UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 a frações glicopeptídicas de *Dermatophagoides pteronyssinus* em indivíduos alérgicos e não alérgicos

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Rafael de Oliveira Resende

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Orientador

Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva

Co-orientadora

Uberlândia
Maio – 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 a frações glicopeptídicas de *Dermatophagoides pteronyssinus* em indivíduos alérgicos e não alérgicos

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Rafael de Oliveira Resende

Uberlândia, 21 de maio de 2009.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda
FMUSP/RP

Profa. Dra. Margareth Leitão G. Cardoso
UESC/BA

Dra. Danielle Reis Napolitano
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Fábio de Oliveira
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi – orientador
ICBIM/UFU

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R433r Resende, Rafael de Oliveira, 1980-
Reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 a frações glicopeptídicas de *Dermatophagoides pteronyssinus* em indivíduos alérgicos e não alérgicos / Rafael de Oliveira Resende. - 2009.
127 f. : il.

Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
Co-orientadora: Deise Aparecida de Oliveira Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Alergia - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Silva, Deise Aparecida de Oliveira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV.Título.

CDU: 616-056.3

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Aos meus pais,

Carlos Humberto e *Maria das Graças*.

"Se não deu certo, é porque não chegou ao final."

Priscila F. S. Moreira

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela iluminação;

À minha esposa, Paula, pelos momentos de inspiração, paixão e compreensão;

Aos meus irmãos, Cícerus e Juliano, minha querida avó, Odete (in memoriam)*, minhas cunhadas, Cíntia e Josiane, e minha sobrinha, Luiza, pelos momentos de alegria;*

Aos meus sogros, Ailton e Carmen, e cunhadas, Angélica e Patrícia pelo pensamento positivo e compreensão;

Ao Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, por contribuir, com maestria, para a minha inserção no meio científico;

Aos meus padrinhos, Leandro Hideki Ynoue e Priscila Ferreira de Sousa Moreira, pela demonstração de companheirismo, lealdade e sinceridade;

À Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, pela solicitude nas discussões sobre este trabalho;

À Profa. Dra. Margareth Leitão Gennari Cardoso, pela idealização deste trabalho;

À Profa. Dra. Mônica Camargo Sopelete, pelos nobres ensinamentos;

À Profa. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda, Profa. Dra. Danielle Reis Napolitano e Prof. Dr. Fábio de Oliveira, pelo aceite em compor a banca examinadora, colaborando para o aprimoramento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza e Prof. Dr. José Roberto Mineo pelas valiosas considerações no exame de qualificação.

À Cláudia Molinaro e Leila Mello, da FIOCRUZ, pela estimada compreensão;

Aos fantásticos e ilustríssimos amigos dos laboratórios de Alergia e Imunoparasitologia: Karine Almeida, Ronaldo Alves, Juliana Miranda, Cristiane Teixeira, Gesmar Rodrigues, Jorge Carísio, Meimei Queirós, Diego Miranda, Laura Fontes, Daniela Beraldo, Carlos Prudêncio, Boscolli Pereira, Carolina Guimarães, Ana Carolina Morais, Isabella Siman, Bia Acerbi, Lucas Lago, Gabriele Faria, Cristina Rostkowska, Celene Alves, Tiago Mineo, Ana Cláudia Pajuaba, Fernanda Pantaleão, Hercílio Higino pelos saudosos momentos de alegria e companheirismo;

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação e Laboratório de Imunologia: Max, Marley, Zilda, Luceleide e Lucélia, pelo carisma e prestabilidade;

Aos pacientes alérgicos atendidos pelo HC-UFU que, com um maravilhoso gesto de caridade, doaram o material biológico necessário para a execução deste estudo;

Ao Serginho, Cristiano, Marlon, Dagata, Marcos e André, da banda TomaRock, pelos momentos de glória nos palcos e pela compreensão nos momentos de ausência;

...obrigado a todos vocês, que fizeram com que esse capítulo da minha vida fosse dotado de momentos de aprendizado, crescimento e resplandecência.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

χ^2	Qui-quadrado
Aa	Extrato bruto de *Alternaria alternata*
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (*2,2′-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid*)
Apud	Citado por
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BBS	Solução salina tamponada com borato
Blot 5	Alérgeno principal de *Blomia tropicalis* do grupo 5
BSA	Soroalbumina bovina
Bg	Extrato bruto de *Blatella germanica*
Bt	Extrato bruto de *Blomia tropicalis*
C1q	Subunidade q do complexo C1 do Sistema Complemento
CD	Marcador do tipo *Cluster of Differentiation*
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cf	Extrato bruto de *Canis familiaris*
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
ConA	Concanavalina A
CRAC	Canal de Cálcio Ativo por Liberação de Cálcio (*Calcium-Release Activated Calcium*)
D-manose	Dextro-manopiranose
DAB	3,3′-diaminobenzidina
Der f	Alérgeno de *Dermatophagoides farinae*
Der p	Alérgeno de *Dermatophagoides pteronyssinus*
Df	Extrato bruto de *Dermatophagoides farinae*
D.O.	Densidade óptica
DP+	Grupo de pacientes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus*
Dp bruto	Extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus*

EAACI	*European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica)
ELISA	*Enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)
et al.	*Et alii* (e outros)
F	Feminino
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade do Tipo I
FcεRII	Receptor de IgE de baixa afinidade do Tipo II
Fd	Extrato bruto de *Felis domesticus*
FL	Fração de *D. pteronyssinus* ligante de Concanavalina A
FNL	Fração de *D. pteronyssinus* não ligante de Concanavalina A
G	Força relativa da gravidade
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leucocyte Antigen*)
IC_{50}	Concentração inibitória mediana (50%)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Índice ELISA
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgD	Imunoglobulina de classe D
IgE	Imunoglobulina de classe E
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
IL	Interleucina
ISAAC	Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância *(International Study of Asthma and Allergies in Childhood)*
ITAM	Motivos de Ativação de Imunoreceptores compostos por Tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*)
I.U.IS	União Internacional das Sociedades de Imunologia (*International Union of Immunology Societies)*
L-lisina	Levo-lisina
LTC	Leucotrieno do tipo C
LTD	Leucotrieno do tipo D
LTE	Leucotrieno do tipo E
Man	Manose
M	Masculino

M*r*	Massa molecular relativa
n	Número de indivíduos
NA	Grupo de indivíduos não atópicos
NB	Nível de Biossegurança
ND	Não determinado
Pa	Extrato bruto de *Periplaneta americana*
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	PBS adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	PBS adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-L	PBS adicionada de Tween 20 e leite em pó desnatado
PGD	Prostaglandina do tipo D
PMSF	*Phenylmethylsulfonyl* (Fenilmetilsulfonil)
r	Coeficiente de correlação
Rf	Mobilidade relativa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (*SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis)*
STIM	Molécula de Interação Estromal (*Stromal Interaction Molecule*)
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TCP	Teste cutâneo de puntura
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina
TGF	Fator de transformação de crescimento (*Transforming Growth Factor*)
Th1	Linfócito T *helper* 1
Th2	Linfócito T *helper* 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
Treg	Linfócito T regulador
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Solução de Tris adicionada de HCl
TT	Toxóide tetânico
Tween 20	Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano (*Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate*)
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de proteínas, carboidratos, Der p 1 e Der p 2 no extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto), fração não ligante (FNL) e fração ligante (FL) de ConA. 66

Tabela 2. Dados clínicos e demográficos dos pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (DP+) e indivíduos não alérgicos (NA), selecionados por Teste Cutâneo de Puntura (TCP) e questionário clínico (ISAAC, 1998). 68

Tabela 3. Soropositividade de IgE, IgG1 e IgG4 ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto) e fração não ligante (FNL) e ligante (FL) de ConA em pacientes alérgicos (DP+) e não alérgicos (NA). 72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posição taxonômica dos principais ácaros da poeira domiciliar. 34

Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato bruto de *D. pteronyssinus* (5mg de proteína) em coluna de afinidade de ConA-*Sepharose*. O primeiro pico (frações 1 a 12) representa a fração não ligante (FNL) de ConA, obtida pela lavagem com tampão de ligação e o segundo pico (frações 41 a 55) representa a fração ligante (FL) de ConA, eluída com metil α-D-manopiranosídeo 0,1g/mol. 65

Figura 3. Teste Cutâneo de Puntura (TCP) aos extratos brutos de *D. pteronyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df), *B. tropicalis* (Bt), *Canis familiaris* (Cf), *Felis domesticus* (Fd), *Periplaneta americana* (Pa), *Blatella germanica* (Bg), *Alternaria alternata* (Aa) em pacientes alérgicos (DP+, n=95). (**A**) Tamanho da pápula formada após 15min de reação cutânea. As barras horizontais indicam a mediana. Diferenças estatisticamente significativas em relação à Dp foram determinadas (***p<0,001, teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn). (**B**) Porcentagem de positividade ao TCP para cada extrato alergênico. #Diferente estatisticamente em relação à Dp ($p < 0,05$, teste de χ^2). 69

Figura 4. Índices de IgE (**A**), IgG1 (**B**) e IgG4 (**C**) ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto) e fração não ligante (FNL) e ligante (FL) de ConA, expressos em Índice ELISA (IE), no soro de pacientes alérgicos (DP+, n = 95) e não alérgicos (NA, n = 92). Barras horizontais indicam a mediana e a linha pontilhada representa o limiar de positividade (IE = 1,2). Diferenças significativas no mesmo grupo foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn (*p<0,05, ***p<0,001). #Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para cada extrato foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). 71

Figura 5. Correlação entre os índices de IgE (**A**, **B**), IgG1 (**C**, **D**), e IgG4 (**E**, **F**) específicos ao extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e fração não ligante (FNL) e ligante (FL) de ConA, expressos em Índice ELISA (IE), no soro de pacientes alérgicos (■) (grupo DP+; n=95) e indivíduos não alérgicos (□) (grupo NA; n=92). O coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) foram calculados pelo teste de correlação de Spearman e estão demonstrados para os grupos DP+ (lado superior esquerdo) e NA (lado inferior direito). 74

Figura 6. Razão dos índices de IgE/IgG1 (**A**), IgE/IgG4 (**B**) e IgG1/IgG4 (**C**) ao extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), fração não ligante (FNL) e ligante (FL) de ConA no soro de pacientes alérgicos (grupo DP+; n=95) e indivíduos não alérgicos (grupo NA; n=92). As caixas indicam a mediana, acompanhada dos valores mínimo e máximo. Diferenças significativas dentre os valores dos grupos foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). #Diferenças significativas entre os grupos, para cada extrato, foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05). 76

Figura 7. Curvas de inibição de IgE (**A**), IgG1 (**B**) e IgG4 (**C**), em ELISA com extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) na fase sólida. Seis soros de pacientes alérgicos (grupo DP+) foram pré-adsorvidos com diferentes concentrações dos agentes inibidores Dp bruto, fração não ligante (FNL) e ligante (FL) de ConA e extratos de *D. farinae* (Df) e *Blomia tropicalis* (Bt). Toxóide tetânico foi utilizado como antígeno irrelevante. A porcentagem de inibição foi calculada pela reatividade do anticorpo residual em relação à reatividade total (100%), em soros sem inibidores). A linha pontilhada intercepta as curvas de inibição na concentração inibitória mediana (IC_{50}). 78

Figura 8. Perfil eletroforético do extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto, faixa 1), frações não ligante (FNL, faixa 2) e ligante de ConA (FL, faixa 3) em SDS-PAGE, a 12%, corado por nitrato de prata. M*r*: massa molecular relativa, em kiloDalton (kDa). 80

Figura 9. *Immunoblotting* representativo de direfentes soros para IgE (**A**), IgG1 (**B**) e IgG4 (**C**) específicos ao extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e frações não ligantes (FNL) e ligantes (FL) de ConA em pacientes alérgicos (grupo DP+) e indivíduos não alérgicos (grupo NA). A massa molecular relativa (M*r*) está indicada em kiloDalton (kDa). 82

Figura 10. Frequência percentual de componentes do extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e frações não ligantes (FNL) e ligantes (FL) de ConA reconhecidos por anticorpos (A) IgE, (B) IgG1 e (C) IgG4 no soro de pacientes alérgicos (grupo DP+) e indivíduos não alérgicos (grupo NA), por *Immunoblotting*. 83

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas 8
Lista de tabelas 11
Lista de figuras 12
Resumo 16
Summary 17
1 Introdução 18
1.1 Alergia e atopia 19
1.2 Alérgenos 20
1.3 Exposição e sensibilização alergênica 22
1.4 O sistema imune e a resposta alérgica 24
1.4.1 O papel das imunoglobulinas 24
1.4.2 Fisiopatologia da alergia 27
1.5 Ácaros da poeira domiciliar 31
1.5.1 Ecologia e morfofisiologia 32
1.5.2 Dermatophagoides pteronyssinus 33
1.6 Glicoconjugados na alergia 37
1.7 Cromatografia 38
1.7.1 Cromatografia de afinidade 39
1.8 Lectinas e Concanavalina A 40
2 Objetivos 43
3 Material e Métodos 45
3.1 Aspectos legais 46
3.2 Locais de estudo 46
3.3 Obtenção do extrato antigênico 47
3.3.1 Extrato bruto de *D. pteronyssinus* e outros ácaros 47
3.3.2 Extratos antigênicos de ácaros da poeira domiciliar para testes in vivo 48
3.4 Cromatografia de afinidade 48
3.4.1 Preparação da coluna 48
3.4.2 Obtenção das frações ligantes e não-ligantes de ConA 49
3.5 Métodos analíticos 50
3.5.1 Dosagem de proteínas 50
3.5.2 Dosagem de carboidratos 50
3.6 Triagem dos indivíduos 51
3.7 Teste Cutâneo de Puntura (TCP) 51

3.8 Coleta de sangue 52
3.9 Distribuição dos indivíduos 53
3.10 Ensaio imunoenzimático (ELISA) 54
3.10.1 Detecção de IgE específica 54
3.10.2 Detecção de IgG1 e IgG4 específicos 56
3.10.3 Detecção de Der p 1, Der p 2 e Blo t 5 57
3.10.4 Inibição competitiva 58
3.11 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 59
3.12 Immunoblotting 61
3.13 Análise estatística 63
3.14 Biossegurança 63
4 Resultados 64
4.1 Obtenção das frações de *D. pteronyssinus* não ligantes (FNL) e ligantes (FL) de ConA 65
4.2 Dados clínicos 66
4.3 Teste Cutâneo de Puntura 68
4.4 Anticorpos específicos ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* e suas frações 70
4.5 Associação entre os índices de anticorpos específicos a *D. pteronyssinus* e suas frações 73
4.5.1 Correlação entre os índices de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a Dp bruto, FNL e FL 73
4.5.2 Razão entre os índices de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a Dp bruto, FNL e FL. 75
4.6 Reatividade cruzada entre *D. pteronyssinus* e suas frações ou ácaros relacionados 77
4.7 Perfil de bandas polipeptídicas no extrato Dp bruto e suas frações 79
4.8 Componentes de Dp bruto e suas frações reconhecidos por IgE, IgG1 e IgG4 80
5 Discussão 84
6 Conclusões 92
Referências Bibliográficas 94
Anexos 122
Anexo 1 123
Anexo 2 124
Anexo 3 125
Anexo 4 127

RESUMO

Ácaros da poeira domiciliar, como *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) são importantes fontes de alérgenos envolvidos na sensibilização de indivíduos geneticamente predispostos. Vários alérgenos são constituídos de glicoconjugados, que apresentam afinidade com lectinas, como a Concanavalina A (ConA). O objetivo deste estudo foi avaliar a reatividade de IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes do extrato Dp não ligantes e ligantes à ConA em pacientes alérgicos e indivíduos não alérgicos. As frações não ligantes (FNL) e ligantes (FL) de ConA foram obtidas do extrato Dp bruto após o fracionamento por cromatografia de afinidade de ConA-Sepharose e todos os extratos foram avaliados por ELISA e *Immunoblotting* para detecção de IgE, IgG1 e IgG4 no soro de 95 pacientes alérgicos a ácaros (DP+) e 92 indivíduos não alérgicos (NA). Em pacientes do grupo DP+, a soropositividade de IgE e IgG1 ao extrato Dp bruto (100% e 84,2%, respectivamente) foi maior do que às demais frações, enquanto a soropositividade de IgG4 foi maior à FL (83,2%), quando comparado aos demais extratos. Curiosamente, a soropositicbbvidade de IgG4 às frações relacionadas à ConA foram maiores no grupo DP+ comparados ao grupo NA, especialmente à FL. O ELISA de inibição competitiva para todos os anticorpos testados representou uma alta (>80%) reatividade cruzada entre o extrato Dp bruto e frações relacionadas à ConA ou extrato de *D. farinae* (>70%). Entretanto, inibições menores foram encontradas para IgG1 (67%) e IgG4 (33%), mas não para IgE, quando utilizado o extrato de *Blomia tropicalis*. O *Immunoblotting* revelou bandas imunodominantes reconhecidas por IgE (14 e 25kDa) e IgG4 (25 e 88kDa) em maior quantidade no extrato Dp e FNL, ao passo que IgG1 reconheceu somente bandas acima de 78kDa, principalmente no extrato Dp bruto. Frações não ligantes e ligantes de ConA derivadas de *D. pteronyssinus* apresentam alta reatividade cruzada e se constituem de componentes capazes de induzir a síntese de IgE em pacientes alérgicos, além de IgG1 e IgG4 em indivíduos alérgicos e não alérgicos.

Palavras-Chave: Glicoconjugados; *Dermatophagoides pteronyssinus*; Alergia; IgE; IgG1; IgG4

SUMMARY

House dust mites as *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) are considered important allergen sources for sensitization of genetically predisposed subjects. Several allergens are commonly constituted by glycoconjugates that may have affinity with lectins, such as Concanavalin A (ConA). The aim of this study was to evaluate IgE, IgG1 and IgG4 reactivity to ConA-related components from Dp extract in allergic and non-allergic subjects. ConA-bound and ConA-unbound components were obtained from Dp crude extract after fractionation on ConA-Sepharose affinity chromatography and all extracts were evaluated by ELISA and immunoblotting for detection of IgE, IgG1, and IgG4 in sera from 95 mite-sensitized patients (DP+)and 92 non-allergic (NA) subjects. In DP+ patients, IgE and IgG1 seropositivity to crude Dp extract was higher (100% and 84,2%, respectively) than to ConA-related extracts, while IgG4 seropositivity was higher to ConA-bound Dp (83,2%) as compared to other Dp extracts. Interestingly, IgG4 seropositivity to ConA-related Dp extracts, especially ConA-bound Dp, was higher in DP+ than NA subjects. Inhibition ELISA for all antibody isotypes showed a high (>80%) cross-reactivity between crude Dp and ConA-related extracts or *D. farinae* extract (>70%). However, partial inhibition for IgG1 (67%) and IgG4 (33%), but not for IgE, was found when using *Blomia tropicalis* extract. Immunoblotting revealed immunodominant bands recognized by IgE (14 and 25 kDa) and IgG4 (25 and 88 kDa) mostly in crude Dp and ConA-unbound extracts, whereas IgG1 recognized bands above 78 kDa mainly in crude Dp extract. ConA-bound and ConA-unbound Dp extracts demonstrate high cross-reactivity and are constituted by components that are able to induce IgE synthesis in allergic patients, and IgG1 and IgG4 in allergic and non allergic subjects.

Key Words: Concanavalin A; *Dermatophagoides pteronyssinus*; Allergy; IgE; IgG1; IgG4

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alergia e atopia

Alguns indivíduos podem apresentar manifestações clínicas desencadeadas pela exposição a um determinado estímulo, que em pessoas normais, é tolerável. Tais manifestações são chamadas de reações de hipersensibilidade e a alergia - caracterizada pela presença de mecanismos imunológicos, como células e anticorpos - é uma dessas reações. Entretanto, a tendência pessoal ou familiar, de ordem genética, que induz, especificamente, à produção de anticorpos de classe IgE é denominada atopia (JOHANSSON et al., 2004).

As manifestações clínicas da alergia ocorrem sob a forma de asma, rinite ou dermatite atópica, dentre outras. A asma alérgica é caracterizada por reação imunológica, sob a forma de inflamação do sistema respiratório inferior, induzindo a quadro de hiperreatividade brônquica e, consequentemente, episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse (LEMANSKE-JUNIOR; BUSSE, 2003).

Apesar de apresentar perfil imunológico semelhante à asma, a rinite alérgica se distingue pelos sintomas característicos de inflamações nasais, tais como: aumento de secreção, obstrução da cavidade, espirros e prurido. Pode também ser acompanhada de conjuntitive, constituindo em um quadro denominado rinoconjuntivite - caracterizado por lacrimejamento, prurido conjuntival e fotofobia (JOHANSSON et al., 2004). Ambas as doenças podem ser desencadeadas por elementos extrínsecos capazes de causar doença alérgica - os alérgenos, presentes em componentes comuns ao nosso ambiente, como pólens de plantas ou ácaros da poeira domiciliar.

A rinite alérgica é muito comum em pacientes com asma, com uma alta concomitância. Gaugris, Sazonov-Kocevar e Thomas (2006), relacionando estudos publicados entre 1983 e 2004, observaram uma prevalência de rinite de 50 a 100% em adultos asmáticos na Europa e Estados Unidos. Além disso, Linneberg e

colaboradores (2002) descrevem que 25 a 50% dos indivíduos com rinite apresentam sintomas de asma.

Esta coprevalência é possível, dentre outros fatores, pela íntima relação entre as mucosas das vias respiratórias superior e inferior, além da similaridade dos componentes e mecanismos inflamatórios envolvidos nestes distúrbios (JEFFERY et al., 2006).

1.2 Alérgenos

Os antígenos causadores de doenças alérgicas são denominados de alérgenos. O ambiente dispõe de inúmeros deles, provenientes de diversas fontes. São de origem protéica, glicoprotéica ou até mesmo carboidratos isolados, porém, raramente de baixo peso molecular (JOHANSSON et al., 2004; MEYER; CO MINH; DEMOLY, 2004). A porção do alérgeno reconhecida pelos anticorpos e receptores de membrana das células efetoras é conhecida como epítopo, ou determinante antigênico. O epitopo de um alérgeno é pequeno, geralmente formado por 5 a 7 resíduos de aminoácidos que combinam com a região variável do anticorpo e 8 a 15 aminoácidos que se ligam a células T. Se constitui de forma seqüencial ou conformacional, o que leva à caracterização do perfil de componente do sistema imune que será ativado após o seu reconhecimento (ARLIAN, 2002).

O uso de uma nomenclatura preconizada é extremamente importante no estudo dos alérgenos, sobretudo no desenvolvimento de mecanismos de diagnóstico específico e de extratos imunoterápicos com alérgenos recombinantes (CHAPMAN et al., 2000; FERREIRA et al., 2004; JUTEL et al., 2005). No sentido de padronizar a referência dos diversos alérgenos descritos na literatura científica, o Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia (I.U.I.S.), em parceria com a Organização Mundial de Saúde (OMS), adotou uma

regra sistemática de nomenclatura. Esta regra é resultado de um consenso entre trabalhos publicados nas décadas de 80 e 90 do século passado (MARSH et al., 1986; KING et al., 1994; KING et al., 1995), atrelada à nomenclatura taxonômica dos animais e plantas de Carolus Linnaeus.

Preconiza-se que o nome de um alérgeno não deve ser escrito de forma itálica e sua designação se dá pelas três primeiras letras do gênero do ser vivo do qual o alérgeno é proveniente e da primeira letra do nome específico, acrescido de um numeral arábico que indica a ordem cronológica de sua purificação: Der p 1 (alérgeno do grupo 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus*, por exemplo). A nomenclatura atual, segundo Chapman e colaboradores (2007), ainda contempla as diferentes formas moleculares do mesmo alérgeno, chamadas de isoformas, ou isoalérgenos. Estes têm sido bastante estudados, principalmente com o avanço da biologia molecular na caracterização do alérgeno e compartilham a reatividade de IgE por apresentarem alto percentual de identidade na sequência de aminoácidos. Neste caso, o número correspondende à isoforma é acrescentado após o número do alérgeno: Der p 2.0101, por exemplo.

Estudos realizados por Smith e colaboradores (2001a), Smith e colaboradores (2001b) e Piboonpocanun e colaboradores (2006) relatam que alguns alérgenos de ácaros apresentam várias isoformas, como por exemplo, 24 para Der p 1 (Der p 1.0101 a Der p 1.0124) e 15 para Der p 2. Suspeita-se que estas isoformas podem alterar o perfil de resposta de células T bem como os sítios de ligação dos anticorpos, o que deve ser cuidadosamente analisado para a elaboração de formulações de imunoterapia.

Para manter a integridade do sistema de nomenclatura, esta inclui apenas alérgenos com prevalência de reatividade de IgE acima de 5% ou com mérito comprovado por testes bioquímicos, moleculares e imunológicos que não permitam ambigüidade nos resultados. Se o alérgeno apresentar reatividade de IgE maior do que 50% dos pacientes contra uma determinada fonte alergênica, o alérgeno é

denominado "principal", ou *major*, em inglês. Se a reatividade de IgE for menor do que este valor, o alérgeno é "minoritário", ou *minor* (LARSEN, LOWERSTEIN, 1996; CHAPMAN et al., 2007).

1.3 Exposição e sensibilização alergênica

A sensibilização a alérgenos depende da genética individual, além dos índices de alérgenos aos quais o indivíduo é exposto, e também, do tempo de exposição (SEGUNDO et al., 2009). Sabe-se que a exposição a alérgenos oriundos de ambientes internos pode produzir sintomas em pacientes com asma, rinite e eczema. Arruda e colaboradores (2001) apontam que a exposição a altos níveis de alérgenos de barata em ambientes domésticos é um importante fator de risco para sintomas em indivíduos alérgicos. Além disso, crianças podem apresentar nove vezes mais riscos de se sensibilizarem a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar em casas em que estes estão presentes do que em ambientes com ausência destes alérgenos (HUSS et al., 2001).

