



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



**Identificação de isoformas antigênicas de
Dermatophagoides pteronyssinus reconhecidas
por anticorpos IgE e IgG1 em pacientes atópicos e
não atópicos**

Juliana Silva Miranda

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Identificação de isoformas antigênicas de *Dermatophagoides pteronyssinus* reconhecidas por anticorpos IgE e IgG1 em pacientes atópicos e não atópicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Juliana Silva Miranda

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Orientador

Prof. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva
Coorientadora

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Identificação de isoformas antigênicas de *Dermatophagoides pteronyssinus* reconhecidas por anticorpos IgE e IgG1 em pacientes atópicos e não atópicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Juliana Silva Miranda

Uberlândia, 24 de fevereiro de 2010.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso – UFTM

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi – ICBIM/UFU

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- R433i Miranda, Juliana Silva, 1983-
Identificação de isoformas antigênicas de *Dermatophagoides pteronyssinus* reconhecidas por anticorpos IgE e IgG1 em pacientes atópicos e não atópicos [manuscrito] / Juliana Silva Miranda. - 2010.
87 f. : il.
Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
Co-orientadora: Deise Aparecida de Oliveira Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Alergia - Teses. 2. *Dermatophagoides pteronyssinus* - Teses. 3. Eletroforese bidimensional - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Silva, Deise Aparecida de Oliveira. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616-056.3

À minha família

*“Sem a qual, as minhas possibilidades de concretização se tornam distantes e não tão
valorosas quanto deveriam ser...
Pois compartilhar as conquistas com os que amamos é que as tornam verdadeiras e
significantes e nos faz buscar novos sonhos a serem realizados.”*

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio têm qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa (1888-1935)

Agradecimentos

A DEUS pela oportunidade que me foi dada em realizar mais esta etapa de expressiva importância não só na minha formação profissional, mas também como crescimento pessoal;

À minha família....

Meus pais Eurípedes e Maria Aparecida, e ao meu irmão Rodrigo por me apoiarem sempre no decorrer da minha vida;

Aos professores Dr. Ernesto Akio Taketomi e Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva pela generosidade na orientação e nos ensinamentos transmitidos durante este período;

Aos professores Dra. Neide Maria da Silva, Dr. Cláudio Vieira da Silva e a Dra. Veridiana de Melo Rodrigues pelos comentários feitos no exame de qualificação;

Ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior e a Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso por disporem do seu tempo e terem aceitado compor a Banca Examinadora contribuindo para o aprimoramento do trabalho;

*Aos que já passaram e aos que ainda compõem o **Grupo da Alergia**: Rafael Resende, Karine Almeida, Leandro Ynoue, Priscila Moreira, Daniela Beraldo, Laura Fontes, Bia Acerbi, Ana Carolina Moraes, Isabella Siman, Jorge Carísio, Lucas Lago, Carolina Guimarães, Boscolli Pereira, Diego Miranda, Danielle Reis, Núbia Araújo, Ronaldo Alves, Gesmar Rodrigues, Cristiane Teixeira e Carlos Prudêncio. E também ao **Grupo da Imunoparasitologia**: Julliane Vargas, Ana Cláudia Pajuaba, Cristina Rostkowska, Gabriele Faria, Arlindo, Mariana de Resende, Silas, Carolina e Hercílio Higino. Pelos momentos compartilhados e também pela amizade e disponibilidade em auxiliar e a colaborar de maneira significativa com a realização do trabalho;*

Ao Prof. Dr. Adriano Mota Loyola pela disponibilização de equipamentos para a realização de parte dos experimentos, e também à Deborah e a Ângela pela atenção e colaboração;

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia e da Pós-graduação: Max, Marley, Zilda, Edilge, Lucileide e Lucélia pela atenção e auxílio de grande valia;

Aos colegas da turma de Pós-graduação: Nágilla, Lorena, Julliane, Guilherme, Daiane, Juliana Martins, Jaqueline, Nahyanne, Marcília, Loyane, Rosiane, Luiz, Paula, Gláucio pelos momentos vivenciados no decorrer deste período;

Às amigas Ana Luiza e Betânia pelos bons momentos vividos e por serem sempre motivadoras nas dificuldades vivenciadas desde o período de graduação;

Aos pacientes do ambulatório e a todos os outros voluntários pela atitude altruísta em aceitarem compor o estudo;

*A todos vocês deixo aqui os meus sinceros **AGRADECIMENTOS** pela colaboração na concretização de mais uma etapa de grande relevância na minha vida.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
A	Grupo de pacientes atópicos a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3 etilbenzotiazolino-6 sulfônico (2,2'- <i>azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i>)
APC	Célula apresentadora de antígeno
APS	Persulfato de amônia
BBS	Salina tamponada com borato
BSA	Soro albumina bovina
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
CD	Grupo de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>)
CDR	Região determinante de complementaridade
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DAB	3,3' - diaminobenzidina
DC	Célula dendrítica
Der f	Alérgeno de <i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
D.O.	Densidade óptica
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade do tipo I
g	Aceleração da gravidade
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos

HCl	Ácido clorídrico
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IE	Índice Elisa
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgD	Imunoglobulina da classe D
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgM	Imunoglobulina da classe M
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da classe G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina da classe G subclasse 2
IgG3	Imunoglobulina da classe G subclasse 3
IgG4	Imunoglobulina da classe G subclasse 4
IL	Interleucina
IPG	Gradiente de pH imobilizado
ISAAC	Estudo Internacional da Asma e Alergias na Infância (<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>)
I.U.I.S	União Internacional das Sociedades de Imunologia (<i>International Union of Immunology Societies</i>)
Mr	Massa molecular relativa
NA	Grupo de pacientes não atópicos a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ND	Não determinado
NPC2	Niemann-Pick C2
PBS	Solução salina tamponada com fostatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e leite desnatado em pó
PMSF	Fenilmetilsulfonil (<i>Phenylmethylsulfonyl</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

TBS	Solução salina tamponada com Tris
TCA	Ácido tricloroacético
TCP	Teste cutâneo de puntura
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
Treg	Linfócito T regulador
Tris	Hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Hidroximetil-aminometano contendo HCl
Tween 20	Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
W.H.O.	Organização Mundial da Saúde (<i>Organization Health World</i>)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características clínicas e demográficas dos pacientes incluídos no estudo. 53
- Tabela 2.** Comparação dos alérgenos hipotéticos de *Dermatophagoides pteronyssinus* reconhecidos por anticorpos IgE em pacientes atópicos e IgG1 em atópicos (A) e não atópicos (NA). 62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição taxonômica dos ácaros mais importantes na sensibilização alérgica, com ênfase para *D. pteronyssinus*. 24
- Figura 2.** Vista ventral dos espécimes: (1) larva, (2) ninfa e (3) fêmea adulta do ácaro *D. pteronyssinus*. Foto: Tai Soon Yong. Fonte: <<http://www.atlas.or.kr>> 25
- Figura 3.** Níveis de IgE e IgG1 ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) expressos em índice ELISA (IE) em soros de indivíduos atópicos (n = 80) e não atópicos (n = 50). As medianas são indicadas por barras horizontais e o limiar de positividade (IE = 1,2) pela linha tracejada. *** $P < 0,0001$ determinado pelo teste Mann-Whitney. 55
- Figura 4.** Eletroforese unidimensional (1D) e *immunoblotting* 1D do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp). (A) Linha 1, MW (padrão de peso molecular) em kDa ; linha 2, extrato bruto de Dp separado por SDS-PAGE (8-18%) sob condições não redutoras e corado por *Coomassie Brilliant Blue* coloidal G-250. As principais bandas com massa molecular relativa (M_r) em kDa estão indicadas à direita. (B) Reatividade de IgE nos soros (I a V) dos pacientes atópicos por *immunoblotting* 1D. (C) Reatividade de IgG1 nos soros (I a V) de pacientes atópicos (A) por *immunoblotting* 1D. (D) Reatividade de IgG1 nos soros (VI a X) de indivíduos não atópicos (NA) por *immunoblotting* 1D. 56
- Figura 5.** (A) Frequência (%) dos componentes do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) reconhecidos por IgE nos soros dos pacientes atópicos (n = 30) analisada por *immunoblotting* 1D. (B) Frequência (%) dos componentes do extrato de Dp reconhecidos por IgG1 nos soros de indivíduos atópicos (n = 30) e não atópicos (n = 30) analisada por *immunoblotting* 1D. A linha tracejada indica > 50% de reconhecimento (bandas imunodominantes). 57
- Figura 6.** Eletroforese bidimensional (2D) do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* e perfil de reatividade para IgE e IgG1 por *immunoblotting* 2D. (A) Gel 2D corado por *Coomassie Brilliant Blue* coloidal G-250 com análise do ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (MW) dos *spots* mapeados e indicados por números pelo software ImageMaster Platinum 7. (B) Perfil de reatividade para IgE em *pool* de cinco soros de pacientes atópicos por *immunoblotting* 2D. (C, D) Perfil de reatividade para IgG1 em *pool* de cinco soros de pacientes atópicos (A) e não atópicos (NA) por *immunoblotting* 2D. *Spots* indicados por círculos representam reatividade de IgE ou IgG1 e referem-se ao mapeamento na Fig. 6A. 60

CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 Introdução	17
1.1 Doenças alérgicas.....	18
1.1.1 Alergia e atopia	19
1.2 Alérgenos	20
1.2.1 Aeroalérgenos.....	22
1.3 Ácaros.....	23
1.3.1 Ácaros da poeira domiciliar	24
1.3.1.1 <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> e seus principais alérgenos	24
1.4 Resposta alérgica.....	28
1.4.1 Resposta celular.....	28
1.4.2 Resposta humoral	29
1.5 Diagnóstico da alergia.....	31
1.6 Imunoterapia alérgeno-específica	33
1.7 Identificação de isoformas antigênicas para aplicações laboratoriais.....	35
2 Objetivos.....	35
2.1 Objetivo geral.....	36
2.2 Objetivos específicos	36
3 Material e Métodos	37
3.1 Critérios éticos e seletivos	40
3.2 Teste Cutâneo de Puntura (TCP).....	41
3.3 Coleta de sangue.....	42
3.4 Obtenção dos extratos de ácaros	42
3.5 Dosagem protéica	43
3.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	43

3.6.1 Dosagem de IgE específica a <i>D. pteronyssinus</i>	43
3.6.2 Dosagem de IgG1 específica a <i>D. pteronyssinus</i>	45
3.7 Eletroforese unidimensional (1D) e <i>immunoblotting</i>	46
3.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 1D	46
3.7.2 <i>Immunoblotting</i> 1D	47
3.8 Eletroforese bidimensional (2D)e <i>immunoblotting</i>	48
3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 2D	48
3.8.2 <i>Immunoblotting</i> 2D	50
3.9 Análises estatísticas	51
3.10 Procedimentos de biossegurança	51
4 Resultados	50
4.1 Caracterização demográfica e clínica dos pacientes.....	53
4.2 Níveis de IgE e IgG1 ao extrato de Dp	54
4.3 Perfil de bandas e reatividade de IgE e IgG1 a alérgenos de Dp separados por 1D	55
4.4 Perfil de <i>spots</i> e reatividade de IgE e IgG1 a alérgenos de Dp separados por 2D	58
5 Discussão	60
6 Conclusão	67
Referências Bibliográficas	69
Anexos	82
AnexoA	83
Anexo B	84
Anexo C.....	85
Anexo D.....	87

RESUMO

O ácaro da poeira domiciliar *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) é uma das principais fontes de alérgenos intradomiciliar em todo o mundo, e por isto considerado importante na sensibilização de indivíduos predispostos geneticamente. Alguns alérgenos deste ácaro podem ocorrer como isoalérgenos diferenciando na sequência dos aminoácidos ou mesmo no padrão de glicosilação, o que pode causar diferenças na sensibilização alérgica. O objetivo do presente trabalho foi investigar novos antígenos imunodominantes com potencial aplicabilidade no diagnóstico laboratorial e monitoramento de indivíduos atópicos sob imunoterapia alérgeno-específica. Para isto, o extrato de Dp foi separado por eletroforese bidimensional (2D) com subsequente *immunoblotting* para detecção de componentes ligantes de IgE e IgG1 específica. O *pool* de soros testado no *immunoblotting* 2D foi escolhido a partir de um painel de soros positivos a alérgenos de Dp determinados por *immunoblotting* 1D para IgE e IgG1 específica em pacientes atópicos (A) e IgG1 em indivíduos não atópicos (NA), grupos estes definidos por teste cutâneo de puntura (TCP) e níveis específicos de IgE e IgG1 determinados por ELISA. Os níveis de IgE a Dp bem como a soropositividade foram maiores em atópicos (mediana IE = 3,8; 100%) do que em não atópicos (mediana IE = 0,7; 0%) ($P < 0,0001$), enquanto níveis de anticorpos IgG1 específicos a Dp não mostraram diferença significativa entre os grupos (mediana IE = 2,9; 84% *vs* mediana IE = 2,5; 86%). Os principais alérgenos ligantes de IgE determinados por *immunoblotting* 1D foram as bandas de 15 kDa, 60 kDa e 103 kDa, enquanto os principais alérgenos ligantes de IgG1 foram as bandas >56 kDa. A eletroforese 2D do extrato de Dp mostrou uma resolução de mais de 70 *spots* na faixa de ponto isoelétrico (pI) 3-10 e massa molecular 11-110 kDa. O *immunoblotting* 2D revelou diferenças nos padrões de ligação de IgE e IgG1, com vários *spots* reconhecidos por anticorpos IgE entre 15 e 103 kDa (pI 5,1-8,0). A reatividade de IgG1 no grupo A foi observada principalmente aos *spots* mais fortemente reconhecidos na faixa de maior massa molecular (70-103 kDa) e menor pI 5,1-6,6. Para a reatividade de IgG1 no grupo NA, os *spots* mais fortemente reconhecidos foram observados entre 85-103 kDa (pI 5,1-5,8). Assim, a eletroforese 2D com a subsequente realização do *immunoblotting* permitiu a identificação de isoalérgenos específicos reconhecidos por diferentes isotipos de anticorpos em atópicos e não atópicos, o que pode contribuir de maneira relevante no desenvolvimento de potenciais candidatos para uso em diagnóstico e também no monitoramento do níveis de IgE e IgG1 específicos de pacientes alérgicos sob imunoterapia.

Palavras-chave ácaro da poeira domiciliar, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *immunoblotting* bidimensional, alergia.

ABSTRACT

The house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) is a major source of indoor allergens in the world and considered important for sensitization of genetically predisposed subjects. Some allergens from this mite can occur as isoallergens with differences in amino acid sequences or glycosylation, leading to differences in allergenic sensitization. The aim of this study was to investigate new immunodominant antigens with potential application for the laboratorial diagnosis and monitoring of atopic patients under allergen-specific immunotherapy. Dp extract was separated by two-dimensional (2D) electrophoresis with subsequent immunoblotting for determination of specific IgE and IgG1 binding components. Pooled human sera tested in 2D immunoblotting were chosen from a panel of sera positive to Dp allergens determined by 1D immunoblotting for specific IgE and IgG1 in atopic patients (A) and IgG1 in non-atopic subjects (NA). Patients were selected by skin prick test (SPT) and levels of specific IgE and IgG1 by ELISA. Levels of IgE to Dp and seropositivity were higher in atopics (median EI = 3.8; 100%) than non-atopics (median EI = 0.7; 0%) ($P < 0.0001$), while levels of Dp-specific IgG1 showed no significant difference between the groups (median EI = 2.9; 84% *vs* median EI = 2.5; 86%). The major IgE-binding components determined by 1D immunoblotting were the 15 kDa, 60 kDa and 103 kDa bands, and the major IgG1-binding allergens were bands >56 kDa. 2D gel electrophoresis of Dp extract showed a resolution of more than 70 spots throughout the separation range of isoelectric point (pI) 3-10 and molecular size of 11-110 kDa. 2D immunoblotting revealed differences in IgE- and IgG1-binding patterns, with several spots recognized by IgE antibodies ranging from 15 to 103 kDa and pI 5.1-8.0. For IgG1 reactivity in atopic patients, strongly recognized spots were observed at ranges of higher molecular masses (70-103 kDa) and lower pI (5.1-6.6). For IgG1 reactivity in non-atopic subjects, the most strongly recognized spots were observed ranging from 85 to 103 kDa (pI 5.1-5.8). 2D electrophoresis with subsequent immunoblotting allowed the identification of specific isoallergens recognized by different antibody isotypes in atopic and non-atopic subjects. This information can be used to improve the development of potential candidates for using in diagnostic as well as in monitoring of the levels of specific IgE and IgG1 in atopic patients under immunotherapy.

Keywords house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, two-dimensional immunoblotting, allergy.

1 Introdução

1.1 Doenças alérgicas

São há muito tempo conhecidas, descritas já na China antiga e também na literatura grega (SIMONS, 1994). Na sociedade moderna, especialmente nas últimas décadas têm assumido papel de significativa importância não só devido ao expressivo aumento na incidência alcançando níveis epidêmicos nos países desenvolvidos, mas também pelo impacto que provocam tanto na qualidade de vida devido à cronicidade que as mesmas apresentam, bem como no âmbito socioeconômico devido aos custos na assistência médica e perdas devido às faltas no trabalho e escola (MASOLI et al., 2004).

Doenças alérgicas referem-se a diferentes respostas sintomáticas a antígenos ambientais normalmente inócuos. Diversas delas podem ser elencadas diferindo quanto ao mecanismo imunológico envolvido bem como a fonte antigênica responsável pelo desencadeamento. Diante disto, muito se tem conjecturado a respeito das condições de exposição aos alérgenos no desencadeamento das respostas alérgicas, e como certos alérgenos têm a propriedade de levar a estas respostas e não a uma resposta imunológica tolerogênica (TRAIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009).

Pesquisas têm demonstrado que exposição a potenciais alérgenos na primeira infância ou mesmo durante a gravidez tem um papel central no desenvolvimento de doenças alérgicas (HOLGATE; POLOSA, 2008). Contrário a isto, uma ação protetora tem sido mostrada por diferentes estudos que sugerem fortemente que a exposição a agentes microbianos durante a primeira infância protege contra doenças alérgicas (STRACHAN, 1989; BRAUN-FAHRLANDER et al., 2002). Subseqüentes pesquisas têm sido realizadas visando desvendar esses possíveis mecanismos que levam à proteção. Tem-se demonstrado que agentes microbianos ativam receptores da imunidade inata nas células apresentadoras de antígenos durante concomitante exposição aos alérgenos e induzem respostas alérgeno-específicas Th1 ou via células T regulatórias (Tregs) como fator adjuvante para proteger o hospedeiro da sensibilização alérgica e desenvolvimento de doenças alérgicas (KAISHO; AKIRA, 2002).

