo	34
4.2 Níveis de IgE específica a Dpt e a seus alérgenos	34
4.3 Correlação entre níveis de IgE a Dpt e a seus alérgenos	35
4.4 Níveis de IgA específica a Dpt e a seus alérgenos	37
4.5 Correlação entre níveis de IgA a Dpt e a seus alérgenos	37
4.6 Níveis de IgG4 específica a Dpt e a seus alérgenos	40
4.7 Correlação entre os níveis de IgG4 a Dpt e a seus alérgenos	42
4.8 Comparação entre níveis séricos de IgG4 e IgE a Dpt, Der p1 e Der p 2	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO A	57
ANEXO B	58
ANEXO C	59
ANEXO D	62

RESUMO

Rinite alérgica (RA) é um problema de saúde pública global de suma importância, devido ao crescente aumento da sua prevalência em todo o mundo. Ácaros da poeira domiciliar como *Dermatophagoides* spp. constituem as principais fontes de sensibilização alérgica em indivíduos geneticamente predispostos. Este estudo teve como objetivo avaliar os níveis de anticorpos IgA, IgE e IgG4 específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e aos seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro e saliva de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos. Um total de 86 indivíduos foi estudado, dos quais 72 tinham RA e teste cutâneo positivo para o extrato Dpt, e 14 eram saudáveis não-alérgicos, com teste cutâneo negativo para aeroalérgenos. Amostras pareadas de soro e saliva foram coletadas de todos os indivíduos e analisadas por ensaios imunoenzimáticos. Os níveis de IgE sérica e de IgG4 sérica ou salivar específicas a Dpt, Der p 1 e Der p 2 foram maiores em crianças e adolescentes alérgicos que não-alérgicos ($p < 0,05$). Ao contrário, os níveis de IgA sérica e salivar para todos os alérgenos foram maiores em indivíduos não-alérgicos em relação aos alérgicos ($p < 0,05$). A razão IgG4/IgE sérica foi menor do que 1,0 para todos os alérgenos e significativamente menor em indivíduos alérgicos que não-alérgicos. Pode-se concluir que crianças e adolescentes alérgicos a ácaros da poeira domiciliar apresentam altos níveis de IgE sérica e IgG4 sérica e salivar alérgeno-específicas e baixos níveis de IgA sérica e salivar alérgeno-específicas a Dpt, Der p 1 e Der p 2. Anticorpos IgG4 alérgeno-específicos estão presentes em soro e saliva de crianças e adolescentes alérgicos com IgE sérica específica a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, porém IgE predomina em soros de crianças e adolescentes alérgicos enquanto IgG4 predomina em soros de não-alérgicos. IgA específica parece atuar como anticorpo protetor natural já que predomina em soro e saliva de crianças e adolescentes não-alérgicos.

PALAVRAS-CHAVE: Rinite alérgica, *Dermatophagoides pteronyssinus*, IgA sérica, IgA salivar, IgE, IgG4.

ABSTRACT

Allergic rhinitis (AR) is a global public health problem and it is gaining importance due to the rapid increase in its prevalence worldwide. House dust mites as *Dermatophagoides* spp. are the major sources of allergen sensitization in genetically predisposed subjects. This study aimed to evaluate serum and salivary IgA, IgE and IgG4 levels to *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) and its major allergens (Der p 1 and Der p 2) in allergic and non-allergic children and teenager. A total of 86 subjects were studied, from which 72 had AR and positive skin test to Dpt extract, and 14 were non-allergic subjects, with negative skin test to aeroallergens. Paired serum and saliva samples were collected from all subjects and analyzed by immunoenzymatic assays. Levels of serum IgE and serum or salivary IgG4 antibodies to Dpt, Der p 1, and Der p 2 were higher in allergic than non-allergic children and teenager ($p < 0.05$). In contrast, levels of serum and salivary IgA antibodies to all allergens were higher in non-allergic than allergic children and teenager ($p < 0.05$). It was noted that the ratio serum IgG4/IgE was lesser than 1.0 to all allergens and significantly lower in allergic than non-allergic children and teenager. It can be concluded that allergic children and teenager have high levels of serum IgE and IgG4 serum and salivary allergen-specific and low levels of serum and salivary IgA allergen-specific to Dpt, Der p 1 and Der p 2. Specific IgG4 antibodies are present in the serum and saliva from allergic children and teenager along with specific serum IgE, but IgE predominates in the serum of allergic children and teenager whereas IgG4 prevails in the serum of non-allergic children. Specific IgA appears to act as natural protective antibody since it predominates in the serum and saliva from non-allergic children and teenager.

KEY WORDS: Allergic rhinitis, *Dermatophagoides pteronyssinus*, serum IgA, salivary IgA, IgE, IgG4.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ácaros e alérgenos da poeira domiciliar

Os ácaros representam a principal fonte de alérgenos em áreas geográficas úmidas e a sensibilização para os seus alérgenos é um grande fator de risco de doenças alérgicas respiratórias em indivíduos expostos (ARLIAN; PLATTIS-MILLS, 2001). De acordo com Boquete e colaboradores (2006), 80 a 90% de pacientes com asma e 10% da população geral estão sensibilizados aos alérgenos de ácaros da poeira domiciliar.

Dentre os ácaros da poeira domiciliar, destaca-se o da família Pyroglyphidae (*Dermatophagoides pteronyssinus*) que é considerado importante fonte de alérgeno para sensibilização em pacientes geneticamente predispostos (MIRANDA; QUINTERO; ALMANZA, 2002; HART et al., 2007).

1.1.1 *Dermatophagoides pteronyssinus*

A espécie *D. pteronyssinus* foi caracterizada em 1897 pelo zoologista francês Trouessart e é vulgarmente conhecida como ácaro europeu. Além de países europeus, é encontrado em países americanos e é considerado uma das principais fontes de alérgenos presentes na poeira domiciliar. Esta espécie necessita de altas temperaturas e umidades para a sua sobrevivência e proliferação (ARLIAN; PLATTIS-MILLS, 2001).

A poeira domiciliar é considerada seu habitat alternativo, uma vez que seu ambiente natural se constitui de ninho de pássaros e peles de pequenos mamíferos. O mecanismo de dispersão deste animal, incluindo a ocupação de seus habitats, é favorecido pela sua morfologia, sendo assim, considerados como “plânctons aéreos”. Além disso, adota uma estratégia de vida do tipo *r*, onde o reduzido tamanho e o investimento na reprodução em massa são características marcantes. Isso faz com que seu desenvolvimento seja precoce e sua sobrevivência esteja diretamente ligada às condições ambientais (JACQUET et al., 2000).

No Brasil, a prevalência desta espécie tem sido avaliada em diversos trabalhos. Arruda e colaboradores (1991) realizaram um estudo sobre a sensibilização e a exposição à alérgenos de ácaros entre crianças na cidade de São Paulo-SP, onde foi verificado alta frequência nos níveis de IgE específica a *D. pteronyssinus* na maioria das crianças estudadas (95%). Um estudo realizado por Terra e colaboradores (2004) na cidade de Uberaba-MG, revelou que *D.*

pteronyssinus foi a espécie de maior frequência (15,3%), seguida por *D. farinae* (12,3%) por meio de identificação morfológica.

Em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, os níveis de sensibilização a *D. pteronyssinus* em pacientes ambulatoriais com diagnóstico de asma e rinite alérgica na cidade de Uberlândia-MG foram de 61,7%, confirmando sua importância como fonte de alérgenos (SOARES et al., 2007).

1.1.2 Alérgenos de *D. pteronyssinus*

Grande parte dos alérgenos de *D. pteronyssinus* são elementos presentes no corpo ou na matéria fecal dos ácaros (TOVEY; CHAPMAN; PLATTS-MILLS, 1981). Os alérgenos relacionados às fezes são originados do trato gastrointestinal do ácaro, e alguns desses também se encontram presentes em sua saliva. Outra provável fonte de alérgenos dessa espécie inclui enzimas associadas aos processos de mudanças de estágios.

Os alérgenos desta espécie, bem como das demais espécies de ácaros são divididos em grupos, de acordo com a composição bioquímica, homologia e massa molecular. Até o momento, foram descritos vinte alérgenos de *D. pteronyssinus* (LORENZ et al., 2009), sendo que algumas de suas principais características bioquímicas estão apresentadas no Quadro 1. Os alérgenos do grupo 1 (Der p 1, 25kDa) estão localizados em altas concentrações nas bolotas fecais (JACQUET et al., 2000), enquanto os do grupo 2 (Der p 2, 14kDa) são os mais encontrados nos componentes do corpo do ácaro (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001). Assim, Der p 1 e Der p 2 são considerados alérgenos principais de *D. pteronyssinus*, devido a serem reconhecidos por mais de 80% dos pacientes sensíveis ao ácaro (JACQUET et al., 2000; ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

Alérgeno	Identidade bioquímica ou homologia	Massa molecular (kDa)	Frequência de ligação à IgE (%)
Der p 1	Cisteína protease; homologia com: papaína, actidina, catepsina B e H	25	80
Der p 2	Função desconhecida; homologia com a proteína putativa epididimal humana	14	80
Der p 3	Tripsina; homologia com Der p 6 e Der f 6, e outras tripsinas de mamíferos e invertebrados	28	16-100
Der p 4	Amilase; homologia com α -amilases de insetos e mamíferos	60	40-46
Der p 5	Função e sítios de clivagens desconhecidos	15	50-70
Der p 6	Quimiotripsina; homologia com Der p 3 e Der f 3, além de quimiotripsinas de mamíferos e invertebrados	25	40
Der p 7	Função e sítios de clivagem desconhecidos	31	50
Der p 8	Glutathione-S-transferase (GST); homologia com outras GSTs	26	20-40
Der p 9	Serina protease collagenolítica	30	90
Der p 10	Tropomiosina; homologia com tropomiosinas de outros invertebrados	37	50-95
Der p 11	Paramiosina; homologia com paramiosinas de outros invertebrados	96	80
Der p 13	Proteína ligante de ácido-graxo	15	ND
Der p 14	Semelhante a apolipopirina; identidade com M-177	177 (variável)	90
Der p 15	Função desconhecida, homologia com quitinases	95	80
Der p 18	Função desconhecida, homologia com quitinases	60	90
Der p 20	Kinase arginina	40	44
Der p 21	Função desconhecida	16	ND
Der p 23	Função desconhecida, homologia com domínio peritrofina-A	14	ND

Quadro 1. Propriedades bioquímicas dos alérgenos de *D. pteronyssinus*. FONTE: LORENZ et al. (2009).

- ausente; ND não determinado

1.2 Alergia e atopia

O termo “alergia” vem do grego “*Allos*”, que significa alteração do estado original, e foi utilizado pela primeira vez em 1906, por Clemens Von Pirquet, para designar “uma capacidade alterada do organismo de reagir a uma substância estranha”. Tratava-se de uma definição extremamente ampla que incluía todas as reações imunológicas. Atualmente alergia é definida de modo mais restrito, como uma parte de uma classe de respostas do sistema imune, denominadas reações de hipersensibilidade (CHARLES et al., 2006).

Hipersensibilidade é um termo utilizado para descrever uma resposta imune adaptativa que ocorre de forma exagerada ou inapropriada (ROITT et al., 2006). A classificação das reações de hipersensibilidades segundo Gell e Coombs (1968) é dividida em tipos I, II, III e IV. Johansson e colaboradores (2004) têm preconizado utilizar o termo de hipersensibilidade para descrever objetivamente os sinais e sintomas iniciados pela exposição a um estímulo definido em uma dose tolerada por indivíduos normais. A alergia é, em geral, uma reação de hipersensibilidade por mecanismos imunológicos específicos. Quando outros mecanismos podem ser comprovados, como na hipersensibilidade à aspirina, o termo hipersensibilidade não alérgica deve ser utilizado (JOHANSSON et al., 2004).

O termo atopia refere-se à tendência pessoal ou familiar de produzir anticorpos IgE em resposta a doses intermediárias de alérgenos ambientais, tais como proteínas antigênicas de ácaros, fungos e polens, e desenvolver doenças típicas, como asma, rinite ou dermatite atópica (JOHANSSON et al., 2004). Portanto, a alergia ou hipersensibilidade imediata é característica de indivíduos atópicos.

Asma e rinite alérgica são as manifestações mais comuns de doença clínica atópica, após exposição aos alérgenos do meio ambiente, seguida pela dermatite atópica. Duas ou mais formas clínicas de atopia podem coexistir ao mesmo tempo no mesmo paciente, ou em diferentes tempos no curso da doença, e a atopia pode ser assintomática (CAMARGOS et. al, 2007).

1.3 Rinite alérgica

1.3.1 Conceito e epidemiologia

De acordo com ARIA (Rinite Alérgica e seu Impacto na Asma) a Rinite Alérgica (RA) é definida clinicamente como uma inflamação da mucosa nasal, mediada por IgE, após

exposição a alérgenos, cujos sintomas (obstrução nasal, rinorréia aquosa, espirros e prurido nasal) ocorrem durante dois ou mais dias consecutivos por mais de 1 hora na maioria dos dias (BOUSQUET et al., 2001; BOUSQUET et al., 2008). O desenvolvimento dessas condições nasais crônicas ou recorrentes pode resultar em complicações como sinusites, otites ou pólipos nasais (LIERL, 1995).

Os alérgenos mais comuns envolvidos na resposta de hipersensibilidade mediada por IgE incluem ácaros da poeira domiciliar, polens, pêlos de animais, esporos de fungos e partículas de insetos (HELLINGS; FOKKENS, 2006). O alérgeno solúvel inalado é absorvido principalmente por difusão passiva, entra em contato com a mucosa nasal, liga-se à IgE específica presente nos mastócitos e basófilos levando à liberação local de mediadores pré-formados ou sintetizados destas células. Inicia-se assim, o quadro sintomatológico desta doença (ABBAS; LICHTMAM; PILLAI, 2008).