Em um estudo de caso, Gehring e colaboradores (2001) demonstraram a relação entre exposição a alérgenos domiciliares e sintomas respiratórios. A exposição a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar aumentou o risco de sibilos e dispnéia e alérgenos de gatos estavam associados à tosse noturna, mesmo naqueles indivíduos não sensibilizados. Indivíduos expostos a concentrações elevadas de mais de um alérgeno tiveram quase sete vezes mais riscos de apresentarem sintomas respiratórios, comparados àqueles não expostos. Ademais, relata-se que esporos de fungos e alérgenos de gatos constituem um importante fator de risco para sensibilização e que grande parte da prevalência de asma pode ser devida a alérgenos de ácaros (DHARMAGE et al., 2001). É importante ressaltar que, segundo o Instituto de Medicina (2000), níveis de alérgenos de ácaros com valores superiores a

2µg/g de poeira são suficientes para que um indivíduo predisposto possa se sensibilizar. Para alérgenos de animais de estimação, estes valores são reduzidos a 1µg/g de poeira.

Devido à importância dos alérgenos de ácaros da poeira domiciliar na sensibilização alergênica, Zoch e colaboradores (2006) realizaram um estudo multicêntrico, demonstrando que, dentre os países europeus, a maior prevalência de alérgenos do ácaro da poeira domiciliar *Dermatophagoides pteronyssinus* ocorreu nas cidades de Oviedo e Galdakao, na Espanha, onde mais de 95% dos lares continham elevados níveis de Der p 1 e mais de 99% continham Der p 2. Outro estudo realizado na Itália, por Perfetti e colaboradores (2004), foram encontrados níveis elevados de alérgenos de ácaros da poeira em móveis estofados situados no ambiente de trabalho. Em outra investigação, Hesselmar e colaboradores (2005) indicaram que o modelo de construção de uma casa pode influenciar na exposição a alérgenos e no desenvolvimento de doenças alérgicas, ao verificar que crianças que moravam em casas com ventilação mecânica apresentaram mais sintomas respiratórios característicos de alergia. A utilização de janelas e estruturas que permitiriam ventilação natural nas residências seria um fator reducional para o problema.

No Brasil, estudos de exposição alergênica têm sido amplamente conduzidos nos últimos anos. No município de Ribeirão Preto-SP, Tobias e colaboradores (2004), detectaram elevados níveis de alérgenos do grupo 1 de ácaros da poeira domiciliar em residências de pacientes alérgicos, além disso, Baqueiro e colaboradores (2006) demonstraram uma alta freqüência de alérgenos dos ácaros da poeira domiciliar *D. pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* na cidade de Salvador-BA. Já na região do Triângulo Mineiro, estudos realizados pelo Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) demonstraram níveis significativos de alérgenos de ácaros da poeira domiciliar em residências (SOPELETE et al., 2000; TERRA et al., 2004), veículos de transporte público (PEREIRA et al., 2004; TAKETOMI et al., 2006), carros particulares (JUSTINO et al., 2005) e hotéis (SIMPLÍCIO et al., 2007).

Em estudos de sensibilização alergênica, Naspitz e colaboradores (2004) reportaram índices elevados de sensibilização a alérgenos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*, com destaque para *D. pteronyssinus*, dentre crianças alérgicas das cinco regiões brasileiras. Semelhantemente, em Uberlândia-MG, Soares e colaboradores (2007) demonstraram uma tendência maior de sensibilização aos mesmos aeroalérgenos, com maiores níveis para *D. pteronyssinus*, dentre pacientes atendidos em um hospital universitário.

Esses achados demonstram que a alergia tem se tornado um problema de saúde cada vez mais importante no contexto nacional e mundial visto que a exposição humana frente a agentes sensibilizantes tem aumentado. Nesse contexto, é importante compreender que a redução da exposição aos aeroalérgenos, sobretudo, provenientes de ácaros, barata, cão e gato se constitui um fator essencial na prevenção da alergia, e conseqüentemente, na redução de casos da doença.

1.4 O sistema imune e a resposta alérgica

1.4.1 O papel das imunoglobulinas

As imunoglobulinas constituem um grupo de glicoproteínas presentes no soro e fluidos teciduais de todos os mamíferos. São bifuncionais, sendo que uma região da molécula é responsável pela ligação ao antígeno e a outra promove as chamadas funções efetoras, que incluem a fixação das imunoglobulinas ao tecido do hospedeiro, às várias células do sistema imune - incluindo as células fagocitárias - e ao elemento C1q da via clássica do sistema complemento. A estrutura básica de todas as imunoglobulinas consiste de uma unidade com duas cadeias polipeptídicas leves idênticas, e duas pesadas, unidas por pontes dissulfeto. As classes e subclasses de uma molécula de imunoglobulina são determinadas por suas cadeias pesadas

(ROITT et al., 2006) e são conhecidas, até o momento, cinco classes em mamíferos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

Dentre estas imunoglobulinas, a IgE exerce um papel substancial na resposta alérgica. Indivíduos com alergia apresentam níveis de IgE total que podem estar ou não elevados, mas os níveis de IgE específica a um ou mais alérgenos se encontram efetivamente elevados (CORRY; KHERADMAND, 1999). Antagonicamente, os níveis de IgE específica estão reduzidos ou ausentes nos indivíduos não alérgicos (GOULD et al., 2003).

A IgE é o isotipo de anticorpo que contém a cadeia pesada *epsílon* (ε). O domínio Cε3 é responsável pela ligação da molécula aos seus receptores (ISHIZAKA; ISHIZAKA, 1966). Circula como um anticorpo bivalente e está normalmente presente no plasma em concentração inferior a 1µg/mL. Em condições patológicas, tais como as infecções helmínticas e na alergia, esse nível pode subir para mais de 1.000µg/mL (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Embora sua meia vida no soro seja de alguns dias, os mastócitos podem permanecer sensibilizados pela IgE por muitos meses como resultado da ligação de alta afinidade aos receptores FcεRI, o que protege a IgE da destruição pelas proteínas séricas. O outro receptor para IgE, FcεRII ou CD23, possui menor afinidade pela imunoglobulina e se apresenta em duas formas, FcεRIIa e FcεRIIb, diferindo-se apenas pela composição da região citoplasmática amino-terminal. Como os demais receptores ativadores de imunoglobulinas, a porção intracitoplasmática dos receptores para IgE é constituída por domínios ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) (GILFILLAN; TKACZYK, 2006). Em estudo realizado por Saini e McGlashan (2002), foram apresentados quatro aspectos da biologia do receptor de IgE que possuem influência significativa no mecanismo da resposta imune, são elas: a) capacidade da imunoglobulina em regular a expressão de FcεRI; b) capacidade de induzir a sobrevivência; c) presença de receptores em outros tipo celulares, criando uma possível ativação por parte da imunoglobulina e; d) o papel que as subunidades do FcεRI desempenham na determinação do sinal da IgE nas células onde são expressos.

A ligação do anticorpo ao antígeno se dá pela formação de múltiplas ligações não-covalentes entre o antígeno e os aminoácidos anticórpicos. Embora as forças de atração (especialmente, pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas, ligações de Van der Waals e hidrofóbicas) envolvidas nestas uniões sejam individualmente fracas em comparação com as ligações covalentes, a multiplicidade das ligações resulta em uma energia de ligação suficientemente forte (ROITT et al., 2006).

Na resposta alérgica, pode eventualmente ocorrer o *switching* de classe, em resposta ao início do processo inflamatório alérgico ou mesmo de sua regulação. Entende-se por *switching*, uma série de eventos que possibilitam que uma mesma região variável das imunoglobulinas (VDJ) se combine com várias sequências constantes de cadeia pesada. Neste processo, o DNA genônico é partido e os elementos VDJ são unidos a um dos éxons codificadores de IgG, IgA ou IgE. Dois sinais são necessários para a indução deste evento: o primeiro origina-se pela ligação de CD40 das células B ao CD40L nas células T e o segundo pela ligação citocina-receptor, representadas pela IL-4 ou IL-13, no caso da IgE; IFN-γ ou IL-21 para IgG1; TGF-β para IgA e IL-10 para IgG4 (SCHMIDT-WEBER; BLASER, 2004).

Quanto ao papel das outras imunoglobulinas, suporta-se o conceito de que indivíduos que não apresentam IgE específica aos alérgenos, podem responder a eles pela produção de IgG (KEMENY et al., 1989). São diferenciadas quatro subclasses de IgG humana: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e as estruturas conformacionais das subclasses IgG1, IgG2 e IgG4 são semelhantes, diferindo apenas na posição de alguns aminoácidos.

Grande parte dos trabalhos publicados revelam substancialmente uma importância da subclasse IgG4 na resposta alérgica (AALBERSE et al., 2009), pois existe uma relação entre os elevados níveis desta imunoglobulina e aqueles que também respondem por meio de IgE, apesar de seu papel ainda ser incerto (KEMENY et al., 1989; JENMALM; BJORKSTEN, 1999; LAU et al., 2005). Diante disso, Hesselmar e colaboradores (2003) demonstram que altas exposições a

alérgenos de gato podem resultar em aumento de IgG4, porém, se não houver IgE associada, não há expressão clínica significativa. Mais recentemente, Jarvis e colaboradores (2007) confirmam que altos níves de IgG4 em indivíduos alérgicos a ácaros da poeira domiciliar estão associados a níveis também elevados de IgE. É relevante notar que IgG4 predomina em períodos de imunização prolongada, de forma que Albeerse, Van der Gaag e Van Leeuwen (1983) mostram que IgG1 é predominante nos primeiros seis meses de imunização com veneno de abelha e após este período, IgG4 passa exercer 90% do papel de resposta.

1.4.2 Fisiopatologia da alergia

O primeiro contato do alérgeno com o sistema imune ocorre pela barreira do tecido epitelial. Na maioria das vezes ocorre o auxílio por parte dos neutrófilos, macrófagos e IgA secretora na neutralização e eliminação o alérgeno da mucosa. Os componentes alergênicos remanescentes são capturados pelas células dendríticas imaturas ou pelas células B, designadas de Células Apresentadoras de Antígenos - CAA (FOKKENS, 1999). Nos indivíduos normais, a presença destes componentes induz tolerância imunológica, caracterizada pela ausência de reatividade. Já naqueles que apresentam predisposição genética para desenvolver alergia, este evento pode resultar na polarização dos linfócitos T para o perfil T-*helper* tipo 2, ou Th2. Nesse contexto, estudo realizado por Weidinger e colaboradores (2008) demonstrou que os polimorfismos do gene RAD50, localizado no cromossomo 5q31 está associado ao aumento do risco de desenvolvimento de alergia e que um *locus* gênico relacionado aos níveis de IgE total é o FCER1A.

Trabalhos demonstram que a apresentação do alérgeno às CAA ocorre via HLA de classe II. Isso pode ser demonstrado pela associação positiva entre genes alelos deste complexo e a presença de IgE específica ou resposta de célula T contra alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, incluindo HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB5, HLA-DQA1 e HLA-DPB1 (YSSEL et al., 1992; JOOST VAN NEERVEN et al.,

1993; HIGGINS et al., 1994; O`BRIEN et al., 1995; TSITOURA et al., 1996; MATSUOKA et al., 1997; O`BRIEN et al., 1999; Hu et al., 2000; MOFFATT et al., 2001; KIM et al., 2002). Recentemente, Nathan e colaboradores (2009) demonstraram que alérgenos de ácaros da poeira domiciliar pode ser reconhecido pelo epitélio da via respiratória de modo específico e que a ligação de β-glicana aos receptores epiteliais resulta na liberação de quimiocinas atrativas de células dendríticas, como CCL20.

Apesar de uma grande variedade de células efetoras serem responsáveis pela inflamação alérgica, a cronicidade da doença é atribuída aos linfócitos CD4+ de perfil Th2, por meio da produção de citocinas do tipo interleucinas, tais como: IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Estas são responsáveis pelo desencadeamento dos efeitos patológicos das células envolvidas no contexto alergênico, incluindo eosinófilos, mastócitos e basófilos.

Nos indivíduos alérgicos, subseqüentes exposições ao alérgeno induz a uma resposta de mastócitos dirigida pela IgE. A quantidade destas células se encontra elevada e se caracterizam pela significativa expressão do receptor FcεRI (YING et al., 1998). A ligação cruzada deste receptor com a IgE ligada ao alérgeno resulta na ativação da proteína quinase Lyn, que participa da fosforilação dos *motifs* ITAMs do receptor e da ativação das quinases Syk e Fyn, que juntas fosforilam o adaptador Gab2, ativando a via fosfatidilinositol-3-OH-quinase. A fosfolipase-C-γ hidroliza fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, formando inositol-1,4,5-trifosfato e diacilglicerol, que participam da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e consequentemente da ativação de STIM1, que aumenta o influxo deste íon por meio de CRACs (canais ativos de liberação de cálcio), culminando na efetiva ativação dos mastócitos (SCHARENBERG et al., 1995; KINET, 1999; TURNER; KINET, 1999; KALESNIKOFF; GALLI, 2008). Esta ativação induz à formação de mediadores esfingosina-1-fosfato 1 e 2 ($S1P_1$ e $S1P_2$), que promovem o rearranjo do citoesqueleto e, em poucos minutos, a exocitose de grânulos de histamina, serina-proteases e proteoglicanas - responsáveis pelos sintomas alérgicos imediatos, tais como: espirros, coriza e broncoespasmos nas vias respiratórias inferiores. Ocorre, também, a liberação de mediadores

neoformados, que incluem prostaglandinas e leucotrienos (particularmente leucotrieno C4). Este evento, aliado à liberação de citocinas, resulta no aumento da permeabilidade vascular e do recrutamento de células efetoras (KAY et al., 1997; SAMPSON, 2000; MARSHALL, 2004; KALESNIKOFF; GALLI, 2008)

Dependendo da dose do alérgeno e do nível de sensibilidade do indivíduo, uma segunda fase de inflamação pode ocorrer de 6 a 12h após a exposição. Neste evento, mediado por células T, eosinófilos, neutrófilos e basófilos, ocorre aumento dos sintomas de hiperreatividade brônquica, que pode persistir por vários dias (COCKCROFT, 1983; COOKSON et al., 1989; GAGA et al., 1991; TSICOPOULOS et al., 1994; ILIOPOULOS et al., 1992; MARUYAMA et al., 1994; IRANI et al., 1998; NOURI-ARIA et al., 2001).

Uma teoria que tenta explicar o aumento da prevalência de doenças alérgicas é a "Hipótese da Higiene", proposta por Strachan (1989), na qual se acredita que a melhoria nas condições de vida poderia estar associada à manutenção da resposta imune no contexto Th2, influenciada pela diminuição de alérgenos ambientais, poluentes, infecções naturais, e utilização de vacinas. Nesse contexto, sabe-se que o recém nascido apresenta um discreto predomínio de componentes Th2, porém com o crescimento, ocorre um amadurecimento e conseqüente equilíbrio da resposta Th1/Th2. Esse processo é genotipicamente determinado, entretanto, sofre influência de vários fatores como aleitamento materno, exposição à infecções e o ambiente onde o indivíduo vive (GARN; RENZ, 2007).

Apesar de ser uma teoria defendida por grande parte da comunidade científica, Platts-Mills e colaboradores (2001a; 2001b) propuseram um modelo de resposta Th2 modificada, com a interação de linfócitos T reguladores (Treg) que, por ação da IL-10, secretam e induzem maior produção de IgG4, em resposta à inibição da síntese de IgE.

A polarização de células T para o perfil Th2 foi, por muitos anos, um paradigma no campo das doenças alérgicas. Entretanto, a discussão a respeito do

mecanismo de ação de citocinas anteriormente associadas ao perfil Th1, tal como IL-23, e de famílias de IL-17, levou ao delineamento de um novo perfil, denominado Th17.

Sabe-se, até o momento, que Th17 é caracterizado pela liberação de citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22, além de IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) (BETTELLI et al., 2008). A identificação do fator de transcrição RORγt como controlador da diferenciação destas células reforça a idéia de que as células produtoras de IL-17 representam um perfil complementar de células T *helper* (IVANOV et al., 2006). Um estudo realizado por Kolls e colaboradores (2003) mostra que os níveis de IL-17A se encontram elevados no lavado broncoalveolar, escarro e tecidos pulmonares de pacientes asmáticos. Verificou-se também que a gravidade da doença está diretamente relacionada ao aumento desta citocina. Ademais, Linden, Laan e Anderson (2005) demonstraram que IL-17A e/ou IL-17F podem liderar uma inflamação local, por meio da indução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-α, G-CSF e IL-6, além da produção de quimiocinas CXCL1/Gro-a, CXCL2 e CXCL8/IL-8 pelos fibroblastos de brônquios, epitélios e músculos lisos de órgãos e vasos *in vitro*.

A interleucina 25 (IL-25) é uma citocina da família de IL-17 (IL-17F), secretada por basófilos e eosinófilos em pacientes alérgicos e relacionada ao aumento da produção de IgE bem como mudanças no perfil histológico em vários tecidos humanos e murinos (FORT et al., 2001; KIM et al., 2002a; HURST et al., 2002; IKEDA et al., 2003; ANGKASEKWINAI et al., 2007; WANG et al., 2007). De acordo com o recente modelo proposto por Wang e Liu (2008), sobre o papel do perfil Th17 no processo alérgico, o reconhecimento do alérgeno pelo epitélio leva à diferenciação de células T produtoras de IL-17, produzindo IL-17A, IL-17F e IL-22, que por sua vez, induzem células estruturais e infiltrados de células da imunidade inata a liberarem citocinas inflamatórias e quimiocinas, como IL-18, Gro-α, TNF-α, IL-6 e IL-1β, que aumentam a resposta inflamatória na fase aguda. Na fase crônica, eosinófilos,

basófilos e mastócitos produzem IL-25, que potencializa a produção de citocinas do perfil Th2, tais como IL-5 e IL-13.

A indução de tolerância nas células T periféricas representa um passo essencial na resposta imune normal frente aos alérgenos (KARAMLOO et al., 2005). Esta tolerância, observada em indivíduos saudáveis e durante processo de imunoterapia com alérgenos é caracterizada pela indução de células Treg tipo 1 e no aumento da capacidade supressora das células CD4+CD25+ (AKDIS et al., 1998; JUTEL et al., 2003; LING et al., 2004). Tal evento é seguido pelo aumento de IgG4 e/ou IgA e diminuição de IgE na fase tardia do tratamento, além da redução de IgE induzida por IL-4, que mostrou ser também efetivo no *switch* para IgG4, por meio da indução da expressão do fator de transcrição γ4 (AALBERSE et al., 1993; JEANNIN et al., 1998; JUTEL et al., 2003; ROSSI et al., 2007).

Em suma, acredita-se que Treg contribui para controlar a resposta imune inflamatória alérgica de vários modos: supressão de células apresentadoras de antígenos indutoras de células T efetoras; supressão de células Th2 e Th1; supressão de mastócitos, basófilos e eosinófilos; supressão da síntese de anticorpos IgE e indução de anticorpos IgG4 (AKDIS; AKDIS, 2007; MEILER et al., 2008; NANDAKUMAR; MILLER; KUMARAGURU, 2009).

Tais estudos demonstram que o processo inflamatório alérgico é resultado de um complexo sistema de liberação de mediadores, cujo sincronismo está diretamente relacionado ao equilíbrio entre as atividades dos diferentes perfis de células T CD4+.

1.5 Ácaros da poeira domiciliar

1.5.1 Ecologia e morfofisiologia

Os ácaros são descritos como organismos diversificados que exploraram, ao longo de seu processo evolutivo, ambientes incomuns, como: cavidades nasais de pássaros, traquéia de insetos, folículos pilosos e pele de mamíferos (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001). Com a ocupação do ambiente natural pelo homem, os ácaros invadiram o ambiente domiciliar e passaram a viver em meio à poeira presente nestes, designados então como ácaros da poeira domiciliar, habitando móveis estofados, carpetes, cortinas, colchões, travesseiros, brinquedos de pelúcia, livros e outros (HART, 1998).

Sabe-se que os fatores abióticos, como temperatura e umidade, influenciam diretamente na dinâmica de populações dos ácaros (ARLIAN et al., 1990; DE BOER et al., 1998). O fato desses animais não viverem em ambientes aquáticos remete na necessidade de absorção de água no estado de vapor, da atmosfera ou estado líquido, dos alimentos, para o seu balanço hídrico (ARLIAN, 1976).

Os ácaros da poeira domiciliar geralmente medem de 0,1 a 0,6mm de comprimento e por serem vistos com dificuldades a olho nu, sua identificação usualmente requer um aumento óptico de pelo menos dez vezes. Possuem oito pernas articuláveis e corpo ovóide. Geralmente se apresentam sob a coloração creme, porém alguns são translúcidos (HART, 1998). Seu sistema respiratório é bastante simplificado e a troca gasosa é realizada ao longo de toda a sua superfície corpórea. A presença destes animais na poeira está intimamente relacionada ao seu hábito alimentar, que consiste de restos de pele humana e demais detritos orgânicos presentes no ambiente (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

O ciclo-de-vida dos ácaros da poeira começa com deposição de aproximadamente dois ovos por dia pela fêmea. A larva hexópoda que surge desses ovos permanece ativa por algum tempo até se tornar uma protoninfa octópoda inativa. De maneira similar, a protoninfa dá origem a uma tritoninfa, já ativa, que com a última liberação do tegumento, se torna um ácaro adulto. O período deste ciclo

pode variar de acordo com a espécie, mas sabe-se que ele pode durar de duas a seis semanas. Além disso, o número de ovos depositados pelas fêmeas pode atingir até uma centena em um período de seis semanas e um ácaro adulto pode viver por até cinco meses (HART, 1998).

Apesar de serem representantes do Filo Arthropoda, que inclui animais com exoesqueleto formado por α-quitina, corpo segmentado e extremidades articuláveis (RUPPERT; FOX; BARNES, 2004), os ácaros da poeira domiciliar diferem muito dos insetos e demais representantes do grupo, quanto à morfologia e fisiologia. Por esta razão, várias medidas adotadas para controlar insetos não são eficazes para o controle destes ácaros. Neste sentido, várias medidas têm sido sugeridas para reduzir sua proliferação em ambientes domésticos, como por exemplo, o uso de acaricidas e aspiradores de pó, a lavagem dos cômodos com água quente, o encapamento de colchões e travesseiros com materiais não porosos e o uso de equipamentos que aumentam a ventilação no ambiente. Essas medidas devem ser adotadas preferencialmente em conjunto (HALLAS, 1991, HART, 1998, ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

Dentre os grupos de ácaros da poeira domiciliar, uma importância considerável é dada àqueles pertencentes à família Pyroglyphidae, sobretudo as espécies *Dermatophagoides pteronyssinus*, Trouessart 1897, e *Dermatophagoides farinae*, Hughes 1961, dois dos principais causadores da sensibilização em pacientes alérgicos, como relatado por Platts-Mills e colaboradores (1997).

1.5.2 Dermatophagoides pteronyssinus

Caracterizada pelo zoologista francês Trouessart, em 1897, a espécie *D. pteronyssinus* é chamada de ácaro europeu. Apesar desta designação, sua importância em países de americanos tem se tornado evidente e hoje se constitui em uma das

principais fontes de alérgenos provenientes da poeira domiciliar (VOORHORST, 1977; ARLIAN; MORGAN; NEAL, 2002).

Segundo Arlian e Platts-Mills (2001), de Jong e colaboradores (2004) e Puerta e colaboradores (2005), *D. pteronyssinus* ocupa uma posição taxonômica próxima aos demais ácaros da poeira domiciliar, conforme a Figura 1.

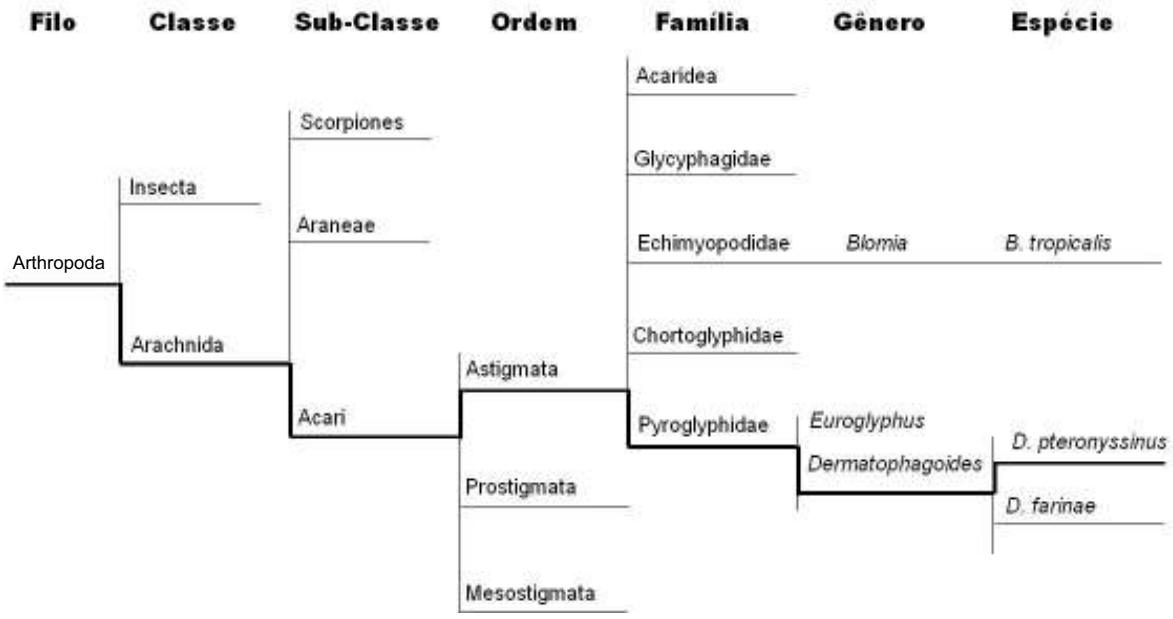

Figura 1. Posição taxonômica dos principais ácaros da poeira domiciliar.
Adaptado de: Arlian; Platts-Mills (2001), de Jong et al. (2004) e Puerta et al. (2005).

Assim como para os demais ácaros domésticos, a poeira domiciliar é o 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 pelo seu peso leve e tamanho pequeno, sendo por esse fator, considerado "plâncton aéreo". 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 (LEBRUN et al., 1991; MACARTHUR e WILSON, 1967 apud QUEIROZ et al., 2001).

No Brasil, a prevalência desta espécie tem sido avaliada em diversos trabalhos. Arruda et al. (1991) realizaram um estudo sobre a sensibilização e a exposição à alérgenos de ácaros entre as crianças asmáticas na cidade de São Paulo-SP, onde foi verificado alta freqüência nos níveis de IgE específica a *D. pteronyssinus* na maioria das crianças estudadas (95%). Além disso, detectaram-se altos níveis de exposição aos dois principais alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) em 90% das residências avaliadas. Seguindo linha semelhante de pesquisa, um estudo realizado por Terra e colaboradores (2004), revelou que *D. pteronyssinus* foi a espécie de maior freqüência na cidade de Uberaba-MG, seguida por *D. farinae*.