É sabido que o microambiente e o estilo de vida contemporâneo contribuem significativamente para o desenvolvimento destas doenças, uma vez que a permanência das pessoas por várias horas em ambientes domésticos, escolares ou ocupacionais, nos quais está presente a maioria dos potenciais alérgenos implica em maior sensibilização dos indivíduos (PLATTIS-MILLS et al., 1997; PERFETTI et al., 2004; HESSELMAR et al., 2005).

Assim, destaca-se uma conjunção de fatores que levam ao desenvolvimento e ao aumento da prevalência de doenças alérgicas, resultado de uma interação de predisposição genética e exposição aos alérgenos, e também a provável associação de alguns cofatores como influência psico-social, diminuição da estimulação do sistema imune (hipótese da higiene), poluição ambiental dentre outros, os quais podem contribuir de maneira relevante no desencadeamento das respostas alérgicas (RING et al., 2001; BARNES; MARSH, 1998).

1.1.1 Alergia e atopia

O termo alergia foi empregado primeiramente por Clemens von Pirquet juntamente com Béla Schick em 1906, os quais estudaram a doença do soro. Von Pirquet sugeriu o termo alergia de “*allos*” significando “outro” ou uma derivação do estado original e “*ergon*” que significa reação (SIMONS, 1994). Atualmente o mesmo é empregado como sinônimo de hipersensibilidade imediata, e é utilizado para designar uma reação desencadeada por mecanismos imunológicos mediados por anticorpos, particularmente o isotipo IgE, e por células responsáveis pelas manifestações clínicas devido à exposição a um determinado estímulo em dose tolerada por indivíduos saudáveis (JOHANSSON et al., 2004).

A atopia, designação esta provinda da palavra “*atopos*” de origem grega significando “estranho”, representa uma predisposição genética de certos indivíduos para a síntese de IgE específica a componentes protéicos de alérgenos ambientais (HOLGATE; POLOSA, 2008). Os indivíduos que respondem aos estímulos

provocados pela exposição a diferentes alérgenos, por meio da produção de altos níveis de IgE são designados atópicos (JOHANSSON et al., 2004).

Diversas doenças alérgicas podem ser listadas como dermatite atópica, eczema, rinite, asma dentre outras, sendo que as respiratórias como a asma e a rinite se destacam devido ao considerável aumento da prevalência nos últimos 20-30 anos com taxas variando de 5% a 30% em países industrializados (ISAAC, 1998; SLY, 1999, HOLGATE; POLOSA, 2008; ASHER et al., 2006). A rinite alérgica é definida clinicamente como uma doença sintomática das vias aéreas superiores induzida por inflamação mediada por IgE, posteriormente à exposição da membrana da mucosa nasal ao alérgeno (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001). Caracteriza-se por rinorréia, obstrução nasal, espirros e prurido nasal, sintomas estes reversíveis espontaneamente ou sob tratamento, podendo ser subdividida em intermitente e persistente (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001).

Em contrapartida, a asma é caracterizada como inflamação das vias aéreas inferiores levando a um quadro clínico caracterizado por reatividade exacerbada dos brônquios acarretando sintomas como dispnéia, tosse e sibilância (LEMANSKE; BUSSE, 2003). A maioria dos genes inicialmente encontrados associados com a asma participam na síntese de IgE, inflamação alérgica e/ou hiper-reatividade das células e órgãos evidenciando assim a importância do fator genético no desenvolvimento de doenças alérgicas (MARSH et al., 1994, OBER; HOFFJAN, 2006). Neste sentido, Weidinger e colaboradores (2008) demonstraram que a presença de polimorfismos no gene RAD50, encontrado no cromossomo 5q31 está ligado a um risco aumentado para o desenvolvimento da alergia, sendo que o *locus* gênico FCER1A estaria relacionado os níveis totais de IgE.

Os estímulos responsáveis pelas manifestações clínicas da alergia se dão especialmente contra componentes de origem protéica estranhos ao organismo, comumente conhecidos como alérgenos (HUBY; DEARMAN; KIMBER, 2000).

1.2 Alérgenos

São designados como alérgenos todos os antígenos com capacidade de induzir e reagir com anticorpos IgE específicos, verdade esta que tem sido desvelada com o conhecimento mais aprofundado dos mesmos, sobretudo das características estruturais destes componentes alergênicos (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001). Nesse sentido pesquisas têm revelado algumas características presentes em muitos alérgenos como glicosilação, atividade enzimática e resistência à proteólise, contudo mais estudos são necessários para definir outras propriedades estruturais presentes nos alérgenos de maneira geral (HUBY; DEARMAN; KIMBER, 2000).

Os alérgenos são representados principalmente por componentes protéicos, entretanto algumas biomoléculas ligadas a tais componentes como os carboidratos podem também ter relevância na sensibilização alergênica, o que tem sido demonstrado pela avaliação da imunogenicidade da porção glicídica de muitas proteínas glicosiladas, salientando a importância dos epítomos de origem glicosídica, e não só os de origem peptídica na geração de respostas pelo sistema imunológico (FÖTISCH; VIETHS, 2001). Trabalhos conduzidos no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU, realizados por Almeida e colaboradores (2006) e Alves e colaboradores (2008) revelaram a importância das frações glicosiladas do ácaro *Blomia tropicalis* isoladas por Concanavalina A frente a soros de pacientes alérgicos ao mesmo, demonstrando alta reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4, comparada aos indivíduos não alérgicos.

Os epítomos são regiões presentes na molécula antigênica que têm a propriedade de se ligarem às regiões determinantes de complementaridade (CDRs) dos anticorpos específicos, podem se apresentar conformacionalmente quando os aminoácidos estão separados na cadeia polipeptídica de forma que o dobramento possibilita espacialmente a ligação, ou também linearmente quando as sequências de aminoácidos estão contíguas (LAVER et al., 1990; SELA, 1969; CRAMERI, 2003).

Com o crescente conhecimento sobre os alérgenos, fez-se necessário a criação de uma nomenclatura padronizada de maneira a possibilitar a organização das informações presentes no meio científico, a qual foi viabilizada pelo Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos regulado pela União Internacional das Sociedades de

Imunologia (I.U.I.S.) e também pela Organização Mundial da Saúde (W.H.O.). Sendo assim, foi determinado que a designação dos alérgenos fosse representada pelas três primeiras letras do gênero ao qual o organismo pertence juntamente com a primeira letra da espécie e o número correspondente à ordem cronológica de descoberta (KING et al., 1995).

Com o aprofundamento sobre o conhecimento dos principais alérgenos das mais relevantes fontes alergênicas, a identificação e sobretudo a caracterização dos alérgenos purificados tem demonstrado a variação existente para um mesmo alérgeno, a qual pode ser resultado da modificação pós-traducional ou de diferenças na estrutura primária, o que resulta em isoformas (VAN REE, 2002). Diante disto, há a possibilidade de determinado alérgeno apresentar-se sob múltiplas formas moleculares, as quais podem compartilhar entre si ampla reatividade cruzada, designados assim de isoalérgenos, os quais são abarcados pela nomenclatura atual recomendada acrescentando-se o número correspondente ao isoalérgeno após o número do alérgeno (CHAPMAN et al., 2007).

Na tentativa de unificação para que uma determinada proteína seja designada como alérgeno e nomeada segundo os critérios definidos, preconiza-se que a mesma se ligue à IgE de 5% dos soros de pessoas com alergia a ácaro da poeira domiciliar, o que é crítico para conhecer a importância relativa dos diferentes alérgenos (THOMAS et al., 2007).

1.2.1 Aeroalérgenos

Os alérgenos estão amplamente distribuídos no ambiente, uma vez que fazem parte da composição de diversos organismos, sejam eles pertencentes ao Reino das Plantas, dos Animais ou mesmo dos Fungos. No ambiente, seja extra ou intradomiciliar há a presença de muitos alérgenos transportados pelo ar, por isto é a eles atribuída a designação de aeroalérgenos.

Diversas são as fontes dos quais os aeroalérgenos podem provir, podem estar presentes no ambiente extradomiciliar como, por exemplo, os grãos de pólen

especialmente os oriundos de gramíneas, contudo os principais aeroalérgenos caracterizados originam-se principalmente de fontes domiciliares com destaque para os animais domésticos (gatos e cães), baratas, alguns fungos e ácaros da poeira domiciliar (SAVOLAINEN; VIANDER; KOIVIKKO, 1990).

1.3 Ácaros

Acari é uma ordem representada por um amplo número de espécies de ácaros que ocupam grande variedade de nichos. Dentre as subordens, a Astigmata é a mais importante comparada às outras uma vez que cerca de 50% das espécies pertencentes à mesma são parasitas de pássaros e mamíferos, tendo assim hábitos nidícolas pela facilidade em se alimentar de debris (restos de pele e pena) deixados nestes ambientes (ARLIAN; MORGAN, 2003).

Os ácaros são animais de tamanho entre 0,1 a 0,6 mm de comprimento, ciclo de vida com metamorfose completa (holometábolo) passando pelos estágios de ovo, larva, protoninfa, tritoninfa e adulto. O período de desenvolvimento de ovo a adulto pode sofrer variações de acordo com a espécie e também devido às condições abióticas, as quais influenciam fortemente na dinâmica da população sendo a umidade e a temperatura os fatores mais preponderantes (ARLIAN; RAPP; AHMED, 1990; DE BOER, 1998; PIKE; CUNNINGHAM; LESTER, 2005).

A disseminação destes animais de seus principais locais de reprodução para uma variedade de lugares onde se estabelecem e nos quais podem desenvolver é extremamente fácil devido ao pequeno porte que apresentam (ARLIAN; MORGAN, 2003). Associado a este fator, a interferência antrópica no ambiente natural destes animais promoveu a dispersão e adaptação de algumas espécies a ambientes urbanizados devido à presença de condições necessárias à sobrevivência como alimento e água, passando assim a viverem em microhabitats nos ambientes domiciliares.

1.3.1 Ácaros da poeira domiciliar

A poeira domiciliar é constituída por diversas partículas em suspensão oriundas de fibras vegetais, fibras de carpetes, partículas de móveis estofados, areia, terra, peças do vestuário, escamações humana e de animais domésticos, restos alimentares, resíduos químicos, micro e macro-organismos. Dentre estes organismos podem ser encontrados bactérias, vírus, algas, fungos, insetos e outros artrópodes como ácaros da poeira (LEDFORD, 1994). Desta forma, tapetes, colchões e móveis estofados são os principais lugares de onde provêm os ácaros encontrados na poeira, devido à disponibilidade de alimento existente, o que favorece a sobrevivência destes organismos (ARLIAN; MORGAN, 2003).

Ácaros da poeira domiciliar são reconhecidos como uma das mais comuns causas de alergia em todo o mundo, aos quais mais de 50% dos pacientes alérgicos são sensibilizados (PLATTS-MILLS; WECK, 1989, ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001; TOVEY; CHAPMAN; PLATTS-MILLS, 1981). Dentre as famílias destacam-se Glycyphagidae, Acaridae, Pyroglyphidae e Echimyopodidae (ARLIAN; PLATTS-

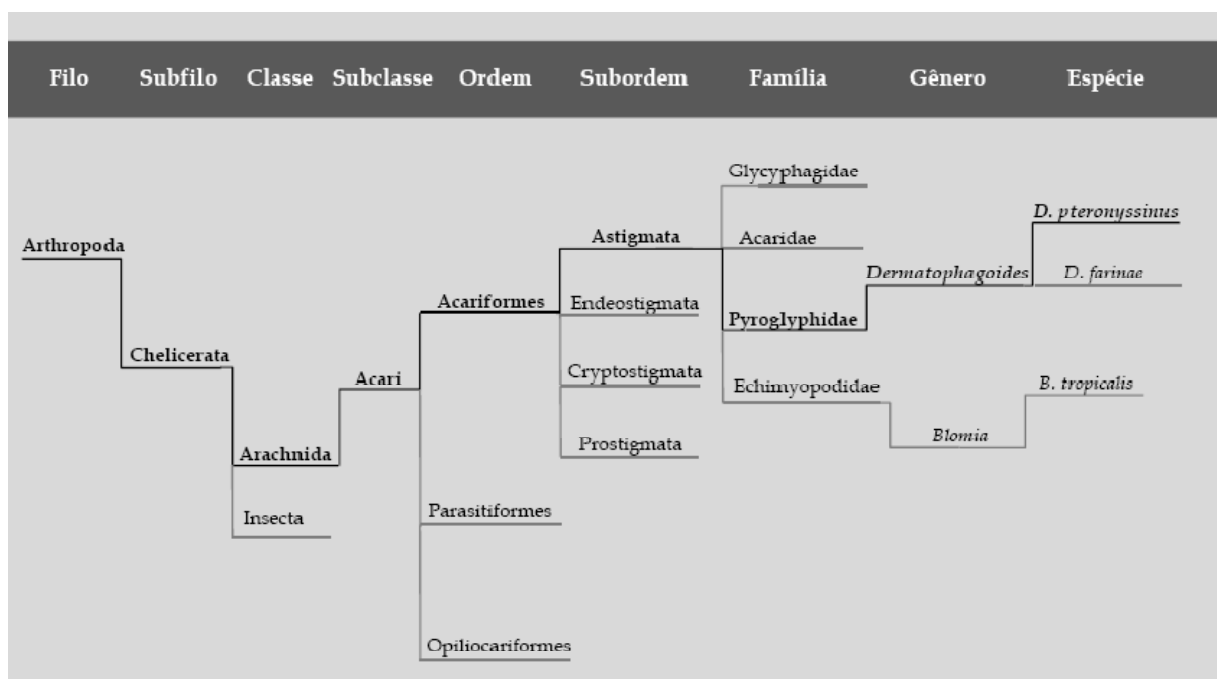


Figura 1. Distribuição taxonômica das espécies mais importantes na sensibilização alérgica, com ênfase para *Dermatophagoides pteronyssinus*. Adaptado de: Arlian e Morgan (2003), Dabert e colaboradores (2010).

MILLS, 2001; ARLIAN; MORGAN, 2003; FERNANDEZ-CALDAS, 1997). De acordo com Platts-Mills e colaboradores (1992) e Arruda e Chapman (1992) a família Pyroglyphidae engloba as espécies mais relevantes da poeira domiciliar em todo o mundo, cuja classificação taxonômica está ilustrada pela Figura 1.

A importância das espécies *Dermatophagoides pteronyssinus*, Trouessart 1897, e *Dermatophagoides farinae*, Hughes 1961, pertencentes à família Pyroglyphidae se deve não apenas à potencialidade alergênica intrínseca destas espécies, mas também devido à ampla distribuição das mesmas em regiões com diferentes climas, como o temperado e tropical, na qual coexistem com o ácaro da família Echimyopodidae, *Blomia tropicalis*, também relevante na sensibilização alergênica (ARRUDA et al., 1991; GELLER; ESCH; FERNANDEZ-CALDAS, 1993). Ressalta-se o fato que *D. pteronyssinus* é mais difundido comparado a *D. farinae*, o qual predomina em regiões com baixa umidade relativa (THOMAS; HALES, 2007).

1.3.1.1 *Dermatophagoides pteronyssinus* e seus principais alérgenos

O nome *Dermatophagoides* utilizado na designação do gênero denota que se alimenta de pele, e o nome específico *pteronyssinus* tem em sua etimologia o sentido de amante de pena, reportando assim tanto a dieta como o hábito de vida primeiro deste ácaro antes de se tornar associado aos ambientes habitados por humanos (ARLIAN, 1999).

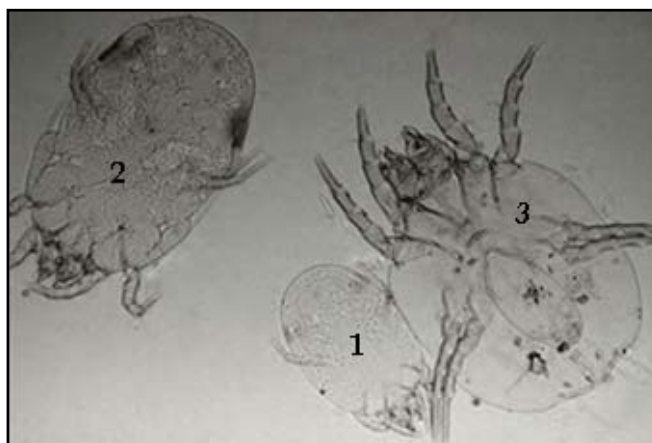


Figura 2. Vista ventral dos espécimes: (1) larva, (2) ninfa e (3) fêmea adulta do ácaro *D. pteronyssinus*. Foto: Tai Soon Yong. Fonte: <<http://www.atlas.or.kr>>

Esta espécie tem sido amplamente estudada devido à sua forte ligação com a sensibilização dos indivíduos, evidenciando assim o papel que possuem no desencadeamento de doenças alérgicas especialmente rinite e asma em pessoas geneticamente predispostas (PLATTS-MILLS et al., 1997, VOORHORST et al., 1967; VAN BRONSWIJK; SINHA, 1971). Afirmação esta que tem sido confirmada por diferentes estudos epidemiológicos que reportam este ácaro como o principal agente alergênico em vários países como Holanda, Reino Unido, Austrália, Japão e Brasil (PLATTS-MILLS, 2003).

No Brasil, similares pesquisas têm corroborado estes dados em diferentes regiões. Em estudo conduzido por Arruda e colaboradores (1991) na cidade de São Paulo foi avaliado tanto a exposição quanto a sensibilização de crianças asmáticas, o que revelou altos níveis de alérgenos do ácaro *D. pteronyssinus* por grama de poeira com destaque para os dois principais grupos (Der p 1 e Der p 2) em 90% das residências, bem como altos níveis de IgE específica em 95% das crianças incluídas no estudo. Com este mesmo propósito, Terra e colaboradores (2004) avaliaram o grau de exposição à alérgenos da poeira domiciliar em Uberaba e constataram que *D. pteronyssinus* era a espécie mais frequente nas amostras analisadas.

O ácaro *D. pteronyssinus* apresenta diversas proteínas com capacidade alergênica, algumas proteínas já são bem caracterizadas e organizadas em grupos definidos segundo parâmetros de identidade bioquímica, homologia e peso molecular. Desde a caracterização do primeiro alérgeno denominado P1 por Chapman e Platts-Mills (1980) têm sido crescente o número de alérgenos descobertos, atualmente pelo menos 18 grupos de alérgenos de *D. pteronyssinus* já foram caracterizados, sendo quinze grupos oficialmente descritos e listados pelo Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos, e três outros grupos descritos por Lorenz e colaboradores (2009) e O'Neil e colaboradores (2006), representados no Quadro 1.