Nos últimos anos, o aumento progressivo verificado na prevalência e morbidade das doenças alérgicas respiratórias vem chamando a atenção de pesquisadores no mundo todo. Apesar dos progressos na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e do maior e melhor arsenal terapêutico disponível, acredita-se que a mudança no estilo de vida das populações justifique esse aumento (BACHERT et al., 2008). A alergia se tornou um dos maiores problemas de saúde em muitas sociedades modernas, onde sua prevalência aumentou em até 34% em crianças e 16,3% em adultos, entre a década de 60 e 90 (WOOLCOCK, 2001). Atualmente, indivíduos que moram em grandes centros urbanos permanecem até 95% do seu tempo em ambientes fechados (residência, escritórios, escolas, automóveis, cinemas, etc), aumentando o período de exposição a determinados alérgenos presentes nesses locais (BACHERT et al., 2008).

Uma teoria que tenta explicar esse aumento da prevalência de doenças alérgicas é a “Hipótese da Higiene”, na qual se acredita que a resposta imunológica da criança ocorra por um processo de seleção dos linfócitos TH1 e TH2, influenciado por alérgenos ambientais, poluentes, exposição à fumaça do cigarro, infecções naturais, e utilização de vacinas. Nesse contexto, o recém nascido apresenta um discreto predomínio TH2, porém com o crescimento, ocorre um amadurecimento e conseqüente equilíbrio da resposta TH1/TH2. Esse processo é geneticamente determinado, porém sofre influência de vários fatores como aleitamento materno, exposição à infecções e o ambiente onde a criança vive podem alterar (GARN; RENZ, 2007). Apesar de existir diversos trabalhos realizados que corroboram com essa hipótese, outros estudos mostram dados contraditórios, demonstrando que o aumento dessa

prevalência necessita de maiores conhecimentos para sua compreensão (BOUSQUET et al., 2008).

No Brasil, em estudo realizado através de um questionário do comitê *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC), observou-se uma prevalência média de rinite de 25,7% em grupos de crianças com idade entre 6-7 anos e 29,6% entre adolescentes com idade de 13-14 (SOLE et al., 2007). Segundo Hellings e Fokkens (2006), a rinite alérgica acomete mais de 30 milhões de americanos sem discriminar sexo, idade, raça ou condição sócio-econômica. Ocupa o sexto lugar dentre as doenças crônicas mais prevalentes entre esta população, que gasta anualmente, bilhões de dólares para o seu tratamento. De acordo com Meltzer (2001) e Vandenplas, D'Alpaos e Brussel (2008), mesmo sendo uma doença de baixa mortalidade, suas complicações como sinusite, disfunção da tuba auditiva, distúrbios do sono e respiração bucal crônica, além do seu impacto na asma, resulta em alto custo financeiro.

1.3.2 Classificação

A classificação atual da rinite alérgica leva em consideração dois aspectos básicos, a sua duração e sua gravidade. Quanto à duração, a rinite pode ser classificada como intermitente ou persistente e, quanto à gravidade, em leve ou moderada/grave, conforme demonstrado na Figura 1 (BOUSQUET et al., 2001; BOUSQUET et al., 2008).

A rinite pode ainda ser classificada, de acordo com a sua etiologia, em infecciosa, alérgica, ocupacional, induzida por drogas, idiopática e por outras causas (irritantes; alimentos; emocional; atrófica e refluxo gastro-esofágico) (BOUSQUET, 2001).

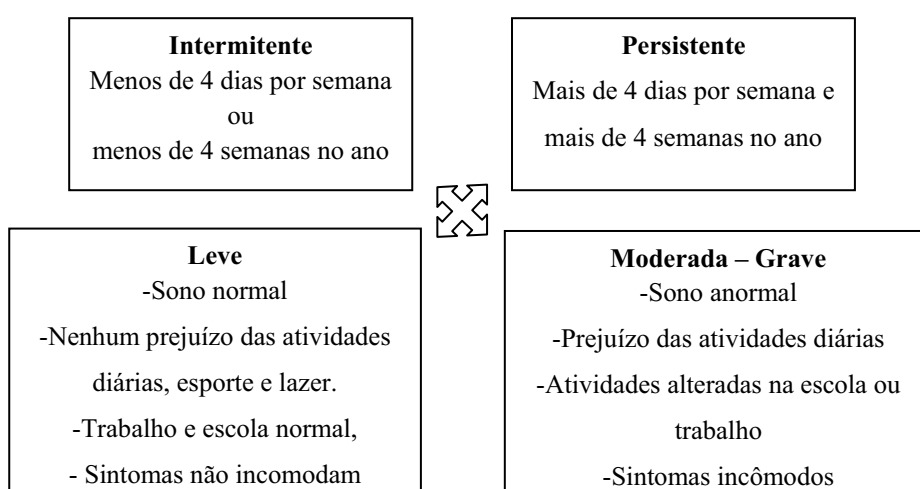


Figura 1. Representação esquemática da classificação atual da rinite alérgica, de acordo com duração e gravidade. FONTE: Bousquet et al., 2001.

1.4 O sistema imune e a resposta alérgica

O desencadeamento da resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigênico e da predisposição genética do hospedeiro. O processamento do alérgeno pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) resulta na geração de peptídeos que são apresentados às células T CD4⁺ em associação com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II (MARONE, 1998). O reconhecimento do complexo peptídeo/MHC II pelas células T CD4⁺ com receptores específicos para os alérgenos, reforçado pelas ligações das moléculas co-estimulatórias B7-1(CD80)/B7-2(CD86) e CD28, leva à ativação das células Th (*T helper* ou T auxiliadora) primárias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Na resposta imune, há a participação de pelo menos dois tipos distintos de células T *helper*, Th1 e Th2. O fenótipo Th1 está envolvido na imunidade a bactérias intracelulares, protozoários, vírus e produção das citocinas IFN- γ e TNF- β . Uma resposta imune típica de células Th1 específicos é caracterizada por respostas cutâneas de hipersensibilidade tardia e ativação de linfócitos B produtores de anticorpos IgG, principalmente da classe IgG1 em humanos. O fenótipo Th2 está associado com respostas imunes a alérgenos e helmintos. A célula Th2 ativada expressa ligante de CD40 e secreta IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, citocinas que auxiliam as células B a produzirem anticorpos IgE e IgG4. Além disso, IL-3, IL-5 e GM-CSF secretadas pelas células Th2 ativadas ativam eosinófilos, basófilos e mastócitos. A IL-4 estimula a expressão de VCAM-1 (molécula-1 de adesão celular vascular) nas células endoteliais, resultando em aumento da adesão dos linfócitos, monócitos e especialmente eosinófilos. A IL-5 é um importante fator de crescimento seletivo para diferenciação terminal, ativação e manutenção dos eosinófilos nos tecidos, possivelmente inibindo a sua apoptose. Além disso, IL-5 em associação com TGF- β , participa na produção de anticorpos da classe IgA (PICCIRILLO et al., 2002; JAMES; DURAN, 2008).

Várias citocinas estão envolvidas na modulação da síntese de IgE, tais como IFN- γ , IFN- α , TNF- β , IL-8, IL-10, que inibem sua síntese ou IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, TNF- α que têm efeito estimulatório (WORM; HENZ, 1997). Recentemente, uma subpopulação de células T CD4⁺CD25⁺ denominadas de células T regulatórias produtoras de TGF- β , tem sido identificada com propriedades imunorregulatórias (inibitórias) tanto para células Th1 como Th2, apresentando um possível papel no controle de respostas alérgicas (MOINGEON et al., 2006). Estudos indicam que o mecanismo de supressão das respostas em diferentes condições patológicas (autoimunidade, respostas alérgicas e infecciosas, entre outras) destas células é

dependente da produção e secreção de TGF- β e/ou IL-10 (PICCIRILLO et al., 2002; JAMES; DURAN, 2008).

Atualmente, uma terceira sub-população de células Th CD4⁺ distinta de Th1 e Th2, produtora de IL-17, tem sido caracterizada como Th17. Esta sub-população se diferencia a partir da célula Th0 na presença de TGF- β , IL-6, IL-21 e IL-23 (OBOKI et al., 2008). Assim, células Th17 desempenham importantes funções na indução de inflamação tecidual pela através da produção e liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, particularmente envolvendo o recrutamento e ativação de neutrófilos (INFANTE-DUARTE et al., 2000). Recentemente, foi demonstrado que em pacientes asmáticos, a expressão de RNAm codificando para IL-17 foi aumentada em pulmões, escarro, lavado broncoalveolar e soro, e a gravidade da hipersensibilidade das vias aéreas em pacientes correlaciona com os níveis de expressão de RNAm para IL-17, sugerindo que esta citocina possui um papel importante na inflamação alérgica (WANG; LIU, 2008).

1.5 Fisiopatologia da resposta imune alérgica

Mastócitos e basófilos expressam receptores de alta afinidade para o fragmento cristalizável das moléculas de IgE (Fc ϵ RI), sendo que outros tipos celulares como monócitos (MAURER et al., 1994), células dendríticas circulantes (MAURER et al., 1996), células de Langerhans e eosinófilos (GOUNNI et al., 1994) também expressam receptor Fc ϵ RI.

A ligação de um alérgeno com moléculas de IgE acopladas à superfície de mastócitos e basófilos leva à despolarização da membrana celular, influxo de Ca⁺⁺ extracelular e posterior liberação de Ca⁺⁺ intracelular, culminando com a ativação de enzimas como a miosina quinase e a fosfolipase A2, além da queda nos níveis intracelulares de AMP cíclico (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2006).

Nos mastócitos, o resultado da ativação é a geração de mediadores lipídicos, como as prostaglandinas D2 (PGD₂) ou leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) e a exocitose de grânulos secretores. A exocitose de histamina e outros mediadores pré-formados promovem aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema e contração de músculos lisos, fenômenos esses responsáveis pelas manifestações clínicas preliminares das reações de hipersensibilidade do tipo I ou imediata, ocorrendo nos primeiros 30 minutos seguidos à exposição alérgica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Nas 12 (doze) horas que se sucedem, ocorre progressiva infiltração tecidual de células inflamatórias, desde neutrófilos a eosinófilos e células mononucleares, em resposta a

mediadores químicos (JAMES; DURAN, 2008). Os principais mediadores da resposta tardia, segundo Galli e Lantz (1999), são as citocinas, sobretudo as interleucinas do tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-5, e IL-13), os quimiotáticos celulares e as moléculas de adesão.

1.6 Sensibilização em pacientes com alergia respiratória

A sensibilização de pacientes com alergia respiratória é comumente avaliada por testes cutâneos (*in vivo*) e/ou pesquisa de IgE sérica específica (*in vitro*) (PLATTS-MILLS; SOLOMON, 1993).

1.6.1 Testes cutâneos

Existem duas técnicas convencionais, de acordo com o local de deposição do extrato alergênico na pele, sendo que seus resultados podem ser complementares: teste cutâneo de puntura (TCP) e teste intradérmico (ID).

O diagnóstico de alergia por meio de testes cutâneos de puntura são úteis para a identificação de pacientes portadores de hipersensibilidade mediada por IgE. São exames de alta especificidade e sensibilidade, de rápida e simples execução, e econômicos comparado à determinação laboratorial da IgE sérica específica. Contudo, não diagnosticam a doença alérgica, simplesmente determinam a presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos, importantes na patogênese da doença alérgica (OWNBY, 1988; BERNSTEIN; STORMS, 1995).

Quando um indivíduo sensibilizado é estimulado pela administração através da pele de um antígeno apropriado, o local torna-se eritematoso por congestão hemática dos vasos sanguíneos localmente dilatados. Na segunda fase, uma pápula origina-se em decorrência do extravasamento de plasma das vênulas. Na terceira fase, os vasos sanguíneos nas margens da pápula se dilatam e ficam ingurgitados com hemácias, resultando em eritema. A reação edematosa-eritematosa completa pode aparecer em 10 a 15 minutos depois da administração do antígeno e geralmente desaparece em menos de uma hora (KING; TAMULIS; LOCKEY, 2008).

Vários métodos são empregados para a mensuração da resposta cutânea ao teste cutâneo de puntura. Tomando-se a medida da pápula, os métodos mais empregados são a média de dois diâmetros (SQUILLACE et al., 1997) e a comparação dessa média com um controle negativo (TUNNICLIFFE et al., 1999). Os padrões de medição e interpretação dos

resultados dos testes cutâneos variam muito, contudo, são importantes para determinar o valor preditivo do teste. Dessa forma, valores limites maiores ou iguais à 3mm de pápula são relatados como positivos (KING; TAMULIS; LOCKEY, 2008).

1.6.2 Pesquisa de IgE sérica específica

A pesquisa de IgE sérica específica para um painel de alérgenos tem maior valor para o diagnóstico de atopia, porém o resultado positivo, assim como nos testes cutâneos, não é suficiente para o diagnóstico. É necessário que o resultado da IgE específica tenha relação com a história clínica do paciente, devido os níveis de IgE específica sofrerem influência de alguns fatores como idade, tempo de sensibilização ao antígeno, presença de IgG específica no soro, detalhes da técnica, qualidade dos reagentes, forma de apresentação do alérgeno no suporte sólido, tempo de incubação do soro com os antígenos, entre outros (OWNBY, 1988). Assim, vários estudos demonstram que a determinação dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos inalantes domiciliares pode ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico de pacientes atópicos (MASTRANDREA et al., 1997; SILVA et al., 2001).

1.7 Resposta de anticorpos IgA, IgE e IgG4 aos alérgenos de *D. pteronyssinus*

A grande maioria dos alérgenos de *D. pteronyssinus* são potenciais imunógenos e são reconhecidos por anticorpos IgA, IgE e subclasses de IgG em indivíduos alérgicos.

A IgA representa a principal classe de anticorpos nas vias aéreas superiores e médias, enquanto a IgG constitui a classe mais relevante para a proteção dos alvéolos e das vias aéreas inferiores. Quanto mais central e alta for a via aérea, menor será a concentração relativa de IgG para IgA; na saliva, a concentração de IgA é três a oito vezes maior que a de IgG (REYNOLDS, 1986).