Grande parte dos alérgenos de *D. pteronyssinus* são elementos presentes no corpo ou na matéria fecal dos ácaros. Os alérgenos relacionados às fezes são originados do trato gastrintestinal 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 (TOVEY; CHAPMAN; PLATTS-MILLS (1981); ARLIAN et al. (1987).

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, nomeados de acordo com a ordem de descoberta. Até o momento, foram oficialmente descritos 15 alérgenos de *D. pteronyssinus*, segundo o Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional das Sociedades de Imunologia (ALLERGEN NOMENCLATURE, 2009), portal Allergome (ALLERGOME, 2009) e Lorenz e colaboradores (2009), sendo que algumas de suas principais características bioquímicas estão apresentadas no Quadro 1.

Alérgeno	Identidade bioquímica ou homologia	Potenciais sítios de glicosilação	Massa molecular relativa (kDa)	Isoformas
Der p 1	Cisteína protease; homologia com: papaína, actidina, catepsina B e H	1	25	Der p 1.0101-Der p 1.0124
Der p 2	Função desconhecida; homologia com a proteína putativa epididimal humana	-	14	Der p 2.0101-Der p 2.0115
Der p 3	Tripsina; homologia com Der p 6 e Der f 6, e outras tripsinas de mamíferos e invertebrados	-	25/28	Der p 3.0101
Der p 4	Amilase; homologia com α-amilases de insetos e mamíferos	1	60	Der p 4.0101
Der p 5	Função e sítios de clivagens desconhecidos	-	14	Der p 5.0101, Der p 5.0102
Der p 6	Quimiotripsina; homologia com Der p 3 e Der f 3, além de quimiotripsinas de mamíferos e invertebrados	-	25	Der p 6.0101
Der p 7	Função e sítios de clivagem desconhecidos	1	22	Der p 7.0101
Der p 8	Glutationa-S-transferase (GST); homologia com outras GSTs	2	26	Der p 8.0101
Der p 9	Serina protease colagenolítica	-	28/30	Der p 9.0101, Der p 9.0102
Der p 10	Tropomiosina; homologia com tropomiosinas de outros invertebrados	ND	36	Der p 10.0101-Der p 10.0103
Der p 11	Paramiosina; homologia com paramiosinas de outros invertebrados	4	103	Der p 11.0101
Der p 14	Semelhante a apolipoforina; identidade com M-177	ND	177 (variável)	Der p 14.0101
Der p 20	Arginina quinase	ND	ND	Der p 20.0101
Der p 21	ND; homologia com Der p 5	ND	14	Der p 21.0101
Der p 23	Função desconhecida; homologia com peritrofina-A	ND	14	Der p 23.0101

Quadro 1. Propriedades bioquímicas dos alérgenos de *D. pteronyssinus*.

Fonte: Kawamoto e colaboradores (2002); Stewart e Thompson (1996); Thomas, Smith e Hales (2004); Allergen nomenclature (2009); Allergome (2009); Lorenz e colaboradores (2009); - ausente; ND não determinado.

1.6 Glicoconjugados na alergia

Sabe-se que a natureza dos epítopos relacionados aos alérgenos não é necessariamente de origem peptídica, pois alguns deles podem apresentar origem glicoprotéica, como comprovaram os estudos realizados por Elgavish e Shaanan (1998) e Varghese e colaboradores (1992).

As glicoproteínas são proteínas que apresentam cadeias de carboidrato em sua composição. Essas cadeias, de tamanho variável, são responsáveis por importantes características, como por exemplo, a determinação da hidrofobicidade e resistência a choques térmicos (HELENIUS; AEBI, 2001; TROMBETTA; PARODI, 2001).

A relação entre a glicobiologia e alergia se dá no início da década de 80, com o trabalho pioneiro de Albeerse, Koshte e Clemens (1981), demonstrando que a IgE de pacientes alérgicos reagiram cruzadamente com vários alérgenos de alimentos bem como venenos de insetos e que a oxidação das porções de carboidratos inibiram esta reatividade. Mais tarde, foi descoberto que a base estrutural da reatividade cruzada estava relacionada às regiões determinantes de carboidratos dos alérgenos e que algumas particularidades entre plantas e insetos são evidentes, sobretudo nas porções N-glicana de seus alérgenos (TRETTER et al., 1993).

Com o passar dos anos, vários estudos têm apontados para a importância dos carboidratos no reconhecimento pela IgE (FÖTISH; VIETHS, 2001; BENCÚROVÁ et al., 2004; HINO et al., 2009). No entanto, seu significado clínico no contexto de alergia não está muito bem elucidado (VAN REE, 2002). Em um estudo de sensibilização envolvendo reatividade cruzada, Ebo e colaboradores (2004) investigaram a prevalência de sensibilização a determinantes de carboidratos em pacientes alérgicos a ácaros da poeira domiciliar, animais domésticos e polens. Foi demonstrado que pacientes exclusivamente com polinose apresentaram níveis de IgE

positivos a venenos de abelha e que esta reatividade cruzada poderia estar ligada aos carboidratos determinantes de reatividade cruzada. Anteriormente, Prenner e colaboradores (1992) e Wilson e colaboradores (1998) também haviam relatado situação semelhante entre glicoproteínas de veneno de abelha e de rabanete.

Sabe-se hoje, que a característica do marcador CD1 em apresentar moléculas que contenham carboidratos, essencialmente glicolipídios, é um paradigma na apresentação destes antígenos (MOODY et al., 2000; YOUNG; MOODY et al., 2006; PADURARU et al., 2006) e seu papel na linha de defesa contra patógenos e na hipersensibilidade foi discutido por Bilenki e colaboradores (2005), quando mostraram que a estimulação de células NKT, que apresentam marcadores CD1 com α-galactosilceramida resultou em maior liberação de IL-4 e produção de IgE. Contudo, o mecanismo de apresentação e de indução *in vivo* de IgE ainda não foi descrito, o que remete para a condução de estudos adicionais neste campo.

1.7 Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada entre duas fases: móvel e estacionária, em uma direção definida. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (MCNAUGHT; WILKINSON, 2004; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Os termos cromatografia, cromatograma e método cromatográfico começaram a ser empregados em 1906, pelo botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de

folhas em faixas coloridas - motivo pelo qual a técnica é conhecida como cromatografia (do grego *chrom*: cor e *graphe*: escrever) (COLLINS, 1997).

Existem diversas formas de cromatografia, que são classificadas de acordo com a forma física do sistema cromatográfico: planar ou em coluna, quando a fase estacionária pode ser disposta sobre uma superfície planar ou colocada em tubo cilíndrico, respectivamente. Em tais processos, diferentes fases móveis podem ser empregadas, sendo que a mais utilizada é a líquida. Em relação aos mecanismos de separação, os fracionamentos cromatográficos utilizam adsorção, troca iônica, exclusão, afinidade biológica ou mesmo a combinação destes (COLLINS, 1997). Esta diversidade de combinações entre as fases móvel e estacionária, aliada aos avanços tecnológicos diretamente relacionados ao desenvolvimento de sistemas cromatográficos mais eficientes, torna a cromatografia uma técnica de grande aplicabilidade, e dentre as diversas variantes largamente empregadas está a cromatografia de afinidade (CLONIS, 2006; AZARKAN et al., 2007).

1.7.1 Cromatografia de afinidade

De acordo com McNaught e Wilkinson (2004), a cromatografia de afinidade é um modelo de cromatografia que faz uso da especificidade biológica para a separação e análise de componentes presentes em uma amostra. Data-se a primeira utilização desta técnica em 1910, quando Starkenstein isolou a α-amilase via adsorção do amido (SCRIBA, 2004). Contudo, o conceito moderno e o termo cromatografia de afinidade somente foram introduzidos mais tarde por Cuatrecasas, Wilchek e Anfinsen (1968).

Este tipo de cromatografia é a mais utilizada técnica de purificação protéica, pois explora a ligação de uma região definida da molécula com o ligante imobilizado, sendo este uma pequena molécula ou uma macromolécula de origem sintética ou biológica, como uma lectina, por exemplo. Esta ligação se faz de maneira

complementar ao sítio de ligação, formando um complexo reversível caracterizado por interações não covalentes (SCRIBA, 2004; CLONIS, 2006). Como exemplo, Sudha e colaboradores (2008), utilizaram-se desta propriedade da cromatografia em coluna de afinidade Benzamidina-*Sepharose* para isolarem o alérgeno Per a 10 do extrato bruto de *Periplaneta americana*, com o objetivo de caracterizá-la bioquímica e imunologicamente, demonstrando ser esta uma técnica já conhecida na purificação de alérgenos e outros antígenos.

1.8 Lectinas e Concanavalina A

As lectinas (do latim *lectus*, particípio de *legere*; selecionar, escolher) são conhecidas pela propriedade de interagirem com carboidratos, o que as tornam excelentes ferramentas na purificação de glicoproteínas solúveis e de membranas, tais como: hormônios, proteínas do plasma, antígenos, anticorpos ou mesmo organelas e células como um todo (SCRIBA, 2004). Tal atributo tem feito com que as lectinas se tornassem um paradigma no que diz respeito ao reconhecimento entre proteína e carboidrato e desta forma, seu uso na imunologia e na glicobiologia tem se tornado ferramenta essencial. Devido ao fato de interagem com as moléculas de carboidratos de maneira altamente específica, porém, não covalente e reversível, as lectinas são geralmente utilizadas em aplicações envolvidas na purificação e na caracterização de glicoconjugados (GOLDSTEIN; PORETZ, 1986).

Uma das lectinas com maior aplicação em técnicas de glicobiologia é a Concanavalina A (ConA). Originada do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), planta leguminosa da família Phaseoleae, a ConA é uma proteína globular composta de quatro monômeros, com massa molecular relativa de 105kDa, sendo a primeira lectina de leguminosa a ser isolada (SUMNER; HOWELL, 1936), seqüenciada (CUNNINGHAM; WANG; WAXDAL, 1975) e analisada quanto à estrutura

tridimensional por cristalografia (EDELMAN et al., 1972). Além dos ensaios de purificação, é classicamente conhecida pelos ensaios biológicos de reconhecimento celular (SHARON; LIS, 1989), mitogênese de linfócitos (POWELL; LEON, 1970) e inibição de crescimento tumoral (SHOHAN et al., 1970).

Vários carboidratos derivados de manose e glicose podem apresentar sítios de ligação com a ConA, dentre eles: metil-α-D-manopiranosídeo, metil-α-D-glucopiranosídeo, 4'nitrofenil-α-D-manopiranosídeo, 4'nitrofenil-α-D-glucopiranosídeo, 4'metillumeliferil-α-D-glucopiranosídeo, arabinose e Manα1-3[Manα1-6]Manα1Me. Nesta interação, a ligação de hidrogênio ocorre essencialmente em três resíduos de aminoácidos lectínicos: um aspartato (Asp208), uma asparagina (Asn14) e uma arginina (Arg228). Tal ligação é também complementada por uma interação de van der Waals entre resíduos aromáticos da lectina e as porções cíclicas dos açúcares. Todas essas interações são dependentes, direta ou indiretamente, de cálcio. (NAISMITH et al., 1994).

A ConA tem sido frequentemente utilizada como ferramenta no isolamento de glicoconjugados (NILSEN et al., 1990; GUPTA et al., 1996; NIGAM; GHOSH; SARMA, 2003) e a reatividade da IgE a estes componentes isolados também constitui um alvo em pesquisas envolvendo doenças alérgicas (GUPTA et al., 2004). Entretanto, poucos estudos foram conduzidos, até o momento, relacionando estes epítopos glicosilados a alergia a ácaros da poeira domiciliar. Os primeiros alérgenos glicosilados de *D. farinae* foram isolados por cromatografia de afinidade de ConA-*Sepharose* (BALDO; UHLENBRUCK, 1977) e, mais tarde, esta lectina também foi utilizada no isolamento de um antígeno de alta massa molecular, identificado como Dpt 4, de *D. pteronyssinus* (STEWART; TURNER, 1980). Apesar disso, nenhum destes estudos demonstrou um perfil de proteínas ligantes e não ligantes de ConA reconhecidas por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus*, bem como a reatividade cruzada destes componentes com alérgenos de outras espécies de ácaros de importância clínica.

Como ponto de partida para a relação desses anticorpos com frações ligantes de ConA, dois importantes estudos foram conduzidos pelo Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU, representados por Almeida e colaboradores (2006) e Alves e Colaboradores (2008), demonstrando que pacientes alérgicos a *B. tropicalis* apresentaram alta reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 às frações ligantes de ConA, comparados aos indivíduos não alérgicos. Esses achados reforçam a importância destas frações no estudo da sensibilização alergênica, remetendo a necessidade de avaliação de alérgenos provenientes de outros ácaros como possíveis sensibilizadores na resposta humoral entre pacientes com alergia respiratória.

2 OBJETIVOS

a) Extrair e fracionar componentes de *D. pteronyssinus* por cromatografia de afinidade de ConA- *Sepharose*;

b) Avaliar a reatividade do extrato bruto de *D. pteronyssinus* e de suas frações não ligantes e ligantes de ConA a anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 de pacientes alérgicos e não alérgicos;

c) Verificar a presença de reatividade cruzada entre o extrato bruto de *D. pteronyssinus* e suas frações ligantes e não ligantes de ConA, além dos extratos brutos de *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides farinae*;

d) Analisar os componentes alergênicos e antigênicos do extrato bruto de *D. pteronyssinus* e suas frações ligantes e não ligantes de ConA reconhecidos por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 de pacientes alérgicos e não alérgicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos legais

O projeto de pesquisa foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde (CNS), e aprovado sob processo n° 111/07 (Anexo 1).

Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), pelo qual foram informados sobre todos os procedimentos adotados, segundo as normas da Resolução CNS 196/96, que regulamenta a ética em pesquisa envolvendo seres humanos.

Os participantes tiveram o direito de se retirar do estudo, em qualquer momento, sem a necessidade de prévia explicação.

3.2 Locais de estudo

Todas as etapas do estudo foram realizadas em Uberlândia. O município se localiza no estado de Minas Gerais, na região conhecida como Triângulo Mineiro, a 563km da capital do Estado, Belo Horizonte. Apresenta população residente total de 608.369 habitantes, distribuída em uma área de 4.116km^2 (IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2009).

O atendimento médico dos indivíduos foi realizado no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. O Hospital está territorialmente inserido no Campus Umuarama e é um dos 88 estabelecimentos no município que prestam serviço junto ao Sistema Único de Saúde (SUS), segundo o IBGE (2009).

Todos os demais procedimentos técnicos foram conduzidos na Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica da UFU e no Laboratório de Investigação em Alergia Ltda. - AlergoLab, ambos situados no bloco 4C, Campus Umuarama.

3.3 Obtenção do extrato antigênico

3.3.1 Extrato bruto de **D. pteronyssinus** *e outros ácaros*

A extração de antígenos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis* foi procedida de acordo com o método adotado por Montealegre e colaboradores (2002) e Pereira e colaboradores (2005). Inicialmente, foram pesados 200g do ácaro em meio de cultura, gentilmente cedido pelo Prof. Federico Montealegre (Laboratório de Imunoquímica, Escola de Medicina de Ponce - Porto Rico, EUA) e peneirados (Peneiras Granutest-Telastem, ABNT 35, TYLER 32) para separar, por retenção, o material de cultura dos corpos e fezes dos ácaros. Dez gramas do material acarológico, constituído de corpos e fezes foram diluídos em 50mL de solução de salina tamponada com borato (BBS) 5mg/mol, pH 8,0, contendo os inibidores de proteases: fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF - ICN Biomedicals, Inc., Aurora, EUA) 1mg/mol, benzamidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) 0,001g/mol, aprotinina (Sigma) 0,2% e leupeptina (Sigma) 1µg/mol.

Após solidificação e criólise dos corpos dos ácaros, com nitrogênio líquido, o conteúdo foi macerado exaustivamente, com gral e pistilo, até a sua fusão, intensificando o rompimento do exoesqueleto do animal e consequentemente, facilitando a liberação dos alérgenos intracorpóreos. A solução foi então transferida para tubos cônicos de 50mL e submetidos a agitação orbital lenta, por 18h, a 4°C.

O sobrenadante resultante de duas pré-centrifugações a 3.000 x G, por 15min e uma centrifugação a 30.000 x G, por 45min, foi submetido à filtração em sistema

Amicon (W.R. Grace & Co., Bervely, EUA), utilizando membrana porosa com limite de exclusão de 10kDa (YM-10 - Whatman International Ltd., Maidstane, Inglaterra), em 500mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10mg/mol, pH 7,2.

O material solúvel retido pela membrana porosa foi definido como o extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto), dividido em alíquotas de 500µL e estocados em microtubos de polipropileno, a -80°C para posterior utilização nos demais procedimentos.

3.3.2 *Extratos antigênicos de ácaros da poeira domiciliar para testes* in vivo

Para a preparação do reagente utilizado no Teste Cutâneo de Puntura (TCP), os extratos Dp bruto, Bt e Df foram diluídos em PBS contendo fenol a 0,4% e glicerina a 50% (Bayer Corporation, Spokane, EUA), na concentração protéica final de 2mg/mL. Esta solução foi armazenada em frascos de vidro do tipo âmbar com conta-gotas, a 4°C, até a realização dos testes cutâneos.

3.4 Cromatografia de afinidade

3.4.1 Preparação da coluna

Para obtenção das frações ligantes e não ligantes de Concanavalina A (ConA), 5mL de resina de ConA-*Sepharose* 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) foi aplicada em uma coluna de cromatografia e assentada por meio de aplicação de 50mL de solução tampão de ligação, pH 7,4, constituído de Tris (Hidroximetil-aminometano – Merck, Darmstadt, Alemanha) 200mg/mol, NaCl 1M, $MgCl_2$ (Sigma) 5mg/mol, $MnCl_2$ (Sigma) 5mg/mol, $CaCl_2$ (Sigma) 25mg/mol.

No sentido de evitar uma possível co-eluição das subunidades de ConA, foi realizada uma ligação cruzada com glutaraldeído, conforme descrição de Scher, Resneck e Bloch (1989), com modificações. Para tal, foram aplicados 250mL de PBS contendo L-lisina (Sigma) 200mg/mol, pH 8,3 e subsequentemente 100mL da mesma solução acrescida de D-manopiranose (Sigma) 200mg/mol, pH 8,3. Em seguida, a válvula de escape da coluna foi fechada e 15µL de glutaraldeído (Merck) 25% foram adicionados. Após agitação orbital, por 1h, à temperatura ambiente, o excesso do composto orgânico foi removido pela aplicação de 25mL de solução tampão constituída de Tris-HCl 100mg/mol, glicina (Quimibrás) e D-manopiranose 200mg/mol, pH 9,2. A coluna foi novamente submetida à agitação orbital, por 10min, temperatura ambiente e armazenada com 50mL de PBS, a 4°C, até o momento do uso.

A aplicação de todos os tampões foi realizada sob fluxo vertical lento e contínuo.

3.4.2 Obtenção das frações ligantes e não-ligantes de ConA

O extrato Dp bruto, em volume de 1mL, contendo 5mg de proteína, foi aplicado à coluna de cromatografia contendo ConA-*Sepharose*, previamente submetida à ligação cruzada com glutaraldeído, e mantido em repouso por 2h, a 4°C. Após este período, o tampão de ligação foi aplicado e as frações não ligantes de ConA (FNL) foram coletadas em tubos de ensaio, em volumes aproximados de 2mL e monitoradas quanto à densidade óptica (D.O.), por espectrofotometria (Espectrofotômetro Micronal, São Paulo, Brasil), a 280nm. Quando os valores de D.O. atingiram próximos de zero, a eluição foi interrompida pela adição de metil-α-D-manopiranosídeo (Ferro Pfanstiehl Laboratories, Inc., Walkegan, EUA) 100mg/mol, para eluição das frações ligantes de ConA (FL). Ao atingir novamente valores basais de D.O., foram aplicados 50mL do tampão de ligação.

Entre cada ensaio cromatográfico, a coluna foi armazenada a 4°C, contendo 10mL de tampão de ligação, acrescido de álcool etílico (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, SP) 20% como conservante.

As frações ligantes e não ligantes de ConA que apresentaram os maiores valores de D.O., foram paralelamente agrupadas, concentradas e filtradas em PBS por meio do sistema Amicon. Seu armazenamento foi feito a -80°C, em microtubos de polipropileno.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Dosagem de proteínas

As concentrações protéicas do extrato Dp bruto e das frações obtidas por cromatografia de afinidade (FL e FNL) foram determinadas conforme descritas por Lowry e colaboradores (1951).

A concentração de proteínas foi obtida de acordo com os valores de D.O. da curva de calibração com soroalbumina bovina (BSA - Sigma) em diluições seriadas de 500 a 15,6µg/mL. Os valores de D.O foram calculados por meio do *software* Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA).

3.5.2 Dosagem de carboidratos

A quantidade de carboidratos presentes nas amostras foi determinada segundo o protocolo descrito por Dubois e colaboradores (1956), utilizando D-Manose (Sigma) como padrão na curva de calibração, em diluições seriadas de 1.000 a 61,5µg/mL. A conversão dos valores de D.O. em concentração de carboidratos

(µg/mL) foi realizada de maneira similar ao procedimento descrito para dosagem de proteínas.

3.6 Triagem dos indivíduos

Cento e oitenta e sete indivíduos voluntários (n = 187), de ambos os sexos, com idade entre 18 a 57 anos, foram selecionados durante o período de agosto de 2006 a novembro de 2008, mediante avaliação clínica e aplicação do questionário clínico proposto pelo Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância *(International Study of Asthma and Allergies in Childhood* - ISAAC, 1998) (Anexo 3). Durante a seleção, todos os indivíduos que concordaram em participar do estudo foram submetidos à anamnese, TCP e coleta de sangue, sob supervisão técnica de um médico alergologista.

3.7 Teste Cutâneo de Puntura (TCP)

A hipersensibilidade imediata foi avaliada pelo Teste Cutâneo de Puntura (TCP), como descrito por Ownby (1988). Para a realização do teste (Anexo 4), foram utilizados os seguintes extratos:

a) *D. pteronyssinus* (produzido conforme anteriormente descrito);

b) *D. farinae* (produzido conforme anteriormente descrito);

c) *B. tropicalis* (produzido conforme anteriormente descrito);

d) Cão (*Canis familiaris* – FDA Allergenic, Rio de Janeiro-RJ);

e) Gato (*Felis domesticus* - FDA Allergenic);

f) Baratas (*Periplaneta americana* e *Blattela germanica* - FDA Allergenic);

g) Fungo (*Alternaria alternata* - FDA Allergenic);

h) Controle positivo: solução de histamina (FDA Allergenic);

i) Controle negativo: solução salina fisiológica (FDA Allergenic).

Uma gota - aproximadamente 30µL - de cada extrato foi depositado na região antebraquial anterior (COMISSÃO DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA - CTA, 2001), após anti-sepsia do local com álcool etílico 70%. Uma puntura cutânea (Puntores Aiko, Rio de Janeiro, Brasil) foi feita no local de depósito da gota e após 15min foram medidos os diâmetros ortogonais das pápulas formadas, com régua apropriada para TCP (Morrow Disposable/Skin Test Needle AllerGuard). As pápulas que apresentaram média aritmética dos diâmetros maiores ou iguais a 3mm, em relação ao controle negativo, foram consideradas positivas ao teste.

3.8 Coleta de sangue

Por meio de punção venosa na fossa cubital (CTA, 2001), foram coletados 10mL de sangue de cada indivíduo, com tubos a vácuo (Vacutainer - Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA) e agulhas 21G1 (Vacutainer). Após serem mantidas em repouso por 30min, para desfibrinação, as amostras de sangue foram centrifugadas (Centrífuga Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), a 4°C, por 10min, 2.000 x G. Os soros obtidos foram divididos em alíquotas e armazenados em microtubos de polipropileno, a -20°C, até a realização dos testes sorológicos.

3.9 Distribuição dos indivíduos

Os indivíduos recrutados para o estudo foram distribuídos em dois grupos, de acordo com o históricos clínicos de asma e/ou rinite alérgica e reatividade ao TCP e ELISA, representados pelo Quadro 2:

Nome do grupo	Número de participantes	Característica
DP +	95	- Pacientes com histórico clínico de asma e/ou rinite alérgica perene; - TCP positivo ao extrato de *D. pteronyssinus;* - Índices de IgE específica a *D. pteronyssinus* maior ou igual a 1,2.
NA	92	- Indivíduos sem histórico clínico de asma e rinite perene; - TCP negativo a todos os extratos testados; - Índices de IgE específica a *D. pteronyssinus* menor que 1,2.

Quadro 2. Distribuição dos participantes selecionados para o estudo e suas características.

Foram excluídos do estudo indivíduos:

a) Com idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos;

b) Que apresentaram lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;

c) Em tratamento com drogas anti-inflamatórias esteroidais e/ou anti-histamínicos de primeira ou segunda geração;

d) Que haviam sido submetidos à imunoterapia com qualquer alérgeno;

e) Que não apresentaram sintomas clínicos para asma e/ou rinite alérgica perene, mas foram positivos ao TCP para pelo menos um dos extratos testados;

f) Que não assinaram o Termo de Consentimento;

g) Que se recusaram a participar do estudo.

3.10 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

3.10.1 Detecção de IgE específica

Para detecção e quantificação de anticorpos IgE reativos ao extrato Dp bruto bem como FNL e FL no soro dos indivíduos participantes do estudo foi utilizado o ensaio imunoenzimático ELISA, conforme descrito por Alves et al. (2008).

Placas de alta afinidade (Costar, Corning Inc., Corning, EUA), contendo 96 poços, foram sensibilizadas com Dp bruto, FNL e FL, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 60mg/mol, pH 9,6, a 1µg/poço, volume de 50µL/poço, por 18h, a 4ºC. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo monolaurato de polioxietileno sorbitano (Tween 20 - Sigma) 0,05% (PBS-T). Os sítios ativos dos poços foram então bloqueados, em volume de 100µL/poço, com solução PBS-T contendo BSA (Sigma) a 1% (PBS-T-BSA), por 1h, à temperatura ambiente. PBS-T-BSA foi também utilizado como diluente dos reagentes utilizados nas etapas posteriores.