Dos grupos de alérgenos de *D. pteronyssinus*, Der p 1 e Der p 2 são as proteínas alergênicas mais importantes, não só devido às altas concentrações destas na poeira mas também devido aos altos níveis de IgE específica às mesmas presente nos indivíduos alérgicos (PLATTS-MILLS et al., 1992). Chapman e colaboradores (1983) na avaliação da sensibilização de pacientes alérgicos, confirmou que 70-80% dos

mesmos possuem anticorpos IgE específicos ao alérgeno Der p 1, um dos principais alérgenos reconhecidos por pacientes sensibilizados a ácaros da poeira.

Alérgeno	Isoformas	Massa molecular relativa (kDa)	Identidade bioquímica
Der p 1	Der p 1.0101 - Der p 1.0124	24	Cisteína protease
Der p 2	Der p 2.0101 - Der p 2.0115	15	Família NPC2
Der p 3	Der p 3.0101	31	Tripsina
Der p 4	Der p 4.0101	60	Alfa amilase
Der p 5	Der p 5.0101 e Der p 5.0102	14	ND
Der p 6	Der p 6.0101	25	Quimiotripsina
Der p 7	Der p 7.0101	26, 30 e 31	ND
Der p 8	Der p 8.0101	27	Glutathione S-transferase
Der p 9	Der p 9.0101 e Der p 9.0102	29	Serina protease collagenolítica
Der p 10	Der p 10.0101 - Der p 10.0103	36	Tropomiosina
Der p 11	Der p 11.0101	103	Paramiosina
Der p 13*	-	15	Proteína ligante de ácido graxo
Der p 14	Der p 14.0101	177 (variável)	Apolipoforina
Der p 15*	-	63-105	Quitinase
Der p 18*	-	60	Quitinase
Der p 20	Der p 20.0101	40	Arginina quinase
Der p 21	Der p 21.0101	16	ND
Der p 23	Der p 23.0101	14	Função desconhecida, homologia ao domínio A da peritrofina

Quadro 1. Listagem dos grupos de alérgenos de *D. pteronyssinus* de acordo com a identidade bioquímica. Segundo: *Subcomitê de Nomenclatura dos alérgenos I.U.I.S. (www.allergen.org)*, *Lorenz e colaboradores (2009)*, *O'Neil e colaboradores (2006)* e *Allergome (www.allergome.com)*. *Alérgenos não presentes na lista oficial da I.U.I.S. NPC2, Niemann-Pick C2; - , não existente; ND, não determinado.

Em trabalho realizado por Smith e colaboradores (1998) em um grupo de crianças do estado do Novo México e da Virgínia nos EUA, foi verificado altos índices de sensibilização (90%) ao antígeno do grupo 2 (Der p 2). A relevância na

sensibilização de indivíduos a outros alérgenos como Der p 3, 5, 6, 7 e 8 tem também sido avaliada por Thomas e colaboradores (2002) que encontraram 50% dos indivíduos sensibilizados a estes componentes, apresentando índices variáveis de IgE.

Estudos dos grupos 11, 14, 15 e 18, os quais apresentam maiores pesos moleculares também tem revelado altos índices (54%-80%) de ligação à IgE, contudo as concentrações dos mesmos encontradas nos extratos apresentam variações devido aos diferentes métodos de obtenção dos extratos, mais ressalta-se o fato que alérgenos presentes em baixas concentrações podem induzir altos títulos de anticorpos IgE (THOMAS; SMITH; HALES, 2004; LEE et al., 2004; O'NEIL et al., 2006). Além disso, polipeptídeos pertencentes a outros grupos não alergênicos, considerados por isto não tão relevantes podem ser altamente imunogênicos, e podem induzir um balanço na resposta de citocinas Th1/Th2 (EPTON et al., 2002).

1.4 Resposta alérgica

1.4.1 Resposta celular

O balanço dos distintos tipos de células T *helper* (Th) 1 e 2 com seus perfis de citocinas próprios sustenta a manutenção da homeostase do sistema imune, uma vez que a desregulação do balanço entre Th1 e Th2 leva a uma excessiva ativação de células Th1 ou Th2 que culmina no desenvolvimento de doenças autoimunes associadas com a exacerbação da ativação de células Th1 ou indução de doenças alérgicas devido a um desvio para o perfil Th2 (OBOKI et al., 2008).

A manifestação da resposta alérgica ocorre pela predominância da via celular Th2. A entrada de alérgenos por meio do tecido epitelial do trato respiratório como evento inicial da resposta é sucedido pelo processamento dos mesmos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais, com destaque para as células dendríticas (DCs), que apresentam os peptídeos via MHC classe II para as células T *naive* direcionando assim para o perfil celular Th2, no qual o fator de transcrição

GATA 3 medeia a produção e a secreção de citocinas (HOLGATE; POLOSA, 2008).

Além da apresentação dos peptídeos antigênicos, há ainda a necessidade da coestimulação das células T para que haja um aumento na expressão dos genes codificados no cromossomo 5q31-33 ligados à codificação de IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), característicos do perfil Th2 (COUSINS; LEE; STAYNOV, 2002). Citocinas estas envolvidas diretamente no *switch* de classe das células B para a síntese de IgE (IL-4 e IL-13), maturação de eosinófilos (IL-3, IL-5 e GM-CSF) e basófilos (IL-3 e IL-4), as quais são as principais células efetoras secretoras de mediadores da resposta alérgica (HOLGATE; POLOSA, 2008).

Mais recentemente um novo perfil de resposta tem sido relacionado às doenças alérgicas, designado de Th17, sendo que o desenvolvimento das células deste perfil está diretamente ligado ao fator de transcrição ROR γ t e consequente produção de um padrão de citocinas diferenciado (IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26), o que indica um perfil de células T *helper* complementar. Este processo pode ser desencadeado pela interação da IL-1 β mais IL-6 ou IL-1 β mais IL-23, acarretando assim a ativação de mecanismos intracelulares e então a produção das citocinas ligadas a este perfil (OBOKI et al., 2008). Estudos têm confirmado o aumento da IL-17 nos pulmões, escarro, lavado broncoalveolar e também em soro de indivíduos asmáticos. Desta forma, os níveis de IL-17 têm sido correlacionados com a gravidade da doença corroborando assim o envolvimento da IL-17 na patogênese da asma, especialmente a IL-17F (WONG et al., 2001).

A citocina IL-17F é capaz de induzir várias citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão nas células epiteliais brônquicas, células endoteliais das veias, fibroblastos e eosinófilos. A IL-17F, derivada de vários tipos celulares como as células Th17, mastócitos e basófilos mostra um amplo padrão de expressão, incluindo o pulmão. Estudos revelam que a superexpressão do gene da IL-17F nas vias aéreas de camundongos está associada com a neutrofilia das vias aéreas, indução de muitas citocinas, aumento na reatividade das vias aéreas e hiper-secreção de muco. Assim, IL-17F tem um papel crucial na inflamação alérgica das vias aéreas, e desta forma importante implicação terapêutica na asma (KAWAGUCHI et al., 2009).

1.4.2 Resposta humoral

Em 1967 uma nova classe de globulina responsável pela reação cutânea foi identificada pelo casal Ishizaka, chamando-a de globulina gama E, denominação esta oriunda da reação de eritema observada (SIMONS, 1994). Desta forma, as classes de imunoglobulinas totalizaram cinco: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE.

A molécula IgE possui a mesma estrutura molecular apresentada pelas outras classes de anticorpos, com duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas também idênticas, diferem apenas em relação à presença de um domínio a mais na cadeia pesada ϵ comparada à cadeia pesada γ da molécula de IgG (GOULD; SUTTON, 2008).

Os níveis séricos de IgE específica apresentam-se em baixas concentrações em indivíduos normais, mas em indivíduos atópicos além dos mastócitos e eosinófilos apresentarem um maior número de receptores para IgE, há um aumento da produção de IgE pelas células B por meio da IL-4 e IL-13 produzidas pelas células Th2, com isto mais moléculas de IgE se ligam aos receptores de IgE (Fc ϵ RI) presentes nos mastócitos e eosinófilos. Diante de novas exposições aos antígenos ocorre a ligação cruzada dos mesmos pelas moléculas de IgE previamente ligadas aos Fc ϵ RI desencadeando a liberação de mediadores pré-formados como a histamina e leucotrienos o que leva aos sintomas característicos da alergia (RAVETCH; KINET, 1991).

A intensidade da resposta imune a alérgenos é decisiva no desenvolvimento de uma condição alérgica sabidamente mediada por IgE, ou de uma condição saudável. Outras classes de anticorpos têm sido analisadas frente a esta variação de resposta, como IgA e as subclasses de IgG (BATARD et al., 1993; BATARD et al., 2006; JACKOLA et al., 2002). Esta classe de imunoglobulina apresenta subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) estabelecidas e nomeadas de acordo com a cronologia do descobrimento, sendo elas produto da duplicação do gene da imunoglobulina G segundo Flanagan e Rabbitts (1982), sendo a IgG1 a mais abundante (>50%) comparada às outras subclasses (AALBERSE et al., 2009).

Em indivíduos saudáveis, a resposta de células B a alérgenos provenientes de

ácaros da poeira domiciliar varia entre ausência de resposta, ou produção predominantemente de anticorpos IgG alérgeno-específicos, IgG1 ou IgG4, na presença ou ausência de baixas concentrações de IgE, já em indivíduos alérgicos além da detecção de altos níveis de IgE pode ser também detectados níveis de IgG, sendo que os níveis de IgG1 são similares aos de indivíduos saudáveis, diferente de IgG4 (AKDIS, 2006; KENEMY et al., 1989).

Aalberse e colaboradores (2009) ressalta que a presença de anticorpos da subclasse IgG1 é acentuada em respostas antimicrobianas geralmente regidas pelo perfil Th1, o que tem sido também demonstrado para a produção de anticorpos IgG1 a antígenos associados a respostas alérgicas suscitada por um *milieu* Th1, em especial IFN γ . Altas doses de alérgenos podem favorecer a indução de uma resposta do tipo Th1, e alguns estudos com aeroalérgenos sugerem que a exposição ao alérgeno pode favorecer tolerância imunológica (SECRIST; DEKRUYFF; UMETSU, 1995; PERZANOWSKI et al., 2002)

Dentre as funções desempenhadas pela subclasse IgG1 está a potencialidade de agir como bloqueadora via competição direta por compartilharem a mesma especificidade a epítomos ligantes de IgE (DEVEY; WILSON; WHEELER, 1976; BOLUDA; CUADRA; BERRENS, 1996).

1.5 Diagnóstico da alergia

O diagnóstico da alergia é baseado na história típica de sintomas alérgicos associado aos testes diagnósticos. Testes estes que podem ser *in vivo* (testes cutâneos de punção ou intradérmico) e/ou *in vitro*, ambos direcionados à detecção de IgE circulante ou ligada às células, e são de grande relevância pois possibilita a identificação da sensibilização de pacientes a um painel de alérgenos, constituindo assim ferramentas importantes na rotina clínica (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001).

Dentre os testes cutâneos, o teste de pele baseado na hipersensibilidade imediata, conhecido como teste cutâneo de punção (TCP) é amplamente empregado,

uma vez que demonstra a reação alérgica mediada por IgE, sendo por isto a principal ferramenta diagnóstica utilizada na prática clínica. É um método simples, de rápida execução e seguro devido às pequenas quantidades de alérgeno necessárias para o teste, quando comparado a outros testes cutâneos como o intradérmico (TURKELTAPUCB; ERGENP, 1989; DREBORG, 1989; (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001). O TCP apresenta a vantagem de ser mais econômico quando comparado a testes *in vitro*, nos quais é realizada a determinação da IgE sérica. Apesar do TCP não diagnosticar a doença alérgica, apenas determinar a presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos importantes na patogênese da doença alérgica, há um alto grau de relação entre os sintomas e o desafio provocativo utilizado no TCP (OWNBY, 1988).

Ambos os métodos *in vivo* (TCP e intradérmico) dependem da apresentação do alérgeno à IgE alérgeno-específica ligada aos receptores de IgE na superfície dos mastócitos residentes na pele. Com a ligação de uma quantidade suficiente de IgE aos receptores e então aos alérgenos, há a agregação dos complexos na superfície celular e assim via mecanismos intracelulares há a liberação de mediadores pré-formados e síntese e liberação de outros mediadores. A presença de mediadores vasoativos leva à formação de eritema e edema local. A histamina, o mediador mais prevalente causa coceira no local da puntura, juntamente com vasodilatação e extravasamento plasmático, o que produz a pápula (WILLIAMS, 2008).

Os testes *in vitro* são preferencialmente utilizados quando os pacientes não podem ser submetidos ao teste cutâneo em virtude da presença de lesões cutâneas, ingestão de medicamentos ou história de possível anafilaxia. Um resultado positivo, assim como nos testes cutâneos, não é suficiente para o diagnóstico, é necessário ter associação com a clínica do paciente.

Contudo, é sabido que tanto doenças alérgicas quanto parasitárias dentre outros fatores levam ao aumento dos níveis de IgE total no soro. Diante disto, a mensuração de IgE total não é um bom valor preditivo como ferramenta diagnóstica da alergia, sendo assim relevante determinar os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos, o que é importante no diagnóstico de pacientes atópicos (BERNSTEIN; STORMS, 1995; MASTRANDREA et al., 1997; SILVA et al., 2001; DYKEWICZ;

FINEMAN, 1998).

Outras classes de anticorpos também têm sido investigadas na alergia, como os anticorpos IgG, particularmente as subclasses IgG1 e IgG4. Anticorpos IgG específicos a alérgenos podem ser detectados tanto em indivíduos atópicos e não atópicos (SALLUSTO et al., 1993).

1.6 Imunoterapia alérgeno-específica

Os tratamentos das doenças alérgicas visam amenizar os sintomas desencadeados por respostas exacerbadas do organismo frente aos alérgenos. Ações que visam à diminuição destes sintomas são indicadas de modo a abrandá-los ou até mesmo cessá-los. Para tanto, além do tratamento medicamentoso disponível há esforços na tentativa de desenvolver estratégias antiácaros da poeira por meio do controle ambiental utilizando acaricidas, capas protetoras de colchões, aspiração, aumento da ventilação interna dentre outras que podem contribuir na atenuação da sensibilização e do desencadeamento dos sintomas em indivíduos alérgicos (SCHEI; HESSEN; LUND, 2002).

No entanto, para alguns indivíduos tanto o tratamento quanto o controle ambiental não surtem resultados satisfatórios na qualidade de vida dos mesmos. No intuito de suprir novas intervenções clínicas, a imunoterapia surge como possível terapêutica no sentido de induzir a tolerância aos componentes antigênicos clinicamente relevantes no desencadeamento de respostas exacerbadas pelos pacientes. Diversos estudos têm corroborado a ação efetiva da imunoterapia alérgeno-específica na melhoria dos sintomas das doenças alérgicas, sobretudo rinite (JUTEL et al., 2005).

A imunoterapia foi introduzida em 1911 por Noon e Freeman no tratamento da polinose, que é uma rinite alérgica provocada por grãos de pólen (NOON, 1911). A imunoterapia consiste basicamente na administração de doses gradualmente crescentes de um determinado alérgeno a indivíduos alérgicos até alcançar uma dose máxima, a qual é mantida e administrada repetidas vezes em um período de

manutenção que pode variar de indivíduo para indivíduo, a fim de amenizar os sintomas provocados por exposições subsequentes ao agente sensibilizador em questão (ROLLAND; DOUGLASS; O'HEHIR, 2000; BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001).

Tal prática imunoterápica é geralmente aconselhada a pacientes que apresentam sintomas de rinite alérgica quando expostos a determinados alérgenos, de forma que alguns fatores devem ser considerados na inclusão destes indivíduos em procedimentos imunoterápicos como a gravidade e duração dos sintomas apresentados, efeitos adversos provocados pelo uso de medicamentos, falta de responsividade a outras formas de terapia, redução do risco de desenvolver asma dentre outros fatores (WALLACE et al., 2008). Entretanto algumas limitações são feitas principalmente a pacientes com asma moderada a grave, e também não é recomendado a utilização de extratos não fracionados de potentes alérgenos, uma vez que há alto risco de efeitos sistêmicos adversos (ROLLAND; DOUGLASS; O'HEHIR, 2000).

A imunoterapia alérgeno-específica tem como fundamento principal a indução de um estado tolerante nas células T periféricas, demonstrado principalmente pela geração de células Tregs alérgeno-específicas e supressão dos efeitos proliferativos celulares bem como das respostas de citocinas contra os principais alérgenos desencadeantes de uma resposta imunológica exacerbada (AKDIS et al., 1996).

A tolerância apresentada por pacientes sob imunoterapia e também por indivíduos saudáveis pode ser caracterizada pela ação de subpopulações de Tregs, denominadas Treg do tipo I (Tr 1) e Treg CD4⁺CD25⁺. Estas subpopulações celulares possuem a capacidade de agir não só nas células T levando-as a um estado anérgico, mas também nas células B induzindo uma diminuição do *switch* de IgE induzido por IL-4 e aumento da expressão do transcrito $\gamma 4$ resultando assim em maiores níveis de IgG4 específica (AALBERSE et al., 1993, MEILER et al., 2008).

Aparentemente as células Tregs contribuem para o controle da resposta imune específica de várias formas: supressão das células apresentadoras de antígenos, supressão das células Th1 e Th2, dos mastócitos, basófilos e eosinófilos, além disso, a supressão de IgE e a indução de isotipos de anticorpos não inflamatórios como IgG4

por Tr1 e por células Treg CD4⁺CD25⁺(MEILER et al., 2008).

Desta forma, podemos perceber a importância de vários fatores sejam eles celulares ou humorais no controle da resposta aos alérgenos. Reforçando assim a importância de um conhecimento mais aprofundado destas proteínas alergênicas, para que as mesmas possam ser utilizadas em aplicações diagnósticas, acompanhamento de indivíduos sob imunoterapia e possivelmente em vacinas imunoterápicas.

1.7 Identificação de isoformas antigênicas para aplicações laboratoriais

Nos últimos anos, particularmente nesta década o crescente esforço no aprimoramento de técnicas e mesmo na criação de outras tecnologias para análises proteômicas tem sido notado nos trabalhos científicos, esforços estes que têm como finalidade identificar e caracterizar um maior número de proteínas expressas por diferentes organismos.

A identificação e caracterização de um repertório mais amplo de alérgenos e suas isoformas têm sido de grande valia no contexto da alergia, uma vez que estas isoformas podem apresentar diferentes antigenicidades frente a soros de pacientes alérgicos. A presença de diversas isoformas pertencentes ao mesmo grupo de alérgenos pode ser devido a diferentes fatores ligados à variabilidade molecular, com destaque para o polimorfismo alélico, modificações pós-traducionais e *splicing* alternativo do mRNA (DE CANIO et al., 2009).

