



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

**“Resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes ligantes de Concanavalina A isolados de *Blomia tropicalis* (Acari: Echimyopodidae) em indivíduos alérgicos e não alérgicos”**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

**Karine Cristine de Almeida**

**Uberlândia  
2005**



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

**“Resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes ligantes de Concanavalina A isolados de *Blomia tropicalis* (Acari: Echimyopodidae) em indivíduos alérgicos e não alérgicos”**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

**Karine Cristine de Almeida**

**Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Margareth Leitão Gennari-Cardoso**

**Uberlândia  
2005**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

A447r Almeida, Karine Cristine de, 1980-  
“Resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 aos componentes ligantes  
de Concanavalina A isolados de *Blomia tropicalis* (Acari: Echimyopodi-  
dae) em indivíduos alérgicos e não alérgicos / Karine Cristine de Almeida.  
– Uberlândia, 2005.  
81f. : il.  
Orientador: Ernesto Akio Taketomi.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-  
grama de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
Inclui bibliografia.  
1. Alergia - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Universidade Fe-  
deral de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
III. Título.

CDU: 616-056.3 (043.3)

## *Dedicatória*

*Dedico este estudo àqueles que me acompanham desde o primeiro passo, da minha primeira palavra... à meus pais, José e Brandina, e meus irmãos que nunca se cansam de caminhar sempre ao meu lado, me dando forças de seguir sempre em frente.....*

*“Que a vontade de aprender  
suporte o erro,  
Que a tentativa de tudo  
permita a decepção,  
Que a busca da perfeição  
escute a crítica,  
Que todo esforço  
compreenda o desprezo,  
E que a alegria de estar vivo  
vença o medo de viver.”*

*Alexandre Heilbuth*

## *Agradecimentos*

*À Deus, por colocar em minha jornada pessoas especiais que me auxiliam a transpor as pedras do caminho.*

*Aos meus pais, José e Brandina, que são o sustentáculo de toda uma família e o meu apoio constante.*

*Aos meus irmãos, Roberto, Lúcia e Edilamar e aos meus sobrinhos, Júnior, Gabrielle, Michelle, Cássio e Yasmin, por entenderem os momentos de ausência.*

*Ao Professor Dr. Ernesto, pela extrema dedicação, maestria ao ensinar, pela competência, paciência e por demonstrar confiança em meu trabalho.*

*À Deise, pela dedicação e carinho que tem demonstrado durante a minha formação acadêmica, se tornando para todos nós uma verdadeira “mãe científica”.*

*À Professora Dra. Margareth, pela alegria que contagia a todos nós mesmo nos momentos difíceis.*

*À Professora Dra. Myrthes Barros e aos Professores Dr. Mineo e Dr. Lobato, por abdicarem de seu tempo para auxiliarem na concretização desse trabalho.*

*Aos grandes amigos, Priscila, Ronaldo, Leandro e Rafael, pelo apoio, desprendimento e provas de incontestável amizade que os tornam um quarteto especialmente fantástico.*

*Aos amigos da alergia, Mônica, Caroline, Sheila, Cristiane, Gesmar, Meimei, Jorge, Juliana, Fabiana, e aos colegas do*

*Laboratório de Imunologia, Cristina, Áurea, Janáina, Ana Cláudia, Jair Júnior, Carolina, ..., pelos momentos de alegria e aprendizado.*

*Aos Professores Dr. Foued, Dr. Joe Sung e Dr. Manoel Medeiros pela doação de materiais essenciais ao bom desenvolvimento desse estudo.*

*Aos Professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pelo aprendizado e companheirismo.*

*Aos secretários Max e Elaine, pelo auxílio nos momentos necessários.*

*Aos funcionários do Laboratório de Imunologia, Andréia e Júnior, que colaboram para o bom andamento dos nossos experimentos.*

*Aos amigos do Núcleo Servos Maria de Nazaré, que tornam os dias sempre mais felizes pelo trabalho de amor. Com carinho especial à Shyrlene, exemplo de que temos que lutar para realizar nossos sonhos. Aos amigos Gessi, Kênia, Mariana, Franklin, Márcia, Célia, Idessânia, Raílene, Janyer, pela alegria e apoio constantes. À queles que tornam as palavras um guia seguro, Dr. Bezerra, Cecília, Joseph, Christopher, Skanay, Charles, e todos mentores, por tudo que representam ao meu coração.*

*À todos aqueles que, com gestos simples, de alguma forma me auxiliaram nesse trabalho.*