Nos dois primeiros anos de vida, os níveis de IgA são geralmente bem reduzidos. Valores de adultos são alcançados por volta de 8 anos de idade. A avaliação quantitativa da IgA secretora (IgAs) em saliva, por métodos extremamente sensíveis, tem demonstrado a sua presença em nível de mucosa já a partir da segunda semana de vida. Entretanto só atinge níveis semelhantes aos de adulto por volta de sete a oito anos de idade (STIEHM, 1996; BOTTCHEER et al., 2002).

Anticorpos da classe IgA desempenham um papel essencial na proteção das mucosas. Na maioria dos indivíduos atópicos, os níveis de IgA sérica estão diminuídos e não aumentam

com a idade, como ocorreria em crianças não alérgicas. Indivíduos não atópicos respondem com produção normal de IgA frente à exposição a alérgenos ambientais, o que desencadearia o mecanismo de exclusão imune, impedindo que essas partículas sensibilizassem as células responsáveis pela produção de IgE. Em pessoas com deficiência de IgA esse mecanismo de exclusão imune deixaria de ocorrer, propiciando o contato do antígeno com plasmócitos produtores de IgE e, dessa forma, desencadeando os mecanismos de hipersensibilidade tipo I (BOTTCHEER et al., 2002; AGHAMOHAMMADI, 2009).

Enquanto a elevação dos níveis de IgE em resposta a alérgenos ambientais é uma característica distinta da atopia, anticorpos IgG alérgeno-específicos a esses mesmos alérgenos são detectados no soro e na saliva, tanto de indivíduos atópicos, quanto de indivíduos não atópicos, com distribuição diferente nos dois grupos (KENEMY et al., 1989). As principais classes de anticorpos IgG alérgeno-específicos relatadas são IgG1 e IgG4, e a predominância de uma ou outra classe depende do grau de exposição ao alérgeno (JAMES; DURHAN, 2008).

Sabe-se, portanto, que a IgE apresenta um importante papel na doença alérgica a ácaros da poeira domiciliar, sobretudo da família *Pyroglyphidae*. Entretanto, com relação às subclasses de IgG na fisiopatologia da rinite ainda não está muito bem elucidado. Em um estudo realizado por Oshika e colaboradores (1992), foi verificado que os níveis de IgG total e IgG1 e IgG4 foram dez vezes maiores em indivíduos com rinite alérgica, comparado aos não-alérgicos. Atualmente, Aalberse e colaboradores (2009) apontaram várias funções da IgG4, baseada em estudos sobre a importância desta subclasse.

Vários pesquisadores têm atribuído uma atividade protetora às subclasses de IgG, principalmente, IgG4, que é produzida como resultado de uma longa exposição antigênica e atuaria como um fator inibitório da reação de hipersensibilidade mediada por IgE. Desta forma, acredita-se que IgG4 poderia neutralizar o antígeno ou bloquear o anticorpo, melhorando, deste modo, o quadro da reação alérgica (MORI et al., 2001; MÖBS et al., 2008). As subclasses de IgG podem ser quantificadas para avaliar a eficácia da imunoterapia específica com alérgenos, embora sejam limitadas para determinar o resultado clínico (MELLO, 2001; MÖBS et al., 2008).

Diante do exposto, a identificação e quantificação de IgE específica a alérgenos em fluidos biológicos é de suma importância para o diagnóstico da rinite alérgica assim como a identificação e quantificação de IgA e IgG4 específicas são importante no acompanhamento de crianças sob imunoterapia específica com alérgenos. Estudos relacionando os níveis destas classes e subclasses de anticorpos em amostras de soro e secreções, como saliva, são escassos

na literatura.

Desta forma, o presente estudo apresenta relevância pelo desenvolvimento de técnicas imunoenzimáticas capazes de detectar anticorpos específicos a alérgenos de *D. pteronyssinus* (Dpt, Der p 1 e Der p 2) em diferentes fluidos biológicos (soro e saliva) de crianças com rinite alérgica, visando a obtenção de um melhor conhecimento da resposta imune de mucosas na rinite alérgica. Além disso, a aplicação destas técnicas imunoenzimáticas será de grande valor no monitoramento de pacientes sob imunoterapia específica a alérgenos, propiciando parâmetros objetivos, além dos clínicos subjetivos, na avaliação destes pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Determinar níveis de anticorpos IgA, IgE e IgG4 específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* e aos seus alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2, em amostras de soro e saliva de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar técnica imunoenzimática convencional (cELISA) e reversa (rELISA) para detecção dos níveis de IgA, IgE e IgG4 específicos aos alérgenos de *D. pteronyssinus* em amostras de saliva de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos;
- Verificar a correlação entre os níveis de anticorpos IgA, IgE ou IgG4 ao extrato total de *D. pteronyssinus* e aos seus alérgenos Der p 1 e Der p 2 em amostras de soro e saliva de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos;
- Verificar a correlação entre os níveis séricos e salivares de anticorpos IgA, IgE e IgG4 aos alérgenos de *D. pteronyssinus* em crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos;
- Determinar a razão entre os níveis de anticorpos IgE e IgG4 específicos aos alérgenos de *D. pteronyssinus* em amostras de soro de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido e aprovado sem restrições pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Conselho Nacional de Saúde (CNS), Ministério da Saúde, segundo normas da Resolução 196/96 que regulamenta a ética em pesquisa em seres humanos (ANEXO A).

Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B) foi assinado pelos responsáveis das crianças que concordaram em participar da pesquisa, estando cientes de todos os procedimentos adotados. Um questionário clínico elaborado segundo ISAAC – *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (1998) (ANEXO C), foi aplicado na presença de médico alergologista para maior conhecimento da história clínica dos indivíduos participantes do estudo.

3.2 Pacientes

Foram selecionados 72 crianças e adolescentes com rinite alérgica perene associada ou não à asma leve, sem distinção de sexo e idade entre 5 e 15 anos, que foram atendidos no Programa de Controle de Asma e Rinite do Sistema Único de Saúde (SUS) da cidade de Itumbiara, estado de Goiás, Brasil entre outubro e novembro de 2008. O diagnóstico de rinite alérgica foi baseado em critérios adotados internacionalmente (BOUSQUET et al., 2008). Os critérios de inclusão para a seleção dos pacientes foram: (1) história clínica de sintomas respiratórios de rinite relacionados com exposição à poeira domiciliar; (2) teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a alérgenos de *D. pteronyssinus*; (3) presença de IgE sérica específica aos alérgenos de *D. pteronyssinus* determinada por ELISA. Os critérios de exclusão para o estudo foram: (1) pacientes com prévia imunoterapia específica com alérgenos; (2) pacientes com asma moderada a grave, doenças cardiovasculares ou autoimunes, fazendo uso de drogas quimioterápicas ou imunossupressoras; (3) uso de anti-histamínicos ou corticosteróides, por via oral ou tópica, na semana anterior ao teste; (4) uso de corticosteróides sistêmicos por período de tempo prolongado; (5) presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo.

Como grupo controle, foram selecionados 14 indivíduos saudáveis, sem distinção de sexo, idade entre 5 e 15 anos de idade, sem sintomas ou histórico clínico de doenças alérgicas e com TCP e IgE sérica negativa a alérgenos inaláveis, entre os pacientes atendidos no Ambulatório de Pediatria Geral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) da cidade de Uberlândia, estado de Minas Gerais, Brasil entre janeiro e fevereiro de 2009.

As cidades onde foram selecionados os grupos alérgicos e não-alérgicos estão localizadas na região central do país, numa distância aproximada de 150Km, apresentando condições climáticas semelhantes.

3.3 Preparação dos extratos de ácaros

A extração de alérgenos de ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* ou *B. tropicalis*) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Pereira e colaboradores (2005). Em resumo, 200g de material seco de cultivo de ácaros (gentilmente cedido pelo Prof. Federico Montealegre, Immunochemistry Laboratory, Medical School of Ponce – Porto Rico, EUA) foram peneirados, adicionados em solução salina tamponada com borato 5mM (pH 8,0) contendo inibidores de proteases (50µg/mL de leupeptina, 10µg/mL de aprotinina, 1,6mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF], 1mM de benzamidina), macerados em nitrogênio líquido para ruptura dos ácaros e incubados durante 18 horas a 4°C sob agitação para extração dos alérgenos. Após centrifugação a 20.000 x g durante 45 minutos a 4°C, o sobrenadante foi dialisado em solução salina tamponada com fosfatos 0,01M pH 7,2 (PBS) por 24 horas a 4°C, consistindo no extrato total de ácaros, o qual foi distribuído em alíquotas e armazenado a -20°C. O conteúdo protéico dos extratos totais de ácaros foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando soroalbumina bovina como padrão protéico para a curva de calibração.

Para o TCP, os extratos alergênicos de ácaros foram preparados a partir dos extratos totais, em concentração protéica final de 2mg/mL em PBS contendo 0,4% de fenol e 50% de glicerina (Bayer Corporation, Spokane, EUA). Os extratos foram armazenados em frascos de vidro do tipo âmbar com conta-gotas a 4°C até a realização dos testes cutâneos.

3.4 Teste cutâneo de puntura

Todas as crianças foram submetidas ao TCP de acordo com as orientações da Academia Européia de Alergologia e Imunologia Clínica (MALLING, 1993), utilizando um painel de aeroalérgenos como segue: extrato de ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*), preparados como descrito anteriormente (PEREIRA et al., 2005); extratos comerciais de barata (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*), de fungo (*Alternaria alternata*) e de animais domésticos (*Felis domesticus* e *Canis familiaris*) (IPI/ASAC, São Paulo, Brasil). Foram utilizadas solução de histamina a 10mg/ml como controle positivo e diluente da preparação alergênica tamponado com glicerol como controle negativo (IPI/ASAC, São Paulo, Brasil). Após 15 minutos, as reações cutâneas foram mensuradas e pápulas com diâmetro médio maior que 3mm que aquelas do controle negativo foram consideradas como TCP positivo (McKAY et al., 2006).

3.5 Coleta de amostras de sangue

Paralelamente ao TCP, amostras de sangue (volume de 5mL) foram coletadas sem anti-coagulante de cada criança utilizando tubos *Vacutainer* (Becton Dickson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, EUA) e agulhas 21G1 para punção venosa na região do antebraço. As amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos a 700 x g e os soros obtidos, distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C até a realização dos testes imunoenzimáticos.

3.6 Coleta de amostras de saliva

Para obter amostras de saliva foi utilizado o Salivette® (Sarstedt AG & Co., Numbrecht, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. Primeiramente, as crianças foram orientadas a enxaguar a boca com água mineral e, posteriormente, a tampa superior do Salivette® foi removida, o algodão colocado embaixo da língua durante aproximadamente 3 minutos. Em seguida, o algodão foi removido, retornado ao Salivette® que foi colocado imediatamente em gelo e, posteriormente, centrifugado (3.000 x g por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi coletado (1 a 1,5mL) e distribuído em alíquotas em tubos tipo *ependorf*, identificados e armazenados a -20°C até a utilização em testes imunoenzimáticos.

3.7 Análise de anticorpos IgA específicos no soro e na saliva

Para a análise de anticorpos IgA específicos ao alérgeno Dpt em amostras de soro e saliva, a técnica ELISA indireto convencional foi empregada como anteriormente descrito por Silva e colaboradores (2001). As concentrações ótimas das amostras e reagentes foram determinadas por meio de titulação em bloco dos reagentes. Em resumo, placas de microtitulação de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com extrato total de Dpt (50 µL/poço) a 20 µg/mL em tampão carbonato 0,06M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e os sítios ativos dos poços foram bloqueados (100 µL/poço) com PBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA) a 1% (PBS-T-BSA 1%) por 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T, as amostras de soro ou saliva diluídas 1:50 ou 1:20, respectivamente, em PBS-T-BSA 1% foram adicionadas em duplicata (50 µL/poço) e incubadas por 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas seis vezes e incubadas (50 µL/poço) com anticorpo secundário biotilado anti-IgA humana (Sigma Chemical Co.) diluído 1:5000 em PBS-T-BSA 1% durante 1 hora a 37°C. Após novo ciclo de seis lavagens, foi adicionado (50µL/poço) o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluído 1:1000 em PBS-T-BSA 1% e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi revelada com o substrato enzimático consistindo de H₂O₂ a 0,03% e ABTS (2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid) a 0,01M diluídos em tampão citrato-fosfato 0,07M (pH 4,2). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus MKII - Flow Laboratories, McLean, EUA) utilizando filtro de 405nm. Os resultados foram expressos em Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/mL) e calculados com base em uma curva padrão construída com um pool de soros ou salivas contendo altos níveis de anticorpos IgA específicos a Dpt (1000UA/mL).

Para a análise de anticorpos IgA específicos aos alérgenos Der p 1 e Der p 2, a técnica ELISA reversa foi empregada (SILVA et al., 2001). Em resumo, placas de alta afinidade foram sensibilizadas (50µL/poço) com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Der p 1 (clone 5H8; Universidade da Virginia, Charlottesville, VA, EUA) ou anti-Der p 2 (clone 1D8; Universidade da Virginia, Charlottesville, VA, EUA) na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-BSA 1%. Após lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas (50µL/poço) com extrato total de Dpt (20µg/mL) por 1 hora à temperatura

ambiente. Em seguida, as placas foram incubadas (50µL/poço) com as amostras de soro (1:50) ou saliva (1:20) e, subsequentemente, com anticorpo secundário biotinilado anti-IgA humana (1:3000), conjugado estreptavidina-peroxidase (1:1000) e substrato enzimático, como descrito para ELISA-IgA convencional. Os níveis de IgA foram expressos em UA/mL, como estabelecido para ELISA-IgA convencional.