Neste sentido, dentre as técnicas proteômicas a eletroforese bidimensional tem sido utilizada como uma poderosa ferramenta no mapeamento protéico de complexas fontes alergênicas. Corroborando isto, pesquisas realizadas por (MAO et al., 1998) utilizando a eletroforese bidimensional com o ácaro *D. farinae* combinada com a imunodeteção por IgE possibilitou a identificação de novos alérgenos e isoformas alergênicas que constituíam múltiplos isoalérgenos, uma vez que uma pequena mudança na sequência dos aminoácidos pode induzir modificações no reconhecimento dos epítomos pelas células B (CHUA; KEHAL; THOMAS, 1993;

CHUA et al., 1996; SMITH; THOMAS, 1996; LIN et al., 1994; SHEN et al., 1995).

Benndorf e colaboradores (2008) também identificaram isoformas alergênicas de esporos de *Aspergillus versicolor* por meio da eletroforese e *immunoblotting* bidimensional, similarmente a Luengo e colaboradores (2008) que investigaram os alérgenos do pólen de *Senecio jacobea* com o objetivo de determinar as características imunológicas e a relevância clínica dos alérgenos identificados.

Diante disto, metodologias como a eletroforese bidimensional e o *immunoblotting*, podem contribuir para a identificação de novas proteínas alergênicas e suas possíveis isoformas provenientes de alérgenos inaláveis como os ácaros da poeira domiciliar, os quais apresentam evidente padrão de reconhecimento pelo soro de pacientes alérgicos. Sendo assim, o emprego de tais alérgenos em técnicas sorológicas, para detecção de anticorpos específicos em indivíduos com alergia respiratória seria viabilizado, bem como o monitoramento dos níveis de IgE e IgG1 específicos de pacientes alérgicos sob imunoterapia alérgeno-específica.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Identificar novos antígenos imunodominantes de *D. pteronyssinus* com potencial aplicação para o diagnóstico laboratorial de alergias e monitoramento de imunoterapia específica com alérgenos.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar os níveis de IgE e IgG1 específicos a *D. pteronyssinus* por ELISA no soro de pacientes alérgicos e indivíduos controles;
- Identificar os principais componentes alergênicos/antigênicos do extrato de *D. pteronyssinus* reconhecidos por anticorpos IgE e IgG1 por *immunoblotting* no soro de pacientes alérgicos e indivíduos controles;
- Determinar por meio de eletroforese bidimensional associada ao *immunoblotting* possíveis isoformas dos componentes alergênicos/antigênicos;
- Identificar possíveis proteínas antigênicas derivadas de *D. pteronyssinus* para uso potencial no diagnóstico *in vitro* da alergia respiratória e também para um possível emprego das mesmas no monitoramento dos níveis de IgE e IgG1 específicos de pacientes alérgicos sob imunoterapia alérgeno-específica.

3 Material e Métodos

3.1 Critérios éticos e seletivos

O projeto de pesquisa foi primeiramente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), alocado na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), coordenado e subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) de maneira a assegurar a regulamentação ética necessária, sendo aprovado sem restrições sob o número de processo 056/07 (Anexo A).

Pacientes atendidos no Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) foram interrogados posteriormente ao atendimento clínico sobre a possibilidade de participarem do estudo. Os concordantes foram previamente esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e de todos os procedimentos que seriam realizados, sendo o aceite preenchido sob a forma de Termo de Consentimento livre e esclarecido (Anexo B) e a seleção feita tanto por meio do questionário clínico (Anexo C) elaborado segundo *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC, 1998), quanto pelo resultado do teste cutâneo de puntura (TCP) a extratos de aeroalérgenos. No processo de seleção dos pacientes foram adotados os critérios de inclusão e exclusão listados no Quadro 2.

Critérios seletivos	
Inclusão	Exclusão
Aceite em participar do estudo (Termo de Consentimento)	Recusa em participar do estudo
Teste cutâneo de puntura (TCP) positivo ao alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos
História clínica de sintomas respiratórios relacionados com exposição à poeira domiciliar (questionário clínico)	Sob tratamento com anti-histamínicos ou corticosteróides por via oral ou tópica na semana anterior ao teste
	Presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo

Quadro 2. Critérios seletivos utilizados para a amostragem dos pacientes a serem incluídos no estudo.

A seleção possibilitou a triagem de oitenta pacientes (n = 80) de ambos os gêneros, faixa etária entre 18 e 48 anos durante o período de março a dezembro de 2008. Cinquenta indivíduos saudáveis (n = 50) de ambos os gêneros, faixa etária entre 18 e 56 anos, assintomáticos quanto a qualquer doença alérgica foram também selecionados entre funcionários e alunos da UFU.

Todo o processo de seleção compreendido por anamnese, TCP e posteriormente coleta de sangue foi feito sob supervisão do médico alergologista responsável. Os indivíduos triados foram distribuídos em dois grupos segundo o histórico clínico e positividade tanto ao TCP quanto ao teste sorológico ELISA, o qual foi realizado posteriormente à triagem.

3.2 Teste Cutâneo de Puntura (TCP)

A reação de hipersensibilidade imediata foi aferida por meio do TCP segundo Ownby (1988). Na realização do teste (Anexo D) foram utilizados diferentes extratos de alérgenos inaláveis:

- Ácaros: *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis* (in house);
- Baratas: *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* (FDA Allergenic, Rio de Janeiro-RJ);
- Epitélio de animais domésticos: *Canis familiaris*, *Felis domesticus* (FDA Allergenic);
- Fungo: *Alternaria alternata* (FDA Allergenic);
- Pólen: *Lolium multiflorum* (in house);
- Controle negativo: solução salina fisiológica em fenol 0,4% e glicerina diluída a 50% (FDA Allergenic);
- Controle positivo: cloridrato de histamina a 10 mg/mL (FDA Allergenic).

Punturas foram realizadas na região anterior do antebraço, posteriormente à anti-sepsia com álcool 70%, utilizando punttores específicos (Punttores Aiko, Rio de Janeiro, Brasil), onde foram depositadas as microgotas (aproximadamente 10 µL) de cada extrato alergênico. Após 15 minutos da realização do teste, o tamanho das pápulas foi medido em milímetros nos seus dois diâmetros ortogonais, sendo o resultado considerado positivo quando as pápulas apresentaram diâmetro médio maior que 3 mm que aquelas do controle negativo.

3.3 Coleta de sangue

Em paralelo ao TCP, foram coletados 10 mL de sangue em tubos a vácuo (Vacutainer – Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA), utilizando agulhas 21G1 (Vacutainer) por meio de punção venosa na região do antebraço. Os tubos contendo sangue total foram centrifugados por 10 min a 2.000 x g para a obtenção das amostras de soro, as quais foram aliquotadas e armazenadas a -20°C até a realização das análises sorológicas.

3.4 Obtenção dos extratos de ácaros

O processo de extração das proteínas dos ácaros *D. pteronyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df) e *B. tropicalis* (Bt) foi realizado de acordo com Pereira e colaboradores (2005). Primeiramente 15 g do material peneirado (Granutest-Telastem, ABNT 35 – TYLER 32) do cultivo dos ácaros (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Federico Montealegre - Medical School of Ponce, Porto Rico, Estados Unidos) foram diluídos em salina tamponada com borato a 5 mM (pH 8,0) na presença dos seguintes inibidores de proteases (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA): fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, benzamidina 1 mM, aprotinina 10 µg/mL e

leupeptina 1 μ M. Esta mistura foi macerada em nitrogênio líquido e posteriormente incubada sob agitação orbital durante 18 h a 4°C. Após este procedimento, foi realizada pré-centrifugação a 3.000 $\times$ g por 15 min a 4°C e o sobrenadante obtido foi coletado e novamente centrifugado por duas vezes a 30.000 $\times$ g por 30 min. O sobrenadante final foi coletado, concentrado e dialisado contra solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M (PBS) pH 7,2 em sistema Amicon (W.R. Grace & Co., Beverly, EUA), utilizando membrana com *cut off* de 10 kDa (YM-10, Whatman International Ltd., Maidstone, Inglaterra), constituindo o extrato protéico solúvel. Os extratos de ácaros foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C.

3.5 Dosagem protéica

A concentração protéica dos extratos de ácaros foi determinada de acordo com o método proposto por Lowry e colaboradores (1951). A curva de calibração foi realizada com soroalbumina bovina (BSA, Sigma) em diluições duplas seriadas de 500 a 15,6 μ g/mL. Os valores da densidade óptica (D.O.) a 650 nm das amostras analisadas foram obtidos e comparados aos da curva de calibração, utilizando o programa Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA), de forma a fornecer os dados da concentração protéica das amostras.

Parte dos extratos alergênicos dos ácaros foi utilizada no TCP, preparados a uma concentração protéica final de 2 mg/mL em PBS contendo 0,4% de fenol e 50% de glicerina, o restante foi utilizado nos ensaios sorológicos.

3.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

3.6.1 Dosagem de IgE específica a *D. pteronyssinus*

Para a quantificação de IgE específica a *D. pteronyssinus* foi realizado o ensaio

imunoenzimático ELISA de acordo com Alves e colaboradores (2008).Primeiramente, o extrato de Dp foi diluído em tampão carbonato 60 mM (pH 9,6) em concentração protéica de 20 µg/mL e utilizado para sensibilização das placas de microtitulação de alta afinidade (Costar Corning Inc., Corning, NewYork, NY, EUA) em volume de 50 µL por poço a 4°C durante 18 h. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS acrescida de Tween 20 (Sigma) a 0,05% (PBS-T).

Em seguida, foi realizado o bloqueio dos sítios ativos das placas com PBS-T contendo BSA (Sigma) a 1% (PBS-T-BSA) em volume de 100 µL por poço, durante 1 h à temperatura ambiente. A solução PBS-T-BSA foi utilizada nas etapas seguintes como diluente dos soros e reagentes.

Um ciclo de três lavagens com PBS-T foi novamente realizado e então os soros foram adicionados em duplicata em volume de 50 µL/poço na diluição 1:2. Três soros controles positivos e três soros controles negativos foram incluídos em cada placa. Após incubação a 37°C por 2 h, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário anti-IgE humana biotinilado (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EUA) diluído a 1:500, em volume de 50 µL/poço, a 37°C por 1 h. Novamente as placas foram submetidas a seis lavagens com PBS-T, seguida pela adição do conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) em volume de 50 µL/poço diluído a 1:500 por 30 min à temperatura ambiente. A revelação da reação foi realizada por meio do substrato enzimático peróxido de hidrogênio - H₂O₂ (Sigma) a 0,03% acrescido de ácido 2,2'-diazino-bis-3-etil-benzotiazol (ABTS - Sigma) a 0,01 M diluídos em tampão citrato-fosfato 70 mM pH 4,2. Os valores de D.O. foram obtidos em leitor de placas de microtitulação (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 405 nm. Os níveis de anticorpos foram expressos por meio do Índice ELISA (IE), segundo a fórmula:

$$IE = \frac{DO_i}{DO_{\text{controle}} + 3.8}$$

em que:

DO_i = média da densidade óptica da amostra testada;

DO controle = média das densidades ópticas de três amostras de soros controles negativos;

δ = desvio-padrão das densidades ópticas das amostras de soros controles negativos.

Com os valores obtidos por meio desta fórmula, os IE foram designados como positivos para valores de IE > 1,2.

3.6.2 Dosagem de IgG1 específica a *D. pteronyssinus*

Para a detecção da subclasse IgG1 específica a *D. pteronyssinus*, foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA, segundo Almeida e colaboradores (2006). Placas de microtitulação de alta afinidade (Costar Corning Inc.) foram previamente sensibilizadas com extrato de Dp diluído em tampão carbonato 60 mM (pH 9,6) a 20 µg/mL em volume de 50 µL/poço a 4°C, durante 18 h. Subsequentemente foi realizado um ciclo de três lavagens com PBS-T. A solução PBS-T foi usada nas etapas subseqüentes para diluição dos soros e reagentes.

Posteriormente as placas foram incubadas com os soros em duplicata (50 µL/poço) diluídos 1:5 por 2 h a 37°C. Três soros controles positivos e três soros controles negativos foram incluídos em cada placa. Após seis lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado anti-IgG1 humana (Sigma) diluído 1:1000 em volume de 50 µL/poço por 1 h a 37°C.

Em seguida, foi realizado outro ciclo de seis lavagens com PBS-T e então adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluído 1:500 em volume de 50 µL/poço e incubado por 30 min à temperatura ambiente. A revelação da reação foi feita por meio do substrato H₂O₂ (Sigma) a 0,03% e ABTS (Sigma) a 0,01 M diluídos em tampão citrato-fosfato 70 mM, pH 4,2. Os níveis de IgG1 específica foram expressos em IE como descrito para IgE específica.

3.7 Eletroforese unidimensional (1D) e *immunoblotting*

3.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 1D

O perfil protéico do extrato bruto de Dp foi analisado por meio de SDS-PAGE em gradiente de concentração de 8-18% sob condições desnaturantes e não redutoras segundo Laemmli (1970). Primeiramente foram preparados os géis de separação a 8% e a 18% separadamente, ambos compostos por Tris-HCl 0,373 M (pH 8,8), SDS a 0,1%, acrilamida-bis na proporção 30:0,8, N,N,N,N,-tetrametiletilenodiamina (TEMED) a 0,125%, persulfato de amônia (APS) a 0,125%, glicerol e azul de bromofenol que foi adicionado apenas no gel a 18%, e então diluídos em água deionizada de acordo com as concentrações do gel. O gel de empilhamento a 3% foi preparado utilizando Tris-HCl 0,122 M (pH 6,8), SDS 0,1%, acrilamida-bis a 30:1,6, TEMED a 0,125% e APS a 0,125% e azul de bromofenol. Todos reagentes utilizados na preparação dos géis foram obtidos da Bio-Rad Laboratories Inc. O processo de polimerização teve um tempo médio de 2 h para o gel de separação e 1 h para o gel de empilhamento.

Previamente à aplicação das amostras nos géis, os extratos foram diluídos em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8), SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% e glicerol 20%. As amostras foram então aquecidas a 95°C em banho seco (Termobath ALB64 – Finemould Precision Ind., Co., Seul, Coréia do Sul) por 5 min para desnaturação protéica completa. Foi então aplicado em cada poço do gel 20 µg de proteína total em volume de 20 µL quando o gel foi corado, ou 400 µg de proteína total em volume de 250 µL em poço único para posterior eletrotransferência para membrana de nitrocelulose. Para o cálculo das massas moleculares relativas das bandas referentes à amostra, foi utilizado em paralelo o marcador de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A eletroforese foi realizada no sistema *Mini-vertical Gel Electrophoresis Unit SE 260* (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) sendo que a migração das

proteínas ocorreu sob corrente constante de 20 mA por aproximadamente 1 h e 30 min. O tampão de corrida (pH 8,3) utilizado tinha em sua composição glicina (Sigma) a 0,19 M, Tris-base a 0,025 M e SDS (Sigma) 0,1%.

O gel foi então corado por imersão em solução de *Coomassie Brilliant Blue* coloidal G-250 (Sigma Chemical Co.) durante um dia e então descorado em solução de ácido acético 7% até a perfeita visualização das bandas polipeptídicas. Todo este processo foi realizado sob agitação lenta e constante (Agitador Kline 108, Nova Ética, Brasil) à temperatura ambiente, para a posterior análise do perfil de bandas polipeptídicas.

A seguir, o gel foi digitalizado e analisado com o programa de análise de imagens ImageQuant 300 versão 1.0.3 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) no qual foi plotado a curva do padrão de peso molecular para determinar a mobilidade relativa (R_F) e a massa molecular aparente das bandas.

3.7.2 Immunoblotting 1D

A técnica de *immunoblotting* foi realizada conforme descrito por Towbin, Staehelin e Gordon (1979) com o intuito de determinar as bandas polipeptídicas do extrato de Dp separadas por SDS-PAGE (8-18%) e reconhecidas por anticorpos IgE e IgG1 em amostras de soros dos pacientes. Para a realização desta técnica foram selecionados 30 pacientes do grupo atópico e 5 do grupo não atópico com base nos resultados positivos em ELISA para IgE e/ou IgG1 específicas.

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (0,45 μ m, Bio-Rad Laboratories Inc.) foi conduzida em sistema semi-úmido de transferência (Multiphor II Electrophoresis Unit, Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia), utilizando tampão de transferência constituído por glicina 0,04 M, Tris 0,05 M, SDS a 0,04% e metanol a 20% sob corrente de 0,8 mA por cm^2 de gel durante 2 h. Ao final das 2 h para certificar a eficácia do processo de eletrotransferência, a membrana foi corada com solução Ponceau S (Merck) a 0,5% diluída em TCA 0,25%.

Após o procedimento de coloração, a membrana foi cortada em tiras de aproximadamente 3 mm de largura que foram acondicionadas nas canaletas das placas de *immunoblotting* (Bio-Rad Laboratories Inc.) e bloqueadas com 800 µL de PBS-T contendo leite desnatado em pó (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) a 5% (PBS-T-M) por 2 h à temperatura ambiente. Subsequentemente, as amostras de soros diluídas 1:2 (IgE) ou 1:5 (IgG1) em PBS-T-M a 1% foram adicionadas (500 µL/canaleta) e incubadas por 18 h à temperatura ambiente.

Após ciclo de seis lavagens com PBS-T 0,1%, as tiras foram incubadas com os anticorpos secundários biotinizados anti-IgE humana (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) e anti-IgG1 humana (Sigma) diluídos 1:250 e 1:1000 em PBS-T-M a 1%, respectivamente, por 2 h à temperatura ambiente.

Na etapa seguinte, após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluído 1:500 por 2 h à temperatura ambiente. A reação foi revelada com 3,3'-tetrahydrocloroeto de diaminobenzidina (DAB, Sigma) diluído em 10 mL de solução salina tamponada com Tris a 20 mM (pH 7,2) até o aparecimento das bandas, quando a reação foi interrompida com a adição de água destilada. Todo este processo foi realizado sob agitação pendular lenta e constante. As tiras foram secas em papel filtro, digitalizadas e analisadas conforme o procedimento descrito no item 3.7.1.

3.8 Eletroforese bidimensional (2D) e *immunoblotting*

3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 2D

Inicialmente, foi realizada a precipitação das proteínas do extrato de Dp em ácido tricloroacético (TCA) 10% (DAMERVAL et al., 1986). Cerca de 60 µL do extrato Dp total foram incubados com 10% de TCA por 10 min em banho de gelo. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 2150 x g a 4°C por 10 min e o sedimento

foi submetido a ciclos de lavagens sob agitação com etanol (1x por 3 min) e acetona (3 x por 2 min) para retirar o excesso de TCA presente na amostra. Após cada ciclo de lavagem a amostra foi centrifugada a 2150 x g, 4°C por 10 min com descarte do sobrenadante. Ao fim, a amostra foi seca em estufa a 37°C durante 5 min e o *pellet* foi então transferido por inversão para outro tubo para eliminar qualquer resíduo de acetona presente na parede do tubo.