Os soros, diluídos na proporção de 1:2, foram adicionados, em duplicata, em volumes de 50µL/poço, após três lavagens prévias com PBS-T. Como controles de cada reação, foram utilizados três soros de pacientes do grupo NA. Após incubação, a 37°C, por 2h, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas com

anticorpo de cabra anti-IgE humana biotinilado (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EUA) diluído a 1:500, em volume de 50µL/poço, por 1h, a 37°C.

Após novo ciclo de seis lavagens com PBS-T, adicionou-se o conjugado Streptavidina-peroxidase (Sigma), diluído a 1:500 em PBS-T-BSA, em volume de 50µL/poço e incubado à temperatura ambiente, por 30min. A revelação da reação foi feita com substrato enzimático peróxido de hidrogênio (Sigma) a 0,03%, acrescido de ácido 2,2'-diazino-bis-3-etil-benzotiazol (ABTS - Sigma), diluídos em tampão citrato-fosfato 70mg/mol, pH 4,2.

As densidades ópticas foram determinadas por espectrofotometria (ELISA Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA), a 405 nm.

Os índices de anticorpos foram expressos em Índice ELISA (IE), calculados pela expressão:

$$IE = \frac{DOi}{DOcontrole + 3.\delta}$$

, onde:

- DO*i* = média da densidade óptica da amostra teste;
- DO*controle* = média da densidade óptica de três amostras de soros de indivíduos com ausência de IgE específica;
- δ = desvio-padrão das densidades ópticas das amostras de soros de indivíduos do grupo NA.

Valores de IE acima de 1,2 (IE ≥ 1,2) foram considerados positivos ao ELISA.

3.10.2 Detecção de IgG1 e IgG4 específicos

O ensaio imunoenzimático ELISA foi utilizado para a detecção de anticorpos IgG1 e IgG4 específicos ao Dp bruto, FNL e FL, segundo protocolo descrito por Almeida e colaboradores (2006).

Placas de microtitulação de alta afinidade foram sensibilizadas com Dp bruto, FNL e FL, a 1μg/poço, volume de 50μL/poço em tampão carbonato-bicarbonato 60mg/mol, pH 9,6, por 18h, 4ºC. Posteriormente, as placas foram lavadas em ciclo de três vezes com PBS-T e os sítios ativos dos poços bloqueados com solução de PBS-T, para detecção de IgG1 ou PBS-T-BSA 1%, para IgG4, ambos em 100μL/poço, 1h, temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T, as amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:5 seus respectivos agentes bloqueadores e adicionadas em duplicata, 50μL/poço. Três soros com altos índices de IgG1 e IgG4 específicos e três soros com índices basais destes anticorpos foram incluídos em cada placa. Após incubação por 2h, 37ºC, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas com os respectivos anticorpos secundários anti-IgG1 humana (Sigma) e anti-IgG4 humana (Sigma), diluídos a 1:3000, 50μL/poço, 1h, 37ºC. Após novo ciclo de seis lavagens com PBS-T, foi adicionado o conjugado streptavidina-peroxidase (Sigma) diluído na proporção de 1:500 em seus respectivos agentes bloqueadores e incubado à temperatura ambiente, por 30min. A reação foi revelada com o substrato enzimático consistindo de H_2O_2 a 0,03% e ABTS a 10mg/mol diluídos em tampão citrato-fosfato 70mg/mol, pH 4,2.

Os índices de IgG1 e IgG4 específicos foram determinados conforme expressão descrita para IgE.

3.10.3 Detecção de Der p 1, Der p 2 e Blo t 5

O ensaio imunoenzimático ELISA foi utilizado para detecção e quantificação dos alérgenos principais de *D. pteronyssinus*, Der p 1 e Der p 2, segundo Simplício e colaboradores (2007). Para confirmar a ausência de contaminação por antígenos de outros ácaros, utilizou-se da mensuração dos níveis de alérgeno Blo t 5, de *B. tropicalis*.

As placas de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura anti-Der p 1 (clone 5H8 - Indoor Biotechnologies Inc., Charlottesville, EUA), anti-Der p 2 (clone 1D8, Indoor) e anti-Blo t 5 (clone 4G9, Indoor), diluídos a 1:1000 (anti-Der p 1 e anti-Der p 2) e 1:50 (anti-Blo t 5, Indoor) em tampão carbonato-bicarbonato 60mg/mol, pH 9,6, no volume de 50µL/poço, por 18h, 4°C. Após um ciclo de três lavagens com PBS-T, os sítios ativos foram bloqueados com PBS-T-BSA 1%, 100µL/poço, por 1h, temperatura ambiente. As placas foram então submetidas a um novo ciclo de três lavagens e incubadas com o extrato Dp bruto, diluído a 1:4000 e FNL e FL, diluídos a 1:500, em PBS-T-BSA 1%, em duplicata, por 1h, temperatura ambiente. Paralelamente, amostras padrões de Der p 1 (Indoor), Der p 2 (gentilmente cedida pelo Dr. Martin D. Chapman, Universidade de Virginia, EUA) e Blo t 5 (Indoor) foram diluídas seriadamente em concentração variando de 500 a 0,4ng/mL, em duplicata. O processo foi seguido de um novo ciclo de três lavagens com PBS-T.

Consecutivamente, foram adicionados os anticorpos monoclonais de detecção biotinilados anti-grupo 1 (clone 4C1, Universidade de Virginia, EUA) a 1:1000, anti-grupo 2 (clone 7A1, Universidade de Virginia, EUA) a 1:3000 e anti-Blo t 5 (clone 4D9, Indoor) a 1:1000, todos em PBS-T-BSA 1%. A incubação ocorreu à temperatura ambiente, por 1h.

Procederam-se novas lavagens, como anteriormente descrito, e adicionou-se (50µL/poço) de conjugado streptavidina-peroxidase, a 1:1000, em PBS-T-BSA 1%. As placas foram incubadas por 30min à temperatura ambiente.

Após o último ciclo de três lavagens com PBS-T, a reação foi revelada por ABTS, acrescido de peróxido de hidrogênio, de maneira semelhante à descrita para detecção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4.

A média dos valores de D.O. obtidos das amostras foi convertida em ng/mL, tendo como referência os valores de curva padrão. Os dados foram analizados pelo *software* Microplate Manager 4.0.

3.10.4 Inibição competitiva

Para avaliação da capacidade de inibição de IgE, IgG1 e IgG4 ao extrato Dp bruto, foi executado o ELISA de inibição competitiva, conforme descrito por Pereira e colaboradores (2005). Para as curvas de inibição, foram realizadas diluições seriadas de 10^2 a 10^{-4}µg/mL dos inibidores Dp bruto, FNL, FL, extrato bruto *D. farinae* (Df) e extrato bruto de *B. tropicalis* (Bt), em PBS-T-BSA 1%, para detecção de IgE e IgG4, ou PBS-T, para detecção de IgG1. Toxóide tetânico (TT - Sigma) foi utilizado como antígeno irrelevante, nas mesmas diluições supracitadas. Inicialmente, todos os extratos foram incubados, por 18h, a 4°C, juntamente com quatro soros positivos, diluídos a 1:5, em PBS-T-BSA 1%, para detecção de IgE e IgG4, ou PBS-T, para detecção de IgG1. Os soros incubados somente com o diluente foram utilizados como controle positivo da reação.

Paralelamente à incubação dos soros com os agentes inibidores, a placa de alta afinidade foi sensibilizada com extrato Dp bruto, a 1µg/poço, em volume de 50µL/poço, por 18h, 4°C. Após o ciclo de três lavagens com PBS-T, as placas utilizadas para a detecção de IgG1 foram bloqueadas com PBS-T e para a detecção de IgE e IgG4, bloqueadas com PBS-T-BSA 1%, por 1h, temperatura ambiente. Os soros incubados previamente com os antígenos inibidores foram adicionados, em duplicata, após um ciclo de três lavagens. Incubou-se a placa por 1h, para detecção de IgG1 e IgG4 e por 2h, para IgE.

Os demais procedimentos, desde a aplicação dos anticorpos secundários anti-IgE, anti-IgG1 e anti-IgG4 humana ate à revelação, foram conduzidos de maneira semelhante à descrita para detecção destes anticorpos no soro. Os resultados foram expressos em porcentagens de inibição em relação à ausência do antígeno inibidor e calculados segundo a fórmula:

$$I = \left[1 - \frac{DOi}{DOcontrole}\right] \times 100$$

,onde:

- DO*i* = média da densidade óptica da amostra inibidora em teste
- DO*controle* = média da densidade óptica do controle positivo da reação

A concentração inibitória mediana (IC_{50}) para cada inibidor foi calculada com base nos valores na curva inibitória gerada pelos diferentes agentes inibidores.

3.11 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil de bandas polipeptídicas de Dp bruto, FNL e FL foi analisado por SDS-PAGE, em condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com Laemmli e colaboradores (1970).

O gel de separação foi preparado a 12%, composto de tampão Tris-HCl 125mg/mol, pH 8,8, dodecil sulfato de sódio (SDS – Bio-Rad) 0,1%, N, N'-Metileno-bis-acrilamida (Bio-Rad) 5%, N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED – Bio-Rad) 0,125% e persulfato de amônia (Bio-Rad) 0,125%, diluídos em água deionizada. O gel de empilhamento foi preparado a 5%, com os mesmos compostos, porém, utilizando

Tris-HCl 0,375mg/mol pH 6,8 como solução tamponante. O tempo de polimerização foi de, aproximadamente, 40min para o gel de separação e 2h para o gel de empilhamento.

Antes da aplicação no gel, as amostras foram diluídas em tampão de amostra, contendo Tris-HCl 100mg/mol, pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% e glicerol 20%, e submetidos a aquecimento a 95ºC, em banho seco (Termobath ALB64 – Finemould Precision Ind., Co., Seul, Coréia do Sul), por 5min, para desnaturação dos polipeptídeos.

Foram aplicados aproximadamente 13µg de polipeptídeos, em volume de 15µL, em cada poço do gel. O padrão de peso molecular pré-corado (BenchMark Pre-Stained Protein Ladde – Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) foi utilizado como recurso para o cálculo das massas moleculares relativas destes polipeptídeos.

O processo de eletroforese foi realizado no sistema Mini-Protean Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Estados Unidos), à corrente constante de 20mA, 4°C, por 1h30min.

A coloração do gel foi realizada de acordo com a técnica descrita por Friedman (1982), utilizando nitrato de prata. O gel foi imerso em 50mL de solução fixadora, composta de álcool metílico 50%, ácido acético 12%, formaldeído 0,05%, por 18h. Posteriormente, impregnou-se o gel em três ciclos com álcool etílico (Dinâmica) 50%, por 10min/cada. Após o pré-tratamento com tiosulfato de sódio penta-hidratado (Vetec Química, Duque de Caxias, RJ) por 1min e água deionizada em três ciclos de 20s, imergiu-se o gel em solução de nitrato de prata (Vetec) 0,25% contendo formaldeído 0,1%, por 20min, ao abrigo da luz. Para relevação das bandas polipeptídicas, utilizou-se solução composta de carbonato de sódio (Vetec) 6%, formaldeído 0,05% e tiossulfato de sódio penta-hidratado 1%. Após o aparecimento das bandas, interrompeu-se a revelação com solução contendo álcool metílico 50% e ácido acético (Isofar, Duque de Caxias, RJ) 12%.

Todo o procedimento de coloração do gel foi realizado sob agitação pendular lenta, à temperatura ambiente.

O *software* KODAK 1D (Eastman Kodak Co., Rochester, EUA) foi adotado na determinação dos valores de massas moleculares das bandas visualizadas no gel, baseado nos valores de mobilidade relativa (Rf).

A documentação do gel foi realizada por digitalização de imagem (Scanjet3800, Hewlett Packard, Co., EUA), em resolução de 200dpi.

3.12 Immunoblotting

Para verificar a presença de bandas polipepdídicas ligantes de IgE, IgG1 e/ou IgG4, o extrato Dp bruto e suas frações foram submetidos à técnica de *Immunoblotting*, conforme técnica descrita por Towbin, Stslehelin e Gordon (1979). Foram selecionados 10 pacientes do grupo DP+ e 10 indivíduos do grupo NA.

Os componentes polipeptídicos separados por SDS-PAGE foram transferidos para membrana de nitrocelulose (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad), com área de 70cm^2, mediante imersão em tampão de transferência composto de Tris 50mg/mol, glicina 40mg/mol, SDS 0,04% e álcool metílico 20%. O procedimento foi conduzido no sistema Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad) em corrente de 350mA, por 1h.

Após a transferência, o gel foi devidamente descartado e a membrana foi imersa em solução de Ponceau S (Merck) 0,5%, para visualização momentânea das bandas no sentido de confirmar o sucesso da transferência.

Efetuada a secagem à temperatura ambiente, a membrana foi cortada em tiras verticais de 2,5mm de largura e acondicionada em placas para *Immunoblotting*

(Bio-Rad), onde foram bloqueadas com 800µL de PBS-T acrescido de 5% de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil), por 2h, à temperatura ambiente.

As amostras de soro foram aplicadas em volume de 500µL/canaleta, diluídas em PBS-T acrescido de 1% de leite desnatado (PBS-T-L) a 1:2, após 3 lavagens com PBS-T. A incubação do soro foi procedida por 18h, à temperatura ambiente e seguida de seis ciclos de lavagens com PBS-T.

Posteriormente, as tiras foram incubadas com 500µL dos conjugados anti-IgE humana biotinilada (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.), anti-IgG1 (Sigma) e anti-IgG4 (Sigma), biotinilados, diluídos em PBS-T-L, a 1:250, 1:1000 e 1:100, respectivamente, por 2h, seguidas de seis ciclos de lavagens com PBS-T.

Na fase seguinte, procedeu-se a adição do complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA), diluído a 1:250 (IgE e IgG1) e 1:100 (IgG4), por 1h, seguidas de seis ciclos de lavagens com PBS-T.

A revelação da reação foi procedida com a adição de 10mg de tetra-hidrocloreto 3,3'-diaminobenzidina (DAB - Sigma) acrescido de 12µL de peróxido de hidrogênio em 15mL de solução salina tamponada com Tris (Merk) 20mg/mol, pH 7,4 até a visualização das bandas.

Toda a reação foi conduzida sob agitação pendular lenta e constante, à temperatura ambiente.

Para documentação, as tiras foram secas em papel de filtro e digitalizadas. Os valores de bandas de massa molecular foram obtidos conforme descrito para SDS-PAGE.

3.13 Análise estatística

As diferenças entre as porcentagens de positividade entre grupos e entre extratos, realizadas pelo TCP foram analisadas pelo teste do χ^2 ou pelo teste exato de Fisher, quando devidamente aplicáveis.

As diferenças entre os índices de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos aos diferentes extratos antigênicos (Dp bruto, FNL e FL), nos diferentes grupos (DP+ e NA) foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com o pós-teste de comparação múltipla de Dunn, após serem submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.

A correlação entre os índices de IgE, IgG1 e IgG4 específicos aos diferentes extratos foi avaliada pelo teste de correlação de Spearman.

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

Todos os cálculos estatísticos e gráficos foram realizados por meio dos *softwares* GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA) e Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, EUA).

3.14 Biossegurança

Todos os procedimentos citados foram conduzidos em laboratórios com Nível de Biossegurança 1 (NB-1), utilizando metodologia de segurança apropriada na manipulação de matérias infecciosos, incluindo a prática e técnica laboratorial, os equipamentos de segurança e construção das instalações, conforme Mineo (2005).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção das frações de *D. pteronyssinus* não ligantes (FNL) e ligantes (FL) de ConA

O ensaio de cromatografia de afinidade de ConcanavalinaA-*Sepharose* foi utilizado para dividir o extrato Dp bruto em duas frações distintas: uma não ligante de ConA (FNL) e uma ligante de ConA (FL).

A Figura 2 representa o perfil cromatográfico do ensaio realizado. Cada tubo coletor conteve aproximadamente 2mL de amostra, instantaneamente monitorados por espectrofotometria, a 280 nm.

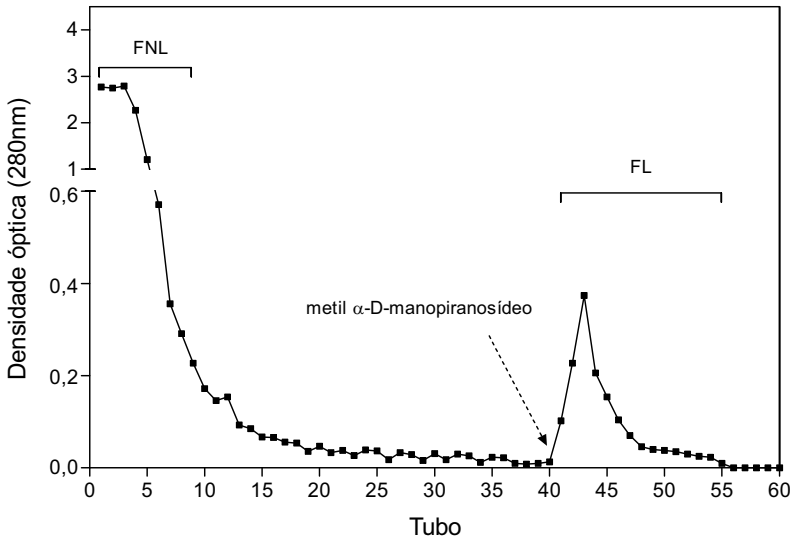

Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato bruto de *D. pteronyssinus* (5mg de proteína) em coluna de afinidade de ConA-*Sepharose*. O primeiro pico (frações 1 a 12) representa a fração não ligante (FNL) de ConA, obtida pela lavagem com tampão de ligação e o segundo pico (frações 41 a 55) representa a fração ligante (FL) de ConA, eluída com metil α-D-manopiranosídeo 0,1g/mol.

Um total de 5mg de proteínas foi aplicado na coluna de ConA-*Sepharose* e a eluição com tampão de ligação (TL) resultou em um pico com D.O. máxima de 2,790,

no tubo 3. As frações de 1 a 12 foram misturadas, concentradas e após a diálise, constituíram a FNL, pela sua incapacidade de ligação à ConA.

No momento em que a D.O. atingiu valores próximos de zero, solução de metil α-D-manopiranosídeo 100mg/mol foi adicionada e um pico foi formado, dado pelas frações de 41 a 55, com D.O. máxima de 0,374. Este pico indicou a eluição da fração que, depois de submetida à diálise, constituiu a fração ligante de ConA (FL).

Os níveis de alérgenos Der p 1, Der p 2 e Blo t 5 foram mensurados, por ELISA em Dp bruto e suas frações. A quantidade de proteínas e carboidratos presentes nestas amostras também foram determinadas.

Conforme esperado, não foram encontrados níveis relevantes de Blo t 5. Os níveis de proteínas, carboidratos e alérgenos Der p 1, Der p 2 nas amostras de FNL e FL bem como em Dp bruto estão representados da Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de proteínas, carboidratos, Der p 1 e Der p 2 no extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto), fração não ligante (FNL) e fração ligante (FL) de ConA.

Extrato	Proteínas[a] (µg/mL)	Carboidratos[b] (µg/mL)	Der p 1[c] (µg/mL)	Der p 2[c] (µg/mL)
Dp bruto	5.000	2.500	293 / 0,059	308 / 0,062
FNL	1.300	700	135 / 0,104	87 / 0,067
FL	500	200	25 / 0,050	4,2 / 0,008

[a] Método de Lowry, [b] Método de Dubois, [c] ELISA, conforme descrito em Material e Métodos. Dados representam a quantidade total/relativa.

4.2 Dados clínicos

Cento e oitenta e sete indivíduos (n=187) foram selecionados para o estudo. Um questionário clínico, elaborado pelo ISAAC (1998) e aplicado pelo médico

alergologista, foi utilizado para determinação do quadro clínico de doença alérgica dentre os participantes desse estudo. Nenhum caso de rejeição de resposta ao questionário foi notificado.

Dentre os indivíduos do estudo, 95 (50,8%) apresentaram sintomas característicos de asma e/ou rinite alérgica. Estes também demonstraram positividade ao TCP para o extrato bruto de *D. pteronyssinus* e índices de IgE específica ao mesmo com valores de IE acima de 1,2, e por isso, foram incluídos no grupo DP+. Dentre os pacientes deste grupo, 13 (13,6%) apresentaram sintomas sugestivos de asma alérgica, apresentando quadro de sibilos, dispnéias ou tosse seca de origem não gripal (Tabela 2). Todos estes pacientes asmáticos também apresentaram sintomas sugestivos de rinite alérgica, como espirros, coriza e/ou lacrimejamento nos olhos. No entanto, os demais pacientes sintomáticos (86,4%) relataram somente sintomas indicativos de rinite.

Os indivíduos que não apresentaram sintomas de doença alérgica e tiveram resultado do TCP caracterizado por pápulas com diâmetro ortogonal menor do que 3mm em relação ao controle negativo, para todos os alérgenos testados, foram devidamente agrupados (grupo NA).

Os dados referentes à faixa etária, gênero e quadro clínico dos participantes do estudo, segundo critérios previamente estabelecidos, estão representados na Tabela 2. De acordo com o critério de seleção adotado, não seria permitido o recrutamento de indivíduos com idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos, desta forma, a faixa etária dos recrutados para o estudo foi entre 18 e 57 anos. A média da idade dos pacientes do grupo DP+ foi de 25,8 ± 15,9 anos (média ± desvio padrão) e dos indivíduos do grupo NA foi de 27,8 ± 22,6 anos.

O número de participantes do sexo feminino (69,6%) foi superior ($p<0,001$) à do sexo masculino (30,4%), resultado da diferença em ambos os grupos, pois o grupo

DP+ foi composto de 63,2% de mulheres e 36,8% de homens e o grupo NA, de 76,1% de mulheres e 23,9% de homens.

Tabela 2. Dados clínicos e demográficos dos pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (DP+) e indivíduos não alérgicos (NA), selecionados por Teste Cutâneo de Puntura (TCP) e questionário clínico (ISAAC, 1998).

Característica	Grupo		Valor de p
	DP+	NA	
Número de indivíduos	95	92	
Idade (média ± desvio-padrão)	25,8 ± 15,9	27,8 ± 22,6	0,8592*
Gênero (Masculino/Feminino)	35/60	22/70	0,0274**
Quadro clínico			
Rinite	95	-	
Asma	0	-	
Ambos	13	-	

* Teste de Mann-Whitney **Teste de χ^2

4.3 Teste Cutâneo de Puntura

O Teste Cutâneo de Puntura (TCP) foi utilizado como ensaio *in vivo* na avaliação do perfil de reatividade dos participantes frente aos extratos brutos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df), *Blomia tropicalis* (Bt), *Canis familiaris* (Cf), *Felis domesticus* (Fd), *Periplaneta americana* (Pa), *Blatella germanica* (Bg) e *Alternaria alternata* (Aa).

A Figura 3A representa o resultado dos tamanhos das pápulas, pelo TCP, após 15min de reação. O resultado positivo foi dado pelo tamanho ortogonal médio da pápula acima de 3mm em relação ao controle negativo.

Não houve diferença estatística entre o tamanho das pápulas para os extratos Dp (mediana = 9,0mm) e Df (8,0mm) no grupo DP+. No entanto, os tamanhos das pápulas para todos os demais extratos alergênicos foram significativamente menores (p<0,001) à Dp. Além disso, valores basais foram encontrados para os tamanhos de pápula frente a Pa e Aa (Figura 3A).

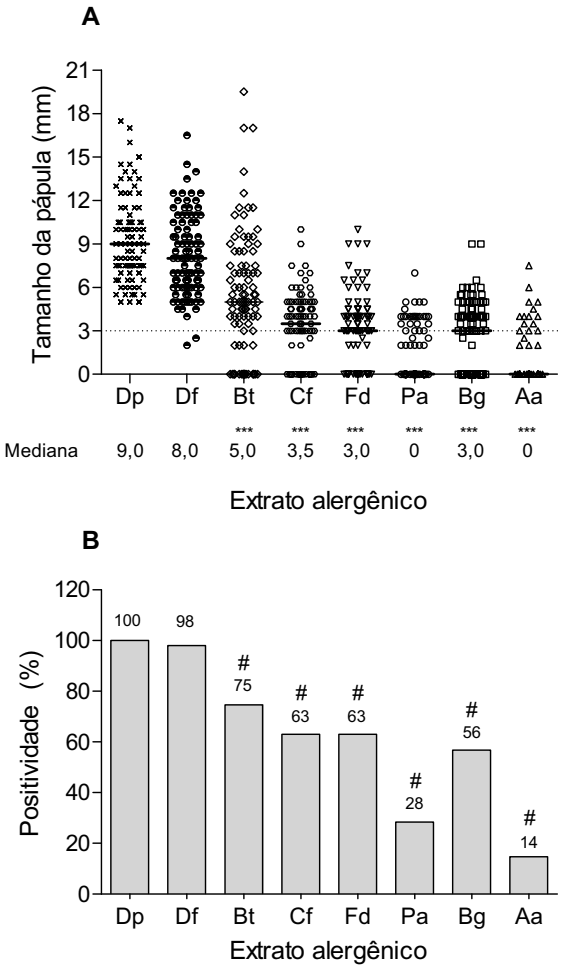

Figura 3. Teste Cutâneo de Puntura (TCP) aos extratos brutos de *D. pteronyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df), *B. tropicalis* (Bt), *Canis familiaris* (Cf), *Felis domesticus* (Fd), *Periplaneta americana* (Pa), *Blatella germanica* (Bg), *Alternaria alternata* (Aa) em pacientes alérgicos (DP+, n=95). (**A**) Tamanho da pápula formada após 15min de reação cutânea. As barras horizontais indicam a mediana. Diferenças estatisticamente significativas em relação à Dp foram determinadas (***p<0,001, teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn). (**B**) Porcentagem de positividade ao TCP para cada extrato alergênico. #Diferente estatisticamente em relação à Dp ($p < 0,05$, teste de χ^2).

Como parte do processo de agrupamento dos indivíduos participantes do estudo, todos os pacientes (100%) do grupo DP+ apresentaram positividade ao extrato de *D. pteronyssinus*, pelo TCP, conforme indicado na Figura 3B. Dentre os extratos de ácaros, uma concomitância (98%) de reatividade entre os extratos Dp e Df foi observada, porém, os valores percentuais de pacientes positivos ao extrato Bt foram menores, comparados ao extrato Dp (75%; $p < 0,05$). Além disso, a positividade para todos os demais extratos alergênicos foi similarmente menor em relação a Dp.