## *Agradecimento especial*

*Aos pacientes e voluntários, pelo ato de altruísmo sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.*



# SUMÁRIO

	Páginas
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. Alérgenos	1
1.2. Ácaros da poeira domiciliar	2
1.2.1. <i>Blomia tropicalis</i>	4
1.2.1.1. Classificação taxônomica	4
1.2.2. Alérgenos de <i>Blomia tropicalis</i>	5
1.3. Exposição e sensibilização alérgicas	6
1.4. Atopia e alergia	8
1.5. Asma	10
1.6. Rinite alérgica	11
1.7. O sistema imune e a resposta alérgica	13
1.8. Fisiopatologia da reação alérgica	14
1.9. Glicoconjugados e a resposta de anticorpos IgE	15
1.10. Avaliação da sensibilização aos alérgenos domiciliares	18
1.10.1. Testes <i>in vivo</i>	18
1.10.2. Testes <i>in vitro</i> (ELISA e RAST)	20
1.11. Imunoterapia	21
<b>2 – OBJETIVOS</b>	23
<b>3 – MATERIAL E MÉTODOS</b>	24
3.1. Aspectos éticos	24
3.2. Local do estudo	24
3.3. Seleção dos pacientes	25
3.4. Teste cutâneo de puntura	26
3.5. Coleta de sangue	27
3.6. Preparação de extratos alérgicos	27
3.7. Obtenção do extrato de <i>B. tropicalis</i> em coluna de afinidade	28
3.7.1. Preparação da coluna de Concanavalina A- <i>Sepharose</i> para cromatografia	28
3.7.2. Fracionamento do extrato antigênico	29
3.8. Dosagem protéica	30
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	30
3.10. ELISA para detecção de anticorpos IgE específicos a <i>B. tropicalis</i>	32
3.11. ELISA para detecção de anticorpos IgG1 e IgG4 específicos a <i>B. tropicalis</i>	33

3.12. ELISA de inibição competitiva	34
3.13. <i>Immunoblotting</i> para detecção de IgE, IgG1 e IgG4 anti- <i>B. tropicalis</i>	35
3.14. Análise estatística	36
3.15. Normas de biossegurança	37
<b>4 – RESULTADOS</b>	<b>38</b>
4.1. Características dos indivíduos do estudo	38
4.2. Teste cutâneo de puntura aos extratos de <i>B. tropicalis</i> e <i>D. pteronyssinus</i>	40
4.3. Obtenção do extrato Bt-ConA de <i>Blomia tropicalis</i>	41
4.4. Concentração protéica	42
4.5. Análise eletroforética dos extratos e frações de <i>B. tropicalis</i>	42
4.6. Anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos a <i>B. tropicalis</i>	43
4.6.1. Níveis de IgE, IgG1 e IgG4 aos extratos Bt total e Bt-ConA	43
4.6.2. Positividade de IgE, IgG1 e IgG4 aos extratos Bt total e Bt-ConA	46
4.6.3. Correlação e associação entre os níveis de IgE, IgG1 ou IgG4 ao extrato Bt total e Bt-ConA	48
4.6.4. Especificidade dos ELISAs para IgE, IgG1 e IgG4 a <i>Blomia tropicalis</i>	48
4.7. <i>Immunoblotting</i> para detecção de componentes antigênicos de <i>Blomia tropicalis</i> reconhecidos por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4	52
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 3</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO 4</b>	<b>78</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	<i>2'2-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i>
BSA	Soroalbumina bovina
Bt	Extrato bruto de <i>Blomia tropicalis</i>
Bt total	extrato total de <i>B. tropicalis</i>
Bt-ConA	frações do extrato de <i>B. tropicalis</i> ligantes de Concanavalina A
Bt+	grupo de pacientes atópicos com TCP positivo à <i>Blomia tropicalis</i>
Bt-	grupo de pacientes atópicos com TCP negativo à <i>Blomia tropicalis</i>
ConA	Concanavalina A
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
DO	Densidade óptica
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
FcεRI	receptor de alta afinidade para porção Fcε de IgE
g	Grama
<i>g</i>	força relativa da gravidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	índice ELISA
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
KDa	Kilodaltons
M	Molar
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
μg	Micrograma
μL	Microlitro
<i>Mr</i>	Massa molecular relativa
NA	grupo de indivíduos não atópicos
Nm	nanômetro
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 ( <i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i> )
PBS-T-M	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e leite desnatado
RAST	<i>Radioallergosorbent test</i> (Radioimunoensaio)
TCP	teste cutâneo de puntura
Th1	linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	linfócito T <i>helper</i> 2