Ao sedimento foi adicionado 40 µL de tampão de lise constituído por uréia 8 M, Triton X-100 2%, Tris-base 40 mM, ditiotreitól (DTT) 65 mM por 1 h à temperatura ambiente sob agitação para a completa solubilização da amostra precipitada. Em seguida, foi realizada a centrifugação da amostra a 1850 x g, por 30 min a 23°C com o objetivo de precipitar partículas restantes não solubilizadas.

Na próxima etapa, 40 µL do sobrenadante da amostra centrifugada foi transferido para um novo tubo e então foi adicionado 85 µL tampão de reidratação composto por uréia 8 M, Triton X-100 2%, azul de bromofenol 0,0025%, DTT 65 mM e anfólitos a 0,2% (Bio-Rad Laboratories Inc.). A mistura ficou sob agitação durante 30 min à temperatura ambiente e, ao final, a amostra foi centrifugada a 1850 x g, a 23°C por 20 min.

A focalização isoeletrica foi realizada em tiras com gradiente de pH imobilizado (ReadyStrip™ IPG strips, pH 3-10, 7 cm) (Bio-Rad Laboratories Inc.). Primeiramente, o sobrenadante da amostra foi aplicado na placa de focalização isoeletrica e então a tira de IPG foi acondicionada na canaleta de forma que o gel ficasse voltado para baixo em contato com a amostra anteriormente adicionada, por 10 min para hidratação. A separação na primeira dimensão (1D) foi iniciada com reidratação passiva para melhorar a entrada das proteínas de alto peso molecular nas tiras IPG, aplicando baixa voltagem 50 V por 12 h, e então as tiras IPG foram focalizadas a 500 V por 30 min, 1000 V por 30 min, 4000 V por 1 h, alcançando assim 10.000 V/h.

Após a focalização isoeletrica, as tiras com as proteínas focalizadas foram equilibradas com tampão de equilíbrio (uréia 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,001%, DTT 130 mM) durante 10 min, posicionadas

na superfície do gel 13,5% juntamente com o marcador de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder) adicionado em paralelo, e então fixados com solução de agarose (0,5%) e azul de bromofenol (0,003%) diluídos em tampão de corrida.

A eletroforese foi realizada em sistema *Mini-Protean Cell* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) sendo que a migração das proteínas ocorreu sob corrente constante de 15 mA por 15 min e 20 mA por 1 h e 15 min. Subsequentemente, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* coloidal G-250 e descorado com ácido acético 7% para posterior análise dos *spots*.

A análise dos géis 2D foi realizada utilizando o software *ImageMaster 2D Platinum 7* (GE, Healthcare, Uppsala, Suécia).

3.8.2 Immunoblotting 2D

Após a realização da eletroforese 2D, todo o processo de transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose, bem como a coloração para certificação da eficácia do processo seguiram os mesmos padrões delineados no tópico 3.7.2.

As membranas foram acondicionadas em caixas de mesma dimensão e bloqueadas com 20 mL de PBS-T-M 5% por 2 h à temperatura ambiente. Para a avaliação do perfil de reconhecimento por anticorpos IgE e IgG1 em soros dos pacientes, foram selecionadas 5 amostras de soros de pacientes atópicos e 5 amostras de indivíduos não atópicos que apresentaram perfil de reatividade similar por *immunoblotting* 1D. Estas amostras foram misturadas (v/v) para constituir um *pool* correspondente a cada grupo de paciente (atópico e não atópico) que foi diluído 1:2 (IgE) e 1:5 (IgG1) em PBS-T-M a 1% e adicionado (10 mL) à membrana, permanecendo sob incubação por 18 h à temperatura ambiente.

Posteriormente foi realizado ciclo de seis lavagens com PBS-T 0,1% e incubação com os anticorpos secundários biotinilados anti-IgE humana (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.) ou anti-IgG1 humana (Sigma) em diluição de 1:250 e

1:1000, respectivamente, em PBS-T-M a 1% em volume de 10 mL por 2 h. Após novo ciclo de seis lavagens, foi adicionado 10 mL do conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluído 1:500, com incubação por 2 h à temperatura ambiente.

A reação foi então revelada com a adição de DAB (Sigma) diluído em 10 mL de TBS a 20 mM (pH 7,2), até a revelação dos *spots*, interrompendo-a com a adição de água destilada. Toda a reação foi procedida sob agitação pendular lenta e constante.

3.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism, versão 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

As diferenças na positividade ao TCP, nas co-sensibilizações e no diagnóstico clínico foram avaliadas pelo teste Qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, quando apropriado. Os dados foram previamente analisados quanto à normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e como não apresentaram distribuição normal, foram utilizados testes não-paramétricos.

As diferenças no tamanho médio da pápula foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Os níveis de anticorpos IgE e IgG1 específicos entre os diferentes grupos (atópicos e não atópicos) foram analisados por meio do teste de Mann-Whitney. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.10 Procedimentos de biossegurança

Todos os procedimentos realizados seguiram as normas exigidas para o manuseio de amostras biológicas, equipamentos de segurança e equipamentos laboratoriais compatíveis, bem como conduta pessoal adequada dentro de ambientes laboratoriais (MINEO et al., 2005).

4 Resultados

4.1 Caracterização demográfica e clínica dos pacientes

Os cento e trinta indivíduos selecionados que aceitaram participar do estudo e preencheram os critérios éticos e seletivos definidos em Material e Métodos (item 3.1) foram distribuídos nos grupos atópico (A) e não atópico (NA), segundo histórico clínico de sintomas de asma e/ou rinite e resultados do TCP ao extrato de alérgenos de ácaros. As características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos no estudo estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos pacientes incluídos no estudo.

Características	Grupos		Valor de <i>P</i>
	Atópico (A)	Não atópico (NA)	
n	80	50	
Gênero			0,0607 ^a
masculino	32	12	
feminino	48	38	
Idade			0,6313 ^b
Mediana (intervalo)	23 (18-48)	22 (18-56)	
Positividade no TCP (%)			< 0,0001 ^a
Dp	100	0	
Df	97,5	0	
Bt	77,5*	0	
Tamanho da pápula (mediana, mm)			< 0,0001 ^c
Dp	9,0	0	
Df	8,0	0	
Bt	5,0*	0	
Co-sensibilizações (%)			0,0384 ^a
Dp/Df	78	0	
Dp/Bt	62*	0	
Diagnóstico (n)			< 0,0001 ^a
A	1	0	
R	69*	0	
A+R	10	0	

TCP, teste cutâneo de puntura; Dp, *Dermatophagoides pteronyssinus*; Df, *Dermatophagoides farinae*; Bt, *Blomia tropicalis*; A, asma; R, rinite.

^a Teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado;

^b Teste de Mann-Whitney;

^c Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn;

* Diferenças significantes em relação aos outros parâmetros dentro do mesmo grupo (atópico).

O grupo A foi representado por 60% de indivíduos femininos e 40% masculinos ($P < 0,05$), enquanto o grupo NA foi constituído por 76% de mulheres e 24% de homens ($P < 0,05$), mas não houve diferença significativa quanto ao gênero entre os grupos ($P = 0,0607$). A faixa etária dos indivíduos selecionados foi compreendida entre 18 e 56 anos, sendo que as idades medianas dos grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P = 0,6313$).

A reatividade do TCP demonstrou que Dp e Df foram os alérgenos sensibilizantes mais prevalentes no grupo A, com positividade ao TCP e tamanho da pápula significativamente maiores comparados a Bt ($P < 0,0001$). Em relação à co-sensibilização, 78% dos pacientes atópicos foram concomitantemente positivos a Dp e Df comparados a 62% para Dp e Bt ($P < 0,05$).

Dentre os indivíduos incluídos no grupo A, o diagnóstico mais frequente foi rinite comparado à asma ou à asma e rinite associados ($P < 0,0001$).

4.2 Níveis de IgE e IgG1 ao extrato de Dp

Os níveis de IgE e IgG1 específicos a Dp foram determinados por ELISA nos soros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* (grupo A, $n = 80$) e nos indivíduos não atópicos (grupo NA, $n = 50$) e estão demonstrados na Figura 3.

Os níveis e a soropositividade de IgE ao extrato de Dp foram significativamente maiores no grupo A (mediana IE = 3,8; 100%) do que no grupo NA (mediana IE = 0,7; 0%) ($P < 0,0001$). Como esperado, o grupo NA não apresentou níveis de IgE anti-Dp acima do limiar de positividade (IE = 1,2). Contudo, os níveis de IgG1 específicos a Dp não mostraram diferenças significantes entre os grupos A e NA (mediana IE = 2,9; 84% vs mediana IE = 2,5; 86%, respectivamente).

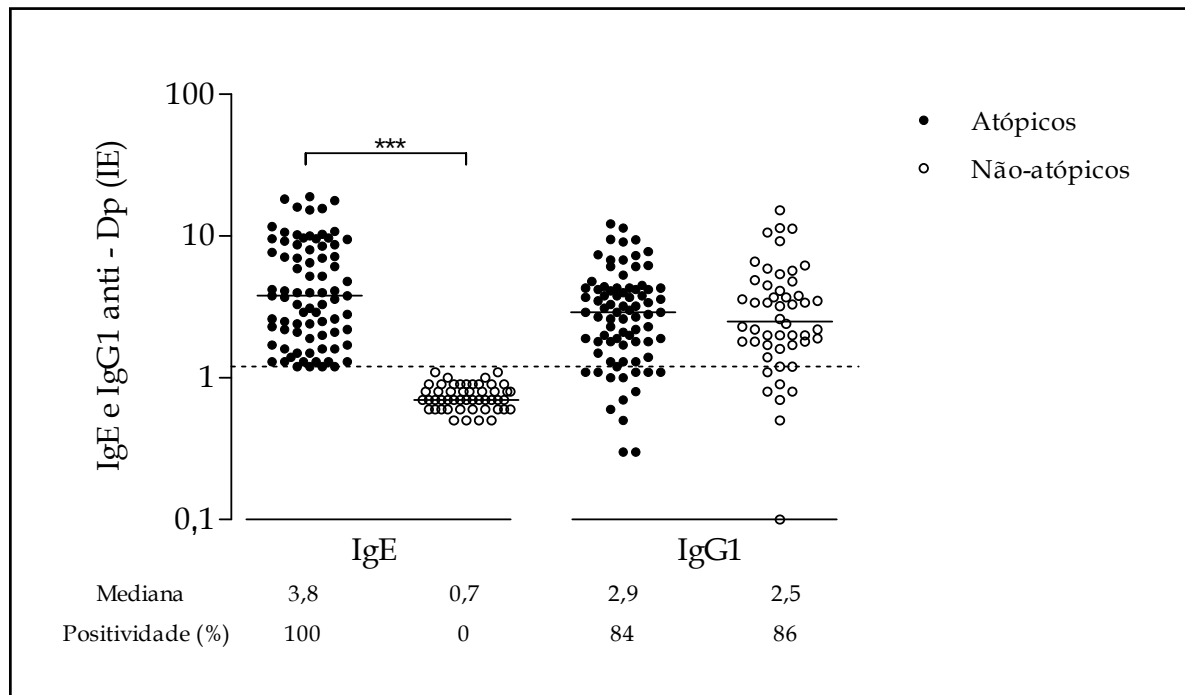


Figura 3. Níveis de IgE e IgG1 ao extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) expressos em índice ELISA (IE) em soros de indivíduos atópicos ($n = 80$) e não atópicos ($n = 50$). As medianas são indicadas por barras horizontais e o limiar de positividade (IE = 1,2) pela linha tracejada. *** $P < 0,0001$ determinado pelo teste Mann-Whitney.

4.3 Perfil de bandas e reatividade de IgE e IgG1 a alérgenos de Dp separados por 1D

O extrato Dp apresentou concentração protéica total de 3,9 mg/mL e os componentes protéicos foram separados em SDS-PAGE 8-18% e corados com *Coomassie Brilliant Blue* coloidal G-250. Várias bandas foram visualizadas em toda a extensão do gel, revelando massas moleculares relativas (M_r) no intervalo de 11 a 110 kDa (Fig. 4A). As bandas com maior coloração foram as de 15, 25 e 27 kDa, seguidas pelas bandas de 11, 13, 45, 51, 56, 60, 103 e 110 kDa (Fig. 4A).

O perfil dos componentes ligantes de IgE presentes no extrato de Dp foi analisado por *immunoblotting* 1D em 30 amostras de soro selecionadas no grupo A e 5 amostras de soro selecionadas no grupo NA. Foi analisado também o perfil de reconhecimento de IgG1 em 30 amostras de soros do grupo A e 30 do grupo NA. O painel representativo do *immunoblotting* para a reatividade de IgE em atópicos e IgG1

em pacientes atópicos e não atópicos está demonstrado na Figura 4B, 4C e 4D, respectivamente. Os soros de indivíduos do grupo NA não mostraram nenhuma reatividade de IgE frente aos componentes do extrato de Dp (dados não mostrados).

A frequência de reconhecimento dos componentes do extrato de Dp por anticorpos IgE e IgG1 em soros de pacientes atópicos e não atópicos está ilustrada na Figura 5. A principal reatividade de IgE ($\geq 50\%$ de reconhecimento) foi vista para as bandas de 15 kDa (80%), 103 kDa (63%) e 60 kDa (50%) no grupo A (Fig. 5A) que foram consideradas imunodominantes.

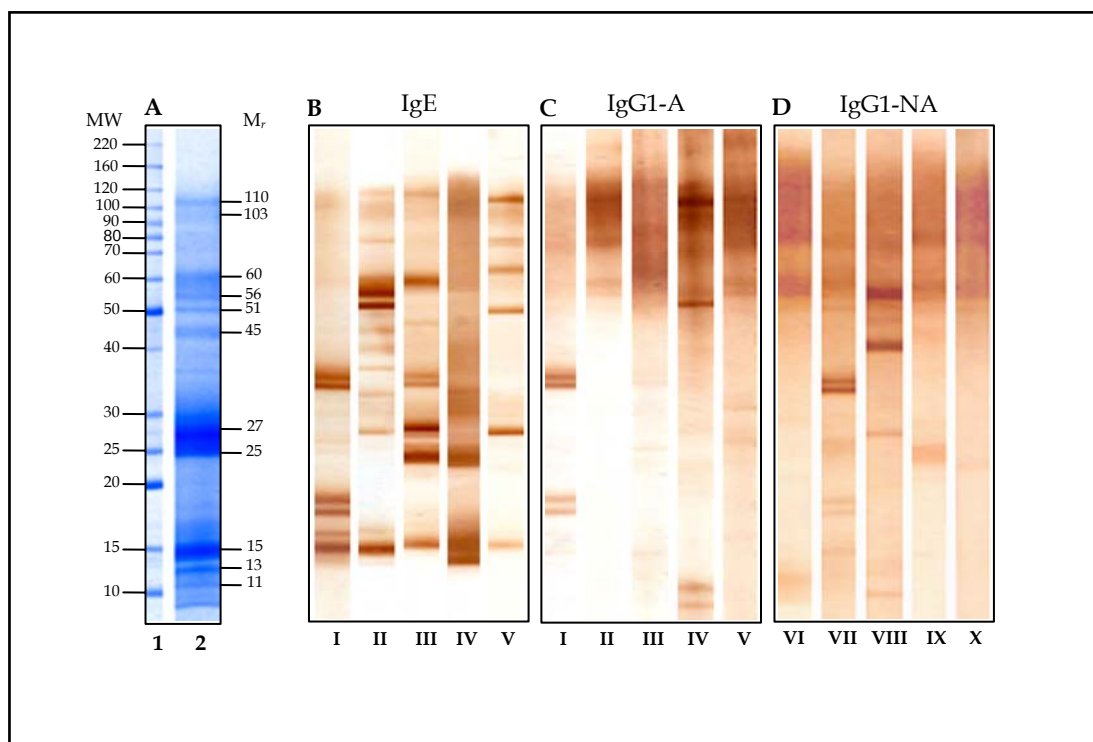


Figura 4. Eletroforese unidimensional (1D) e *immunoblotting* 1D do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp). (A) Linha 1, MW (padrão de peso molecular) em kDa ; linha 2, extrato bruto de Dp separado por SDS-PAGE (8-18%) sob condições não redutoras e corado por *Coomassie Brilliant Blue* coloidal G-250. As principais bandas com massa molecular relativa (M_r) em kDa estão indicadas à direita. (B) Reatividade de IgE nos soros (I a V) dos pacientes atópicos por *immunoblotting* 1D. (C) Reatividade de IgG1 nos soros (I a V) de pacientes atópicos (A) por *immunoblotting* 1D. (D) Reatividade de IgG1 nos soros (VI a X) de indivíduos não atópicos (NA) por *immunoblotting* 1D.

Quanto ao perfil de reconhecimento dos componentes de Dp reconhecidos por anticorpos IgG1 nos soros de pacientes atópicos, houve predominância de

reatividade das bandas acima de 50 kDa, especialmente as de 51 kDa (57%), 56 kDa (70%), 60 kDa (73%), 74 kDa (87%), 103 kDa (63%) e 110 kDa (83%) (Fig. 5B). Em relação aos indivíduos não atópicos foi encontrado um perfil similar de bandas acima de 56 kDa reconhecidas por anticorpos IgG1 (Fig. 5B).