Nenhum indivíduo do grupo NA apresentou positividade ao TCP.

4.4 Anticorpos específicos ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* e suas frações

O ensaio imunoenzimático ELISA foi utilizado para determinar os índices de IgE, IgG1 e IgG4 específicos ao extrato Dp bruto e suas frações relacionadas à ConA. Esses anticorpos foram dosados nos soros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (grupo DP+; n=95) e de indivíduos não alérgicos (grupo NA; n=92). A Figura 4 representa os índices de anticorpos específicos aos diferentes extratos e frações, em ambos os grupos estudados.

Os índices de IgE específica ao extrato DP bruto e suas frações foram significativamente mais altos nos pacientes do grupo DP+, quando comparados aos indivíduos do grupo NA ($p<0,001$) (Figura 4A). Diferenças significativas foram encontradas entre os índices de IgE específica à Dp bruto (IE=3,8) e FNL (IE=2,1; $p<0,001$) ou FL (IE=1,3; $p<0,001$) em pacientes do grupo DP+. Além disso, os índices de IgE específica à FNL foram mais altos do que FL ($p<0,05$) (Figura 4A).

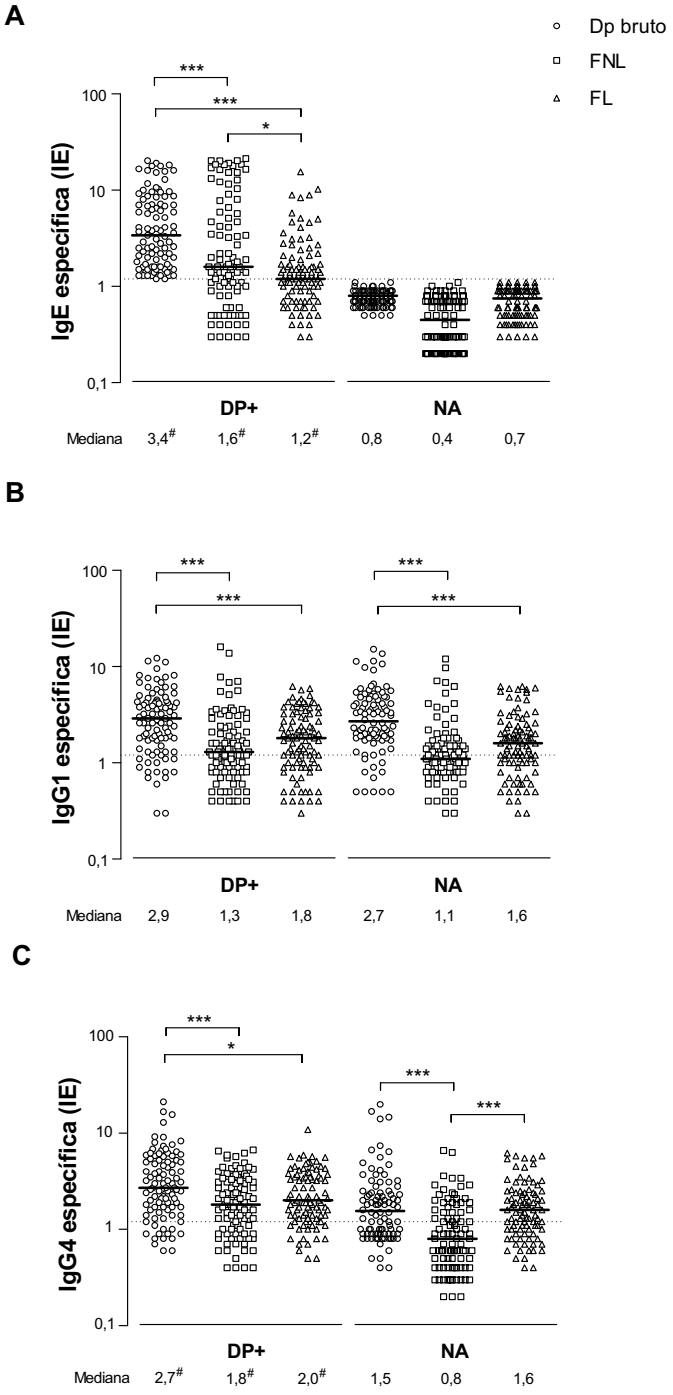

Figura 4. Índices de IgE (**A**), IgG1 (**B**) e IgG4 (**C**) ao extrato de *D. pteronyssinus* (Dp bruto) e frações não ligante (FNL) e ligante (FL) de ConA, expressos em Índice ELISA (IE), no soro de pacientes alérgicos (DP+; n=95) e não alérgicos (N; n=92). Barras horizontais indicam a mediana e a linha pontilhada representa o limiar de positividade (IE=1,2). Diferenças significativas no mesmo grupo foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn (*p<0,05, ***p<0,001). #Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para cada extrato foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney (p < 0,05).

Os soros de pacientes do grupo DP+ apresentaram índices mais altos de IgG1 a Dp bruto (IE=2,6), comparado à FNL (IE=1,4) e FL (IE=1,6) (p<0,001) (Figura 4B). Resultados similares foram observados no grupo NA, com índices mais altos de IgG1 a Dp bruto (IE=2,7) do que FNL (IE=1,2) e FL (IE=1,5) (p<0,001). Não houve diferença significativa nos índices de IgG1 entre os grupos DP+ e NA, quando o mesmo extrato foi comparado (Figura 4B).

Os índices de IgG4 foram mais altos para Dp bruto (IE=2,8) do que FNL (IE=1,7; p<0,001) e FL (IE=2,1; p<0,05) no grupo DP+ (Figura 4C). Entretanto, no grupo NA, os índices de IgG4 específicos a Dp bruto (IE=1,6) foram e FL (IE=1,5) foram mais altos do que FNL (IE=0,8) (p<0,001). Quando os grupos DP+ e NA foram comparados, os índices de IgG4 a todos os extratos foram mais altos no grupo DP+ do que em NA (p<0,001) (Figura 4C).

Os pacientes do grupo DP+ tiveram maior soropositividade de IgE a Dp bruto do que FNL e FL, enquanto a soropositividade de IgG4 foi mais alta a FL, quando comparada aos demais extratos (p<0,05) (Tabela 3).

No grupo NA, não foram encontrados índices de IgE acima do limiar de positividade, porém, neste grupo, a soropositividade para anticorpos IgG1 específicos a Dp bruto foi maior do que os demais extratos. Para anticorpos IgG4, a soropositividade foi maior para os extratos Dp bruto e FL, em relação a FNL (p<0,05).

Tabela 3. Soropositividade de IgE, IgG1 e IgG4 ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto) e fração não ligante (FNL) e ligante (FL) de ConA em pacientes alérgicos (DP+) e não alérgicos (NA).

Extrato	DP+			NA		
	IgE	IgG1	IgG4	IgE	IgG1	IgG4
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Dp bruto	95 (100)[a*]	80 (84,2)[a]	69 (72,6)[a]	0 (0)	82 (89,1)[a]	57 (61,9)[a]
FNL	61 (64,2)[b*]	59 (62,1)[b]	67 (70,5)[a*]	0 (0)	46 (50,0)[c]	35 (38,0)[b]
FL	40 (42,1)[c*]	66 (69,5)[b]	79 (83,2)[b*]	0 (0)	64 (69,5)[b]	62 (67,4)[a]

[a,b,c] Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os extratos para cada anticorpo; *Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos DP+ e NA para cada extrato e anticorpo (p < 0,05; teste χ^2).

4.5 Associação entre os índices de anticorpos específicos a *D. pteronyssinus* e suas frações

4.5.1 Correlação entre os índices de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a Dp bruto, FNL e FL

Os índices de anticorpos específicos a Dp bruto, FNL e FL foram comparados por meio do teste de correlação de Spearman. Uma significativa correlação positiva entre os índices de IgE específica a Dp bruto e FNL foi observada (r=0,833; p<0,001) no grupo DP+. Resultado similar foi observado entre os índices de IgE específica a Dp bruto e FL (r=0,789; p<0,001), como representado na Figura 5A. Entretanto, não houve correlação entre os índices de IgE específica dentre os indivíduos do grupo NA.

Quanto aos anticorpos IgG1 (Figura 5B), no grupo DP+, os índices de anticorpos específicos a Dp bruto apresentaram baixa correlação positiva com os específicos a FNL (r=0,342; p=0,007) e correlação moderada entre Dp bruto e FL (r=0,588; p<0,001). No grupo NA, houve correlação positiva entre Dp bruto e FNL (r=0,452; p<0,001) e entre Dp bruto e FL (r=0,666; p<0,001).

Os índices de anticorpos IgG4 específicos apresentaram alta correlação positiva entre Dp bruto e FNL (r=0,639; p<0,001) e baixa correlação entre Dp bruto e FL (r=0,446; p<0,001) no grupo DP+. No grupo NA, correlação positiva, porém moderada, também foi observada entre Dp bruto e FNL (r=0,585; p<0,001) e entre Dp bruto e FL (r=0,436; p<0,001), conforme representados na Figura 5C.

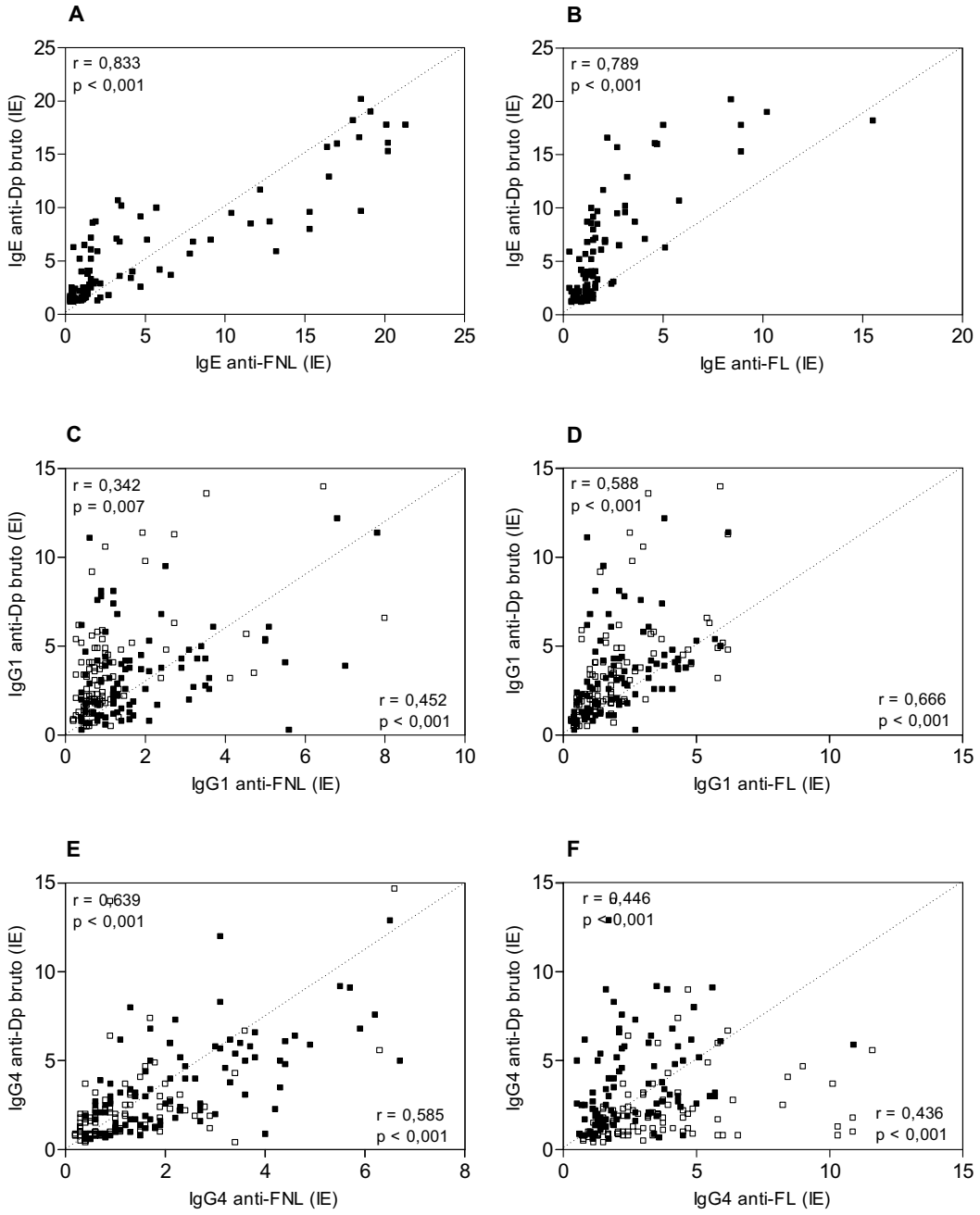

Figura 5. Correlação entre os índices de IgE (**A**, **B**), IgG1 (**C**, **D**), e IgG4 (**E**, **F**) específicos ao extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e fração não ligante (FNL) e ligante (FL) de ConA, expressos em Índice ELISA (IE), no soro de pacientes alérgicos (■) (grupo DP+; n=95) e indivíduos não alérgicos (□) (grupo NA; n=92). O coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) foram calculados pelo teste de correlação de Spearman e estão demonstrados para os grupos DP+ (lado superior esquerdo) e NA (lado inferior direito).

4.5.2 Razão entre os índices de IgE, IgG1 e IgG4 específicos a Dp bruto, FNL e FL.

As razões entre os índices de IgE/IgG1, IgE/IgG4 e IgG1/IgG4 específicos a todos os extratos foram calculadas com base nos valores de IE dos soros de indivíduos alérgicos (grupo DP+) e indivíduos não alérgicos (NA) (Figura 6).

A razão IgE/IgG1 foi mais alta no grupo DP+ do que em NA, para todos os extratos ($p<0, 001$). (figura 6A). Além disso, a razão IgE/IgG1 foi mais baixa para FL do que para os outros extratos, no grupo DP+ ($p<0,001$), enquanto o oposto foi observado no grupo NA, cuja razão IgE/IgG1 a FL foi mais alta do que para Dp bruto ($p<0,001$) e FNL ($p<0,01$) (Figura 6A).

A razão IgE/IgG4 foi mais alta no grupo DP+ do que NA, para todos os extratos testados ($p<0,01$) (Figura 6B). Ademais, no grupo DP+, a esta razão foi mais baixa para FL do que Dp bruto ($p<0,001$) e FNL ($p<0,05$), enquanto nenhuma diferença significativa foi encontrada no grupo NA (Figura 6B).

Curiosamente, a razão IgG1/IgG4 a Dp bruto e FNL foi maior no grupo NA do que em DP+ ($p<0,001$) (Figura 6C) e dentre os extratos no grupo NA, esta razão foi mais baixa para FL do que Dp bruto ($p<0,001$) e FNL ($p<0,05$). Não houve diferença entre as razões IgG1/IgG4 no grupo DP+ (Figura 6C).

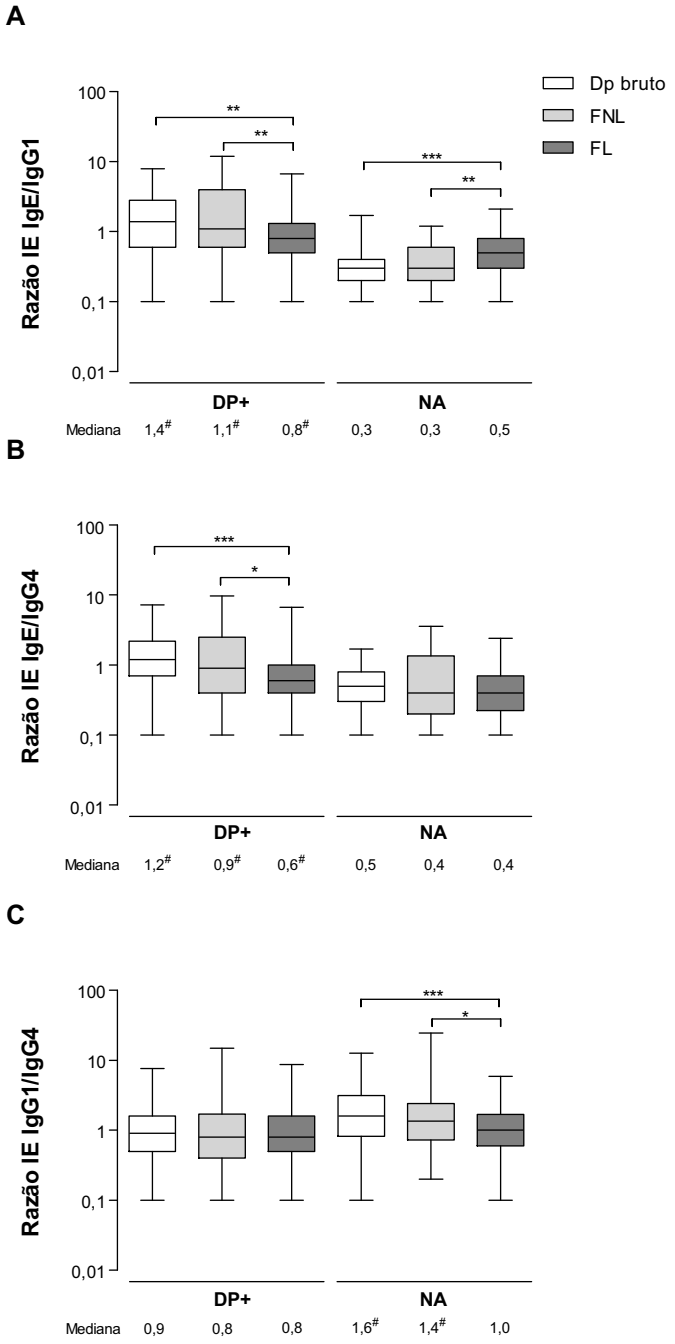

Figura 6. Razão dos índices de IgE/IgG1 (**A**), IgE/IgG4 (**B**) e IgG1/IgG4 (**C**) ao extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), fração não ligante (FNL) e ligante (FL) de ConA no soro de pacientes alérgicos (grupo DP+; n=95) e indivíduos não alérgicos (grupo NA; n=92). As caixas indicam a mediana, acompanhada dos valores mínimo e máximo. Diferenças significativas dentre os valores dos grupos foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). #Diferenças significativas entre os grupos, para cada extrato, foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05).

4.6 Reatividade cruzada entre *D. pteronyssinus* e suas frações ou ácaros relacionados

A reatividade cruzada entre o extrato Dp bruto e frações não ligantes (FNL) e ligantes (FL) de ConA bem como extratos brutos de *D. farinae* (Df) e *B. tropicalis* (Bt) foi avaliada por meio de inibição de IgE, IgG1 e IgG4, em ELISA de inibição competitiva. Toxóide tetânico (TT) foi utilizado como antígeno irrelevante (Figura 7).

Uma alta inibição homóloga foi observada para a reatividade de IgE, ocorrendo com eficiência na concentração inibitória máxima de 100µg/mL para cada inibidor (93%, 92% e 84% para Dp bruto, FNL e FL, respectivamente) (Figura 7A). Inibição heteróloga ocorreu por parte de Df (71%), na concentração inibitória máxima. Além disso, uma curva de inibição dose-resposta similar de IgE foi observada para todos os extratos, exceto o extrato bruto de Bt, com concentração inibitória mediana (IC_{50}) sendo alcançada em índices crescentes para Dp bruto (IC_{50}=0,3µg/mL), Df (IC_{50}=0,9µg/mL), FNL (IC_{50}=1,5µg/mL) e FL (IC_{50}=9,0µg/mL) (Figura 7A).

Para IgG1, foi também detectada uma alta inibição tanto homóloga (93%, 91% e 90% para Dp bruto, FNL e FL, respectivamente) e quanto heteróloga para Df (92%) e Bt (67%) na concentração inibitória máxima (Figura 7B). Os valores de IC_{50} foram atingidos em concentrações crescentes para Df (IC_{50}=0,4µg/mL), Dp bruto (IC_{50}=0,7µg/mL), FNL (IC_{50}=9,1µg/mL), FL (IC_{50}=9,8µg/mL) e Bt (IC_{50}=19,1µg/mL) (Figura 7B).

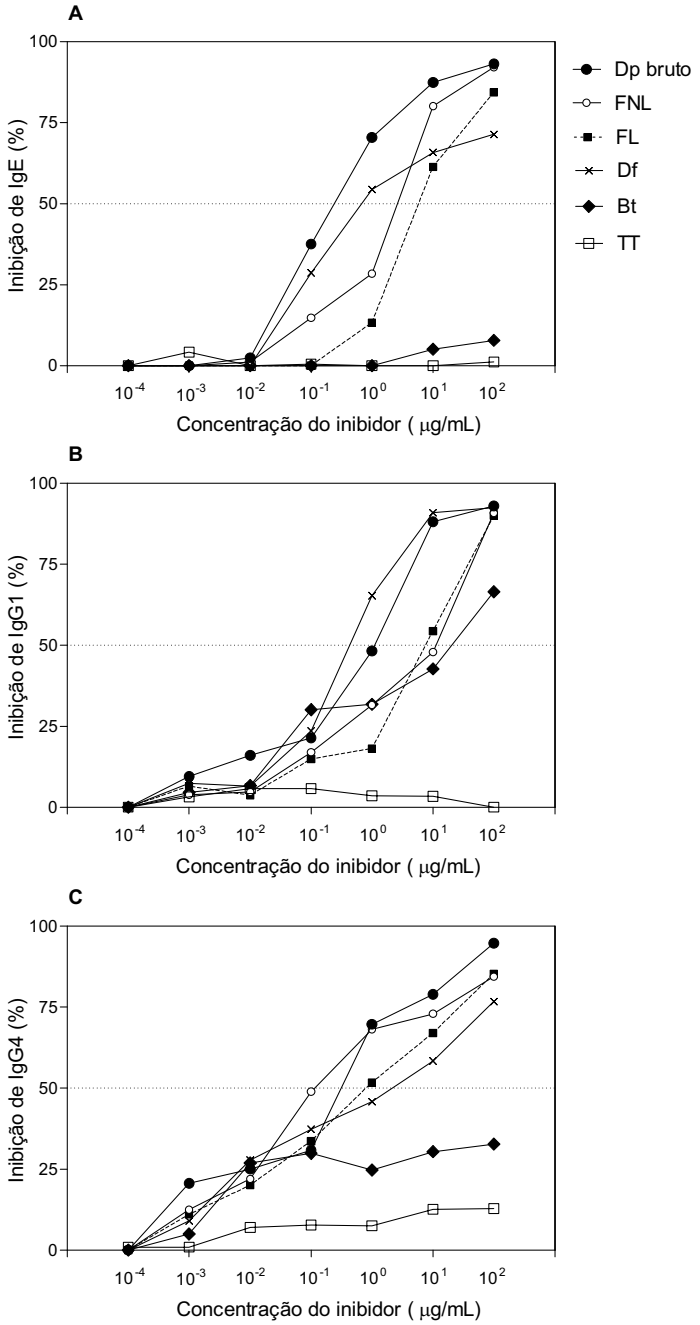

Figura 7. Curvas de inibição de IgE (**A**), IgG1 (**B**) e IgG4 (**C**), em ELISA com extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) na fase sólida. Seis soros de pacientes alérgicos (grupo DP+) foram pré-adsorvidos com diferentes concentrações dos agentes inibidores Dp bruto, fração não ligante (FNL) e ligante (FL) de ConA e extratos de *D. farinae* (Df) e *Blomia tropicalis* (Bt). Toxóide tetânico foi utilizado como antígeno irrelevante. A porcentagem de inibição foi calculada pela reatividade do anticorpo residual em relação à reatividade total (100%), em soros sem inibidores. A linha pontilhada intercepta as curvas de inibição na concentração inibitória mediana (IC_{50}).

Para IgG4, inibições homóloga (95%, 84% e 85% para Dp bruto, FNL e FL, respectivamente) e heteróloga (77% para Df e 33% para Bt) foram observadas em concentração inibitória máxima (Figura 7C). Os valores de IC_{50} foram atingidos em concentrações crescentes para FNL (IC_{50}=0,2µg/mL), Dp bruto (IC_{50}=0,3µg/mL), FL (IC_{50}=0,9µg/mL) e Df (IC_{50}=2,6µg/mL) (Figura 7B).

O antígeno irrelevante (TT) exibiu uma inibição desprezível para IgE (1%), IgG1 (0%) e muito reduzida para IgG4 (12%).

4.7 Perfil de bandas polipeptídicas no extrato Dp bruto e suas frações

O extrato Dp bruto bem como FNL e FL foram submetidos ao SDS-PAGE, na concentração de 12%, para análise das bandas polipeptídicas dos mesmos. A Figura 8 ilustra o perfil eletroforético do extrato Dp bruto e suas frações, por meio da coloração com nitrato de prata.

Foram visualizados componentes polipeptídicos de Dp bruto por toda a extensão vertical do gel (Figura 8, faixa 1), com massas moleculares relativas (M*r*) variando de 14 a 116kDa, porém, com predominância de bandas protéicas de 14, 23-42, 45, 66-78, 81, 88, 99, 103, 105, 108 e 116kDa.

Um perfil muito semelhante foi encontrado em FNL (Figura 8, faixa 2), onde são visualizadas bandas de com baixos valores de M*r* (abaixo de 29kDa) e bandas acima de 66kDa.

Um amplo espectro de bandas polipeptídicas foi visualizado em FL, cujas M*r* encontradas foram entre 20 e 116 kDa (Figura 8, faixa 3), com destaques para 20, 22,

25, 26, 34, 36, 42, 47, 63, 57, 74, 81 e 95-116kDa. Uma complementaridade do perfil de FL foi observada, caracterizada pela presença das bandas polipeptídicas de 34-37, 43-45, 65, 71 e 95kDa, que estão presentes em Dp bruto, porém, ausentes em FNL.