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Blomia tropicalis*, ácaro da poeira domiciliar. 4  
(<http://82.198.66.21/JTFd/index-57html/>)
- Figura 2:** Posição taxonômica de *B. tropicalis* e outros ácaros da poeira domiciliar. 5
- Figura 3.** Perfil cromatográfico das frações do extrato total de *Blomia tropicalis* obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A-Sepharose. O 1º pico representa o Bt-void, e a fração Bt-ConA está indicada nos 2º e 3º picos, eluídos pela adição de PBS contendo 0,05M de metil  $\alpha$ -D-manopiranosídeo. Volume da resina: 5,0mL; amostra aplicada: 18mg em um volume de 2,0mL. 42
- Figura 4.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) dos extratos e frações de *Blomia tropicalis*. Bt total (pista 1), Bt-void (pista 2) e Bt-ConA (pista 3). Os padrões de massas moleculares (kDa) estão indicadas à esquerda e os componentes protéicos estimados dos extratos de *B. tropicalis* estão representados à direita. 43
- Figura 5.** Níveis séricos de IgE (A), IgG1(B) e IgG4 (C) ao extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total) e à fração com afinidade por Con-A (Bt-ConA) em pacientes e indivíduos não atópicos (NA) de acordo com o teste cutâneo de puntura (TCP) a *B. tropicalis* (Bt), expressos em índices ELISA (IE). Pacientes com TCP positivo a Bt (Bt+, n = 70), TCP negativo (Bt-, n = 51) e indivíduos NA (n = 36). A linha pontilhada indica o limiar de positividade da reação (IE = 1,2). As barras horizontais representam as médias (ma) obtidas para cada grupo. \* p < 0,05. \*\* p < 0,01. \*\*\* p < 0,001. 45
- Figura 6.** Positividade (%) de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 ao extrato total de *Blomia tropicalis* (A) e à fração com afinidade por Con-A (B) em amostras de soros de pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a Bt (Bt+, n = 70) e negativo (Bt-, n = 51) a *B. tropicalis* e indivíduos não atópicos (NA, n = 36). Diferenças estatísticas significativas estão representadas por \*\*\* p < 0,001. 47
- Figura 7.** Correlação e associação entre os níveis séricos de IgE (A), IgG1(B) ou IgG4 (C) ao extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total) e à fração com afinidade por Con-A (Bt-ConA) em pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a *B. tropicalis* (Bt+, n=70), expressos em índices ELISA (IE). O coeficiente de correlação ( $r_s$ ) foi calculado pelo teste de correlação de Spearman. As linhas pontilhadas indicam o limiar de positividade da reação (IE = 1,2). As porcentagens de duplo positivo, duplo negativo ou simples positivo para cada extrato estão indicadas nos quadrantes correspondentes. 49

**Figura 8.** Especificidade do ELISA para os anticorpos IgE (**A, D**), IgG1 (**B, E**) e IgG4 (**C, F**) anti-*B. tropicalis* (Bt) utilizando ensaios de inibição competitiva. Extratos de Bt total, Bt-ConA, *D. pteronyssinus* (Dp) ou Concanavalina-A (Con-A, controle negativo) foram submetidos a diluições decimais seriadas de  $10^2$  a  $10^{-4}$  µg/mL em solução diluente de PBS-T-BSA e incubados com um *pool* de 6 soros de pacientes do grupo Bt+. As misturas antígenos-soro foram analisadas nos ELISAs frente aos extratos de Bt total (**A, B, C**) ou de Bt-ConA (**D, E, F**) na fase sólida. O soro incubado somente com diluente foi utilizado como controle positivo. Porcentagem de inibição foi calculada a partir da fórmula:  $[1,0 - (\text{DO amostra} / \text{DO controle positivo})] \times 100$ . 51

**Figura 9.** Frequência (%) de componentes antigênicos do extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total) (**A, C, E**) e da fração com afinidade por Con-A (Bt-ConA) (**B, D, F**) reconhecidos através de *immunoblotting* por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 entre soros que apresentaram-se positivos nos ensaios de ELISA, nos grupos de pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a Bt (Bt+, n = 13, 17) (**A, B**) e negativo (Bt-, n = 4) (**C, D**) à *B. tropicalis* e indivíduos não atópicos (NA, n = 3) (**E, F**). 54