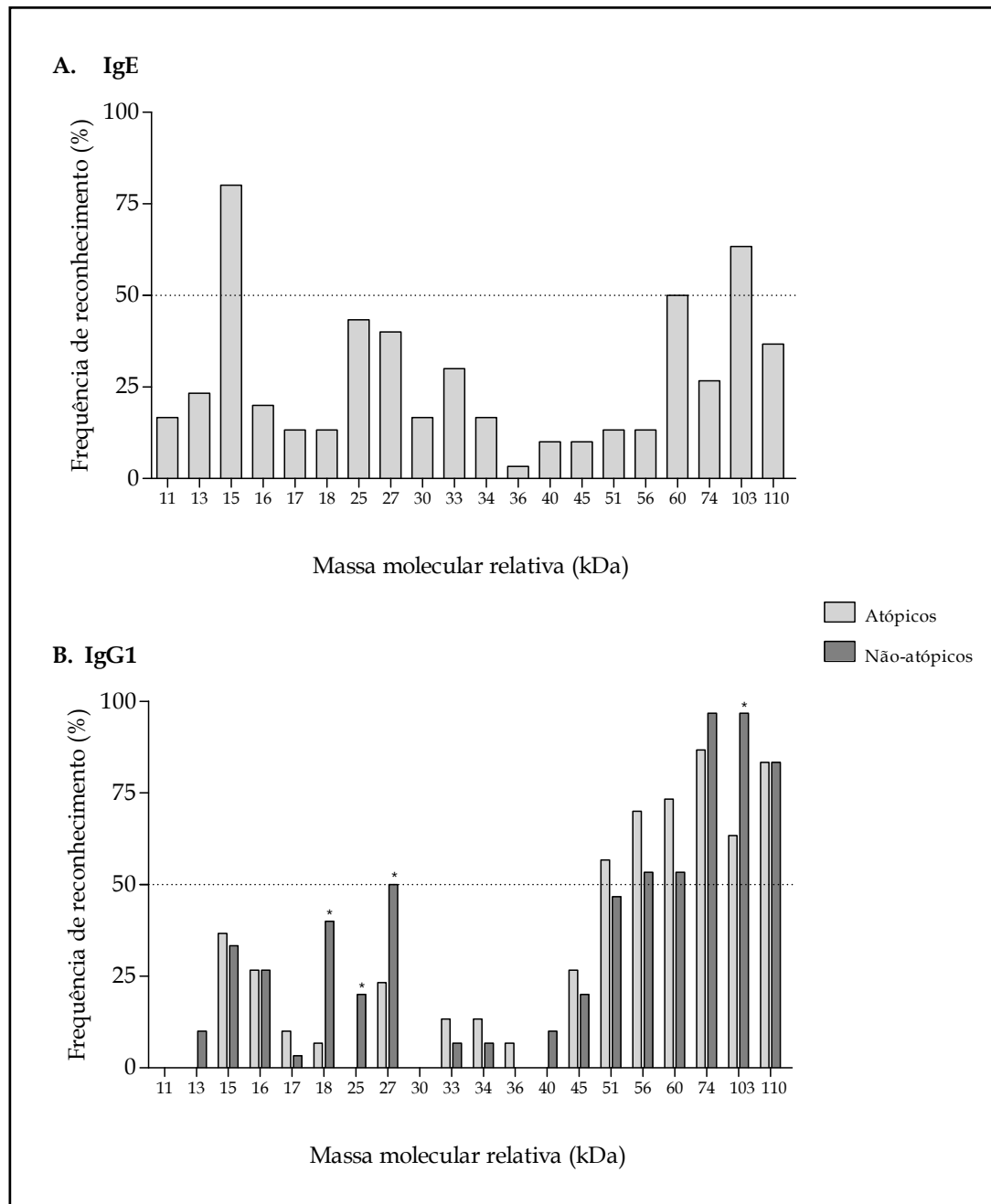


Figura 5. (A) Frequência (%) dos componentes do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) reconhecidos por IgE nos soros dos pacientes atópicos ($n = 30$) analisada por *immunoblotting* 1D. (B) Frequência (%) dos componentes do extrato de Dp reconhecidos por IgG1 nos soros de indivíduos atópicos ($n = 30$) e não atópicos ($n = 30$) analisada por *immunoblotting* 1D. A linha tracejada indica > 50% de reconhecimento (bandas imunodominantes).

Além disso, a reatividade de IgG1 a bandas abaixo de 30 kDa foi predominantemente detectada em indivíduos não atópicos, particularmente as bandas de 27 kDa (50%), 18 kDa (40%) e 25 kDa (20%) com diferenças significantes ($P < 0,05$) quando comparadas às respectivas bandas reconhecidas por pacientes atópicos. Foi observada também reatividade de IgG1 à banda de 103 kDa, a qual foi significativamente maior ($P < 0,05$) nos não atópicos (97%) do que nos atópicos (63%).

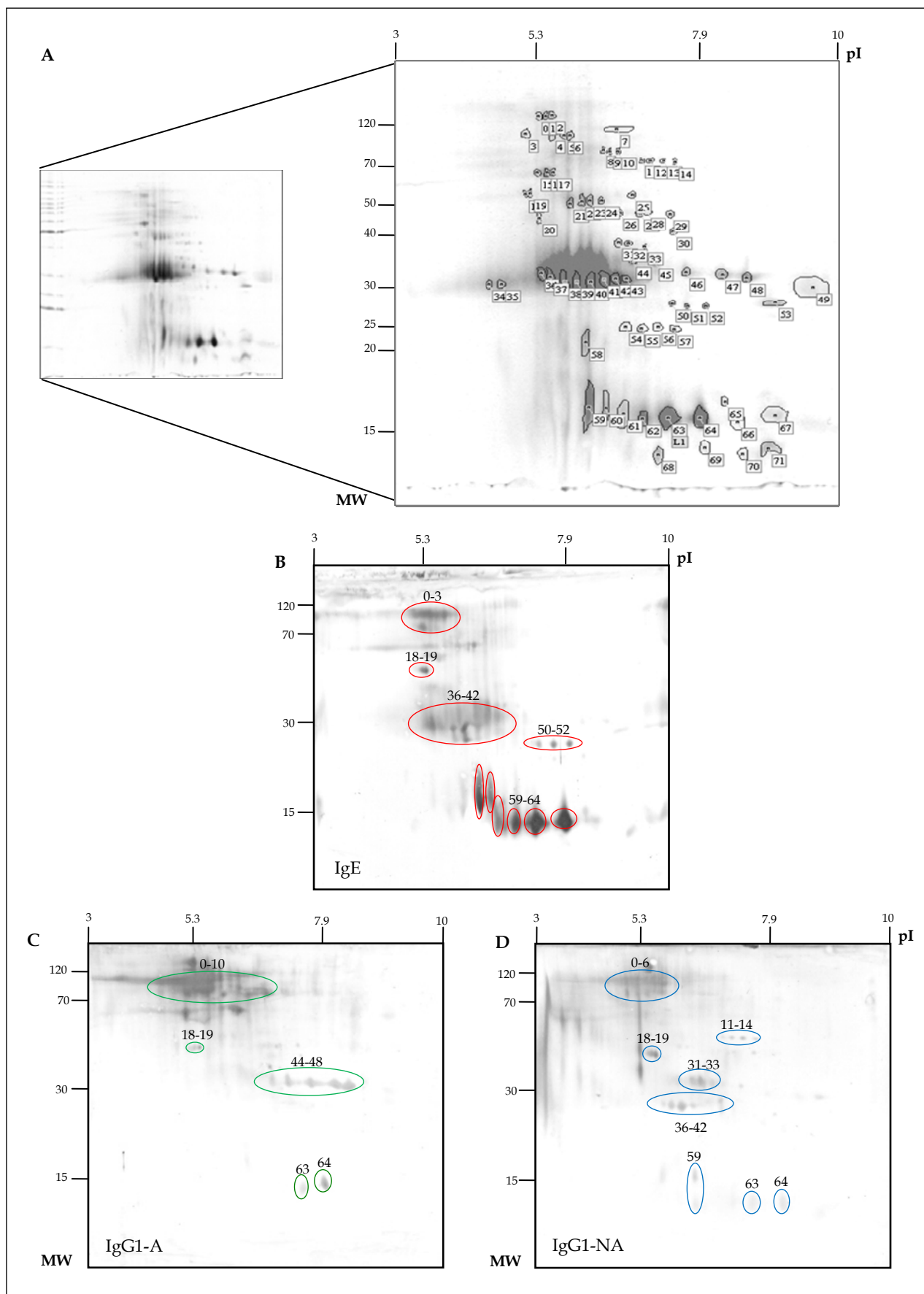
4.4 Perfil de *spots* e reatividade de IgE e IgG1 a alérgenos de Dp separados por 2D

A eletroforese bidimensional (2D) com o extrato de Dp revelou ampla distribuição de *spots* tanto na faixa de ponto isoelétrico (pI) 3-10 quanto na faixa de peso molecular 11-110 kDa, com resolução de mais de 70 *spots* (Fig. 6A) visualizados por meio da coloração com *Coomassie brilliant blue* coloidal G-250. A replicação dos géis forneceu reprodutibilidade dos *spots* entre 80 e 90% ($n = 3$). O *immunoblotting* 2D foi realizado para a análise da reatividade de IgE (Fig. 6B) e IgG1 (Fig. 6C) com *pool* de cinco soros de pacientes atópicos selecionados com base na similaridade do perfil de reatividade observada no *immunoblotting* 1D. O mesmo critério foi adotado para a análise da reatividade de IgG1 em indivíduos não atópicos (Fig. 6D).

O reconhecimento de vários *spots* por anticorpos IgE mostrou ampla variação (15 a 103 kDa e pI 5,1-8,0), entretanto a intensidade da reatividade foi maior aos *spots* (#59-64) de 15 kDa e pI 6,1-7,9 (Fig. 6B, Tabela 2).

Com relação à reatividade de IgG1 nos soros de pacientes atópicos (Fig. 6C, Tabela 2) os *spots* mais intensamente reconhecidos (#0-10) foram observados na faixa de maior massa molecular (70-103 kDa) e menor pI (5,1-6,6), enquanto *spots* moderadamente reconhecidos (#44-48, 63, 64) foram visualizados na faixa de menor massa molecular (30-36, 15 kDa) e maior pI (6,8-8,6), sendo que alguns *spots* fracamente reconhecidos (#18-19) foram vistos em faixas intermediárias (52 kDa e pI 5,1-5,2).

Figura 6. Eletroforese bidimensional (2D) do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* e perfil de reatividade para IgE e IgG1 por *immunoblotting* 2D. **(A)** Gel 2D corado por Coomassie Brilliant Blue coloidal G-250 com análise do ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (MW) dos *spots* mapeados e indicados por números pelo software ImageMaster Platinum 7. **(B)** Perfil de reatividade para IgE em *pool* de cinco soros de pacientes atópicos por *immunoblotting* 2D. **(C, D)** Perfil de reatividade para IgG1 em *pool* de cinco soros de pacientes atópicos (A) e não atópicos (NA) por *immunoblotting* 2D. *Spots* indicados por círculos representam reatividade de IgE ou IgG1 e referem-se ao mapeamento na Fig. 6A.



A reatividade de IgG1 em indivíduos não atópicos (Fig. 6D, Tabela 2) foi observada para os *spots* (#0-6) com variação de 85 a 103 kDa (pI 5,1-5,8), enquanto vários *spots* moderadamente reconhecidos (#11-14, 18-19, 31-33, 36-42) foram detectados em faixas intermediárias (25-62 kDa e pI 5,1-7,5) e *spots* menos reconhecidos (#59, 63, 64) na faixa de pI 6,1-7,9 com aproximadamente 15 kDa.

Comparando os alérgenos de Dp reconhecidos por anticorpos IgE e IgG1 entre atópicos e não atópicos (Tabela 2), a reatividade de IgE foi exclusivamente detectada aos *spots* (#50-52, 60-61, 62), correspondendo aos alérgenos hipotéticos de 27 kDa, pI 7,4-8,0 (Der p 8), 15 kDa, pI 6,4-6,7 (Der p 5) e 15 kDa, pI 7,0 (Der p 2) respectivamente, conforme análise no banco de dados de proteínas (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>>UniProtKB/TrEMBL database).

A reatividade de IgG1 nos pacientes atópicos foi exclusivamente detectada aos *spots* (#46-48), correspondendo aos alérgenos hipotéticos de 30 kDa, pI 7,6-8,6 (Der p 3) e alguns *spots* (#7, 92 kDa, pI 6,6; #8-10, 70 kDa, pI 6,3-6,6) ainda indefinidos em bancos de dados de proteínas. A reatividade de IgG1 nos indivíduos não atópicos foi exclusivamente observada aos *spots* (#11-14), correspondendo aos alérgenos hipotéticos 62 kDa, pI 6,9-7,5 (grupo 15). Concomitantemente nos grupos de pacientes (A e NA) foi identificada reatividade de IgG1 para os *spots* (#31-33, #44-45) correspondendo aos alérgenos hipotéticos de 36 kDa, pI 6,6-7,2 (Der p 10).

Outros *spots* (#36-42) correspondentes aos alérgenos hipotéticos de 25 kDa, pI 5,4-6,5 (Der p 1), *spot* #59 de 15 kDa, pI 6,1 correspondendo ao alérgeno hipotético (Der p 5) foram reconhecidos concomitantemente por IgE em atópicos e IgG1 em não-atópicos. Também foi observado um reconhecimento concomitante por IgE e IgG1 tanto em atópicos quanto em não atópicos dos *spots* (#0-3, 18-19, 63-64), correspondendo aos alérgenos hipotéticos de 103 kDa, pI 5,1-5,6 (Der p 11), 52 kDa, pI 5,1-5,2 (grupo 18) e 15 kDa, pI 7,4-7,9 (Der p 2).

Tabela 2. Comparação dos alérgenos hipotéticos de *Dermatophagoides pteronyssinus* reconhecidos por anticorpos IgE em pacientes atópicos e IgG1 em atópicos (A) e não atópicos (NA).

#Spots	2D [£]		IgE	IgG1		Alérgeno hipotético [§]	Provável função molecular
	M _r (kDa)	pI		A	NA		
0	103	5,3	X	X	X	Der p 11	Paramiosina
1	103	5,4	X	X	X	Der p 11	Paramiosina
2	103	5,6	X	X	X	Der p 11	Paramiosina
3	86	5,1	X	X	X	?	?
4	85	5,6		X	X	?	?
5	85	5,7		X	X	?	?
6	85	5,8		X	X	?	?
7	92	6,6		X		?	?
8	70	6,3		X		?	?
9	70	6,5		X		?	?
10	70	6,6		X		?	?
11	62	6,9			X	Der p 15	Quitinase
12	62	7,1			X	Der p 15	Quitinase
13	62	7,3			X	Der p 15	Quitinase
14	62	7,5			X	Der p 15	Quitinase
18	52	5,1	X	X	X	Der p 18	Quitinase
19	52	5,2	X	X	X	Der p 18	Quitinase
31	36	6,6			X	Der p 10	Tropomiosina
32	36	6,7			X	Der p 10	Tropomiosina
33	36	7,0			X	Der p 10	Tropomiosina
36	25	5,4	X		X	Der p 1	Cisteína protease
37	25	5,5	X		X	Der p 1	Cisteína protease
38	25	5,7	X		X	Der p 1	Cisteína protease
39	25	5,9	X		X	Der p 1	Cisteína protease
40	25	6,1	X		X	Der p 1	Cisteína protease
41	25	6,4	X		X	Der p 1	Cisteína protease
42	25	6,5	X		X	Der p 1	Cisteína protease
44	36	6,8		X		Der p 10	Tropomiosina
45	36	7,2		X		Der p 10	Tropomiosina
46	30	7,6		X		Der p 3	Tripsina
47	30	8,2		X		Der p 3	Tripsina
48	30	8,6		X		Der p 3	Tripsina
50	27	7,4	X			Der p 8	Glutathione S-transferase
51	27	7,7	X			Der p 8	Glutathione S-transferase
52	27	8,0	X			Der p 8	Glutathione S-transferase
59	15	6,1	X		X	Der p 5	ND
60	15	6,4	X			Der p 5	ND
61	15	6,7	X			Der p 5	ND
62	15	7,0	X			Der p 2	Família NPC2
63	15	7,4	X	X	X	Der p 2	Família NPC2
64	15	7,9	X	X	X	Der p 2	Família NPC2

Números dos spots correspondentes ao mapeamento presente na Fig.6 A.

£ Dados experimentais calculados pelo software ImageMaster 2D Platinum 7.

§ Alérgenos hipotéticos <<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>>UniProtKB/TrEMBL database.

M_r, massa molecular relativa em kiloDaltons (kDa); pI (ponto isoelétrico); ? indefinido; ND não determinado; NPC2, Niemann-Pick C2.

5 Discussão

No presente estudo, os alérgenos imunodominantes de *D. pteronyssinus* reconhecidos por anticorpos IgE e IgG1, por meio de eletroforese 2D e *immunoblotting* 2D, em soros de indivíduos atópicos e não atópicos foram investigados. A grande importância da identificação e caracterização dos alérgenos se deve ao grande aumento na prevalência de doenças alérgicas, as quais são ligadas a vários fatores como predisposição genética, influências ambientais, exposição aos alérgenos, dentre outros (TORRES-BORREGO; MOLINA-TERÁN; MONTES-MENDOZA, 2008).

A análise dos indivíduos atópicos e não atópicos selecionados em nosso estudo revelou predominância do gênero feminino em ambos os grupos, com representatividade de 60% no grupo A e de 76% no grupo NA. Um fator que pode estar envolvido nesta predominância de pacientes do gênero feminino poderia ser a percepção diferente dos sintomas em relação aos homens, o que leva a procura de atendimento clínico visando à melhora dos sintomas e consequentemente da qualidade de vida, muito afetada pela cronicidade da rinite e também da asma (BAQUEIRO et al., 2007).

A alta prevalência (78%) encontrada para sensibilização concomitante aos alérgenos de *D. pteronyssinus* e de *D. farinae* determinados por reatividade ao TCP no grupo A, confirma que os ácaros do gênero *Dermatophagoides* são importante fonte de alérgenos, os quais quando inalados se tornam o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias, particularmente rinite e asma, em indivíduos geneticamente predispostos (BARNES; MARSH, 1998; PLATTS-MILLS; WHEATLEY; AALBERSE, 1998).

Com o intuito de conhecer o perfil de sensibilização de pacientes com doenças alérgicas em Uberlândia, Soares e colaboradores (2007) detectaram que os principais alérgenos sensibilizantes foram *D. pteronyssinus* e *D. farinae* com porcentagem de positividade ao TCP semelhante ao encontrado no presente estudo.

A sensibilização a *D. pteronyssinus* foi também mensurada *in vitro* por ELISA, mostrando maiores níveis de IgE específica a Dp em atópicos comparados aos não atópicos, mas a soropositividade e os níveis de IgG1 a Dp não foram significativamente diferentes entre os grupos. Estes dados são reforçados por estudo

mostrando que proteínas do ácaro estimulam respostas imunes mediadas por IgE, mas também por IgG1 e IgG4 a antígenos inalados em pacientes alérgicos por meio de citocinas Th1/Th2 (THOMAS; HALES, 2007). Além disso, estas proteínas podem induzir proliferação de células T e citocinas Th1 mesmo em indivíduos saudáveis, uma vez que são capazes de produzir IgG e subclasses alérgeno-específicas, mas não anticorpos IgE (THOMAS; HALES, 2007).

Diferentes estudos têm considerado a importância das subclasses de IgG, IgG1 e IgG4 notadamente, específicas a alérgenos. Kenemy e colaboradores (1989) verificaram níveis semelhantes de anticorpos IgG1 específicos a ácaros da poeira domiciliar em indivíduos atópicos e não atópicos, similarmente ao observado por Pereira e colaboradores (2005) ao ácaro *Blomia tropicalis*, em concordância ao observado em nosso estudo. No trabalho conduzido por Ruiz, Price e Kemeny (1994) foi observado além da predominância da subclasse IgG1, a alta afinidade de ligação apresentada por estas moléculas a antígenos de *D. pteronyssinus*.