3.8 Análises de anticorpos IgE específicos no soro e na saliva

Para a análise de anticorpos IgE específicos ao alérgeno Dpt em amostras de soro e saliva, a técnica ELISA indireto convencional foi empregada como anteriormente descrito por Silva e colaboradores (2001). As concentrações ótimas das amostras e reagentes foram determinadas por meio de titulação em bloco dos reagentes. Em resumo, placas de alta afinidade foram sensibilizadas com extrato de Dpt (20µg/mL), lavadas e bloqueadas como descrito em ELISA para detecção de IgA específica a Dpt. As amostras de soro ou saliva foram diluídas 1:2 em PBS-T-BSA 1% e incubadas por 2 horas a 37°C. Subsequentemente, foi adicionado o anticorpo secundário biotinilado anti-IgE humana (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, EUA) diluído 1:1000 em PBS-T-BSA 1% e incubado por 1 hora a 37°C. Em seguida, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase diluído 1:500 em PBS-T-BSA 1% e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi revelada com substrato enzimático como descrito para ELISA-IgA convencional. Os níveis de anticorpos IgE foram expressos em Índice ELISA (IE), segundo a fórmula: $IE = DO_{amostra} / cut\ off$, onde o *cut off* foi estabelecido como a média aritmética dos valores de DO dos soros controles negativos acrescida de 3 desvios padrões (RODRIGUES et al., 2004). Valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos para excluir valores de reatividade limítrofes próximos aos valores de $IE = 1,0$.

Para a análise de anticorpos IgE específicos aos alérgenos Der p 1 e Der p 2, a técnica ELISA reversa foi empregada (SILVA et al., 2001), como descrito para ELISA-IgA. Em resumo, placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-Der p 1 ou anti-Der p 2 (10µg/mL), bloqueadas e incubadas com extrato total de Dpt (20µg/mL). Em seguida, as placas foram incubadas com amostras de soro ou saliva (1:2) e, subsequentemente, com anticorpo secundário biotinilado anti-IgE (1:1000), conjugado estreptavidina-peroxidase (1:500) e substrato enzimático, como descrito para ELISA-IgE convencional. Os níveis de anticorpos IgE foram arbitrariamente expressos em IE.

3.9 Análises de anticorpos IgG4 específicos no soro e na saliva

Para a análise de anticorpos IgG4 específicos ao alérgeno Dpt em amostras de soro e saliva, a técnica ELISA indireto convencional foi empregada como anteriormente descrito (SILVA et al., 2001). As concentrações ótimas das amostras e reagentes foram determinadas por meio de titulação em bloco dos reagentes. Em resumo, placas de alta afinidade foram sensibilizadas com extrato total de Dpt (20 µg/mL) em tampão carbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-BSA 0,1% por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagens, as amostras de soro ou saliva foram diluídas 1:10 em PBS-T-BSA 0,1%. Subsequentemente foi adicionado o anticorpo secundário biotilado anti-IgG4 humana (Sigma Chemical Co.) diluído 1:5000 em PBS-T-BSA 0,1% e incubado por 1 hora a 37°C. Em seguida, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase diluído 1:500 em PBS-T-BSA 0,1% e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi revelada com substrato enzimático como descrito para ELISA-IgA convencional. Os níveis de anticorpos IgG4 foram expressos em IE como estabelecido para ELISA-IgE.

Para a análise de anticorpos IgG4 específicos aos alérgenos Der p 1 e Der p 2, a técnica ELISA reversa foi empregada (SILVA et al., 2001), como descrito para ELISA-IgA. Em resumo, placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-Der p 1 ou anti-Der p 2 (10 µg/mL), bloqueadas e incubadas com extrato total de Dpt (20 µg/mL). Em seguida, as placas foram incubadas com amostras de soro ou saliva (1:10) e, subsequentemente, com anticorpo secundário biotilado anti-IgG4 (1:3000), conjugado estreptavidina-peroxidase (1:500) e substrato enzimático, como descrito para ELISA-IgG4 convencional. Os níveis de anticorpos IgG4 foram arbitrariamente expressos em IE.

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5,0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Como os níveis de anticorpos não tiveram distribuição normal, as comparações foram analisadas utilizando testes não-paramétricos. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o teste U de Mann-Whitney. As diferenças nos percentuais de amostras positivas para anticorpos IgG4 específicos aos alérgenos de *D. pteronyssinus* entre os grupos foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Correlação entre

níveis de anticorpos foi analisada pelo teste de correlação de Spearman. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.11 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

4 RESULTADOS

4.1 Características dos indivíduos do estudo

Um total de 86 crianças e adolescentes foram estudados, das quais 72 tinham rinite alérgica (42 do sexo masculino e 30 do sexo feminino; média de idade $\pm$ DP: $10,0 \pm 3,1$ anos) e 14 eram indivíduos saudáveis não-alérgicos (9 do sexo masculino e 5 do sexo feminino; média de idade $\pm$ DP: $10,6 \pm 2,6$ anos). Não houve diferença significativa quanto ao sexo ($p = 0,7723$) ou idade ($p = 0,2358$) entre os dois grupos. Resultados do TCP ao extrato total de *D. pteronyssinus* revelou altos valores médios de pápula ($8,8 \pm 3,2$ mm) no grupo alérgico comparado ao não-alérgico ($p = 0,0002$).

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos indivíduos do estudo.

Características	Grupos		
	Alérgico	Não-alérgico	Valor de p*
Número de indivíduos	72	14	-
Idade (anos)			
Média (variação)	10 (5-15)	10,6 (7-14)	0,2358
Sexo (Masculino/Feminino)	42/30	9/5	0,7723
TCP positivo a Dp (mm) [§]			
Média $\pm$ DP	$8,8 \pm 3,2$	$2,3 \pm 1,0$	0,0002

[§] Positividade ao teste cutâneo de puntura (TCP) a alérgenos de *D. pteronyssinus* (Dp) foi determinada a partir do diâmetro médio da pápula e estabelecida como ≥ 3 mm em relação ao controle negativo da reação.

* Determinado através do teste t de Student/Fisher.

4.2 Níveis de IgE específica a Dpt e a seus alérgenos

A Figura 2 apresenta os níveis de IgE sérica aos alérgenos de *D. pteronyssinus* nos diferentes grupos estudados. Os níveis de IgE anti-Dpt foram maiores no grupo alérgico (média geométrica [m.g.] IE: 5,97) que no não-alérgico (m.g. IE: 0,79; $p = 0,0004$). Resultados similares foram observados para os níveis de IgE anti-Der p 1 (m.g. IE: 6,59 vs 0,67; $p < 0,0001$) e anti-Der p 2 (m.g. IE: 9,00 vs 0,75; $p < 0,0001$). No entanto, os níveis de

IgE específica na saliva foram indetectáveis em ambas as crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos (dados não mostrados).

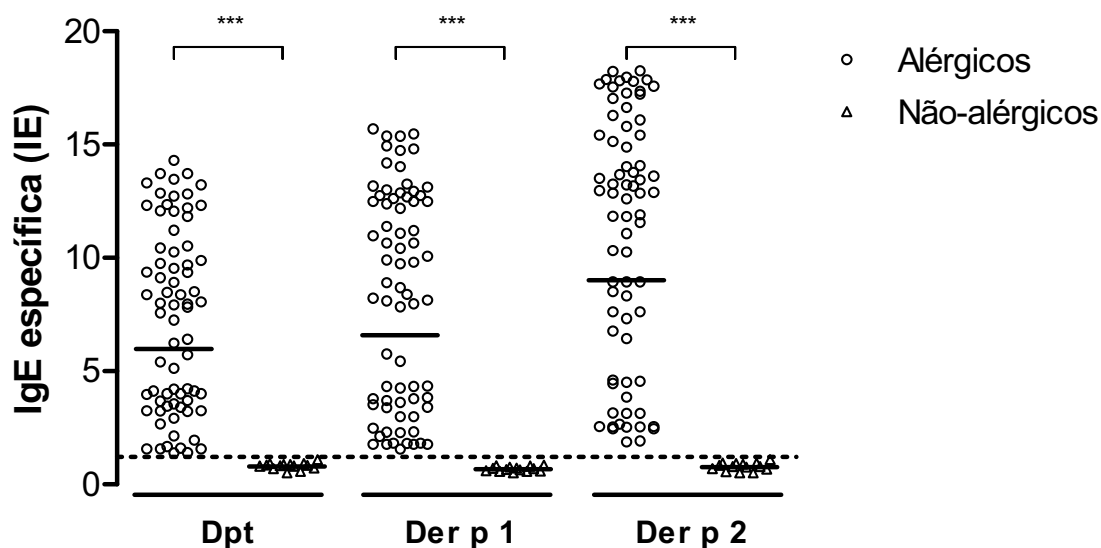


Figura 2. Níveis de anticorpos IgE específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro de crianças e adolescentes alérgicos ($n = 72$) e não-alérgicos ($n = 14$). Os dados são expressos em Índice ELISA (IE) e a média geométrica para cada alérgeno é indicada por barras horizontais. A linha tracejada indica o *cut off* da reação (EI = 1,2). *** $p < 0,0001$ (teste de Mann-Whitney).

4.3 Correlação entre níveis de IgE a Dpt e a seus alérgenos

A correlação entre os níveis de IgE ao extrato total Dpt e aos seus alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2, em crianças e adolescentes alérgicos está ilustrada na Figura 3. Níveis de IgE anti-Dpt mostraram alta correlação positiva com IgE anti-Der p 1 ($r = 0,8418$; $p < 0,0001$) (Figura 3A) e IgE anti-Der p 2 ($r = 0,8484$; $p < 0,0001$) (Figura 3B). Similarmente, níveis de IgE anti-Der p 1 foram correlacionados positivamente com IgE anti-Der p 2 ($r = 0,8112$; $p < 0,0001$) (Figura 3C).

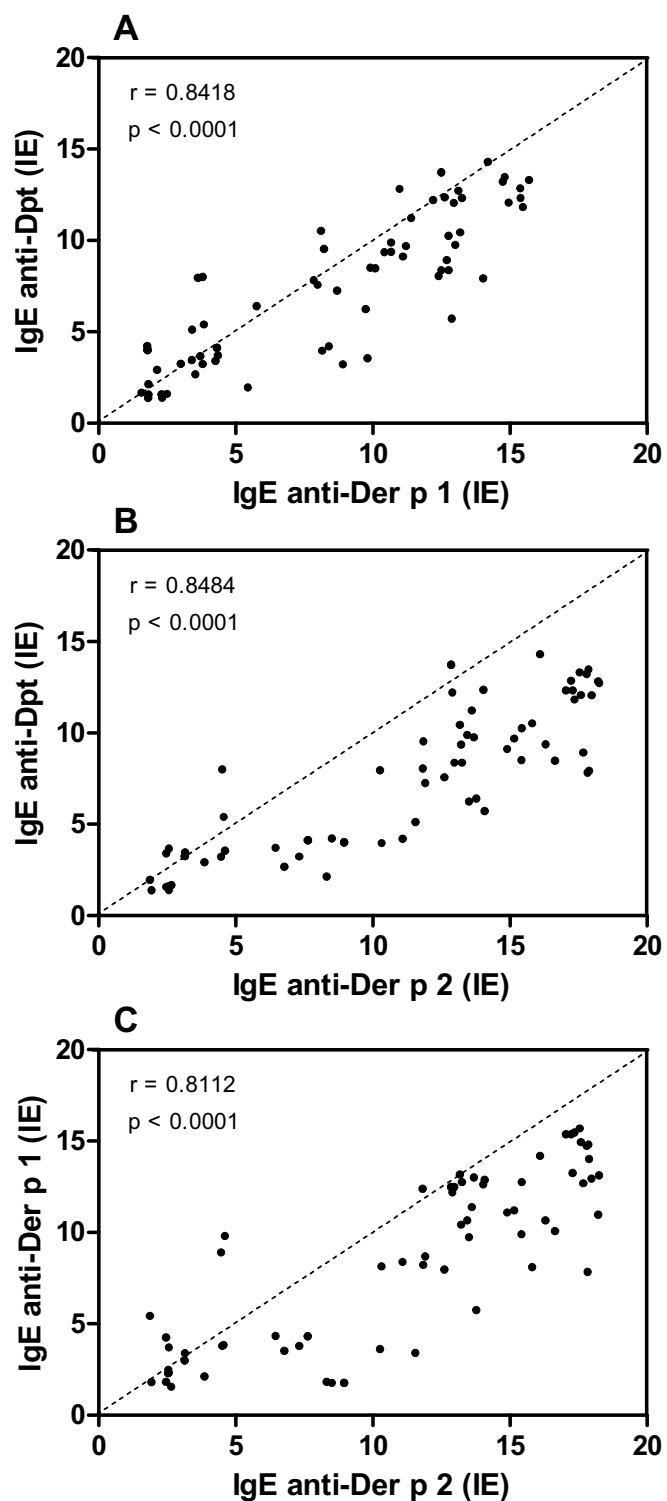


Figura 3. Correlação entre níveis de anticorpos IgE específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro de 72 crianças e adolescentes alérgicos. (A) IgE anti-Dpt vs anti-Der p 1; (B) IgE anti-Dpt vs anti-Der p 2, (C) IgE anti-Der p 1 vs anti-Der p 2. Os dados são expressos em Índice ELISA (IE). O coeficiente de correlação de Spearman (r) e a significância estatística também são indicados

4.4 Níveis de IgA específica a Dpt e a seus alérgenos

Os níveis de anticorpos IgA séricos específicos a Dpt, Der p 1 e Der p 2 foram maiores no grupo não-alérgico (m.g.: 791 UA/mL; 568 UA/mL; 407 UA/mL, respectivamente) que no grupo alérgico (m.g.: 135 UA/mL; 69 UA/mL; 103 UA/mL, respectivamente); ($p < 0,0001$) (Figura 4A). Resultados semelhantes foram observados para os níveis de IgA anti-Dpt, anti-Der p 1 e anti-Der p 2 na saliva de crianças e adolescentes não-alérgicos (g.m.: 858 UA/mL; 889 UA/mL; 774 UA/mL, respectivamente), em comparação com os alérgicos (g.m.: 126 UA/mL; 186 UA/mL; 150 UA/mL, respectivamente; $p < 0,0001$) (Figura 4B).