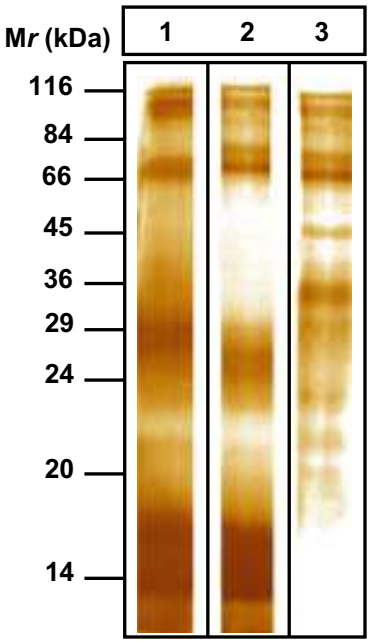

Figura 8. Perfil eletroforético do extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto, faixa 1), frações não ligante (FNL, faixa 2) e ligante de ConA (FL, faixa 3) em SDS-PAGE, a 12%, corado por nitrato de prata. M*r*: massa molecular relativa, em kiloDalton (kDa).

4.8 Componentes de Dp bruto e suas frações reconhecidos por IgE, IgG1 e IgG4

A capacidade de reconhecimento das bandas polipeptídicas presentes no extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp) bem como suas frações não ligantes (FNL) e ligantes (FL) de ConA foram avaliadas pela técnica de *Immunoblotting*, por detecção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 no soro de 10 pacientes do grupo DP+ e 10 pacientes

do grupo NA. A triagem dos soros para realização destes ensaios foi realizada pela seleção de soros com IE≥5,0 do grupo DP+ e IE<1,2 do grupo NA, para IgE.

Doze soros representativos para IgE estão representados na Figura 9A. Todos os soros do grupo DP+ testados apresentaram reatividade de IgE a todos os extratos analisados, mas os componentes imunodominantes (acima de 50% de reconhecimento) aqueles com 14 e 25kDa para Dp bruto e FNL, 80kDa para FL, 95-99kDa para FNL e 116 para todos os extratos (Figura 10A). Foram também reconhecidos componentes de 29, 35, 50, 57, 63-66 e 74kDa, porém, em menor frequência.

Na análise de IgG1, componentes acima de 57kDa foram reconhecidos como imunodominantes para o extrato Dp bruto, onde aqueles com massa molecular de 74, 78, 80, 95-99 e 116kDa foram detectados em FNL, tanto no grupo DP+ quanto em NA (Figuras 9B e 10B). Destes, foi percebido que os soros dos pacientes do grupo NA reconheceram, em sua maioria, os componentes de 74kDa, (Dp bruto e FNL), 78kDa (Dp bruto e FNL), 80kDa (FL) e 88 kDA (FL). Além disso, interessantemente, o componente de 80kDa foi reconhecido por IgG1 somente em Dp bruto e FNL, enquanto o componente de 88kDa foi reconhecido apenas em Dp bruto e FL, predominantemente no grupo NA (Figura 10B). Foram também reconhecidos componentes de 35, 50, 63-66 e 116kDa, entretanto, sem imunodominância.

Para IgG4, todos os soros testados apresentaram componentes imunodominantes de 25, 88 e 116kDa em Dp bruto, com predominância de reconhecimento em indivíduos do grupo NA (Figuras 9C e 10C). Para FNL, houve imunodominância do componente de 50 e 88kDa, em todos os extratos, que foi reconhecido por participantes de ambos os grupos. Apenas os componentes de 35, 50, 88 e 95-99kDa apresentaram imunodominância para FL, com maior frequência no grupo NA (Figura 10C). Além disso, os componentes de 14, 29, 63-66, 74, 78 e 80kDa foram reconhecidos em menor frequência.

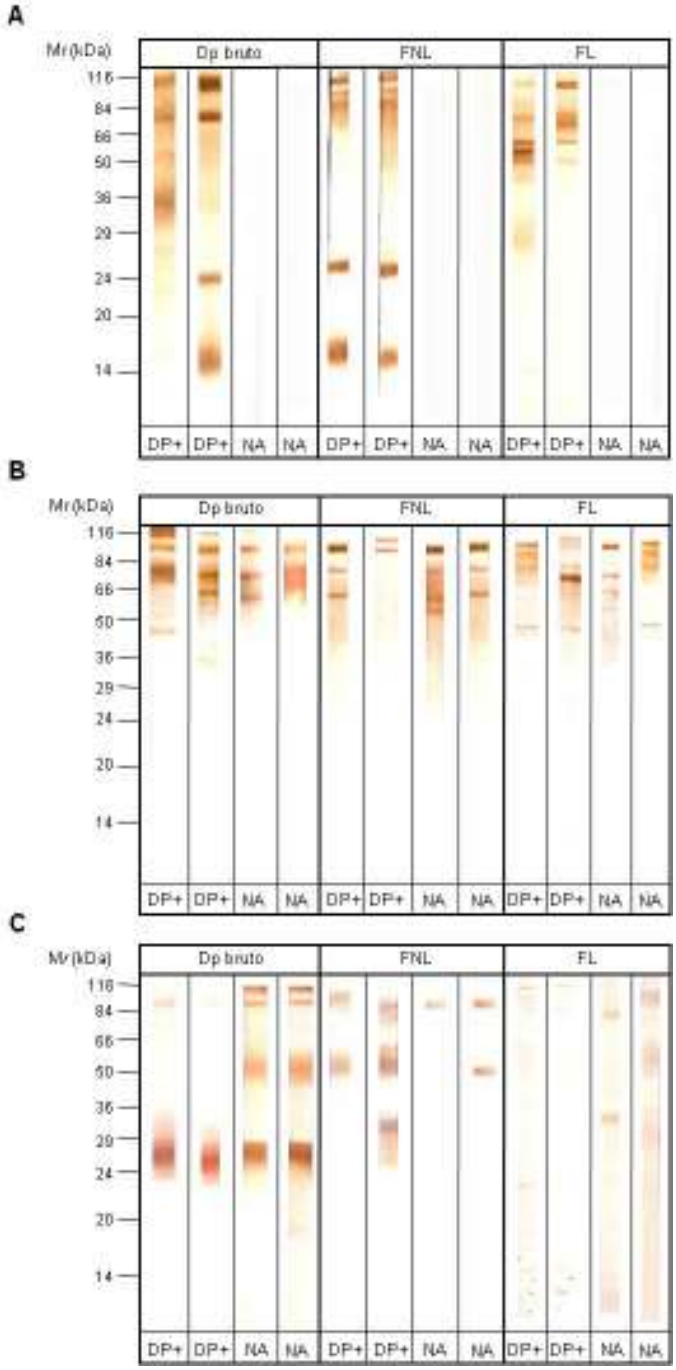

Figura 9. *Immunoblotting* representativo para diferentes soros para IgE (**A**), IgG1 (**B**) e IgG4 (**C**) específicos ao extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e frações não ligantes (FNL) e ligantes (FL) de ConA em pacientes alérgicos (grupo DP+) e indivíduos não alérgicos (grupo NA). A massa molecular relativa (M*r*) está indicada em kiloDalton (kDa).

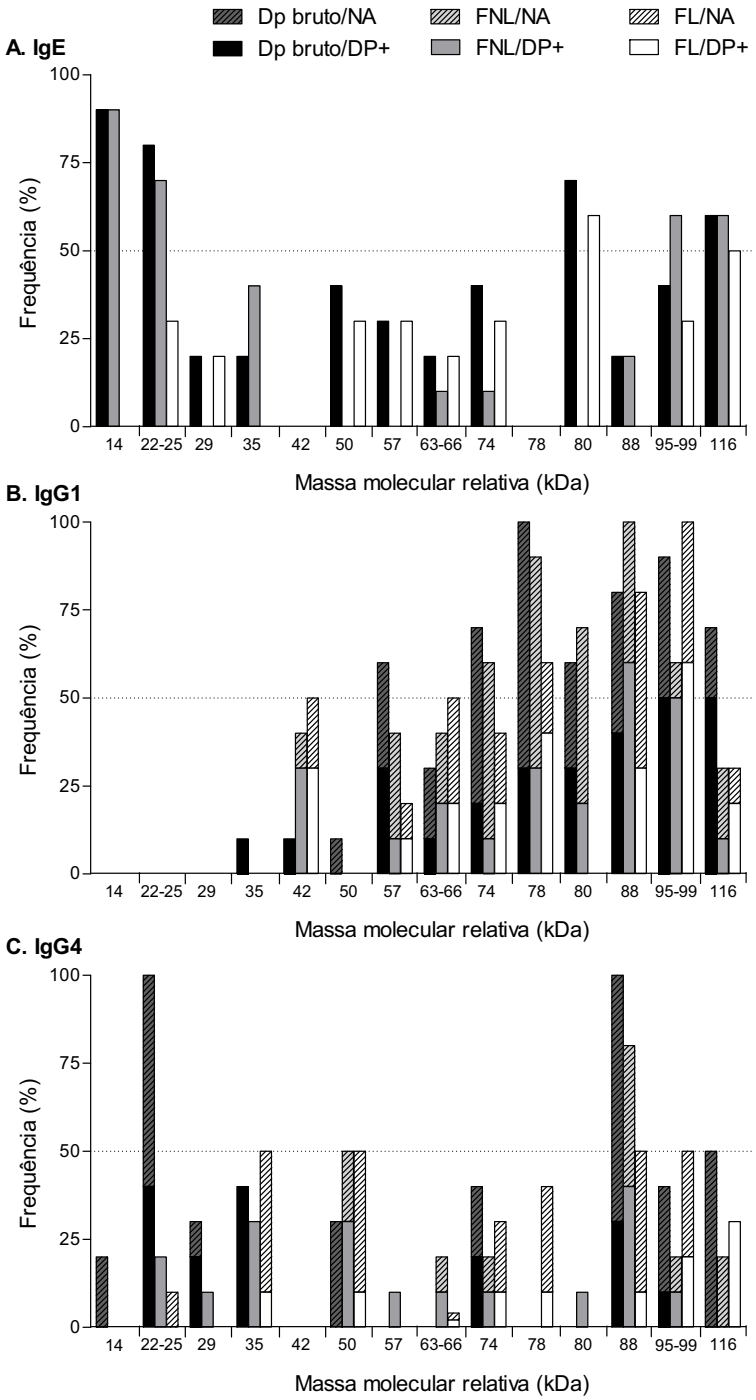

Figura 10. Frequência percentual de componentes do extrato bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e frações não ligantes (FNL) e ligantes (FL) de ConA reconhecidos por anticorpos (**A**) IgE, (**B**) IgG1 e (**C**) IgG4 no soro de pacientes alérgicos (grupo DP+) e indivíduos não alérgicos (grupo NA).

5 DISCUSSÃO

Constituem-se alérgenos proteínas simples ou compostas com capacidade de ligação à IgE, incluindo glicoproteínas. As cadeias de carboidratos presentes nestas moléculas podem operar como sítios imunogênicos - epítopos de células T - ou sítios de ligação de IgE - epítopos de células B, que variam em tamanho e quantidade (STEWART; THOMPSON, 1996).

Sabe-se que a glicosilação de um alérgeno é um fator importante em sua alergenicidade. Exemplo disso foi reportado por Shreffler e colaboradores (2006), demonstrando que um alérgeno glicosilado de amendoim, Ara h 1, de *Arachis hypogaea,* é capaz de ativar células dendríticas derivadas de monócitos, induzindo células T de perfil Th2 a secretar citocinas IL-4 e IL-13. Além disso, acredita-se que o alérgeno Der p 1, de *D. pteronyssinus* é capturado por células dentríticas exclusivamente por meio do receptor de manose CD206, uma lectina presente na membrana destas células apresentadoras de antígenos (CHIEPPA et al., 2003).

Neste contexto, as lectinas são freqüentemente utilizadas na obtenção de extratos glicosilados devido à sua afinidade por componentes que contenham carboidratos e a ConA é uma das mais utilizadas em ensaios de isolamento de antígenos glicosilados (GUPTA et al., 1996; VAN DIE et al., 2000). Ela é uma lectina vegetal que geralmente apresenta sítios de ligação aos açúcares comuns α-D-manose e β-D-glicose, além de resíduos estereoquimicamente relacionados a estes (SCRIBA, 2004). Por esse fato, ensaios imunológicos e bioquímicos, utilizando a ConA, têm sido desenvolvidos com a finalidade de estudar suas funções biológicas (GUPTA et al., 2004).

No presente estudo, frações não ligantes (FNL) e ligantes (FL) dessa lectina foram obtidas a partir do extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dp bruto), por cromatografia de afinidade de ConA-*Sepharose*. Essas frações foram visualizadas por SDS-PAGE, que revelou um perfil no qual bandas protéicas que estavam presentes em Dp bruto antes do fracionamento foram também visualizadas em uma das frações. Em FNL, os componentes protéicos apresentaram massa molecular relativa

na faixa de 14 a 25kDa, possivelmente constituídos por proteínas, ou mesmo glicoproteínas que não contenham carboidratos derivados de α-D-manose e β-D-glicose, que possuem afinidade com ConA.

Por outro lado, FL apresentou bandas polipeptídicas com massa molecular relativa acima de 20kDa, particularmente entre 35 e 45kDa, sugerindo que estes compostos apresentam moléculas de manose ou glicose. Além disso, FNL e FL apresentaram um perfil similar de bandas acima de 66kDa, sugerindo que ambas as frações podem ser constituídas por compostos com a mesma massa molecular, mas os resíduos de manose possivelmente estão presentes somente em FL.

Até o momento, pelo menos 19 grupos de alérgenos de ácaros do gênero *Dermatophagoides* já foram caracterizados e a maioria deles são descritos como proteínas de relativa baixa massa molecular (em torno de 14 a 60kDa) e algumas glicoproteínas com estruturas e propriedades bioquímicas diversificadas (THOMAS et al., 2002; STEWART; THOMPSON, 1996; ALLERGEN NOMENCLATURE, 2009). Estudos apontam que os alérgenos mais importantes do gênero *Dermatophagoides* são aqueles do grupo 1 (aproximadamente 25kDa) e no grupo 2 (aproximadamente 14kDa), por serem reconhecidos por mais de 80% dos pacientes alérgicos a esses ácaros (HALES; SHEN; THOMAS, 2000; HALES et al., 2002; THOMAS et al., 2007).

Dentre os alérgenos de *D. pteronyssinus*, alguns apresentam sítios de glicosilação, em tamanhos e quantidade variadas, segundo Kawamoto e colaboradores (2002) e Thomas; Smith (1998). Essas moléculas apresentam massas moleculares iguais a 22, 25, 26, 57 e 103kDa, que correspondem, respectivamente, aos alérgenos dos grupos 7, 1, 8, 4 e 11. Alguns desses valores de massa molecular também foram encontrados no presente estudo, como demonstrado por SDS-PAGE, demonstrando que a cromatografia de afinidade de ConA-*Sepharose* pode ter isolado, de maneira efetiva, tais glicoconjugados a partir do extrato bruto de *D. pteronyssinus*.

Um componente com massa molecular relativa de 25kDa foi visualizado em ambas as frações, bem como no próprio extrato Dp bruto, em intensidades de coloração variadas. Uma possível explicação para esse fato se remete na descrição de antígenos diferentes, porém com massas moleculares semelhantes, como descrito por Kawamoto e colaboradores (2002), que apresenta alérgenos do grupo 1 como glicosilados e grupo 3 e grupo 6, como não glicosilados. Ainda assim, pode ser constituído de diferentes isoformas do mesmo alérgeno, como discutido por Van Ree (2002).

Ademais, de acordo com Thomas e Smith (1998), bandas protéicas com massas moleculares abaixo de 10kDa presentes no extrato bruto de *D. pteronyssinus* podem atuar como haptenos, potencializando a ação de outros alérgenos. A diálise em sistema Amicon utilizado nesse estudo explica possivelmente a ausência dessas bandas protéicas em Dp bruto bem como suas frações, pois foram utilizadas membranas com ponto de corte igual a 10kDa, implicando em perda de componentes protéicos menores a esse valor.

A seleção dos participantes desse estudo foi feita por meio de avaliação clínica e TCP. Com relação ao diagnóstico clínico, todos os pacientes alérgicos selecionados apresentaram sintomas característicos de rinite e uma pequena porcentagem relatou a presença de sintomas sugestivos de asma. Voorhorst (1977) associou a presença de ácaros do gênero *Dermatophagoides* na poeira domiciliar à prevalência de distúrbios respiratórios, incluindo rinite e asma. No presente estudo, todos os pacientes alérgicos foram positivos ao TCP para os extratos de *D. pteronyssinus* e 98% para *D. farinae*. A alta freqüência de positividade a este último, por meio do TCP, pode ser explicada pelos altos índices do alérgeno Der f 1 encontrados na região do Triângulo Mineiro, conforme descrito por Terra e colaboradores (2004) no município de Uberaba e por Sopelete e colaboradores (2000), em Uberlândia, em estudos de coleta de poeira domiciliar e dosagem *in vitro* desses alérgenos por ELISA. Além disso, Soares e colaboradores (2007) relatam semelhante

porcentagem de positividade a extratos alergênicos de ácaros da poeira domiciliar em pacientes atendidos pelo hospital universitário de Uberlândia, demonstrando ser *D. pteronyssinys* e *D. farinae* importantes agentes sensibilizantes na região do Triângulo Mineiro.

Houve predominância do gênero feminino dentre os participantes do estudo, com uma representatividade de 63,2% no grupo DP+ e 73,1% no grupo NA. Este número representativo de pacientes do gênero feminino pode ser atribuído a percepção diferente dos sintomas em relação aos homens, o que provavelmente influencia na sua busca por auxílio médico, ou também a uma diferente exposição aos alérgenos (BAQUEIRO et al., 2007).

A resposta de IgE, IgG1 e IgG4 a Dp bruto e suas frações relacionadas à ConA foi avaliada pelos ensaios ELISA e *Immunoblotting*. O ensaio imunoenzimático tem sido adotado como uma das principais técnicas *in vitro* no diagnóstico de alergias, de forma complementar ao TCP. Sua utilização na dosagem de anticorpos reativos a antígenos presentes nas frações ligantes de ConA foi relatada em décadas passadas, por Baldo e Uhlenbruck (1977) e Stewart e Turner (1980), em extrato de *Dermatophagoides*, porém, a dosagem de IgG1 e IgG4 bem como o perfil de reconhecimento das bandas protéicas presentes na fração ligante de ConA derivada de *D. pteronyssinus*, pelos diferentes isotipos de anticorpos não foi avaliado até o momento.

A alta correlação positiva e significativa observada entre os índices de IgE a Dp bruto e frações relacionadas a ConA em pacientes do grupo DP+ refletem o seu potencial alergênico, ainda assim, a soropositividade de IgE a Dp bruto foi maior do que FNL e FL. Por outro lado, correlações baixas a moderadas, mas significantes, foram detectadas para as reatividades de IgG1 e IgG4 em ambos os grupos estudados, com maior soropositividade a Dp bruto do que FNL e FL, enquando a soropositividade de IgG4 foi predominante para FL. Esses resultados sugerem que a

fração ligante de ConA apresentam um número maior de epítopos para IgG4, especialmente em pacientes alérgicos.

Quando as razões entre os isotipos de anticorpos são analisadas, IgE/IgG1 e IgE/IgG4 a todos os extratos foram mais altas no grupo DP+ do que o grupo NA, enquanto o oposto foi observado para a razão IgG1/IgG4, com exceção para FL. Isto indica que existe um predomínio de IgE sobre IgG4 em pacientes alérgicos e de IgG1 sobre IgG4 em pacientes não alérgicos, particularmente para Dp bruto e FNL. A análise destes dados também implica que a fração que não contém resíduos de manose ou glicose é mais reativa a IgE e IgG1 em pacientes alérgicos.

Tais descobertas permitem explorar que uma resposta imune tipo Th1 poderia estar operando, por meio da indução de IFN-γ, e estimulando linfócitos B a produzirem IgG1 e células Treg a produzirem IgG4. Estes mecanismos possivelmente atuariam na manutenção da homeostase em indivíduos não alérgicos. Por outro lado, células T de perfil Th2 estariam envolvidas na produção de IgE e IgG4 em pacientes alérgicos, de maneira semelhante à reportada por Schmidt-Weber e Blaser (2004).

A reatividade cruzada entre os alérgenos é freqüentemente manifestada por meio da co-sensibilização e isso é observado em pacientes alérgicos entre os extratos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, devido aos 80% e 88% de homologia observados entre os alérgenos de 25kDa (grupo 1) e 14kDa (grupo 2), respectivamente, como discutido por Thomas e Smith (1998) e Sidenius e colaboradores (2001). Recentemente, Chruszcz e colaboradores (2009) demonstraram as áreas compartilhadas entre Der p 1 e Der f 1, cujos sítios constituem a base da ligação dos anticorpos monoclonais e para a reatividade cruzada entre ambos os alérgenos. Estes sítios também são alvos para anticorpos IgE e IgG, evidenciando a alergenicidade e a imunogenicidade destas moléculas. Com base nestes dados, os resultados do presente estudo confirmaram esta reatividade cruzada, onde uma alta inibição heteróloga (>80%) foi encontrada entre os extratos Dp e Df, não apenas para IgE, mas para os isotipos de IgG. Em

contraste, o extrato de Bt foi incapaz de inibir a ligação de IgE ao extrato Dp bruto na fase sólida, mas inibiu consideravelmente a reatividade dos anticorpos IgG1 (67%) e IgG4 (33%). Além disso, a inibição por parte de Dp para anticorpos IgE está mais relacionada a Df do que às frações ligantes e não ligantes de ConA, visto que os valores de IC_{50} encontrados em ambos os inibidores são bem próximos. Em estudos prévios, realizados pelo Laboratório de Alergia e Imunologia da UFU (ALMEIDA et al., 2006), foi demonstrada, por ELISA, uma significativa reatividade cruzada entre alérgenos de Bt e Dp para anticorpos IgE, quando o extrato Bt foi utilizado na fase sólida e o extrato Dp como inibidor. Uma provável explicação para este fato poderia ser os títulos diferenciais de índices de anticorpos para *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* ou mesmo possíveis diferenças na afinidade do anticorpo para os antígenos diferenciais, conforme previamente demonstrado em estudos envolvendo parasitas, por Silva e colaboradores (2007).

A análise dos dados de *Immunoblotting* revelou três bandas imunodominantes com reatividade para IgE (14, 25 e 116kDa) a Dp bruto e FNL, reforçando que esses anticorpos foram menos reativos à FL e correlacionando com os baixos índices de IgE a FL, quando comparados a Dp bruto, evidenciados por ELISA. Um perfil antigênico similar foi observado para o ensaio com IgG4, especialmente a Dp bruto e FNL, porém, excluindo a banda de 14kDa e incluindo a banda de 88kDa. Antagonicamente, a reatividade de IgG1 a todos os extratos testados foi predominantemente direcionada à bandas polipeptídicas de alta massa molecular.

Algumas destas bandas não estão representadas na literatura com a massa molecular correspondente a este estudo, provavelmente, devido às isoformas glicosiladas e não glicosiladas, que poderiam ter sido separadas pela cromatografia de afinidade, resultando em bandas com massa moleculares diferentes, conforme previamente discutido por Mandalain e colaboradores (2005). Além disso, na década de 80, Tovey e Baldo (1987) demonstraram, por *Immunoblotting*, que o extrato Dp

bruto é formado por, aproximadamente, 26 bandas polipeptídicas ligantes de IgE, incluindo aquelas com massa molecular de 15, 25, 28-32, 53 e 95kDa, que foram também encontradas em nosso estudo.

Quando analisados concomitantemente os dados obtidos por ELISA e *Immunoblotting*, observa-se que o extrato Dp bruto apresentou alta imunogenicidade e alergenicidade, reagindo significativamente com anticorpos IgE em pacientes alérgicos e com IgG1 em ambos os grupos de participantes do estudo. Além disso, alérgenos com resíduos de manose ou glicose podem ser considerados importantes componentes devido à sua reatividade preferencial com anticorpos IgG4 em pacientes alérgicos.

Desta forma, o extrato Dp bruto e suas frações relacionadas à ConA podem representar uma ferramenta potencial na avaliação da alergenicidade e antigenicidade, incluindo perspectivas de uso em diagnóstico e imunoterapia de doenças alérgicas.

6 CONCLUSÕES

a) A cromatografia de afinidade de ConA-*Sepharose* é uma importante ferramenta envolvida no fracionamento de componentes derivados de *Dermatophagoides pteronyssinus*;

b) Frações não ligantes e ligantes de Concanavalina A (ConA) derivadas de *D. pteronyssinus* se constituem de componentes capazes de induzir a síntese de IgE em pacientes alérgicos, além de IgG1 e IgG4, em pacientes alérgicos e não alérgicos;

c) Alérgenos presentes no extrato bruto de *D. pteronyssinus* podem apresentar uma reatividade cruzada homóloga - pelo próprio extrato e frações não ligantes e ligantes de ConA - e heteróloga - com alérgenos de *D. farinae*, frente a anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 de pacientes alérgicos;

d) Componentes do extrato bruto de *D. pteronyssinus* e de suas frações não ligantes e ligantes de ConA apresentam diferentes perfis do reconhecimento por parte de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4, com predomínio de bandas de alta massa molecular reconhecidas por IgG1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

[1] SILVA, A. M.; PINHEIRO, M. S. F.; FREITAS, N. E. **Guia para normatização de trabalhos de trabalhos técnicos-cientificos:** projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses. 4. ed. Uberlândia: EDUFU, 2002. 157p.

AALBERSE R. C.; KOSHTE, V.; CLEMENS, J. G. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and hymenoptera venom. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 68, p. 356–364, 1981.

AALBERSE R. C.; STAPEL, S. O.; SCHUURMAN, J.; RISPENS, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 469-477, Apr. 2009.

AALBERSE, R. C.; VAN DER GAAG, R.; VAN LEEUWEN, J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. **Journal of Immunology**, Baltimore , v. 130, n. 2, p. 722-726, Feb. 1983.

AALBERSE, R. C.; VAN MILLIGEN, F.; TAN, K. Y.; STAPEL, S. O. Allergen-specific IgG4 in atopic disease. **Allergy**, Copenhagen, v. 48, n. 8, p. 559–569, Nov. 1993

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

AKDIS, C. A.; BLESKEN, T.; AKDIS, M.; WUTHRICH, B.; BLASER, K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 102, n. 1, p. 98–106, Jul. 1998.

AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 119, n. 4, p. 780–791, Apr. 2007.

AKDIS, M.; VERHAGEN, J.; TAYLOR, A.; KARAMLOO, F.; KARAGIANNIDIS, C.; CRAMERI, R.; THUNBERG, S.; DENIZ, G.; VALENTA, R.; FIEBIG, H.; KEGEL, C.; DISCH, R.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 199, n. 11, p. 1567–1575, Jun. 2004.