Dentre as relevâncias atribuídas aos anticorpos IgG1 e IgG4 específicos aos alérgenos, destaca-se a capacidade bloqueadora capaz de inibir a ação da IgE, função esta relacionada à alta afinidade de ligação e maior concentração sérica, uma vez que tal atividade se dá por competição ao epítipo antigênico (VAN REE; AALBERSE, 1995; MEILER et al., 2008). A importância dos anticorpos IgG de alta afinidade é considerável, uma vez que investigações apontam que a presença dos mesmos, em especial IgG1 e IgG4, a alérgenos de pólen e de ácaros da poeira é muito mais comum em indivíduos alérgicos que apresentam altos níveis de IgE alérgeno-específica do que em indivíduos não atópicos que não apresentam IgE específica (AALBERSE et al., 2009). No intuito de esclarecer a distinção da base imunológica para a manifestação de um perfil distinto de subclasses de IgG específica a alérgenos, Martinez-Alonso, Coutinho e Agustin (1980) sugerem que uma possível explicação é que cada tipo de alérgeno pode ser processado diferencialmente por células apresentadoras de antígenos de tal forma que as células T *helper* desenvolvem um padrão especial de citocinas dirigido pelo alérgeno, controlando a expressão das subclasses de IgG bem como a afinidade do anticorpo. Outro fator importante no

direcionamento do processo de maturação da afinidade pode estar relacionado com exposições antigênicas repetidas e prolongadas (RAMOS et al., 2003; DEVEY; BECKMAN; KEMENY, 1993).

Recentemente, a função da subclasse IgG1 específica a alérgenos foi inversamente relacionada com a sensibilização de basófilos (CADY et al., 2009). Os autores demonstraram que os níveis de anticorpos IgG1 específicos aos alérgenos de epitélio de gato foram associados com diminuição da sensibilização de basófilos, independente dos níveis de IgE específicos, confirmando o papel protetor/bloqueador desta subclasse.

A frequência dos componentes do extrato de Dp reconhecidos por anticorpos IgE e IgG1 foi analisada para obter informação sobre o padrão de reatividade dos atópicos e não atópicos. Pelo menos vinte componentes ligantes de IgE (11-110 kDa) foram detectados no extrato de Dp por *immunoblotting* 1D, similar ao estudo prévio que identificou 19 componentes variando de 13-116 kDa no extrato de Dp (ACEVEDO et al., 2009), sendo que 14 deles apresentaram massas moleculares iguais ou muito similares às bandas polipeptídicas ligantes de IgE encontradas em nosso estudo. Em relação aos componentes de Dp ligantes de IgG1 foi possível identificar 15 bandas polipeptídicas reconhecidas por pacientes atópicos e 17 reconhecidas por indivíduos não atópicos, mas pouco é discutido na literatura sobre os alérgenos reconhecidos por IgG1 específica a Dp.

Atualmente, há pelo menos 18 grupos de alérgenos de *D. pteronyssinus* já caracterizados, segundo o Subcomitê de Nomenclatura dos alérgenos, Lorenz e colaboradores (2009), O'Neil e colaboradores (2006) e base de dados Allergome, o que possibilita um maior conhecimento relativo à predominância da reatividade destes diferentes alérgenos. No presente estudo, a mais freqüente reatividade de IgE (80%) foi direcionada ao alérgeno de 15 kDa (grupo 2), seguida por 63% ao de 103 kDa (grupo 11) e 50% ao de 60 kDa (grupo 15). Estes achados mostram que a grande maioria dos pacientes atópicos testados reconheceram o grupo 2, o que corrobora dados prévios demonstrando que os alérgenos dos grupos 1 e 2 apresentam grande capacidade de ligação à IgE (80%) (THOMAS; SMITH; HALES, 2004). Entretanto, a

reatividade de IgE ao componente de 25 kDa (grupo 1) foi menor que 50% no nosso grupo de pacientes, contrastando com dados na literatura e reforçando que o alérgeno de Dp mais sensibilizante nestes pacientes foi do grupo 2, seguido pelos alérgenos dos grupos 11 e 15.

Neste contexto, Lee e colaboradores (2004) clonaram e caracterizaram o alérgeno do grupo 11 (103 kDa) como Der p 11, mostrando reatividade de IgE relativamente alta (42-67%) no soro de pacientes de Taiwan alérgicos a ácaros. Além disso, um estudo prévio caracterizou o alérgeno quitinase como Der p 15 de Dp, o qual mostrou alta frequência (70%) de ligação à IgE no soro de pacientes australianos alérgicos (O'NEIL et al., 2006).

Uma pesquisa recente demonstrou por meio da comparação de diferentes extratos de *D. pteronyssinus* que a mistura dos grupos de alérgenos 1, 2, 5, 7, 8 e 10 se ligam em média a 76% de IgE específica a *D. pteronyssinus* (BRUNETTO et al., 2010). Portanto, um teste diagnóstico consistindo da mistura de Der p1, Der p 2, Der p 5 e Der p 7 parece ser suficiente para o diagnóstico da sensibilização na Europa (WEGHOFER et al., 2008) e na Austrália (HALES et al., 2007).

Quando foi analisado o padrão dos componentes de Dp reconhecidos por anticorpos IgG1, vale a pena ressaltar uma mudança do perfil de reconhecimento para proteínas com alto peso molecular em ambos os grupos, os quais exibiram uma reatividade predominante para bandas acima de 50 kDa, provavelmente correspondendo aos alérgenos dos grupos 11, 15 e 18 (THOMAS; SMITH; HALES, 2004). Destes, somente o componente de 103 kDa (grupo 11) foi consideravelmente mais reconhecido por indivíduos não atópicos. Estes achados sugerem que enquanto os alérgenos ligantes de IgE mais estudados são os de menor peso molecular, os alérgenos ligantes de IgG1 têm alto peso molecular, refletindo em diferenças no reconhecimento dos isotipos, particularmente em indivíduos não atópicos. Por outro lado, quando os componentes ligantes de IgG1 abaixo de 30 kDa foram analisados, houve predominância de reconhecimento em não atópicos, reforçando que pacientes atópicos respondem a alérgenos de baixo peso molecular preferencialmente com anticorpos IgE.

É sabido que alérgenos de Dp podem ocorrer na forma de múltiplos isoalérgenos, os quais se diferenciam nas sequências de aminoácidos e consequentemente em sua atividade, tendo assim impacto importante no diagnóstico e imunoterapia das alergias a ácaros (CHUA; KEHAL; THOMAS, 1993; CHUA et al., 1996; SMITH; THOMAS, 1996; LIN et al., 1994; SHEN et al., 1995). Neste estudo, nós investigamos potenciais isoformas de alérgenos separados por eletroforese 2D presentes no extrato de Dp por meio do *immunoblotting* para IgE e IgG1. Soros de pacientes selecionados para esta análise foram reunidos em uma única amostra, sendo eles representativos dos padrões de reatividade individual obtidos no *immunoblotting* 1D, embora possam não ser representativos de diferentes populações.

Nossos resultados mostraram que pacientes atópicos reconheceram os alérgenos hipotéticos Der p 2 (15 kDa, pI 7,0), Der p 5 (15 kDa, pI 6,4-6,7) e Der p 8 (27 kDa, pI 7,4-8,0) como isoalérgenos reconhecidos exclusivamente por IgE. Estes achados foram concordantes com os relatos de Weghofer e colaboradores (2005) que identificaram por meio de *immunoblotting* bidimensional de inibição, uma eficiente inibição dos alérgenos recombinantes dos grupos 2, 5 e 8, em adição ao grupo 7, ressaltando assim a importância de tais grupos. Batard e colaboradores (2006), utilizando extratos de Dp obtidos sob diferentes condições, também observaram por meio da eletroforese bidimensional, que as proteínas mais abundantes dentre os 50 *spots* predominantes, foram caracterizadas como pertencentes aos grupos 1, 2, 10 em adição às proteínas com homologia à actina, tubulina e ferritina.

O alérgeno hipotético Der p 3 (30 kDa, pI 7,6-8,6) foi o isoalérgeno reconhecido exclusivamente por anticorpos IgG1 em pacientes atópicos. Por outro lado, alérgenos hipotéticos do grupo 15 (62 kDa, pI 6,9-7,5) foram reconhecidos exclusivamente por anticorpos IgG1 em indivíduos não atópicos. Estes achados sugerem um reconhecimento diferencial de alguns isoalérgenos de Dp por diferentes isotipos de anticorpos, IgE ou IgG1, presentes no soro de atópicos e não atópicos.

Outros alérgenos, entretanto, foram concomitantemente reconhecidos por anticorpos IgG1 em atópicos e não atópicos, como o alérgeno hipotético Der p 10 (36 kDa, pI 6,6-7,2), indicando um potencial candidato para procedimentos

imunoterápicos. Adicionalmente, outros alérgenos foram reconhecidos concomitantemente por IgE em atópicos e IgG1 em não atópicos, como os alérgenos hipotéticos Der p 1 (25 kDa, pI 5,4-6,5) e Der p 5 (15 kDa, pI 6,1). Finalmente, um reconhecimento concomitante por IgE e IgG1 em ambos atópicos e não atópicos foi observado para os alérgenos hipotéticos Der p 11 (103 kDa, pI 5,3-5,6), grupo 18 (52 kDa, pI 5,1-5,2) e Der p 2 (15 kDa, pI 7,4-7,9), sugerindo que tais alérgenos devem ser capazes de induzir tanto anticorpos anafiláticos quanto bloqueadores em pacientes atópicos e anticorpos protetores em indivíduos não atópicos.

Deve ser enfatizado que vários outros componentes do extrato de Dp ligantes de IgE e/ou IgG1, com destaque aos componentes entre 70-92 kDa e pI 5,1-6,6, ainda permanecem indefinidos em bancos de dados de proteínas pesquisados. Portanto, estudos futuros deverão ser conduzidos para melhor caracterizar estes isoalérgenos, por espectrometria de massa, os quais serão essenciais na identificação de potenciais isoalérgenos para avaliação das respostas de células T e B aos alérgenos individuais, além dos principais alérgenos já conhecidos dos grupos 1 e 2, o que possibilitará a melhoria de ferramentas diagnósticas de alergia e o monitoramento efetivo da imunoterapia alérgeno-específica (CHRUSZCZ et al., 2009; HALES; SHEN; THOMAS, 2000).

Adicionalmente, a caracterização dos isoalérgenos de Dp possibilitará a produção de alérgenos recombinantes, os quais utilizados em conjunto permitirão estabelecer testes diagnósticos visando melhor definição dos perfis de reatividade dos pacientes alérgicos e, além disso, utilizá-los no acompanhamento de pacientes sob imunoterapia, bem como seu uso potencial nos procedimentos da imunoterapia específica a alérgenos.

6 Conclusões

- Alérgenos do ácaro *D. pteronyssinus* são capazes de levar à produção de anticorpos IgE específicos em pacientes atópicos, além de anticorpos IgG1 alérgeno-específicos em pacientes atópicos e não atópicos;
- O extrato de *D. pteronyssinus* apresenta reatividade diferenciada em relação aos anticorpos IgE e IgG1, com predominância de reconhecimento por IgG1 de bandas com maior massa molecular aparente;
- Determinados isoalérgenos apresentam reconhecimento diferencial entre os grupos de indivíduos estudados, uma vez que alguns são reconhecidos exclusivamente por anticorpos IgE ou IgG1, e outros reconhecidos por anticorpos IgE em atópicos e por anticorpos IgG1 em não atópicos;
- Reconhecimento concomitante por anticorpos IgE e IgG1 em atópicos e não atópicos a alguns isoalérgenos, sugere que os mesmos podem ser capazes de induzir tanto anticorpos anafiláticos quanto anticorpos bloqueadores em pacientes atópicos, bem como anticorpos protetores em indivíduos saudáveis;
- Alguns componentes de *D. pteronyssinus* ligantes de IgE e/ou IgG1 detectados (70-92 kDa; pI 5,1-6,6) ainda são ausentes em bancos de dados de proteínas, e merecem assim atenção especial.

*Referências Bibliográficas**

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

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

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

ACEVEDO, N.; SÁNCHEZ, J.; ERLER, A.; MERCADO, D.; BRIZA, P.; KENNEDY, M.; FERNANDEZ, A.; GUTIERREZ, M.; CHUA, K. Y.; CHEONG, N.; JIMÉNEZ, S.; PUERTA, L.; CARABALLO, L. IgE cross-reactivity between *Ascaris* and domestic mite allergens: the role of tropomyosin and the nematode polyprotein ABA-1. **Allergy**, v. 64, n. 11, p. 1635-1643, 2009.

AKDIS, C. A.; AKDIS, M.; BLESKEN, T. ; WYMAN, D.; ALKAN, S. S.; MULLER U.; BLASER, K. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 7, p. 1676-1683, 1996.

AKDIS, M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 738-744, 2006.

ALLERGEN NOMENCLATURE. Disponível em: <<http://www.allergen.org/allergen.aspx>>. Acesso em 02 dez. 2009.

ALLERGOME. Disponível em: <http://www.allergome.org/script/search_step2.php>. Acesso em 02 dez. 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**, v. 39, n. 11, p. 1445-1454, 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**, v. 41, n. 9, p. 773-781, 2008.

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

ARLIAN, L. G. House dust mites. In: MACHER, J. Ed. **Bioaerosols: assessment and control**. Cincinnati: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 1999, p. 22.1– 22.9.

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

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S. Biology, ecology, and prevalence of dust mites. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 443– 468, 2003.

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

ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D. A review of recent immunochemical studies of *Blomia tropicalis* and *Euroglyphus maynei* allergens. **Experimental and Applied Acarology**, v. 6, n.1-2, p. 129-140, 1992.

ASHER, M. I.; MONTEFORT, S.; BJÖRKSTÉN, B.; LAI, C. K.; STRACHAN, D. P.; WEILAND, S. K.; WILLIAMS, H.; ISAAC PHASE THREE STUDY GROUP. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **Lancet**, v. 368, n. 9537, p. 733-743, 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**, v. 28, n. 3, p. 362-367, 2007.

BARNES, K. C.; MARSH, D. G. The genetics and complexity of allergy and asthma. **Immunology today**, v. 19, n. 7, p. 325-332, 1998.

BATARD, T.; BASUYAUX, B.; LAMBIN, P.; BREMARD-OURY, C.; HAMILTON, R. G.; DAVID, B.; PELTRE, G. Isotypic analysis of grass pollen-specific immunoglobulins in human plasma. 1. Specialization of certain classes and subclasses in the immune response. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 100, n. 1, p. 68-78, 1993.

BATARD, T.; BASUYAUX, B.; LAROZE, A.; LAMBIN, P.; BREMARD-OURY, C.; AUCOUTURIER, P.; HAMILTON, R. G.; DAVID, B.; PELTRE, G. Isotypic analysis of grass-pollen-specific immunoglobulins in human plasma. 2. Quantification of the IgE, IgM, IgA class and the IgG subclass antibodies. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 102, n. 3, p. 279-287, 1993.

BATARD, T.; HRABINA, A.; BI, X. Z.; CHABRE, H.; LEMOINE, P.; COURET, M.; FACCENDA, D.; VILLET, B.; HARZIC, P.; ANDRÉ, F.; GOH, S. Y.; ANDRÉ, C.; CHEW, F. T.; MOINGEON, P. Production and Proteomic Characterization of Pharmaceutical-Grade *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* Extracts for Allergy Vaccines. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 140, n. 4, p. 295-305, 2006.

BENNDORF, D.; MÜLLER, A.; BOCK, K.; MANUWALD, O.; HERBARTH, O.; VON BERGEN, M. Identification of spore allergens from the indoor mould *Aspergillus versicolor*. **Allergy**, v. 63, n. 4, p. 454-460, 2008.

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

BOLUDA, L.; CUADRA, B.; BERRENS, L. Binding affinities of allergens from pollen, mites, and house dust for specific IgG subclass antibodies. **Allergy**, v. 51, n. 10, p. 706-711, 1996.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its Impact on Asthma: Aria Workshop Report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 5, p. s147-s270, 2001.

BRAUN-FAHRLÄNDER, C.; RIEDLER, J.; HERZ, U.; EDER, W.; WASER, M.; GRIZE, L.; MAISCH, S.; CARR, D.; GERLACH, F.; BUFE, A.; LAUENER, R. P.; SCHIERL, R.; RENZ, H.; NOWAK, D.; VON MUTIUS, E.; ALLERGY AND ENDOTOXIN STUDY TEAM. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 12, p. 869-877, 2002.

BRUNETTO, B.; TINGHINO, R.; BRASCHI, M. C.; ANTONICELLI, L.; PINI, C.; IACOVACCI, P. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. **Allergy**, v. 65, n. 2, p. 184-190, 2010.

CADY, C. T.; POWELL, M. S.; HARBECK, R. J.; GICLAS, P. C.; MURPHY, J. R.; KATIAL, R. K.; WEBER, R. W.; HOGARTH, P. M.; JOHNSON, S.; BONVINI, E.; KOENIG, S.; CAMBIER, J. C. IgG antibodies produced during subcutaneous allergen immunotherapy mediate inhibition of basophil

activation via a mechanism involving both Fc γ RIIA and Fc γ RIIB. **Immunology Letters**, v. xx, n.x, 2009.

CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. E. Purification and characterization of the major allergen from *D. pteronyssinus*-antigen PI. **Journal of Immunology**, v. 125, n. 2, p. 587-592, 1980.

CHAPMAN, M. D.; ROWNTREE, S.; MITCHELL, E. B.; DI PRISCO DE FUENMAJOR, M. C.; PLATTS-MILLS, T. A. Quantitative assessments of IgG and IgE antibodies to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 72, n. 1, p. 27-33, 1983.

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

CHRUSZCZ, M.; CHAPMAN, M. D.; VAILES, L. D.; STURA, E. A.; SAIN-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**, v. 386, n. 2, p. 520-530, 2009.

CHUA, K. Y.; KEHAL, P. K.; THOMAS, W. R. Sequence polymorphisms of cDNA clones encoding the mite allergen Der p 1. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 101, n. 4, p. 364-368, 1993.

CHUA, K. Y.; HUANG, C. H.; SHEN, H. D.; THOMAS, W. R. Analysis of sequence polymorphism of a major mite allergen, Der p 2. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 26, n. 7, p. 829-837, 1996.

COUSINS, D. J.; LEE, T. H.; STAYNOV, D. Z. Cytokine coexpression during human TH1/TH2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of TH2 cytokines. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 5, p. 2498-2506, 2002.

CRAMERI, R. Correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. **Biochemical Journal**, v. 376, n. 1, e1-e2, 2003.

DABERT, M.; WITALINSKI, W.; KAZMIERSKI, A.; OLSZANOWSKI, Z.; DABERT, J. Molecular phylogeny of acariform mites (Acari, Arachnida): Strong conflict between phylogenetic signal and long-branch attraction artifacts. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. xx, p. xx-xx, 2010.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 67, n. 1, p. 52-54, 1986.