4.5 Correlação entre níveis de IgA a Dpt e a seus alérgenos

A correlação entre os níveis de IgA específica a Dpt e a seus alérgenos (Der p 1 e Der p 2) foi avaliada em ambos os grupos alérgico e não-alérgico (Figura 5). Como demonstrado na Figura 5A,B,C, foi observada alta correlação positiva entre os níveis de IgA anti-Dpt e a seus alérgenos em amostras de soro de ambos os grupos ($p < 0,0001$).

Os níveis de IgA específica aos alérgenos de Dpt, Der p 1 e Der p 2 também foram correlacionados em amostras de saliva (Figura 5D,E,F). Foi encontrada correlação positiva moderada entre os níveis de IgA específica a Dpt e a seus alérgenos Der p 1 e Der p 2 no grupo de indivíduos alérgicos ($p < 0,0001$), mas não em não-alérgicos ($(p > 0,05)$) (Figura 5D,E). Entretanto, níveis de IgA anti-Der p 1 e anti-Der p2 mostraram alta correlação positiva em ambos os grupos alérgicos e não-alérgicos ($p < 0,0001$) (Figura 5F). Nenhuma correlação foi observada entre níveis séricos e salivares de IgA específica a Dpt, Der p 1 e Der p 2 em ambos os grupos (Tabela 2).

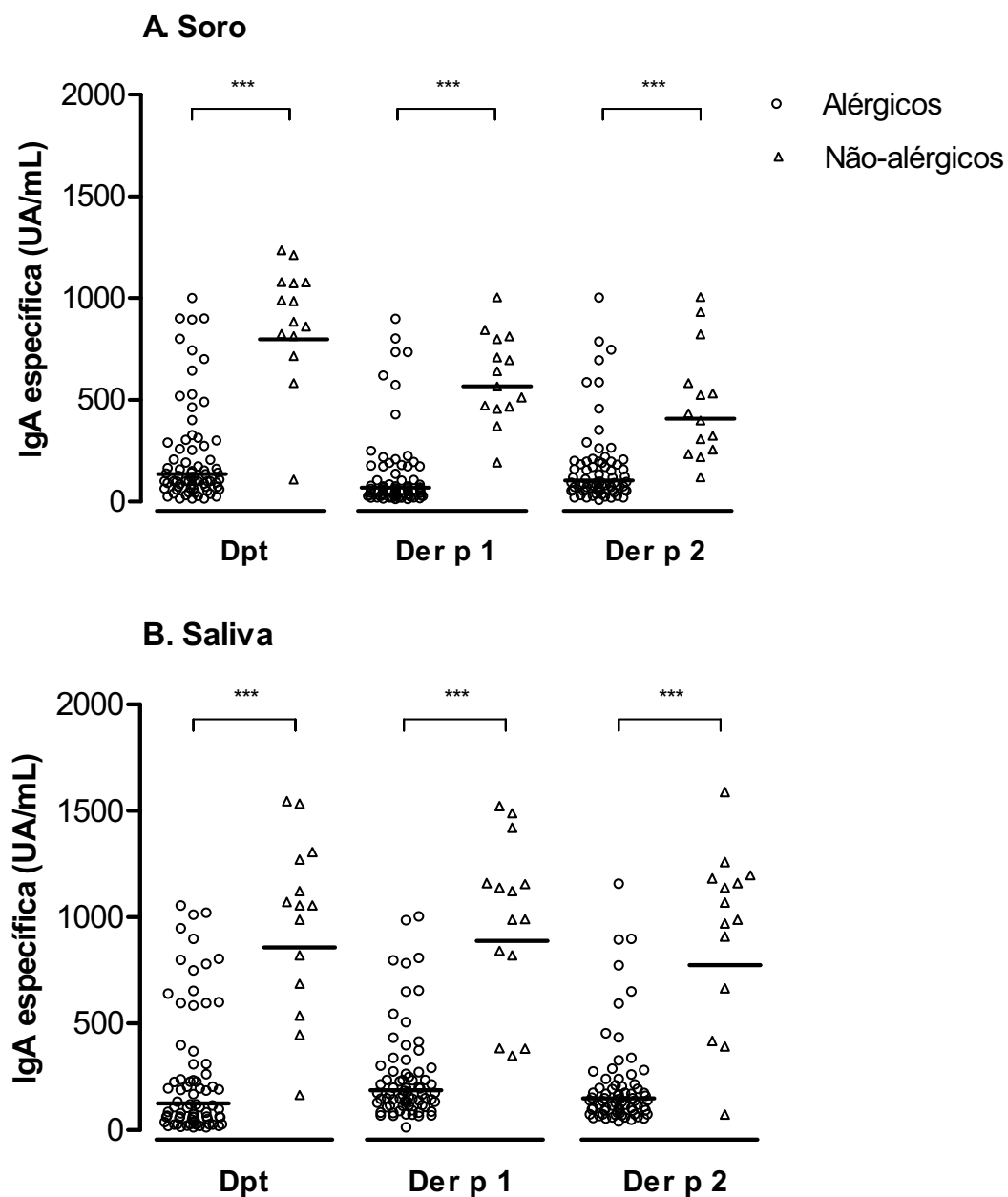


Figura 4. Níveis de anticorpos IgA específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro de crianças e adolescentes alérgicos ($n = 72$) e não-alérgicos ($n = 14$). Os dados são expressos em Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/mL) e a média geométrica para cada alérgeno é indicada por barras horizontais. *** $p < 0,0001$ (teste de Mann-Whitney).

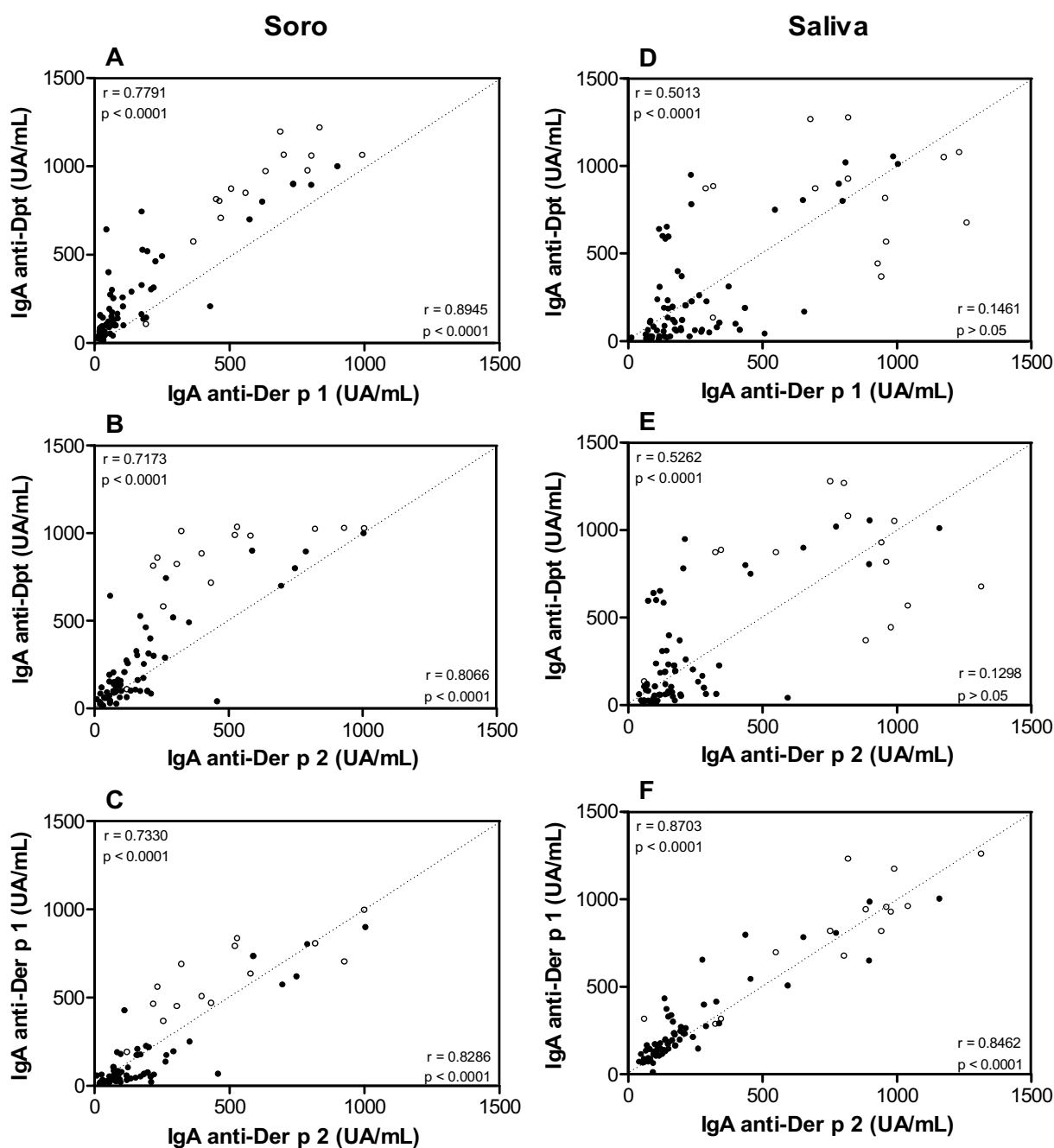


Figura 5. Correlação entre níveis de anticorpos IgA específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro (A-C) e saliva (D-F) de 72 crianças e adolescentes alérgicos (●) e 14 não-alérgicos (○). Os dados são expressos em Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/mL) e a linha pontilhada indica uma correlação perfeita. Os coeficientes de correlação Spearman (r) e a significância estatística também são indicados para indivíduos alérgicos (canto superior esquerdo) e não-alérgicos (canto inferior direito).

Tabela 2. Correlação entre níveis séricos e salivares de IgA e IgG4 específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos.

Grupos	Soro versus Saliva					
	IgA	IgG4	IgA	IgG4	IgA	IgG4
	anti-Dpt	anti-Dpt	anti-Der p 1	anti-Der p 1	anti-Der p 2	anti-Der p 2
Alérgico (n = 72)	r = 0,1802 p > 0,05	r = 0,3667 *p < 0,001	r = -0,0519 p > 0,05	r = 0,3551 *p < 0,001	r = -0,0547 p > 0,05	r = 0,2901 *p < 0,05
Não- alérgico (n = 14)	r = 0,2640 p > 0,05	r = -0,0396 p > 0,05	r = 0,3407 p > 0,05	r = 0,1894 p > 0,05	r = 0,5209 p > 0,05	r = 0,2970 p > 0,05

r = Coeficiente de correlação de Spearman; * Valores estatisticamente significativos (p < 0,05).

4.6 Níveis de IgG4 específica a Dpt e a seus alérgenos

Os níveis de IgG4 séricos anti-Dpt, anti-Der p 1 e anti-Der p 2 foram maiores no grupo alérgico (m.g. IE: 3,47; 3,49; 2,97; respectivamente) comparados ao grupo não-alérgico (m.g. IE: 1,62; 1,62; 1,22; respectivamente; p < 0,05) (Figura 6A). Resultados semelhantes foram observados para níveis de IgG4 salivares a Dpt e Der p 1 em crianças e adolescentes alérgicos (g.m. IE: 2,15; 1,93; respectivamente) em relação aos não-alérgicos (g.m. IE: 1,09; 1,45; respectivamente; p < 0,05) (Figura 6B). Entretanto, níveis de IgG4 anti-Der p 2 na saliva de indivíduos alérgicos não foram diferentes dos não-alérgicos (p > 0,05) (Figura 6B).

A porcentagem de amostras de soro positivas para IgG4 anti-Der p 2 foi maior nas crianças e adolescentes alérgicos que em não-alérgicos (82% vs 50%; p = 0,016), mas nenhuma diferença significativa foi observada na positividade de IgG4 sérica anti-Dpt e anti-Der p 1 entre os grupos alérgico e não-alérgico. Em amostras de saliva, foi observada maior porcentagem de amostras positivas para IgG4 anti-Dpt no grupo alérgico comparada ao não-alérgico (83% vs 43%; p = 0,002); entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada na positividade para IgG4 salivar anti-Der p 1 e anti-Der p 2 entre os grupos.