ALLERGEN NOMENCLATURE. Disponível em: <http://www.allergen.org/Allergen.aspx>. Acesso em: 09 mai. 2009.

ALLERGOME . Disponível em: <http://www.allergome.org/script/dettaglio.php?id_molecule=1803 >. Acesso em: 10 mai. 2009.

ALMEIDA, K. C.; SILVA, D. A. O.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Responses of IgE, IgG1, and IgG4 to concanavalin A-binding *Blomia tropicalis* antigens in allergic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** São Paulo**,** v. 39, n. 11, p. 1445-1454, Nov. 2006.

ALVES, R.; SILVA, D. A. O.; FERNANDES, J. F.; ALMEIDA, K. C.; YNOUE, L. H.; BERNARDES, C. T.; MOREIRA, P. F.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Humoral and cellular immune responses to *Blomia tropicalis* and concanavalin A-binding fractions in atopic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** São Paulo**,** v. 41, n. 9, p. 773-781, Sep. 2008.

ANGKASEKWINAI, P.; PARK, H.; WANG, Y. H.; WANG, Y. H.; CHANG, S. H.; CORRY, D. B.; LIU, Y. J.; ZHU, Z.; DONG, C. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 204, n. 7, p. 1509-1517, Jul. 2007.

ARLIAN, L. G. Arthropod allergens and human health. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 395-433, May 2002.

ARLIAN, L. G. Mites and house dust allergy. **Journal of Asthma Research**, Ossining, v. 13, n. 4, p. 165-172, Jul. 1976.

ARLIAN, L. G.; BERNSTEIN, I. L.; VYSZENSKI-MOHER, D. L.; GALLAGHER, J. S. Investigations of culture medium-free house dust mite. III: Antigens and allergens of body and fecal extract of *Dermatophagoides farinae*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 79, n. 3, p. 457-466, Mar. 1987.

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

ARLIAN, L. G.; PLATTS-MILLS, T. A. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 107, p. s406-s413, Mar. 2001. Supplement 3.

ARLIAN, L. G.; RAPP, C. M.; AHMED, S. G. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). **Journal of Medical Entomollogy**, Honolulu, v. 27, n. 6, p. 1035-1040, Nov. 1990.

ARRUDA, L. K.; FERRIANI, V. P.; VAILES, L. D.; POMÉS, A.; CHAPMAN, M. D. Cockroach allergens: environmental distribution and relationship to disease. **Current allergy and asthma reports**, Philadelphia, v. 1, n. 5, p. 466–473, Sep. 2001.

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

ARRUDA, L. K.; VAILES, L. D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; CHAPMAN, M. D.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; MONTEALEGRE, F.; LIN, K. L.; CHUA, K.Y.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 155, n. 1, p. 343-350, Jan. 1997.

AZARKAN, M.; HUET, J.; BAEYENS-VOLANT, D.; LOOZE, Y.; VANDENBUSSCHE, G. Affinity chromatography: A useful tool in proteomics studies. **Journal of chromatography. B**, Amsterdam, v. 849, n. 1-2, p. 81-90, Apr. 2007.

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

BAQUEIRO, T.; CARVALHO, F. M.; RIOS, C. F.; DOS SANTOS, N. M.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; MEDICAL STUDENT GROUP. Dust mite species and allergen concentrations in beds of individuals belonging to different urban socioeconomic groups in Brazil. **Journal of Asthma,** Ossining, v**.** 43, n. 2, p. 101-105, Mar. 2006.

BAQUEIRO, T.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; CARVALHO, F. M.; SANTOS, N. M.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M. Asthma and rhinitis symptoms in individuals from different socioeconomic levels in a Brazilian city. **Allergy and Asthma Proceedings**, Providence, v. 28, p. 362-367, 2007.

BATES, J. M.; MAHAFFY, D. J. Relationships of reported allergy symptoms, relative humity, and airbone biologicals in thirteen Florida classroms. In: **Indoor air**, Nagoia, Japan, 1999, p. 551-556.

BENCÚROVÁ, M.; HEMMER, W.; FOCKE-TEJKL, M.; WILSON, I. B.; ALTMANN, F. Specificity of IgG and IgE antibodies against plant and insect glycoprotein glycans determined with artificial glycoforms of human transferrin. **Glycobiology,** Oxford, v. 14, n. 5, p. 457-466, May. 2004.

BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. **Nature**, London, v. 453, n. 7198, p. 1051-1057, Jun. 2008.

BILENKI, L.; WANG S.; YANG J.; FAN, Y.; JOYEE, A.G.; YANG, X. NK T cell activation promotes *Chlamydia trachomatis* infection *in vivo*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.175, p.3197-206, 2005.

CHAPMAN, M. D.; POMÉS, A.; BREITENEDER, H.; FERREIRA, F. Nomenclature and structural biology of allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 119, n. 2, p. 414-420, Feb. 2007.

CHAPMAN, M. D.; SMITH, A. M.; VAILES, L. D.; ARRUDA, K.; DHANARAJ, V.; POMÉS, A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v, 106, n. 3, p. 409-418, Sep. 2000.

CHARPIN, D.; KLEISBAUR, J. P.; LANTEAUME, A.; RAZZOUK, H.; VERVLOET, D.; TOUMI, M.; FARAJ, F.; CHARPIN, J. Asthma and allergy in house-dust mite in population living in high altitudes. **Chest**, Chicago, v. 93, n. 4, p. 758–761, Apr. 1988.

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

CHIEPPA, M.; BIANCHI, G.; DONI, A.; DEL PRETE, A.; SIRONI, M.; LASKARIN, G.; MONTI, P.; PIEMONTI, L.; BIONDI, A.; MANTOVANI, A.; INTRONA, M.; ALLAVENA, P. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte- derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. **Journal of Immunology**, Baltimore , v. 171, n. 9, p. 4552–4560, Nov. 2003.

CHRUSZCZ, M.; CHAPMAN, M. D.; VAILES, L. D.; STURA, E. A.; SAINT-REMY, J. M.; MINOR, W.; POMÉS, A. Crystal structures of mite allergens Der f 1 and Der p 1 reveal differences in surface-exposed residues that may influence antibody binding. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 386, n. 2, p. 520-530, Feb. 2009.

CLONIS, Y. D. Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatorial tools develop. **Journal of Chromatography. A**, Amsterdam, v. 1101, n. 1-2, p. 1-24, Jan. 2006.

COCKCROFT, D. W. Mechanism of perennial allergic asthma. **Lancet,** London , v. 2, n. 8344, p. 253–256, Jul. 1983.

COLLINS, C. H. Princípios Básicos de Cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Unicamp, 1997, p.11-28.

COOKSON, W. O.; CRADDOCK, C. F.; BENSON, M. K.; DURHAM, S. R. Falls in peripheral eosinophil counts parallel the late asthmatic response. **American review of respiratory disease**, Baltimore, v. 139, n. 2, p. 458–462, Feb. 1989.

CORRY, D. B.; KHERADMAND, F. Induction and regulation of the IgE response. **Nature**, London, v. 402, p. B18–23, Nov. 1999. Supplement 6760.

CTA - COMISSÃO DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANATOMIA. Terminologia anatômica. São Paulo: Manole, 2001. 248 p.

CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M.; ANFINSEN, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 61, n. 2, p. 636-643, Oct. 1968.

CUNNINGHAM, B. A.; WANG, J. L.; WAXDAL, M. J.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F3, **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, n. 4, p.1503-1512, Feb. 1975.

CUSTOVIC, A.; TAGGART, S. C. O.; WOODCOCK, A. House dust mite and cat allergens in different indoor environments. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1164-1168, Dec. 1994.

DE BOER, R. Reflections on the control of mites and mite allergens. **Allergy**, Copenhagen, v. 53, n. suppl. 48, p. 41-46, 1998.

DE JONG, N. W.; GROENEWOUD, G. C.; VAN REE, R.; VAN LEEUWEN, A.; VERMEULEN, A. M.; VAN TOORENENBERGEN, A. W.; DE GROOT, H.; VAN WIJK, R. G. Immunoblot and radioallergosorbent test inhibition studies of allergenic cross-reactivity of the predatory mite *Amblyseius cucumeris* with the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 93, n. 3, p. 281-287, Sep. 2004.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 7, p. 21-25, Mai. 1998.

DEVOS, S.; CORMONT, F.; VRTALA, S.; HOOGHE-PETERS, E.; PIRSON, F.; SNICK, J. Allergen-induced interleukin-9 production *in vitro*: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 174-182, Feb. 2006.

DHARMAGE, S.; BAILEY, M.; RAVEN, J.; MITAKAKIS, T.; CHENG, A.; GUEST, D.; ROLLAND, J.; FORBES, A.; THIEN, F.; ABRAMSON, M.; WALTERS, E. H. Current indoor allergen levels of fungi and cats, but not house dust mites, influence allergy and asthma in adults with high dust mite exposure**. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 164, n. 1, p. 65–71, Jul. 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, Mar. 1956.

EBO, D. G.; HAGENDORENS, M. M.; BRIDTS, C. H.; DE CLERCK, L. S.; STEVENS, W. J. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: mimickers of allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 137-144, Jan. 2004.

EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A.; REECKE, G. N.; BECKER, J. W.; WAXDAL, M. W.; WANG, J. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 69, n. 9, p. 2580-2584, Sep. 1972.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Structures of the *Erythrina corallodendron* lectin and of its complexes with mono and disaccharides. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 277, n. 4, p. 917–932, Apr. 1998.

FERREIRA, F.; WALLNER, M.; THALHAMER, J. Customized antigens for desensitizing allergic patients. **Advances in Immunology**, New York, v. 84, p. 79-129, 2004.

FOARDE, K.; BERRY, M. Comparison of biocontaminant levels associated with hard vs. Carpet floors in nonproblem schools: results of a year long study. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, Princetown, v. 14, p. s41-s48, 2004. Supplement 1.

FOKKENS, W. J. Antigen-presenting cells in nasal allergy. **Allergy**, Copenhagen, v. 54, n. 11, p. 1130-1141, Nov. 1999.

FORT, M. M.; CHEUNG, J.; YEN, D.; LI, J.; ZURAWSKI, S. M.; LO, S.; MENON, S.; CLIFFORD, T.; HUNTE, B.; LESLEY, R.; MUCHAMUEL, T.; HURST, S. D.; ZURAWSKI, G.; LEACH, M. W.; GORMAN, D. M.; RENNICK, D. M. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. **Immunity**, Cambridge, v. 15, n. 6, p. 985-995, Dec. 2001.

FÖTISH, K.; ALTMANN, F.; HAUSTEIN, D.; VIETHS, S. Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 120, n. 1, p. 30-42, Sep. 1999.

FÖTISH, K.; VIETHS, S. N- and O-linked oligossacharides of allergenic glycoproteins. **Glycoconjugate Journal**, Boston, v.18, n. 5, p. 373-390, May 2001.

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

GAGA, M.; FREW, A. J.; VARNEY, V. A.; KAY, A. B. Eosinophil activation and T lymphocyte infiltration in allergen-induced late phase skin reactions and classical delayed-type hypersensitivity. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 147, n. 3, p. 816–822, Aug. 1991.

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

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

GAUGRIS, S.; SAZONOV-KOCEVAR, V.; THOMAS, M. Burden of concomitant allergic rhinitis in adults with asthma. **Journal of Asthma**, Philadelphia, v. 43, n. 1, p. 1-7, Jan-Feb. 2006.

GEHRING, U.; HEINRICH, J.; JACOB, B.; RICHTER, K.; FAHLBUSCH, B.; SCHLENVOIGT, G.; BISCHOF, W.; WICHMANN, H. E.; INGA STUDY GROUP. Respiratory symptoms in relation to indoor exposure to mite and cat allergens and endotoxins. Indoor Factors and Genetics in Asthma (INGA) Study Group. The **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 555–563, Sep. 2001.

GILFILLAN, A. M.; TKACZYK, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 6, n. 3, p. 218-230, Mar. 2006.

GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, R. D. Isolation, physico-chemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. **The lectins**: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, Orlando: Academic Press, 1986. p. 33-247

GOULD, H. J.; SUTTON, B. J.; BEAVIL, A. J.; BEAVIL, R. L.; MCCLOSKEY, N.; COKER, H. A.; FEAR, D.; SMURTHWAITE, L. The biology of IGE and the basis of allergic disease. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 21, p. 579–628, 2003.

GUPTA, N.; MARTIN, B. M.; METCALFE, D. D.; RAO, P. V. Identification of a novel hydroxyproline-rich glycoprotein as the major allergen in *Parthenium* pollen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 98, n. 5, p. 903-912, Nov. 1996.

GUPTA, R.; SHARMA, V.; SRIDHARA, S.; SINGH, B. P.; ANORA, N. Identification of serine protease as a major allergen of *Curvularia lunata*. **Allergy**, Copenhagen, v. 59, n. 4, p. 421-427, Apr. 2004.

HALES, B. J.; HAZELL, L. A.; SMITH, W.; THOMAS, W. R. Genetic variations of Der p 2 allergens: effects on T-cell responses and IgE binding. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 1461-1467, Oct. 2002.

HALES, B. J.; SHEN, H. D.; THOMAS, W. R. Cross-reactivity of T-cell responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*: studies with group 1 and 7 allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 30, n.7, p. 934-943, Jul. 2000.

HALLAS, T. E. The biology of mites. **Allergy**, Copenhagen, v. 46, p. s6-s9, 1991, Supplement 11.

HART, B. J. Life cycle and reproduction of house-dust mites: environmental factors influencing mite populations. **Allergy**, Copenhagen, v. 53, p. s13-s17, 1998. Supplement 48.

HELENIUS, A.; AEBI, M. Intracellular functions of N-linked glycans. **Science**, Washington, v. 291, n. 5512, p. 2364-2369, Mar. 2001.

HESSELMAR, B.; ABERG, B.; ERIKSSON, B.; BJORKSTEN, B.; ABERG, N. High dose exposure to cat is associated with clinical tolerance: a modified TH2 immune response. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 1681-1685, Dec. 2003.

HESSELMAR, B.; ABERG, B.; ERIKSSON, B.; BJORKSTÉN, B.; ABERG, N. Building characteristics affect the risk of allergy development. **Pediatric Allergy and Immunology**, Copenhagen, v. 16, n. 2, p. 126-131, Mar. 2005.

HIGGINS, J. A.; THORPE, C. J.; HAYBALL, J. D.; O'HEHIR, R. E.; LAMB, J. R. Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of Dermatophagoides species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 93, n. 5, p. 891–899, May. 1994.

HINO, S.; MATSUBARA, T.; URISU, A.; AOKI, N.; SATO, C.; OKAJIMA, T.; NADANO, D.; MATSUDA, T. Periodate-resistant carbohydrate epitopes recognized by IgG and IgE antibodies from some of the immunized mice and patients with allergy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 380, n. 3, p. 632-637, Mar. 2009.

HONG, C. S.; LEE, M. K.; OH, S. H. Identification of major allergens from the house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*, by electroblotting. **Yonsei Medical Journal**, v. 32, n. 1, p. 24-32, Mar. 1991.

HU, C.; HSU, P. N.; LIN, R. H.; HSIEH, K. H.; CHUA, K. Y. HLA DPB1*0201 allele is negatively associated with immunoglobulin E responsiveness specific for house dust mite allergens in Taiwan. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 538–545, Apr. 2000.

HURST, S. D.; MUCHAMUEL, T.; GORMAN, D. M.; GILBERT, J. M.; CLIFFORD, T.; KWAN, S.; MENON, S.; SEYMOUR, B.; JACKSON, C.; KUNG, T. T.; BRIELAND, J. K.; ZURAWSKI, S. M.; CHAPMAN, R. W.; ZURAWSKI, G.; COFFMAN, R. L. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. **Journal of Immunology**, Baltimore , v. 169, n. 1, p. 443-453, Jul. 2002.

HUSS, K.; ADKINSON, N. F. JR.; EGGLESTON, P. A.; DAWSON, C.; VAN NATTA, M. L.; HAMILTON, R. G. House dust mite and cockroach exposure are strong risk factors for positive allergy skin test responses in the Childhood Asthma Management Program. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 107, n. 1, p. 48–54, Jan. 2001.

IACOVACCI, P.; PINI, C.; AFFERNI, C.; BARLETTA, B.; TINGHINO, R.; SCHININA, E.; FEDERICO, R.; MARI, A.; DI FELICE, G. A monoclonal antibody specific for a carbohydrate epitope recognizes an IgE-binding determinant shared by taxonomically unrelated allergenic pollens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 458-465, Mar. 2001.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1 >. Acesso em: 02 mai. 2009.

IKEDA, K.; NAKAJIMA, H.; SUZUKI, K.; KAGAMI, S.; HIROSE, K.; SUTO, A.; SAITO, Y.; IWAMOTO, I. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. **Blood**, New York, v. 101, n. 9, p. 3594-3596, May. 2003.

ILIOPOULOS, O.; BAROODY, F. M.; NACLERIO, R. M.; BOCHNER, B. S.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L. M. Histamine-containing cells obtained from the nose hours after antigen challenge have functional and phenotypic characteristics of basophils. **Journal of Immunology**, Baltimore , v. 148, n. 7, p. 2223–2228, Apr. 1992.

INSTITUTE OF MEDICINE - NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Clearing the air: asthma and indoor air exposures. 1.ed. Washington: National Academy Press, 2000.

IRANI, A. M.; HUANG, C.; XIA, H. Z.; KEPLEY, C.; NAFIE, A.; FOUDA, E. D.; CRAIG, S.; ZWEIMAN, B.; SCHWARTZ, L. B. Immunohistochemical detection of human basophils in late-phase skin reactions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 101, n. 3, p. 354–362, Mar. 1998.

ISAAC. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. **Lancet**, London, v. 351, n. 9111, p. 1225-1323, Apr. 1998.

ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. Physicochemical properties of reaginic antibody. 1. association of reaginic activity with an immunoglobulin other than gammaA- or gammaG- globulin. **Journal of Allergy**, St. Louis, v. 37, n. 3, p. 169-185, Mar. 1966.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J. J.; CUA, D. J.; LITTMAN, D. R. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, Cambridge, v. 126, n. 6, 1121-1133, Sep. 2006.

JARVIS, D.; ZOCK, J. P.; HEINRICH, J.; SVANES, C.; VERLATO, G.; OLIVIERI, M.; VILLANI, S.; PONZIO, M.; LEYNAERT, B.; SUNYER, J.; DAHLMAN-HOGLUND, A.; CHINN, S.; LUCZYNSKA, C.; NORBÄCK, D.; BURNEY, P. Cat and dust mite allergen levels, specific IgG and IgG4, and respiratory symptoms in adults. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 119, n. 3, p. 697-704, Mar. 2007.

JEANNIN, P.; LECOANET, S.; DELNESTE, Y.; GAUCHAT, J. F.; BONNEFOY, J. Y. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **Journal of Immunology**, Baltimore , v. 160, n. 7, p. 3555–3561, Apr. 1998.

JEFFERY, P. K.; HAAHTELA, T. Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one airway condition. **BMC Pulmonary Medicine**, London, v. 6, p. S5, Nov. 2006. Supplement 1.

JENMALM, M. C.; BJORKSTEN, B. Development of immunoglobulin G subclass antibodies to ovalbumin, birch and cat during the first eight years of life in atopic and non-atopic children. **Pediatric Allergy and Immunology**, Copenhagen, v. 10, n. 2, p. 112-21, May. 1999.

JOHANSSON, S. G.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S.; LANIER, B. Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; ORTEGA MARTELL, J. A.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; RING, J.; THIEN, F.; VAN CAUWENBERGE, P.; WILLIAMS, H. C. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 113, n. 5, p. 832-836, May. 2004.

JOOST VAN NEERVEN, R.; VAN T'HOF, W.; RINGROSE, J. H.; JANSEN, H. M.; AALBERSE, R. C.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. T cell epitopes of house dust mite major allergen Der p II. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, n. 4, p. 2326–2335, Aug. 1993.

JUSTINO, C. M.; SEGUNDO, G. R.; PEREIRA, F. L.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. S.; TAKETOMI, E. A. Mite and pet allergen exposure in Brazilian private cars. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 94, n. 6, p. 658-661, Jun. 2005.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; BUDAK, F.; AEBISCHER- CASAULTA, C.; WRZYSZCZ, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. IL-10 and TGF-beta 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. 1205–1214. May. 2003.

JUTEL, M.; JAEGER, L.; SUCK, R.; MEYER, H.; FIEBIG, H.; CROMWELL, O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 116, n. 3, p. 608-613, Sep. 2005.

KALESNIKOFF, J.; GALLI, S. J. New developments in mast cell biology. **Nature Immunology**, New York, v. 9, n. 11, p. 1215-1223, Nov. 2008.

KARAMLOO, F.; SCHMID-GRENDELMEIER, P.; KUSSEBI, F.; AKDIS, M.; SALAGIANNI, M.; VON BEUST, B. R.; REIMERS, A.; ZUMKEHR, J.; SOLDATOVA, L.; HOUSLEY-MARKOVIC, Z.; MÜLLER, U.; KÜNDIG, T.; KEMENY, D. M.; SPANGFORT, M. D.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Prevention of allergy by a recombinant multi-allergen vaccine with reduced IgE binding and preserved T cell epitopes. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 35, n. 11, p. 3268-3276, Nov. 2005.

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

KAY, A. B.; BARATA, L.; MENG, Q.; DURHAM, S. R.; YING, S. Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel , v. 113, n. 1-3 , p. 196–199, May-Jul. 1997.

KEMENY, D. M.; URBANEK, R.; EWAN, P. W.; 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 dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 545-549, Sep. 1989.

KIM, M. R.; MANOUKIAN, R.; YEH, R.; SILBIGER, S. M.; DANILENKO, D. M.; SCULLY. S.; SUN, J.; DEROSE, M. L.; STOLINA, M.; CHANG, D.; VAN, G. Y.; CLARKIN, K.; NGUYEN, H. Q.; YU, Y. B.; JING, S.; SENALDI, G.; ELLIOTT, G.; MEDLOCK, E. S.Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, Blymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. **Blood**, New York, v. 100, n. 7, p. 2330-2340, Oct. 2002a.

KIM, Y. K.; OH, S. Y.; OH, H. B.; LEE, B. J.; SON, J. W.; CHO, S. H.; KIM, Y. Y.; MIN, K. U. Positive association between HLA-DRB1*07 and specific IgE responses to purified major allergens of D. pteronyssinus (Der p 1 and Der p 2). **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 88, n. 2, p. 170–174, Feb. 2002b.

KINET, J. P. The high-affinity IgE receptor (Fc *epsilon* RI): from physiology to pathology. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 17, p. 931–972, 1999.

KING, T. P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. **Allergy**, Copenhagen, v. 50, n. 9, p. 765-774, Sep. 1995.

KING, T. P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. R. Allergen nomenclature. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 105, n. 3, p. 224-233, Nov. 1994.

KOLLS, J. K.; KANALY, S. T.; RAMSAY, A. J. Interleukin-17: an emerging role in lung inflammation. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, New York, v. 28, n. 1, p. 9-11, Jan. 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LARSEN, J. N.; LOWERSTEIN, H. Allergen nomenclature. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 97, n. 2, p. 577-718, Feb. 1996.

LAU, S.; ILLI, S.; PLATTS-MILLS, T.; RIPOSO, D.; NICKEL, R.; GRUBER, C.; NIGGEMANN, B.; WAHN, U.; MULTICENTRE ALLERGY STUDY GROUP.. Longitudinal study on the relationship between cat allergen and endotoxin exposure, sensitization, cat specific IgG and development of asthma in childhood: report of the German Multicentre Allergy Study (MAS 90). **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 6, p. 766-73, Jun. 2005.

LEBRUN, P. H.; VAN IMPE, G.; GEORGES-GRIDELET, D. S.; WAUTHY, G.; ANDRE, H. M. The life strategies of mites. In: SCHUSTER, R.; MUROHY, P. W. **The acari**: reproduction, development and life-history strategies. London: Chapman & Hall, 1991, p.3-22.

LEMANSKE-JUNIOR, R. F.; BUSSE, W. W. Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 111, p. s502-519, 2003. Supplement 2.

LEYNAERT, B.; BOUSQUET, J.; NEUKIRCH, C.; LIARD. R.; NEUKIRCH. F. Perennial rhinitis: an independent risk factor for asthma in non-atopic subjects: results from the European Community Respiratory Health Survey. **Journal of Allergy and Clinical Immunology,** St. Louis, v. 104, n. 2, p. 301-304, Aug. 1999.

LINDÉN, A.; LAAN, M.; ANDERSON, G. P. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 25, n. 1, p. 159-172, Jan. 2005.

LING, E. M.; SMITH, T.; NGUYEN, X. D.; PRIDGEON, C.; DALLMAN, M.; ARBERY, J.; CARR, V. A.; ROBINSON, D. S. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. **Lancet,** London, v. 363, n. 9409, p. 608–615, Feb. 2004.

LINNEBERG, A.; HENRIK NIELSEN, N.; FROLUND, L.; MADSEN, F.; DIRKSEN, A.; JORGENSEN, T. The link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population-based study.: The Copenhagen Allergy Study. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n. 11, p. 1048-1052, Nov. 2002.

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

MALANDAIN, H. IgE reactive carbohydrate epitopes – classification, cross-reactivity and clinical impact. **Allergie et Immunologie**, Paris, v. 37, n. 4, p. 122-128, Apr. 2005.

MARI, A.; IACOVACCI, P.; AFFERNI, C.; BARLETTA, B., TINGHINO, R.; DI FELICE, G.; PINI, C. Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 103, n. 6, p. 1005-1011, Jun. 1999.

MARSH, D. G.; GOODFRIEND, L.; KING, T. P.; LOWENSTEIN, H.; PLATTS-MILLS, T. A. E. Allergen nomenclature. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 64, n. 5, p. 767-770, 1986.

MARSHALL, J. S. Mast-cell responses to pathogens. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 4, n. 10, p. 787–799, Oct. 2004.

MARUYAMA, N.; TAMURA, G.; AIZAWA, T.; OHRUI, T.; SHIMURA, S.; SHIRATO, K.; TAKISHIMA, T. Accumulation of basophils and their chemotactic activity in the airways during natural airway narrowing in asthmatic individuals. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 150, n. 4, p. 1086–1093, Oct. 1994.