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

DE CANIO, M.; D'AGUANNO, S.; SACCHETTI, C.; PETRUCCI, F.; CAVAGNI, G.; NUC CETELLI M.; FEDERICI, G. Novel IgE Recognized Components of *Lolium perenne* Pollen Extract: Comparative Proteomics Evaluation of Allergic Patients Sensitization Profiles. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 9, p. 4383-4391, 2009.

DEVEY, M. E.; WILSON, D. V.; WHEELER, A. W. The IgG subclass of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensitization. **Clinical Allergy**, v. 6, n. 3, p. 227-236, 1976.

DEVEY, M. E.; BECKMAN, S.; KEMENY, D. M. The functional affinities of antibodies of different IgG subclasses to dietary antigens in mothers and their babies. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 94, n.1, p. 117-121, 1993.

DREBORSG, Ed. Skin tests used in type I allergy testing. Position Paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. **Allergy**, v. 1-59, 1989. Supplement 10.

DYKEWICZ, M. S.; FINEMAN, S. Executive Summary of Joint Task Force Practice Parameters on Diagnosis and Management of Rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 81, n. 5, p. 463-468, 1998.

EPTON, M. J.; SMITH, W.; HALES, B. J.; HAZELL, L.; THOMPSON, P. J.; THOMAS W. R. Non-allergenic antigen in allergic sensitization: responses to the mite ferritin heavy chain antigen by allergic and non-allergic subjects. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, n. 9, p. 1341-1347, 2002.

FERNANDES-CALDAS, E. Mite species of allergologic importance in Europe. **Allergy**, v. 52, n. 4, p. 383-387, 1997.

FLANAGAN, J. C.; RABBITTS, T. H. Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing gamma, epsilon and alpha genes. **Nature**, v. 300, n. 5894, p. 709-713, 1982.

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

GELLER, M.; ESCH, R. E.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Sensibilização acarina na atopia respiratória do Rio de Janeiro – considerações preliminares. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, v.153, n. 4, p.174-175, 1993.

GOULD, H. J.; SUTTON, B. J. IgE in allergy and asthma today. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 205-217, 2008.

HALES, B. J.; SHEN, H.D.; THOMAS, W. R. Cytokine responses to Der p 1 and Der p 7: house dust mite allergens with different IgE-binding activities. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 934-943, 2000.

HALES, B. J.; LAING, I. A.; PEARCE, L. J.; HAZELL, L. A.; MILLS, K. L.; CHUA, K. Y.; THORNTON, R. B.; RICHMOND, P.; MUSK, A. W.; JAMES, A. L.; LESOUËF, P. N.; THOMAS, W. R. Distinctive immunoglobulinE anti-house dust allergen-binding specificities in a tropical Australian Aboriginal community. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, n. 9, p. 1357-1363, 2007.

HESELMAR, B.; ABERG, B.; ERIKSSON, B.; BJORKSTÉN, B.; ABERG, N. Building characteristics affect the risk of allergy development. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 16, n. 2, p. 126-131, 2005. HOLGATE, S.T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 218-230, 2008.

HUBY, R. D. J.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Why are some proteins allergens? **Toxicological Sciences**, v. 55, n. 2, p. 235, 246, 2000.

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**, v. 351, n. 9111, p. 1225-1323, 1998.

- JACKOLA, D. R.; PIERSON-MULLANY, L. K.; LIEBELER, C. L.; BLUMENTHAL, M. N.; ROSENBERG, A. Variable binding affinities for allergen suggests a 'selective competition' among immunoglobulins in atopic and non-atopic humans. **Molecular Immunology**, v. 39, n.5-6, p.367-377, 2002.
- JOHANSSON, S. G. O.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S.; LANIER, B. Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; MARTELL, J. A. O.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; RING, J.; THIEN, J. 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**, v. 113, n. 5, p. 832-836, 2004.
- JUTEL, M.; JAEGER, L.; SUCK, R.; MEYER, H.; MATH, D.; FIEBIG, H.; CROMWELL, O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 3, p. 608-613, 2005.
- KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1589, n. 1, p. 1-13, 2002.
- KAWAGUCHI, M.; KOKUBU, F.; FUJITA, J.; HUANG, S. K.; HIZAWA, N. Role of interleukin-17F in asthma. **Inflammation and Allergy Drug Targets**, v. 8, n. 5, p. 383-389, 2009.
- KENEMY, D. M.; URBANEK, R.; EWAN, P.; MCHUGH, S.; RICHARDS, D.; PATEL, S.; LESSOF, M. H. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 19, n. 5, p. 545-549, 1989.
- KING, T. P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. **Allergy**, v. 50, n. 9, p. 765-774, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LAVER, W. G.; AIR, G. M.; WEBSTER, R. G.; SMITH-GILL, S. J. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. **Cell**, v. 61, n. 4, p. 553-556, 1990.
- LEE, C. S.; TSAI, L. C.; CHAO, P. L.; LIN, C. Y.; HUNG, M. W.; CHIEN, A. I.; CHIANG, Y. T.; HAN, S. H. Protein sequence analysis of a novel 103-kDa *Dermatophagoides pteronyssinus* mite allergen and prevalence of serum immunoglobulin E reactivity to rDer p 11 in allergic adult patients. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, n. 3, p. 354-362, 2004.
- LEDFORD, D. K. Indoor allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 94, n. 2, p. 327-334, 1994.
- LEMANSKE, R. F. JR; BUSSE, W. W. Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. s502-s519, 2003. Supplement 2.
- LIN, K. L.; HSIEH, K. H. ; THOMAS, W. R.; CHIANG, B. L.; CHUA, K. Y. Characterization of Der p V allergen, cDNA analysis, and IgE-mediated reactivity to the recombinant protein. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 94, n. 6, p. 989-996, 1994.
- LORENZ, A. R.; LÜTTKOPF, D.; MAY, S.; SCHEURER, S.; VIETHS, S. The principle of homologous groups in regulatory affairs of allergen products-a proposal. **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 Folin-pheol reagent. **Journal of Biological Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

- LUENGO, O.; MOLLÁ, R.; GÁMEZ, C.; CARDONA, V.; LÓPEZ, E.; SASTRE, B.; WAISE, Y.; BELMONTE, J.; CADAHIA, Á.; LAHOZ, C.; DEL POZO, V. Allergenicity and cross-reactivity of *Senecio* pollen: identification of novel allergens using the immunoproteomics approach. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 6, p. 1048-1060, 2008.
- MAO, L. J.; MAYER, C. E.; PELTRE, G.; DESVAUX, F. X.; DAVID, B.; WEYER, A.; SÉNÉCHAL, H. Mapping of *Dermatophagoides farinae* mite allergens by two-dimensional immunoblotting. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, n. 4, p. 631-636, 1998.
- MARTINEZ-ALONSO, C.; COUTINHO, A.; AGUSTIN, A. A. Immunoglobulin G-gene expression. I. The commitment to IgG subclass of secretory cells is determined by the quality of the non-specific stimuli. **European Journal of Immunology**, v. 10, n. 9, p. 698-702, 1980.
- MARSH, D. G.; NEELY, J. D.; BREAZEALE, D. R.; GHOSH, B.; FREIDHOFF, L. R.; EHRLICH-KAUTZKY, E.; SCHOU, C.; KRISHNASWAMY, G.; BEATY, T. H. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. **Science**, v. 264, n. 5162, p. 1152-1156, 1994.
- MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 469-478, 2004.
- MASTRANDREA, F.; SERIO, G.; MINARDI, A.; CORADDUZZA, G.; ROSSI, N.; SCARCIA, G.; MAIETTA, G.; IACOBELLI, A.; LAMANNA, C.; TURSI, A. IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy. **Allergy**, v. 52, n. 11, p. 1115-1119, 1997.
- 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**, v. 63, n. 11, p. 1455-1463, 2008.
- 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.
- NOON, L. Prophylactic inoculation against hayfever. **Lancet**, v. 177, n. 4580, p. 1572-1573, 1911.
- OBBER, C.; HOFFJAN, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. **Genes and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 95-100, 2006.
- OBOKI, K.; OHNO, T.; SAITO, H.; NAKAE, S. Th17 and allergy. **Allergology International**, v. 57, n. 2, 2008.
- O'NEIL, S. E.; HEINRICH, T. K.; HALES, B. J.; HAZELL, L. A.; HOLT, D. C.; FISCHER, K.; THOMAS, W. R. The chitinase allergens Der p 15 and Der p 18 from *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, n. 6, p. 831-839, 2006.
- OWNBY, D. Allergy testing: in vivo versus in vitro. **Pediatric Clinics of North America**, v. 35, n. 5, p. 995-1009, 1988.
- PEREIRA, E. A. L.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; ALMEIDA, K. C.; ALVES, R.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy**, v. 60, n. 3, p. 401-406, 2005.
- PERFETTI, L.; FERRARI, M.; GALDI, E.; POZZI, V.; COTTICA, D.; GRIGNANI, E.; MINOIA, C.; MOSCATO, 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**, v. 328, n. 1-3, p. 15-21, 2004.

PERZANOWSKI, M. S.; RÖNNMARK, E.; PLATTS-MILLS, T. A.; LUNDBÄCK, B. Effect of cat and dog ownership on sensitization and development of asthma among preteenage children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 5, p. 696-702, 2002.

PIKE, A. J.; CUNNINGHAM, M. J.; LESTER, P. J. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) at constant and simultaneously fluctuating temperature and humidity conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 266-269, 2005.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; WECK, A. L. Dust mite allergens and asthma - A worldwide problem. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 83, n. 2, p. 416-427, 1989.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; VERVLOET, D.; CHAPMAN, M. D. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 89, n. 5, p. 1046-1060, 1992.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; CHAPMAN, M. D. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, n. 6, p. s2-s24, 1997.

PLATTS-MILLS, T. A.; WHEATLEY, L. M.; AALBERSE, R. C. Indoor versus outdoor allergens in allergic respiratory disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, n. 6, p. 634-639, 1998.

PLATTS-MILLS, T. A. Indoor Allergens. In: ADKINSON, N. F. JR., YUNGINGER, J. W.; BUSSE, W. W.; BOCHNER, B. S.; HOLGATE, S. T.; SIMONS, F. E. R. Ed. **Allergy Principles and Practice**. New York: Mosby; 2003. p. 465-78.

RAMOS, J. D. A.; CHEONG, N.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. Peptide mapping of immunoglobulin E and immunoglobulin G immunodominant epitopes of an allergenic *Blomia tropicalis* paramyosin, Blot 11. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, n. 4, p. 511-517, 2003.

RAVETCH, J. V.; KINET, J. P. Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 9, p. 457-492, 1991.

RING, J.; KRÄMER, U.; SCHÄFER, T.; BEHRENDT, H. Why are allergies increasing? **Current Opinion in Immunology**, v. 13, n. 6, p. 701-708, 2001.

ROLLAND, J. M.; DOUGLASS, J.; O'HEHIR, R. E. Allergen immunotherapy: current and new therapeutic strategies. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v. 9, n. 3, p. 515-527, 2000.

RUIZ, R. G. G.; PRICE, J. F.; KEMENY, D. M. Specificity of ELISA for IgG subclass antibodies against inhalant antigens in early childhood. **Allergy**, v. 49, n. 9, p. 719-723, 1994.

SALLUSTO, F.; QUINTIERI, F.; PUGLIESE, O.; REALE, G.; PINI, C.; DIFELICE, G. T-cell and antibody response to *Parietaria judaica* allergenic fractions in atopic and nonatopic individuals. **Allergy**, v. 48, n. 1, p. 37-44, 1993.

SAVOLAINEN, J.; VIANDER, M.; KOIVIKKO, A. IgE-, IgA- and IgG-antibody responses to carbohydrate and protein antigens of *Candida albicans* in asthmatic children. **Allergy**, v. 45, n. 1, p. 54-63, 1990.

SCHEI, M. A.; HESSEN, J. O.; LUND, E. House-dust mites and mattresses. **Allergy**, v. 57, n. 6, p. 538-542, 2002.

SECRIST, H.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. Interleukin 4 production by CD4+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen- presenting cell type. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 3, p. 1081-1089, 1995.

SELA, M. Antigenicity: some molecular aspects. **Science**, v. 166, n. 911, p. 1365-1374, 1969.

SHEN, D. H.; CHUA, K. Y.; LIN, W. L.; HSIEH, K. H.; THOMAS, W. R. Characterization of the house dust mite allergen Der p 7 by monoclonal antibodies. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 25, n. 5, p. 416-422, 1995.

SILVA, D. A. O.; GERVÁSIO, A. M.; SOPELETE, M. C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; SUNG-SANG, J. S.; TAKETOMI, E. A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 86, n. 5, p. 545-550, 2001.

SIMONS, F. E. R. Ed. **Ancestors of Allergy**. New York: New York Global Medical Communications, 1994. p. 110-117.

SLY, R. M. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 82, n. 3, p. 233-248, 1999.

SMITH, A. M.; YAMAGUCHI, H.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; FU, S. M. Prevalence of IgG Anti-Der p 2 Antibodies in Children from High and Low Antigen Exposure Groups: Relationship of IgG and Subclass Antibody Responses to Exposure and Allergic Symptoms. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 86, n. 1, p. 102-109, 1998.

SMITH, W. A.; THOMAS, W. R. Sequence polymorphisms of Der p 3 house dust mite allergen. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 26, n. 5, p. 571-579, 1996.

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

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ: British Medical Journal**, v. 299, n. 6710, p. 1259-1260, 1989.

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**, v. 14, n. 3, p. 232-7, 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**, v. 129, n. 1, p. 1-18, 2002.

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

THOMAS, W. R.; HALES, B. J. T and B Cell Responses to HDM Allergens and Antigens. **Immunologic Research**, v. 37, n. 3, p. 187-199, 2007.

THOMAS, W. R.; HEINRICH, T. K.; SMITH, W. A.; HALES, B. J. Pyroglyphid House Dust Mite Allergens. **Protein and Peptide Letters**, v. 14, n. 10, p. 943-953, 2007.

TORRES-BORREGO, J.; MOLINA-TERÁN, A. B.; MONTES-MENDOZA, C. Prevalence and associated factors of allergic rhinitis and atopic dermatitis in children. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 36, n. 2, p. 90-100, 2008.

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

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TRAIDL-HOFFMANN, C.; JAKOB, T.; BEHRENDT, H. Determinants of allergenicity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 3, 2009.

TURKELTAUB, P. C.; GERGEN, P. J. The risk of adverse reactions from percutaneous prick-puncture allergen skin testing, venepuncture, and body measurements: data from the Second National Health and Nutrition Examination Survey 1976-80 (NHANES II). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 84, n. 6, p. 886-890, 1989.

VAN BRONSWIJK, J. E. M. H.; SINHA, R. N. Pyroglyphid mites (Acari) and house dust allergy. **Journal of Allergy**, v. 47, n. 1, p. 31-52, 1971.

VAN REE, R.; AALBERSE, R. C. Demonstration of carbohydrate specific immunoglobulin G4 antibodies in sera of patients receiving grass pollen immunotherapy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 106, n. 2, p. 146-148, 1995.

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

VOORHORST, R.; SPIEKSMAN, F. T. H. M.; VAREKAMP, H.; LEUPEN, M. J.; LYKLEMA, A. W. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces: identity with the house dust allergen. **Journal of Allergy**, v. 39, n. 6, p. 325-339, 1967.

WALLACE, D. V.; DYKEWICZ, M. S. The diagnosis and management of rhinitis: An updated practice parameter. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, p. s1-s84, 2008. Supplement 2.

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. et al. Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 8, p. 1000166, 2008.

WEGHOFFER, M.; THOMAS, W. R.; PITTNER, G.; HORAKZ, F.; VALENTA, R.; VRTALA, S. Comparison of purified *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens and extract by two-dimensional immunoblotting and quantitative immunoglobulin E inhibitions. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, n. 10, p. 1384-1391, 2005.

WEGHOFFER, M.; THOMAS, W. R.; KRONQVIST, M.; MARI, A.; PUROHIT, A.; PAULI, G.; HORAK, F.; GRÖNLUND, H.; VAN HAGE, M.; VALENTA, R.; VRTALA, S. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 38, n. 12, p. 959-965, 2008.

WILLIAMS, L. W. Allergy Skin Tests: Use and Interpretation. In: CASTRO, M.; KRAFT, M. **Clinical Asthma**. Elsevier: 2008.

WONG, C. K.; HO, C. Y.; KO, F. W.; CHAN, C. H.; HO, A. S.; HUI, D. S.; LAM, C. W. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 125, n. 2, p. 177-183, 2001.

Anexos

Anexo A



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

ANÁLISE FINAL Nº 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.

Sandra Terezinha de Farias Furtado

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

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.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 B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica

Av. Pará, 1720 – Campus Umuarama – Bloco 4C – CEP 38400-902 – Uberlândia – MG

Telefone: (34) 3218-2195 – Fax: (34) 3218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado **“Identificação de isoformas antigênicas de *Dermatophagoides pteronyssinus* reconhecidas por anticorpos IgE e IgG1 em pacientes atópicos e não atópicos”**, cujo principal objetivo é identificar novos antígenos imunodominantes de *D. pteronyssinus* com potencial aplicação para o diagnóstico laboratorial de alergias e monitoramento de imunoterapia específica com alérgenos.

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

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

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

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

Uberlândia, _____ de _____ de 200__.

ASSINATURA

TESTEMUNHA

Anexo C**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA****Instituto de Ciências Biomédicas**

Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica

Av. Pará, 1720 – Campus Umuarama – Bloco 4C – CEP 38400-902 – Uberlândia – MG

Telefone: (34) 3218-2195 – Fax: (34) 3218-2333

Nome: _____ Prontuário HC: _____

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 frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?

Nunca acordou com chiado ()

Menos de uma noite por semana ()

Uma ou mais noites por semana ()

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

() Sim

() Não

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

Questionário 2 (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 D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica

Av. Pará, 1720 – Campus Umuarama – Bloco 4C – CEP 38400-902 – Uberlândia – MG

Telefone: (34) 3218-2195 – Fax: (34) 3218-2333

TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (Ácaros de poeira domiciliar)

Nº	Extrato	Tamanho da pápula (mm)*	Tamanho do eritema (mm)
1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
2	<i>Dermatophagoides farinae</i>		
3	<i>Blomia tropicalis</i>		
4	<i>Canis familiaris</i>		
5	<i>Felis domesticus</i>		
6	<i>Periplaneta americana</i>		
7	<i>Blatella germanica</i>		
8	<i>Alternaria alternata</i>		
9	Solução salina		
10	Histamina		

***Valores de referência:**

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

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

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Responsável técnico