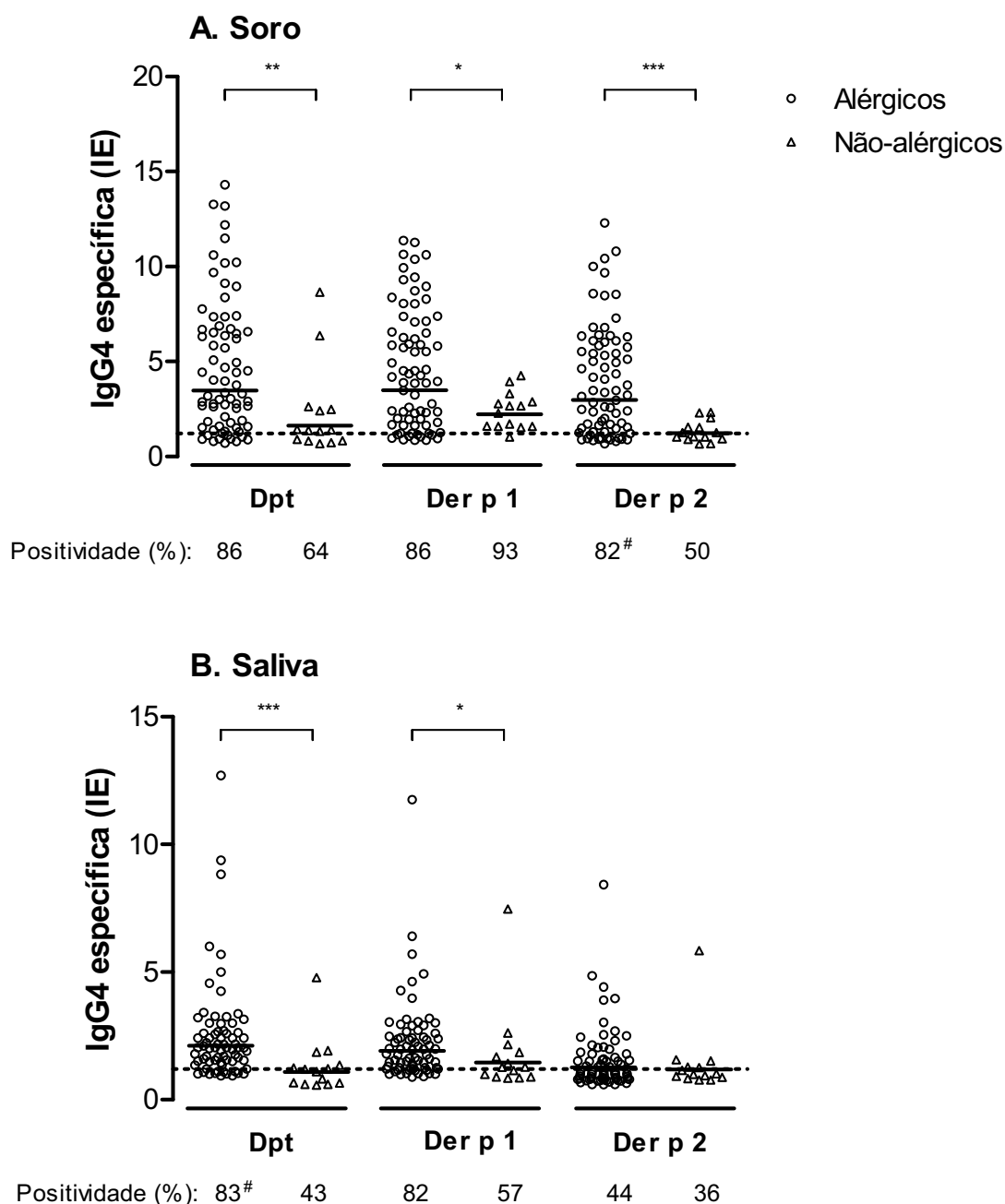


Figura 6. Níveis de anticorpos IgG4 específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro (A) e saliva (B) de crianças e adolescentes alérgicos (n = 72) e não-alérgicos (n = 14). Os dados são expressos em Índice ELISA (IE) e a média geométrica para cada alérgeno é indicada por barras horizontais. A linha tracejada indica o *cut off* da reação (EI = 1,2) e as porcentagens de amostras positivas para IgG4 contra cada alérgeno também são indicadas. * p < 0,05; ** p < 0,001; *** p < 0,0001 (teste de Mann-Whitney); # p < 0,05 entre grupos alérgicos e não-alérgicos para cada alérgeno (teste exato de Fisher).

4.7 Correlação entre níveis de IgG4 a Dpt e a seus alérgenos

Correlações entre os níveis de anticorpos IgG4 específicos a Dpt e a seus alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2, em amostras de soro ou saliva de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos estão demonstradas na Figura 7. Foi encontrada alta correlação positiva entre os níveis de IgG4 anti-Dpt e anti-Der p 1 em amostras de soros de ambos os grupos ($p < 0,0001$) (Figura 7A), enquanto que moderada correlação positiva foi observada entre os níveis de IgG4 anti-Dpt vs anti-Der p 2 ($p < 0,0001$), bem como entre IgG4 anti-Der p 1 vs anti-Der p 2 ($p < 0,0001$) em soros de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos (Figura 7B,C). Por outro lado, níveis de IgG4 salivares a Dpt, Der p 1 e Der p 2 foram altamente correlacionados entre si em ambos os grupos (Figura 7D,E,F).

A correlação entre os níveis séricos e salivares de IgG4 específica a Dpt, Der p1 e Der p 2 se mostrou positiva, porém fraca, para todos os alérgenos no grupo de crianças e adolescentes alérgicos ($p < 0,05$) e nenhuma correlação foi observada no grupo não-alérgico (Tabela 2).

4.8 Comparação entre níveis séricos de IgG4 e IgE a Dpt, Der p 1 e Der p 2

A relação entre os níveis séricos de IgG4 e IgE específicas foi analisada por meio da razão IgG4/IgE (Tabela 3), observando-se valores menores que 1,0 para todos os alérgenos e significativamente menor em crianças e adolescentes alérgicos que em não-alérgicos ($p < 0,0001$).

Tabela 3. Razão entre níveis séricos de IgG4 e IgE específicas ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos.

Razão ^a	Grupos		
	Alérgico	Não-alérgico	Valor de p
IgG4/IgE para Dpt	0,54 (0,33 – 0,99)	1,64 (1,01 – 2,64)	$p < 0,0001$
IgG4/IgE para Der p 1	0,54 (0,28 – 0,75)	2,10 (1,61 – 3,21)	$p < 0,0001$
IgG4/IgE para Der p 2	0,35 (0,21 – 0,47)	1,45 (1,20 – 2,18)	$p < 0,0001$

^a Dados expressos em mediana (quartis 25% - 75%).

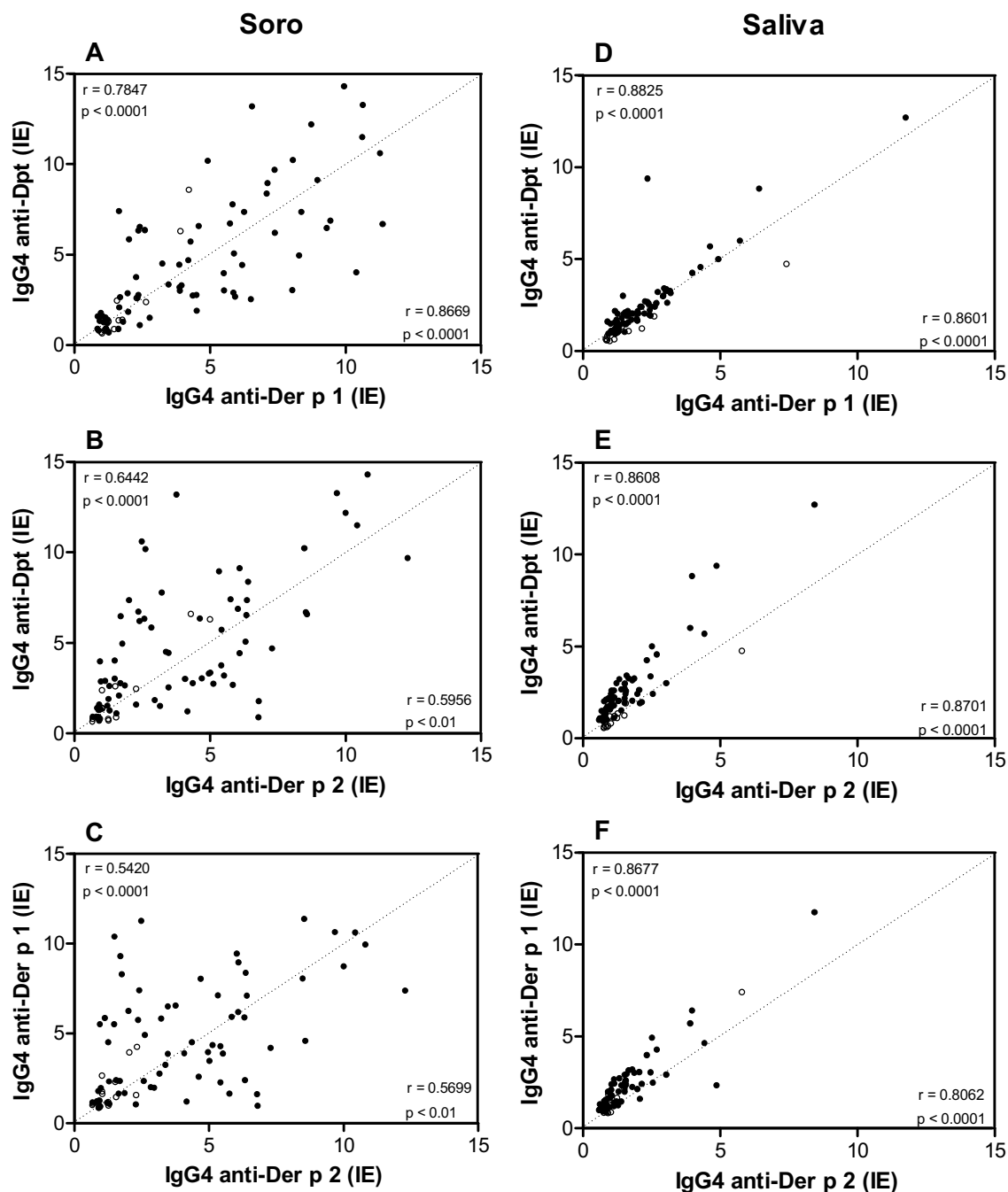


Figura 7. Correlação entre níveis de anticorpos IgG4 específicos ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e a seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em amostras de soro (A-C) e saliva (D-F) de 72 crianças e adolescentes alérgicos (●) e 14 não-alérgicos (○). Os dados são expressos em Índice ELISA (IE) e a linha pontilhada indica uma correlação perfeita. Os coeficientes de correlação Spearman (r) e a significância estatística também são indicados para indivíduos alérgicos (canto superior esquerdo) e não-alérgicos (canto inferior direito).

5 DISCUSSÃO

Ácaros da poeira domiciliar como *D. pteronyssinus* são bem reconhecidos como importantes fontes de alérgenos para induzir doenças alérgicas respiratórias. Embora crianças com RA sensibilizadas aos ácaros possuam níveis aumentados de IgE sérica específica aos alérgenos, a presença de diferentes isotipos de anticorpos salivares, como IgA, IgE e subclasses de IgG, bem como a relação entre anticorpos séricos e salivares ainda não estão bem estabelecidas. Além disso, com o crescente avanço nas abordagens da imunoterapia sublingual para RA, a mensuração de anticorpos IgA, IgE ou IgG4 específicos aos alérgenos em amostras de saliva pode ser uma ferramenta útil para o acompanhamento das alterações imunológicas durante o tratamento.

No presente estudo, crianças com RA apresentaram níveis elevados de IgE sérica específica a Dpt e a seus alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2, que foram altamente correlacionados entre si. Além disso, quando níveis de IgE sérica anti-Der p 1 e anti-Der p 2 foram correlacionados, observou-se que as crianças estavam mais sensibilizadas aos alérgenos de Der p 2 que Der p 1. Neste contexto, estudos anteriores mostraram que níveis de IgE anti-Der p 2 foram sempre maiores do que IgE anti-Der p 1 em soro de pacientes, reforçando que Der p 2 parece ser uma molécula mais imunologicamente ativa que Der p 1 na indução de síntese de IgE (MASTRANDREA et al., 1997, QUEIRÓS et al., 2008). Considerando que existe importante reatividade cruzada entre *D. pteronyssinus* e *D. farinae* e que a co-sensibilização a alérgenos dos dois ácaros é frequentemente observada, a detecção de IgE específica a Dpt, Der p 1 e Der p 2 pode ser suficiente para avaliar a sensibilização aos ácaros da poeira domiciliar. Por outro lado, IgE específica foi indetectável em amostras de saliva de ambos os grupos de crianças alérgicas e não-alérgicas, confirmando estudo anterior, onde não foram encontrados anticorpos IgE na saliva (NAKAJIMA; GILLESPIE; GLEICH, 1975). Estes achados sugerem que anticorpos IgE específicos não foram produzidos localmente na mucosa oral, nem passivamente transferidos do soro ou secreções nasais, embora seja bem conhecido que IgE específica é uma importante classe de imunoglobulina na mucosa nasal e parece ser produzida localmente (NAKAJIMA; GILLESPIE; GLEICH, 1975; MARCUCCI et al., 2003).

No presente estudo, níveis de anticorpos IgA anti-Dpt, anti-Der p 1 e anti-Der p 2, foram significativamente maiores em ambas amostras de soro e saliva em crianças não-alérgicas que em alérgicas, sugerindo um papel protetor para anticorpos IgA alérgeno-

específicos no desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias. Tem sido proposto que baixos níveis de IgA salivar estão associados com o desenvolvimento de alergias (BOTTCHEER et al., 2002). A diminuição de IgA total na saliva de crianças com atopia também já foi descrita (PAYETTE; WEISS, 1977), bem como respostas deficientes de IgA salivar contra o vírus sincicial respiratório foram encontradas em crianças alérgicas sintomáticas (BANZHOF et al., 1994). Schwarze e colaboradores (1998) verificaram em modelo murino de sensibilização alérgica das vias aéreas que o pré-tratamento com IgA alérgeno-específica anterior à inalação de alérgenos foi capaz de evitar o desenvolvimento de hiperresponsividade das vias aéreas, a inflamação pulmonar eosinofílica, a produção de IgE alérgeno-específica e a produção local de citocinas de perfil Th2. Assim, IgA alérgeno-específica pode modificar as consequências respiratórias e imunológicas em camundongos sensibilizados. Em estudos anteriores, indivíduos não-atópicos saudáveis apresentaram produção de IgA sérica anti-Der p 1 aumentada, mas não de anticorpos IgE específicos (JUTEL et al., 2003; AYDOGAN et al., 2007). Este aumento de IgA específica no soro coincidiu com o aumento de TGF- β , justificando o papel da IgA e do TGF- β nas respostas imunes periféricas de mucosas aos alérgenos em indivíduos saudáveis. Além disso, a presença de IgA sérica e salivar em pacientes com RA parece ser um mecanismo imunoregulatório concorrente através da ativação de células T regulatórias produtoras de TGF- β na tentativa de normalizar as reações alérgicas (JUTEL et al., 2003; AYDOGAN et al., 2007).