MATSUOKA, T.; KOHROGI, H.; ANDO, M.; NISHIMURA, Y.; MATSUSHITA, S. Dermatophagoides farinae-1-derived peptides and HLA molecules recognized by T cells from atopic individuals. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel , v. 112, n. 4, p. 365–370, Apr. 1997.

MCNAUGHT , A. D.; WILKINSON, A. **IUPAC**: Compendium of Chemical Terminology. 2. ed. Oxford: Blackwell, 2004, 464 p.

MEILER, F.; KLUNKER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. **Allergy**, Copenhagen, v. 63, n. 11, p. 1455-1463, Nov. 2008.

MEYER, P.; CO MINH, H. B.; DEMOLY, P. Nomenclature révisée des termes d'allergologie. **Archives de pédiatrie**, Paris, v. 11, n. 9, p. 1131–1134, Sep. 2004.

MINEO, J. R. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica**: do planejamento à publicação. Uberlândia: Edufu, 2005, 273p.

MOFFATT, M. F.; SCHOU, C.; FAUX, J. A.; ABECASIS, G. R.; JAMES, A.; MUSK, A. W.; COOKSON, W. O. Association between quantitative traits underlying asthma and the HLA-DRB1 locus in a family-based population sample. **European Journal of Human Genetics**, Basel, v. 9, n. 5, p. 341–346, 2001.

MONTEALEGRE, F.; QUIÑONES, C.; TORRES, N.; GOTH, K. Detection of serine proteases in extracts of the domestic mite Blomia tropicalis. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 24, n. 1-2, p. 87–100, 2002.

MOODY, D. B.; GUYB, M. R.; GRANTA, E.; CHENGA, T. Y.; BRENNERA, M. B.; BESRAB, G. S.; PORCELLIA, S. A. CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 192, n. 7, p. 965-976, Oct. 2000.

NAISMITH J. H.; EMMERICH, C.; HABASH, J.; HARROP, S. J.; HELLIWELL, J. R.; HUNTER, W. N.; RAFTERY, J.; KALB, A. J.; YARIV, J. Refined structure of concanavalin A complexed with methyl alpha-D-mannopyranoside at 2.0 A resolution and comparison with the saccharide-free structure. **Acta Crystallographica**, Copenhagen, v. 50, n. 6, p. 847-858, Nov. 1994.

NANDAKUMAR, S.; MILLER, C. W.; KUMARAGURU, U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. **Clinical and Molecular Allergy,** London, v. 7, p. 5, Mar. 2009.

NASPITZ, C. K.; SOLÉ, D.; JACOB, C. A.; SARINHO, E.; SOARES, F. J.; DANTAS, V.; MALLOZI, M. C.; WANDALSEN, N. F.; BORGES, W.; ROCHA FILHO, W.; GRUPO PROAL. Sensitization to inhalant and food allergens in Brazilian atopic children by in vitro total and specific IgE assay. Allergy Project—PROAL. **Jornal de Pediatria,** Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 203-210, May-Jun. 2004.

NATHAN, A. T.; PETERSON, E. A.; CHAKIR, J.; WILLS-KARP, M. Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 123, n. 3, p. 612-618, Mar. 2009

NIGAM, S.; GHOSH, P. C.; SARMA, P. U. A new glycoprotein allergen/antigen with the protease activity from *Aspergillus fumigatus*. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 132, n. 2, p. 124-131, Oct. 2003.

NILSEN, B. M.; SMESTAD-PAULSEN, B.; CLONIS, Y.; MELLBYE, K. S. Purification of the glycoprotein allergen Ag7 from mugwort pollen by concanavalin A affinity chromatography. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 3-4, p. 305-316, Nov. 1990.

NOURI-ARIA, K. T, IRANI, A. M.; JACOBSON, M. R.; O'BRIEN, F.; VARGA, E. M.; TILL, S. J.; DURHAM, S. R.; SCHWARTZ, L. B. Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen-induced late asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 108, n. 2, p. 205–211, Aug. 2001.

O'BRIEN, R. M.; TAIT, B. D.; VARNEY, M. D.; THOMAS, W. R. HLA-DPB1 alleles in house dust mite allergic patients. **European Journal of Human Genetics**, Basel, v. 26, n. 4 , p. 281–284, Aug. 1999.

O'BRIEN, R. M.; THOMAS, W. R.; NICHOLSON, I.; LAMB, J. R.; TAIT, B. D. An immunogenetic analysis of the T-cell recognition of the major house dust mite allergen Der p 2: identification of high- and low-responder HLA-DQ alleles and localization of T-cell epitopes. **Immunology**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 176–182, Oct. 1995.

O'HEHIR, R. E.; ECKELS, D. D.; FREW, A. J.; KAY, A. B.; LAMB, J. R. MHC class II restriction specificity of cloned human T lymphocytes reactive with *Dermatophagoides farinae* (house dust mite). **Immunology**, Oxford, v. 64, n. 4 , p.627–631, Aug. 1988.

O'HEHIR, R. E.; MACH, B.; BERTE, C.; GREENLAW, R.; TIERCY, J. M.; BAL, V.; LECHLER, R. I.; TROWSDALE, J.; LAMB, J. R. Direct evidence for a functional role of HLA-DRB1 and -DRB3 gene products in the recognition of *Dermatophagoides* spp. (house dust mite) by helper T lymphocytes. **International Immunology**, Oxford, v. 2, n. 9, p. 885–892, 1990.

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

PADURARU, C.; SPIRIDON, L.; YUAN, W.; BRICARD, G.; VALENCIA, X.; PORCELLI, S. A.; ILLARIONOV, P. A.; BESRA, G. S.; PETRESCU, S. M.; PETRESCU, A. J.; CRESSWELL, P. An N-linked glycan modulates the interaction between the CD1d heavy chain and beta 2-microglobulin. **Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 281, n. 52, p. 40369-40378, Dec. 2006.

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

PEREIRA, F. L.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. S.; TAKETOMI, E. A. Mite and cat allergen exposure in Brazilian public transport vehicles. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 93, n. 2, p. 179-184, Aug. 2004.

PERFETTI, L.; FERRARI, M.; GALDI, E.; POZZI, V.; COTTICA, D.; GRIGNANI, E.; MINOIAC, C.; MOSCATOA, G. House dust mites (Der p 1, Der f 1), cat (Fel d 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in indoor work-places (offices and archives). **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 328, n.1-3, p.15–21, Jul. 2004.

PETERSEN, A.; SCHRAMM, G.; SCHLAAK, M. Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 315-321, Mar. 1998.

PIBOONPOCANUN, S.; MALINUAL, N.; JIRAPONGSANANURUK, J.; VICHYANOND, P.; THOMAS, W. R. Genetic polymorphisms of major house dust mite allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 510-516, Apr. 2006.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VAUGHAN, J. W.; BLUMENTHAL, K.; POLLART SQUILLACE, S.; SPORIK, R. B. Serum IgG and IgG4 antibodies to Fel d 1 among children exposed to 20 microg Fel d 1 at home: relevance of a nonallergic modified Th2 response. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 124, n. 1-3, p.126-129, Jan-Mar. 2001b.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VAUGHAN, J.; SQUILLACE, S.; WOODFOLK, J.; SPORIK, R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. **Lancet,** London, v. 357, n. 9258, p. 752-756, Mar. 2001a.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W.; ALBERSE, R.; CHAPMAN, M. Indoor allergens and asthma. Report of a Third International Workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 100, p. S1–S24, 1997. Supplement 6.

POWELL, A. E.; LEON, M. A. Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen concanavalin A. **Experimental Cell Research**, New York, v. 62, n. 2, p. 315-325, Oct. 1970

PRENNER, C.; MACH, L.; GLOSSL, J.; MARZ, L. The antigenicity of the carbohydrate moiety of an insect glycoprotein honey-bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. The role of alpha 1,3-fucosylation of the asparagines-bound N-acetylglucosamine. **Biochemical Journal**, London, v. 284, n. 2, p.377-380, Jun. 1992.

PUERTA, L.; LAGARES, A.; MERCADO, D.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; CARABALLO, L. Allergenic composition of the mite *Suidasia medanensis* and cross-reactivity with *Blomia tropicalis*. **Allergy,** Copenhagen, v. 60, n. 1, p. 41-47, Jan. 2005.

QUEIROZ, R. M.; MARCON, G.; ANUNCIAÇÃO-FILHO, C. J.; MATOS, V. P.; CISNEIROS, R. A. Estratégias adaptativas de populações de *Stylosanthes scabra* provenientes de três regiões ecogeográficas de Pernambuco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 5, n. 2, p. 320-325, Fev. 2001

RODRIGUES, R. M.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 89-93, Feb. 2004.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D.; D. ROTH. **Immunology**. 7.ed., Baltimore: Mosby, 2006. 544 p.

ROSSI, R. E.; MONASTEROLO, G.; COCO, G.; SILVESTRO, L.; OPERTI, D. Evaluation of serum IgG4 antibodies specific to grass pollen allergen components in the follow up of allergic patients undergoing subcutaneous and sublingual immunotherapy. **Vaccine**, Amsterdam, v. 25, n. 5, p. 957–964, Jan. 2007.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Invertebrate Zoology**. 7. ed. Oxford: Brooks Cole. 2004, 1008 p.

RUSCONI, F.; GALASSI, C.; CORBO, G. M.; FORASTIERE, F.; BIGGERI, A.; CICCONE, G.; RENZONI, E. Risk factors for early, persistent, and late-onset wheezing in young children. SIDRIA Collaborative Group. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine,** New York, v. 160, n. 5, p. 1617-1622, Nov. 1999.

SAINI, S. S.; MCGLASHAN, D. How the IgE upregulates allergic response. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 14, n. 6, p. 694-697, Dec. 2002.

SAMPSON, A. P. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 30, n. Suppl. 1, p. 22–27, Jun. 2000.

SCHARENBERG AM, LIN S, CUENOD B, YAMAMURA H, KINET JP. Reconstitution of interactions between tyrosine kinases and the high affinity IgE receptor which are controlled by receptor clustering. **EMBO Journal**, Oxford**,** v. 14, n. 14, p. 3385–3394, Jul. 1995.

SCHER, M. G.; RESNECK, W. G.; BLOCH, R. Stabilization of immobilized lectin columns by crosslinking with glutaraldehyde. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 177, n. 1, p. 168-171, Fev. 1989.

SCHMIDT-WEBER, C. B.; BLASER, K. Regulation and role of transforming growth factor-beta in immune tolerance induction and inflammation. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 16, n. 6, p. 709-716, Dec. 2004.

SCRIBA, G. K. E. Affinity Chromatography. In: DINGERMAN, T.; STEINHILBER, D.; FOLKERS, G. **Molecular Biology in Medical Chemistry**, 1.ed, Washington: Wiley-VCH, 2004, p. 211-241.

SEGUNDO, G. R. S.; SOPELETE, M. C.; TERRA, S. A.; PEREIRA, F. L.; JUSTINO, C. M.; SILVA, D. A. O.; TAKETOMI, E. A. Diversity of allergen exposure: Implications for the efficacy of environmental control. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology,** São Paulo, v. 75, n. 2, p. 311-316, 2009.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, Washington, v. 246, n. 4927, p. 227-234, Oct. 1989.

SHOHAM, J.; INBAR, M.; SACHS, L. Differential toxicity on normal and transformed cells in vitro and inhibition of tumour development in vivo by concanavalin A. **Nature**, London, v. 227, n. 5264, p. 1244-1246, Sep. 1970.

SHREFFLER, W. G.; CASTRO, R. R.; KUCUK, Z. Y.; CHARLOP-POWERS, Z.; GRISHINA, G.; YOO, S.; BURKS, A. W.; SAMPSON, H. A. The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro. **Journal of Immunology**, Baltimore , v. 177 n. 6, p. 3677–3685, Sep. 2006.

SIDENIUS. K. E.; HALLAS, T. E.; POULSEN, L. K.; MOSBECH, H. Allergen cross-reactivity between house-dust mites and other invertebrates. **Allergy,** Copenhagen, v. 56, n. 8, p. 723-733, Aug. 2001.

SILVA, D. A. O.; LOBATO, J.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with Toxoplasma gondii. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, Feb. 2007.

SIMPLÍCIO, E. C.; SILVA, D. A. O.; BRAGA, I. A.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite and pet allergen exposure in hotels in Uberlândia, Midwestern Brazil. **Indoor Air**, Copenhagen, v. 17, n. 4, p. 278-283, Aug. 2007.

SMITH, A. S.; BENJAMIN, D. C.; HOZIC, N.; DEREWENDA, U.; SMITH, W. A.; THOMAS, W. R.; GAFVELIN, G.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; CHAPMAN, M. D. The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, St. Louis, v. 107, n. 6, p. 977-984, Jun. 2001a.

SMITH, W. A.; HALES, B. J.; JARNICKI, A. G.; THOMAS, W. R. Allergens of wild house dust mites: environmental Der p 1 and Der p 2 sequence polymorphisms. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, St. Louis, v. 107, n. 6, p. 985-92, Jun. 2001b.

SOARES, F. A.; SEGUNDO, G. R.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; SUNG, S. S.; TAKETOMI, E. A. Indoor allergen sensitization profile in allergic patients of the allergy clinic in the University Hospital in Uberlândia, Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 25-28, Jan-Feb. 2007.

SOPELETE, M.C.; SILVA, D.A.O.; ARRUDA, L.K.; CHAPMAN, M.D.; TAKETOMI, E.A. *Dermatophagoides farinae* (Der f 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) allergen exposure among subjects living in Uberlândia, Brazil. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 122, n. 4, p. 257-263, Aug. 2000.

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

STEWART, G. A.; THOMPSON, P. J. The biochemistry of common aeroallergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1020-1024, Sep. 1996.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ: British Medical Journal**, v. 299, n. 6710, p. 1259-60, Nov. 1989.

SUDHA, V. T.; ARORA, N.; GAUR, S. N.; PASHA, S.; SINGH, B. P. Identification of a serina protease as a major allergen (Per a 10) of *Periplaneta americana*. **Allergy**, Copenhagen, v. 63, n. 6, p. 768-776, Jun. 2008.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 227, Mar. 1936.

TAKETOMI, E. A.; JUSTINO, C. M.; PEREIRA, F. L.; SEGUNDO, G. R.; SOPELETE, M. C.; SUNG, S. J.; SILVA, D. A. O. Taxis but not private cars are mite allergen reservoirs in Brazil. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 16, n. 1, p. 34-36, 2006.

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

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, Sep. 2004.

THOMAS, W. R.; HEINRICH, T. K.; SMITH, W. A., HALES, B. J. Pyroglyphid house dust mite allergens. **Protein and Peptide Letters**, Schiphol, v. 14, n. 10, 943-953, 2007.

THOMAS, W. R.; SMITH, W. A.; HALES, B. J. The allergenic specificities of the house dust mite. **Chang Gung Medical Journal**, Taipei, v. 27, n. 8, p. 563-569, Aug. 2004.

THOMAS, W. R.; SMITH, W. A.; HALES, B. J.; MILLS, K. L.; O' BRIEN, R. M. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 129, n. 1, p. 1-18, Sep. 2002.

THOMAS, W. R.; SMITH, W. House-dust-mite allergens. **Allergy,** Copenhagen, v. 53, n. 9, p. 821-832, Sep. 1998.

TOBIAS, K. R.; FERRIANI, V. P.; CHAPMAN, M. D.; ARRUDA, L. K. Exposure to indoor allergens in homes of patients with asthma and/or rhinitis in southeast Brazil: effect of mattress and pillow covers on mite allergen levels. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 133, n. 4, p. 365-70, Apr. 2004.

TOVEY, E. R.; BALDO, B. A. Comparison by electroblotting of IgE-binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite culture. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 79, n. 1, p. 93-102, Jan. 1987.

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, Feb. 1981.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, I. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4352, Sep. 1979.

TRETTER, V.; ALTMANN, F.; KUBELKA, V.; MARZ, L.; BECKER, W. M. Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 102, p. 259-266, 1993.

TROMBETTA, E. S.; PARODI, A. J. N-glycan processing and glycoprotein folding. **Advances in Protein Chemistry**, New York, v. 59, p. 303-344, 2001.

TSICOPOULOS, A.; HAMID, Q.; HACZKU, A.; JACOBSON, M. R.; DURHAM, S. R.; NORTH, J.; BARKANS, J.; CORRIGAN, C. J.; MENG, Q.; MOQBEL, R.; KAY, A. B. Kinetics of cell infiltration and cytokine messenger RNA expression after intradermal challenge with allergen and tuberculin in the same atopic individuals. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 94, n. 4, p. 764–772, Oct. 1994.

TSITOURA, D. C.; VERHOEF, A.; GELDER, C. M.; O'HEHIR, R. E.; LAMB, J. R. Altered T cell ligands derived from a major house dust mite allergen enhance IFN-gamma but not IL-4 production by human CD4+ T cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, n. 5, p. 2160–2165, Sep. 1996.

TURNER, H.; KINET, J. P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI**. Nature**, London, v. 402, p. 24–30, Nov. 1999. Supplement 6760.

VAN DIE, I.; CUMMINGS, R. D.; VAN TETERING, A.; HOKKE, C. H.; KOELEMAN, C. A.; VAN DEN EIJNDEN, D. H.; Identification of a novel UDP-Glc:GlcNAc beta1-4-glucosyltransferase in *Lymnaea stagnalis* that may be involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. **Glycobiology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 263-271, Mar. 2000.

VAN NEERVEN, R. J.; VAN DE POL, M. M.; WIERENGA, E. A.; AALBERSE, R. C.; JANSEN, H. M.; KAPSENBERG, M. L. Peptide specificity and HLA restriction do not dictate lymphokine production by allergen-specific T-lymphocyte clones. **Immunology**, Oxford, v. 82, n. 3 , p. 351–356, Jul. 1994.

VAN REE, R. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. **International Archives Allergy and Immunology**, Basel, v. 129, n. 3, p.189-197, Nov. 2002.

VAN REE, R. Isoallergens: a clinically relevant phenomenon or just a product of cloning? **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 975-978, Jul. 2002.

VARGHESE, J. N.; MCKIMM-BRESCHKIN, J. L.; CALDWELL, J. B.; KORTT, A. A.; COLMAN, P. M.; The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. **Proteins,** New york**,** v. 14, n. 3, p. 327–32, Nov. 1992.

VERHOEF, A.; HIGGINS, J. A.; THORPE, C. J.; MARSH, S. G.; HAYBALL, J. D.; LAMB, J. R.; O'HEHIR, R. E. Clonal analysis of the atopic immune response to the group 2 allergen of *Dermatophagoides* spp.: identification of HLA-DR and -DQ restricted T cell epitopes. **International Immunology**, Oxford, v. 5, n. 12, p. 1589–1597, Dec. 1993.

VIGNOLA, A. M.; CHANEZ, P.; GODARD, P.; BOUSQUET, J. Relationships between rhinitis and asthma. **Allergy**, Copenhagen, v. 53, n. 9, p. 833-839, Sep. 1998. Visitado em: 06 mai. 2009.

VOORHORST, R. House dust mite and house dust allergy. **Annals of Allergy**, McLean, v. 38, n. 1, p. 71, Jan. 1977.

WANG, Y. H.; ANGKASEKWINAI, P.; LU, N.; VOO, K. S.; ARIMA, K.; HANABUCHI, S.; HIPPE, A.; CORRIGAN, C. J.; DONG, C.; HOMEY, B.; YAO, Z.; YING, S.; HUSTON, D. P.; LIU, Y.J. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 204, n. 8, p. 1837-1847, Aug. 2007.

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

WEBER, A.; SCHRODER, H.; THALBERG, K. Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honey bee venom phospholipase A2. **Allergy**, Copenhagen, v. 42, n. 6, p. 464, Sep. 1987.

WEIDINGER, S.; GIEGER, C.; RODRIGUEZ, E.; BAURECHT, H.; MEMPEL, M.; KLOPP, N.; GOHLKE, H.; WAGENPFEIL, S.; OLLERT, M.; RING, J.; BEHRENDT, H.; HEINRICH, J.; NOVAK, N.; BIEBER, T.; KRÄMER, U.; BERDEL, D.; Von BERG, A.; BAUER, C. P.; HERBARTH, O.; KOLETZKO, S.; PROKISCH, H.; MEHTA, D.; MEITINGER, T.; DEPNER, M.; Von MUTIUS, E.; LIANG, L.; MOFFATT, M.; COOKSON, W.; KABESCH, M.; WICHMANN, H. E.; ILLIG, T. Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. **PLoS Genetics,** San Francisco v. 4, n. 8, p. 1000166, Aug. 2008.

WIERINGA, M. H.; WEYLER, J. J.; VAN BASTELAER, F. J.; NELEN, V. J.; VAN SPRUNDEL, M. P.; VERMEIRE, P. A. Higher asthma occurrence in an urban than a suburban area: role of house dust mite skin allergy. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 10, n. 7, p. 1460–1466, Jul. 1997.

WILSON, I. B.; HARTHILL, J. E.; MULLIN, N. P.; ASHFORD, D. A.; ALTMANN, F. Core alpha-1,3-fusose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts. **Glycobiology**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 651-661, Jul. 1998.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, Jul. 1954.

YING, S.; BARATA, L. T.; MENG, Q.; GRANT, J. A.; BARKANS, J.; DURHAM, S. R.; KAY, A. B. High-affinity immunoglobulin E receptor (Fc *epsilon* RI)-bearing eosinophils, mast cells, macrophages and Langerhans' cells in allergen-induced latephase cutaneous reactions in atopic subjects. **Immunology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 281–288, Feb. 1998.

YOUNG, D. C.; MOODY, D. B. T-cell recognition of glycolipids presented by CD1 proteins. **Glycobiology,** Oxford, v. 16, n. 7, p. 103R-112R, Jul. 2006.

YSSEL, H.; JOHNSON, K. E.; SCHNEIDER, P. V.; WIDEMAN, J.; TERR, A.; KASTELEIN, R.; DE VRIES, J. E. T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-specific CD4+ T cell clones. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 148, n. 3, p. 738–745, Feb. 1992.

ZOCK, J. P.; HEINRICH, J.; JARVIS, D.; VERLATO, G.; NORBÄCK, D.; PLANA, E.; SUNYER, J.; CHINN, S.; OLIVIERI, M.; SOON, A.; VILLANI, S.; PONZIO, M.; DAHLMAN-HOGLUND, A.; SVANES, C.; LUCZYNSKA, C.; INDOOR WORKING GROUP OF THE EUROPEAN COMMUNITY RESPIRATORY HEALTH SURVEY II. Distribution and determinants of house dust mite allergens in Europe: the European Community Respiratory Health Survey II. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 118, n. 3, p. 682-690, Sep. 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

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 111/07 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 056/07

Projeto Pesquisa: "Análise do perfil anticórpico e de citocinas específicos a diferentes frações de ácaros da poeira domiciliar e produção de anticorpos monoclonais"

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: janeiro/2009**

Data para entrega do **Relatório final: janeiro/2011**

13 de abril de 2007.

Profa. 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.z), 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 requeiram 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 2

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

Você está sendo convidado para participar da pesquisa "Análise do perfil anticórpico e de citocinas específicos a diferentes frações de ácaros da poeira domiciliar e produção de anticorpos monoclonais" sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi.

Nesta pesquisa, estamos buscando entender o perfil de anticorpos frente à diversas frações de proteínas de diferentes espécies de ácaros da poeira domiciliar. Para isso, você será submetido à realização de teste alérgico a aeroalérgenos para triagem dos pacientes e indivíduos saudáveis que participarão do estudo.

Serão coletados 20mL de sangue para análise de anticorpos específicos aos aeroalérgenos. Se necessário, você será chamado posteriormente para coleta de mais 60mL de sangue para análise de citocinas específicas e proliferação celular.

Durante esta pesquisa, o atendimento médico será realizado no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia e os exames de sangue serão realizados no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU-MG.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados desta pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será totalmente preservada.

Você não terá nenhum ônus e ganho financeiro por participar desta pesquisa.

Os riscos são mínimos, mas podem ocasionar as próprias crises alérgicas. Caso isso aconteça, você será imediatamente examinado por médicos assistentes e receberá tratamento adequado. Dentre os benefícios estão inseridos a possível descoberta, a longo prazo de uma terapia eficaz para o controle das alergias respiratórias.

Você é livre para abandonar sua participação da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você ou responsável pelo paciente.

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

Dr. Ernesto A. Taketomi
Avenida Pará, 1720 Bloco 4C Campus Umuarama
Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia-MG
Tel.: (34)3218-2398 / Telefax: (34) 3218-2333

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

Uberlândia, _____ de _____ de _____.

_____
Assinatura

ANEXO 3

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

Nome:_____ Prontuário HC-UFU: _____
Data do questionário: ____ / ____ / ____
Idade: _____ Data de nascimento: ____ / ____ / ____
Sexo: ( ) masculino ( ) feminino
Grau de escolaridade: ( ) Ensino fundamental ( ) Ensino Médio
( ) Ensino Superior e/ou pós-graduação

Questionário 1 (Módulo Asma)

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

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

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

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

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

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

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

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

8) Alguma vez na vida você teve asma?
   ( ) Sim ( ) Não

<u>Questionário 2</u> (Módulo Rinite)

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

1) Alguma vez na vida você teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava resfriado ou gripado?
   ( ) Sim ( ) Não

2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou com resfriado?
   ( ) Sim ( ) Não

3) Nos últimos 12 (doze) meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?
   ( ) Sim ( ) Não

4) Em qual dos últimos 12 (doze) meses este problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu)
   ( ) Janeiro ( ) Maio ( ) Setembro
   ( ) Fevereiro ( ) Junho ( ) Outubro
   ( ) Março ( ) Julho ( ) Novembro
   ( ) Abril ( ) Agosto ( ) Dezembro

5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal?
   Nada ( )
   Pouco ( )
   Moderado ( )
   Muito ( )

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

ANEXO 4

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

Nº	Extrato	Referência	Tamanho da pápula (mm)*	Tamanho do eritema (mm)
1	*Dermatophagoides pteronyssinus*	Ácaro		
2	*Dermatophagoides farinae*	Ácaro		
3	*Blomia tropicalis*	Ácaro		
4	*Canis familiaris*	Cão		
5	*Felis domesticus*	Gato		
6	*Blatella germanica*	Barata		
7	*Periplaneta americana*	Barata		
8	*Alternaria alternata*	Fungo		
9	Solução salina	Controle negativo		
10	Histamina	Controle positivo		

**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