Contrastando com os nossos achados, Kitani e colaboradores (1985) demonstraram que anticorpos IgA específicos á ácaros em amostras de soro e escarro foram significativamente maiores em pacientes sensibilizados que em controles normais. Além disso, crianças que desenvolveram alergia até os 2 anos de idade tendem a ter níveis mais altos de IgA total e de IgA específica a alérgenos de gatos na saliva do que crianças não-alérgicas (BOTTCHEER et al., 2002). Um recente estudo comparando níveis de anticorpos anti-Der p 1 em crianças com doenças alérgicas respiratórias e controles saudáveis mostrou que anticorpos IgA específicos em soros de crianças alérgicas não foram significativamente diferentes dos controles, mas quando a razão IgA/IgE foi investigada, verificou-se ser significativamente menor em crianças com asma, mas não em crianças com RA quando comparado ao grupo controle (AYDOGAN et al., 2007).

Analisando a correlação entre os níveis de IgA específica a Dpt e a seus alérgenos principais, níveis de IgA sérica anti-Dpt correlacionaram positivamente com níveis de IgA anti-Der p 1 ou anti-Der p 2 e entre os alérgenos principais, tanto no grupo de crianças alérgicas quanto em não-alérgicas. Em contraste, níveis de IgA salivar anti-Dpt

correlacionaram moderadamente com níveis de IgA anti-Der p 1 ou anti-Der p 2 apenas em crianças alérgicas, sem correlação significativa nos controles não-alérgicos. Além disso, nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis séricos e salivares de IgA específica a Dpt, Der p 1 e Der p 2, em ambas as crianças alérgicas e não-alérgicas. Estes achados sugerem que respostas imunes sistêmicas são muito mais estimuladas do que respostas imunes secretoras em ambos os grupos. Em adição, a correlação entre níveis de IgA salivar específica a Dpt e a seus alérgenos principais encontrada somente em crianças alérgicas e a ausência de correlação entre níveis séricos e salivares de IgA específica sugerem que anticorpos IgA sejam produzidos localmente em vez de passivamente transferidos do soro. Neste contexto, é bem conhecido que a grande maioria de anticorpos IgA em secreções são produzidos localmente (NAKAJIMA; GILLESPIE; GLEICH, 1975; PLATTS-MILLS, 1979), embora células B produtoras de IgA possam migrar para locais distantes e, como resultado, o sítio de produção de IgA pode não indicar o local da resposta ao antígeno (PLATTS-MILLS, 1979). Vale destacar que a presença de altos níveis de IgA alérgeno-específica, especialmente no soro, em crianças não-alérgicas pode ser responsável por prevenir sensibilização alérgica. Estes dados reforçam que IgA específica pode inibir a ligação de alérgenos em plasmócitos produtores de IgE como já descrito anteriormente (BOTTCHE et al., 2002). Portanto, a presença de IgA alérgeno-específica parece ter papel fundamental para a resposta imunológica normal aos alérgenos.

Em adição aos anticorpos IgA, estudos anteriores têm demonstrado atividade protetora para subclasses de IgG, especialmente IgG4, que é produzida como resultado de longa exposição natural ao alérgeno ou de imunoterapia alérgeno-específica (MORI et al., 2001; PEREIRA et al., 2005). No presente estudo, níveis de IgG4 sérica específica a Dpt e a seus alérgenos principais foram maiores em crianças alérgicas do que em não-alérgicas, reforçando que antígenos que induzem anticorpos IgE também são bons indutores de anticorpos IgG4 (AALBERSE et al., 2009). Nossos resultados concordam com vários estudos relatando boas correlações entre níveis de IgE e IgG4 sérica após exposição natural a alérgenos em pacientes com doenças alérgicas respiratórias (YAMASHITA et al., 1987; PEREIRA et al., 2005), embora haja um estudo publicado por Tame e colaboradores (1996) no Japão, onde não foi encontrada correlação entre níveis de IgG4 e IgE sérica anti-Der p 2. Curiosamente, quando a razão IgG4/IgE a Dpt e a seus alérgenos principais foi investigada no presente estudo, foi observado valor menor que 1,0 em crianças alérgicas e significativamente menor em relação às não-alérgicas. Estes dados indicam que anticorpos IgE específicos predominam sobre anticorpos IgG4 específicos no grupo alérgico enquanto o oposto ocorre no grupo não-

alérgico. Do mesmo modo, níveis de IgG4 anti-Dpt e anti-Der p 1, mas não anti-Der p 2, foram mais elevados na saliva de crianças alérgicas que em não-alérgicas, reforçando estudos anteriores do nosso grupo que Der p 2 parece ser uma molécula mais imunologicamente ativa que Der p 1, na indução de síntese de IgE e não de IgG4 (QUEIRÓS et al., 2008). Além disso, a moderada correlação positiva encontrada entre níveis séricos e salivares de IgG4 para todos os alérgenos em crianças alérgicas, ao contrário do que foi observado para a correlação de IgA, reflete que anticorpos IgG4 provavelmente sejam transferidos passivamente e não produzidos localmente.

A associação de anticorpos IgG4 com atividade protetora ou ausência de sintomas tem sido relacionada à função de anticorpo bloqueador ou marcador de indução de tolerância clínica (AALBERSE et al., 2009). Os mecanismos propostos para anticorpos bloqueadores são a competição entre IgG4 e IgE ligada às células pelo alérgeno e a inibição da apresentação alérgênica facilitada pela IgE, já que esta facilitação é impedida na presença de anticorpos IgG4 por causa da competição entre os anticorpos, resultando em diminuição da sensibilização de células T e, conseqüentemente, supressão de reações de fase tardia (VAN DER HEIJDEN et al., 1993; VAN NEERVEN et al., 1999). Como marcador da indução de tolerância clínica, mensurações de anticorpos IgG4 específicos podem ser particularmente úteis em estudos de acompanhamento de imunoterapia alérgênica, no qual o aumento considerável de níveis de IgG4 pode ser forte indicador da ativação de mecanismos indutores de tolerância (AALBERSE et al., 2009). Esta atividade protetora pode representar um significativo mecanismo para a eficácia da imunoterapia alérgeno-específica.

6 CONCLUSÕES

- Crianças e adolescentes alérgicos a ácaros da poeira domiciliar apresentam altos níveis de IgE sérica e IgG4 sérica e salivar alérgeno-específicas e baixos níveis de IgA sérica e salivar alérgeno-específicas a Dpt, Der p 1 e Der p 2.
- Crianças e adolescentes não-alérgicos a ácaros da poeira domiciliar apresentam altos níveis de IgA sérica e salivar alérgeno-específicas e baixos níveis de IgE sérica e IgG4 sérica e salivar alérgeno-específicas a Dpt, Der p 1 e Der p 2.
- Existe correlação positiva entre os níveis de IgA, IgE e IgG4 sérica e IgG4 salivar específicos ao extrato total de *D. pteronyssinus* e a seus alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2.
- Não existe correlação entre níveis séricos e salivares de IgA específicos ao extrato total de *D. pteronyssinus* e a seus alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2 em ambos grupos de crianças alérgicas e não-alérgicas, entretanto, correlação positiva foi observada entre níveis séricos e salivares de IgG4 específicos no grupo alérgico.
- Anticorpos IgG4 alérgeno-específicos estão presentes em soro e saliva de crianças e adolescentes alérgicos com IgE sérica específica a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, porém IgE predomina em soros de crianças e adolescentes alérgicos enquanto IgG4 predomina em soros de indivíduos não-alérgicos.
- IgA específica a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar parece atuar como anticorpo protetor natural já que predomina em soro e saliva de crianças e adolescentes não-alérgicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERSE, R. C.; STAPEL, S. O.; SCHUURMAN, J.; RISPENS, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, p. 1-9, 2009.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6 ed. Philadelphia, USA: Saunders, 2008. 562p.

AGHAMOHAMMADI, A.; CHERAGHI, T.; GHARAGOZLOU, M.; MOVAHEDI, M.; REZAEI, N.; YEGANEH, M.; PARVANEH, N.; ABOLHASSANI, H.; POURPAK, Z.; MOIN, M. IgA deficiency: correlation between clinical and immunological phenotypes. **Journal of Clinical Immunology**, New York, v. 29, n. 1, p. 130-6, 2009.

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

ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; FAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; NASPITZ, C. K. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 433-439, Jul. 1991.

AYDOGAN, M.; METE, N.; YAZI, D.; AKKOC, T.; OZDEMIR, C.; BLASER, K.; AKDIS, M.; AKDIS, C.; BAHCECILER, N.; BARLAN I. Comparison of Der p 1-specific antibody levels in children with allergic airway disease and healthy controls. **Pediatric Allergy and Immunology**, Copenhagen, v. 18, n. 4, p. 320-325, 2007.

BACHERT, C.; JORISSEN, M.; BERTRAND, B.; KHALTAEV, N.; BOUQUET, J. Allergic rhinitis and its impact on asthma: a update (ARIA 2008). **B-ENT**, v. 4, n. 4, p. 253-7, 2008.

BANZHOF, A.; DULLECK, A.; PETZOLDT, S.; RIEGER, C. H. L. Salivary anti-RSV IgA antibodies and respiratory infections during the first year of life in atopic and non-atopic infants. **Pediatric Allergy and Immunology**, Copenhagen, v. 5, n. 1, p. 46-52, 1994.

BERNSTEIN, I. L.; STORMS, W. W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint task force on practice parameters for the diagnosis and treatment of asthma. The American College of Allergy, Asthma and Immunology. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 75, n. 6, p. 543-625, 1995.

BOTTCHER, M.F.; HAGGSTROM, P.; BJORKSTEN, B.; JENMALM, M. C. Total and allergen-specific immunoglobulin A levels in saliva in relation to the development of allergy in infants up to 2 years of age. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 32, n. 9, p. 1293-8, 2002.

BOQUETE, M.; IRAOLA, V.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; VILLAROEL, L. A.; CARBALLADA, F. J.; de la CUESTA, C. G.; LOPEZ-RICO, M. R.; ORJALES, R. N.; PARRA, A.; SOTO-MERA, M. T.; VARELA, S.; VIDAL, C. House Dust Mite species and allergen levels in Galicia, Spain: a cross-sectional, multicenter, comparative study. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**; Barcelona, v. 16, n. 3, p. 169-176, 2006.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 108, n. 5, p. 147-334, 2001.

BOUSQUET, J.; KHALTAEV, N.; CRUZ, A.A.; DENBURG, J.; FOKKENS, W.J.; TOGIAS, A. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). **Allergy**, Copenhagen, v. 63, n. 4, p. 8-160, 2008.

CAMARGOS, P.; IBIAPINA, C.; LASMAR, L.; CRUZ, A.A. Obtaining concomitant control of allergic rhinitis and asthma with a nasally inhaled corticosteroid. **Allergy**, Copenhagen, v. 62, n. 3, p. 310-6, 2007.

CHARLES, A.; JANEWAY, J. R.; PAUL, T.; WALPORT, M.; MARK, J. S. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 767p.

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

GARN, H.; RENZ, H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 212, n. 6, p. 441-452, 2007.

GELL, P. G. H.; COOMBS, R. R. A. **Clinical aspects of immunology**. 2 ed. Oxford: Blackwell, 1968. 1356p.

GOUNNI, A. S.; LAMKHIOUED, B.; OCHIAI, K.; TANAKA, Y.; DELAPORTE, E.; CAPRON, A.; KINET, J. P.; CAPRON, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. **Nature**, London, v. 367, n. 6459, p. 183-473, 1994.

HART, B. J.; CROWTHER, D.; WILKINSON, T.; BIDDULPH, P.; UCCI, M.; PRETLOVE, S.; RIDLEY, I.; ORESZCZYN, T. Reproduction and development of laboratory and wild House Dust Mites (Acari: Pyroglyphidae) and their relationship to the natural dust ecosystem. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, n. 4, p. 568-574, 2007.

HELLINGS, P. W.; FOKKENS, W. J. Allergic rhinitis and its impact on otorhinolaryngology. **Allergy**, Leuven, v. 61, n. 6, p. 653-664, 2006.

INFANTE-DUARTE, C.; HORTON, H. F.; BYRNE, M. C.; KAMRADT, T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 165, n. 11, p. 6107-6115, 2000.

JACQUET, A.; HAUMONT, M.; MASSAER, M.; DAMINET, V.; GARCIA, L.; MAZZU, P.; JACOBS, P.; BOLLEN, A. Biochemical and immunological characterization of a recombinant precursor form of the house dust mite allergen Der p 1 produced by *Drosophila* cells. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 30, p. 677-684, 2000.

JAMES L. K.; DURHAM, S. R. Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 1074-88, 2008.

JOHANSSON, S. G. O.; JOHANSSON, S.G.; HOURIHANE, J.O.; BOUSQUET, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; DREBORG, S.; HAAHTELA, T.; KOWALSKI, M.L.; MYGIND, N.; RING, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; WÜTHRICH, B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, Sweden, v. 56, n. 9, p. 813-824, 2001.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; BUDAK, F.; AEBISCHER-CASAULTA, C.; WRZYSZCZ, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 33, n. 5, p. 1205-14, 2003.

KING, M. J.; TAMULIS, T.; LOCKEY, R. F. Prick puncture skin tests and serum specific IgE as predictors of nasal challenge response to *Dermatophagoides pteronyssinus* in older adults. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 101, n. 1 p. 12-7, 2008.

KITANI, S.; ITO, K.; MIYAMOTO, T. IgG, IgA and IgM antibodies to mite in sera and sputa from asthmatic patients. **Annals of Allergy**, McLean, v. 55, n. 4, p. 55: 612-20, 1985.

KENEMY, D. M.; URBANEK, R.; EWAN, P.; MCHUGH, S.; RICHARDS, D.; PATEL, S.; LESSOF, M. H. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of

antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 545-549, 1989.

LIERL, M. B. **Allergy of upper respiratory tract**. 3. ed. Boston: Little, Brown and Company, p. 94-102, 1995.

LORENZ, A.R.; LÜTTKOPF, D.; MAY, S.; SCHEURER, S.; VIETHS, S. The principle of homologous groups in regulatory affairs of allergen products. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 148, n. 1, p. 1-17, 2009.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MALLING, H. J. Methods of skin testing: position paper. **Allergy**, Copenhagen, v. 48, n. 6, p. 55-6, 1993.

MARCUCCI, F.; SENSI, L.; FRATI, F.; BERNARDINI, R.; NOVEMBRE, E.; BARBATO, A.; PECORA, S. Effects on inflammation parameters of a double-blind, placebo controlled one-year course of SLIT in children monosensitized to mites. **Allergy**, Copenhagen, v. 58 n. 7, p. 657-62, 2003.

MASTRANDREA, F.; SERIO, G.; MINARDI, A.; CORADDUZZA, G.; ROSSI, N.; SCARCIA, G.; MAIETTA, G.; IACOBELLI, A.; LAMANNA, C.; TURSI, A. IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy. **Allergy**, Copenhagen, v. 52, n. 11, p. 1115-1119, 1997.

MAURER, D.; FIEBIGER, E.; REININGER, B.; WOLFF-WINISKI, B.; JOUVIN, M. H.; KILGUS, O.; KINET, J. P.; STINGL, G. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (FcεRI) on monocytes of atopic individuals. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 179, n. 2, p. 745-750, 1994.

MAURER, D.; FIEBIGER, S.; EBNER, C.; REININGER, B.; FISCHER, G. F.; WICHLAS, S.; JOUVIN, M. H.; SCHMITT-EGENOLF, M.; KRAFT, D.; KINET, J. P.; STINGL, G. Peripheral blood dendritic cells express FcεRI as a complex composed of FcεRIα and FcεRIγ chains; and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, n. 2, p. 607-616, 1996.

McKAY, S. P.; MESLEMANI, D.; STACHLER, R. J.; KROUSE, J. H. Intradermal positivity after negative prick testing for inhalants. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, Chicago, v. 135, n. 2, p. 232-235, 2006.

MELTZER, E. O. Quality of life in adults and children with allergic rhinitis. **Journal Allergy and Clinical Immunology**, San Diego, v. 108, p. 545-53, 2001.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. ed. EDUFU, 2005. p. 81-111.

MIRANDA, R. J.; QUINTERO, D.; ALMANZA, A. House dust mites from urban and rural houses on the lowland Pacific slopes of Panama. **Systematic and Applied Acarology**, London, v. 7, n. 1, p. 23-30, 2002.

MÖBS, C.; SLOTSCH, C.; LÖFFLER, H.; PFÜTZNER, W.; HERTL, M. Cellular and humoral mechanisms of immune tolerance in immediate-type allergy induced by specific immunotherapy, **International Archives of Allergy and Immunology**, New York, v. 147, n. 3, p. 171-8, 2008.

MOINGEON, P.; BATARD, T.; FADEL, R.; FRATI, F.; SIEBER, J.; OVERTVELT, L.V. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy, **Allergy**, Copenhagen, v. 61, n. 2, p. 151-165, 2006.

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

NAKAJIMA, S.; GILLESPIE, D. N.; GLEICH, G. J. Differences between IgA and IgE as secretory proteins. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 306-12, 1975.

OBOKI, K.; OHNO, T.; SAITO, H.; NAKAE, S. Th17 and allergy. **Allergology International**, Tokyo, v. 57, n. 2, p. 121-134, Jun 2008.

OSHIKA, E.; KUROKI, Y.; SAKIYAMA, Y.; MATSUMOTO, S. Measurement of IgG subclass antibodies to the group II antigen of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p II) in sera from children with bronchial asthma. **Annals of Allergy**, McLean, v. 69, n. 5, p. 427-32, 1992.

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

PAYETTE, K.; WEISS, N. S. Salivary IgA levels in atopic children. **Annals of Allergy**, McLean, v. 39, n. 5, p. 328-31, 1977.

PEREIRA, E. A. L.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ALMEIDA, K. C.; ALVES, R.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 3, p. 401-406, 2005.

PICCIRILLO, C.A.; LETTERIO, J.J.; THORNTON, A.M.; McHUGH, R.S.; MAMURA, M.; MIZUHARA, H.; SHEVACH, E.M. CD24+CD25+ regulatory T cells mediate supressor function in the absense of transformiang growth factor beta 1 production and responsiveness. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 196, n. 2, p. 237-245, 2002.

PLATTS-MILLS, T. A. E. Local production of IgG, IgA and IgE antibodies in grass pollen hay fever. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 122, n. 6, p. 2218-25, 1979.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; SOLOMON, W. R. Aerobiology and inhalant allergens. In: MIDDLETON, E. Jr.; REED, C. E.; ELLIS, E. F.; ADKINSON, N. F. Jr.; YUNGINGER, J. W.; BUSSE, W. W. **Allergy: principles and practice**, 4. ed. St. Louis: Mosby-Year Book, p. 469-528, 1993.

QUEIRÓS, M. G. J.; SILVA, D. A. O.; ALVES, R.; CHIBA H. F.; AMARAL, V. B. S.; ALMEIDA, K.C.; YNOUE, L. H.; RESENDE R. O.; SOPELETE, M. C. C.; SEGUNDO G. R. S.; MOREIRA, P. F. S.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite-specific immunotherapy using allergen and/or bacterial extracts in atopic patients in Brazil. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, Barcelona, v. 18, n. 2, p. 84-92, 2008.

REYNOLDS, H. Y. Lung immunology and its contribution to the immunopathogenesis of ccertain respiratory diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 78, p. 833-847, 1986.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 6 ed. London: Mosby International, 2006. 481p.

SCHWARZE, J.; CIESLEWICZ, G.; JOETHAM, A.; SUN, L. K.; SUN, W. N.; CHANG, T. W.; HAMELMANN, E.; GELFAND, E. W. Antigen-specific immunoglobulin A prevents increased airway responsiveness and lung eosinophilia after airway challenge in sensitized mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 158, n. 2, p. 519-25, 1998.

SILVA, D. A. O.; GERVÁSIO, A. M.; SOPELETE, M. C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; SUNG, S.S.; TAKETOMI, E. A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 86, n. 5, p. 545-50, 2001.

SIRAGANIAN, R. P. Allergic diseases. In: ROSE, N. R.; JACOBSEN, B.; BRINCH-NIELSEN, A.; ARNVED, J.; IPSEN, H. **Manual of clinical laboratory Immunology**. 4 ed. Washington: American Society for Microbiology, p. 689-701, 1992.

SOARES, F. A. A.; SEGUNDO, G. R. S.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Perfil de sensibilização a alérgenos domiciliares em pacientes ambulatoriais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 25-28, Fev. 2007.

SOLÉ, D.; CAMELO-NUNES, I. C.; WANDALSEN, G. F.; ROSARIO, F. N. A.; NASPITZ, C. K. Prevalence of rhinitis among Brazilian schoolchildren: ISAAC phase 3 results. **Rhinology**, Leiden, v. 45, n. 2, p. 122-8, 2007.

SQUILLACE, S. P.; SPORIK, R. B.; RAKES, G.; COUTURE, N.; LAWRENCE, A.; MERRIAM, S.; ZHANG, J.; PLATTS-MILLS, A. E. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. Multiple regression analysis of a population-based study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 156, n. 6, p. 1760-4, 1997.

STIEHM, E. R. **Immunology disorders of infants and children**. 4 ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. p. 1084.

TAME, A.; SAKIYAMA, Y.; KOBAYASHI, I.; TERA, I.; KOBAYASHI, K. Differences in titres of IgE, IgG4 and other IgG subclass anti-Der p 2 antibodies in allergic and non-allergic patients measured with recombinant allergen. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 43-9, 1996.

TERRA, S. A. ; SILVA, D. A.; SOPELETE, M. C.; MENDES, J.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite allergen levels and acarologic analysis in house dust samples in Uberaba, Brazil. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 14, n. 3, p. 232-237, 2004.

TOVEY, E. R.; CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. E. Mite faeces are a major source of house dust allergens. **Nature**, London, v. 289, n. 5798, p. 592-593, 1981.

TUNNICLIFFE, W. S.; FLETCHER, T.J.; HAMMOND, K.; ROBERTS, K.; CUSTOVIC, A.; SIMPSON, A.; WOODCOCK, A.; AYRES, J. G. Sensitivity and exposure to indoor allergens in adults with differing asthma severity. **The European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 13, n. 3 p. 654-9, 1999.

VAN DER HEIJDEN, F. L.; VAN NEERVEN, R. J.; VAN KATWIJK, M.; BOS, J. D.; KAPSENBERG, M. L. Serum-IgE-facilitated allergen presentation in atopic disease. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 150, n. 8, p. 3643-50, 1993.

VAN NEERVEN, R. J.; WIKBORG, T.; LUND, G.; JACOBSEN, B.; BRINCH-NIELSEN, A.; ARNVED, J.; IPSEN, H. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4⁺ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, n. 5, p. 2944-52, 1999.

VANDENPLAS, O.; D'ALPAOS, V.; VAN BRUSSEL, P. Rhinitis and its impact on work. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstownv, v. 8, n. 2, p. 145-9, 2008.

WANG, Y.; LIU, Y. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 20, n. 6, p. 697-702, 2008.

WOOLCOCK, A. J.; BASTIAMPILLAI, S.A.; MARKS, G.B.; KEENA, V.A. The burden of asthma in Australia. **The Medical Journal of Australia**, Sydney, v. 175, n. 3, p. 141-5, 2001.

WORM, M.; HENZ, B. M. Molecular regulations of human IgE synthesis. **Journal of Molecular Medicine**, Amsterdam, v. 75, n. 6, p. 440-447, Jun. 1997.

YAMASHITA, N.; ITO, K.; NAKAGAMWA, T.; HAIDA, M.; OKUDAIRA, H.; NAKADA, S.; MIYAMOTO, T.; SHIBUYA, T.; KAMEI, K.; SASA, M. IgG and IgE antibodies to Chironomidae in asthmatic patients. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 93-9, 1987.

ANEXO A



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531

ANÁLISE FINAL Nº 130/07 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 262/06

Projeto Pesquisa: "Imunoterapia sublingual com alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* associados ou não a extratos bacterianos em pacientes com rinite alérgica com ou sem asma leve"

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

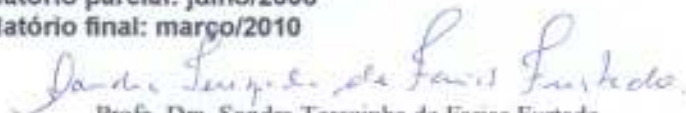
b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do Relatório parcial: julho/2008

Data para entrega do Relatório final: março/2010

13 de abril de 2007.


Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.x), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requerem ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado “Anticorpos IgA, IgE e IgG4 específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* e aos seus alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2, em amostras de soro e saliva de crianças e adolescentes alérgicos e não-alérgicos”.

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

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

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

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

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Uberlândia, _____ de _____ de 200__.

ASSINATURA

TESTEMUNHA

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

Enf. Diego Oliveira Miranda
Av. Amazonas, 1593 apto 302
Bairro Umuarama - Uberlândia MG
Tel.: (34) 9169-0402

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



ANEXO C

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas
Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
Av. Pará, 1720, Campus Umuarama - Bloco 4C
Uberlândia, MG - Brasil - 38.400-902
Telefone: (34) 3218-2195 - TELEFAX: (34) 3218-2333

Nome (iniciais): _____

Data: ____/____/____

Idade: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino

Grau de escolaridade: ☐ Primeiro grau ☐ Segundo grau ☐ Faculdade

Nível sócio-econômico (renda familiar):

- | | |
|--|--|
| ☐ até 1 salário mínimo | ☐ de 5 a 10 salários mínimos |
| ☐ de 1 a 2 salários mínimos | ☐ mais de 10 salários mínimos |
| ☐ de 2 a 5 salários mínimos | |

Questionário 1 (Módulo Asma)

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

☐ Sim ☐ Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6.

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

☐ Sim ☐ Não

3) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?

- Nenhuma crise ☐
1 a 3 crises ☐
4 a 12 crises ☐
mais de 12 crises ☐

4) Nos últimos 12 (doze) meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?

- Nunca acordou com chiado ☐
Menos de uma noite por semana ☐
Uma ou mais noites por semana ☐

5) Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?

☐ Sim ☐ Não

6) Alguma vez na vida você teve asma?

☐ Sim ☐ Não

7) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?

☐ Sim ☐ Não

- 8) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?
() Sim () Não

Questionário 2 (Módulo Rinite)

Todas as perguntas são sobre problemas que ocorreram quando você **não** estava gripado ou resfriado

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

Questionário 3 (Módulo Eczema)

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

☐ Sim ☐ Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6

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

☐ Sim ☐ Não

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

☐ Sim ☐ Não

- 4) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) desapareceram completamente nos últimos doze meses?

☐ Sim ☐ Não

- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa dessa coceira na pele?

Nunca nos últimos 12 (doze) meses ☐

Menos de uma noite por semana ☐

Uma ou mais noites por semana ☐

- 6) Alguma vez na vida você teve eczema?

☐ Sim ☐ Não

ANEXO D



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

TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (Ácaros da poeira domiciliar)

Extrato	Tamanho da pápula (mm)	Tamanho do eritema (mm)
Controle positivo		
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
<i>Felis domesticus</i>		
<i>Dermatophagoides farinae</i>		
<i>Canis familiaris</i>		
<i>Blomia tropicalis</i>		
<i>Blattella germânica</i>		
<i>Periplaneta americana</i>		
<i>Alternaria alternata</i>		
Controle negativo		

Valores de referência:

Positivo – diâmetros ortogonais maiores ou iguais a 3mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.

Negativo – diâmetros ortogonais menores do que 3mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Responsável técnico