**Figura 10.** Perfil antigênico (*immunoblotting*) do extrato total de *Blomia tropicalis* (**A**) e fração com afinidade por Con-A (Bt-ConA) (**B**) de acordo com a reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4. Estão demonstrados três *immunoblots* representativos do grupo Bt+ e dois para os grupos Bt- e indivíduos não atópicos. As massas moleculares relativas (*Mr*) expressas em kDa estão indicadas à esquerda. Os componentes alergênicos imunodominantes de Bt total e Bt-ConA estão representados à direita (setas). 55

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características demográficas e clínicas de pacientes com rinite alérgica e indivíduos não atópicos de Uberlândia, MG. 39
- Tabela 2.** Teste cutâneo de puntura (TCP) aos extratos de *B. tropicalis* (Bt) e *D. pteronyssinus* (Dp) em 121 pacientes com rinite alérgica de Uberlândia, MG. 41

## RESUMO

*Blomia tropicalis* (Bt) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) são os principais ácaros da poeira domiciliar em países tropicais e subtropicais que estão associados com doenças alérgicas. Antígenos glicosilados são altamente imunogênicos e estão envolvidos em diferentes patologias, incluindo alergias. Os objetivos deste estudo foram avaliar a resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 a componentes ligantes de Concanavalina A (Bt-ConA) isolados do extrato Bt total em soros de indivíduos alérgicos e não alérgicos, bem como a reatividade cruzada com Dp e identificar por *immunoblotting* componentes protéicos de ambos extratos reconhecidos por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4. O extrato Bt-ConA foi obtido por fracionamento do extrato Bt total em cromatografia de afinidade Con A-*Sepharose* e ambos extratos foram avaliados em SDS-PAGE e ELISA para IgE, IgG1 e IgG4 em 121 soros de pacientes com rinite alérgica e 36 indivíduos não alérgicos. Testes cutâneos de puntura (TCP) foram realizados em todos os indivíduos do estudo. Ensaio de inibição foram realizados para detecção de IgE, IgG1 e IgG4 específica a Bt total e Bt-ConA. Ensaio de *immunoblotting* foram realizados para detecção de componentes antigênicos de ambos extratos reconhecidos por IgE, IgG1 e IgG4. Do total de 121 pacientes, 58% mostraram-se sensibilizados a Bt (Bt+), com 52% apresentando reatividade cutânea a ambos ácaros (Bt e Dp) e apenas 6% somente a Bt. Um largo espectro de proteínas (14-152kDa) foram visualizadas no extrato Bt total e componentes acima de 27kDa na fração Bt-ConA. ELISA apresentou um perfil similar nos níveis de IgE, IgG1 e IgG4 para os extratos Bt total e Bt-ConA em diferentes grupos, embora pacientes do grupo Bt+ demonstraram uma reatividade menor de IgG4 para o extrato Bt-ConA. Níveis de IgG1 específica foram maiores nos pacientes Bt+ do que nos indivíduos controles e os níveis de IgG4 não apresentaram diferença significativa entre os grupos. ELISA de inibição demonstrou uma reatividade cruzada parcial com o extrato de Dp para IgE específica e total para IgG1 e IgG4 específicas aos extratos de Bt total e Bt-ConA. *Immunoblotting* revelou dez componentes antigênicos do extrato Bt total (14-152kDa) reconhecidos por anticorpos IgE e IgG4 e cinco destes componentes (>50kDa) foram reconhecidos por IgG1 em pacientes Bt+. O extrato Bt-ConA revelou oito componentes antigênicos (27-152kDa), dos quais as bandas de 152 e 123kDa foram predominantemente reconhecidos por IgE e apenas três destes componentes (93, 123 e 152kDa) foram reconhecidos por IgG1 enquanto anticorpos IgG4 reconheceram fracamente os componentes de 66 e 152kDa em pacientes Bt+. Pode-se concluir que componentes ligantes de Con-A isolados de Bt constituem alérgenos principais e estão envolvidos tanto na sensibilização alérgica (resposta IgE) quanto na manutenção da homeostase (respostas IgG1 e IgG4) e que componentes glicosilados, particularmente os de alto peso molecular, são preferencialmente reconhecidos por anticorpos IgE e IgG1, mas não por anticorpos IgG4.

**Palavras-Chave:** Alergia, *Blomia tropicalis*, ácaro da poeira domiciliar, Concanavalina-A, IgE, IgG1, IgG4.

## ABSTRACT

*Blomia tropicalis* (Bt) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) are the most prevalent house dust mites in tropical countries and associated with allergic diseases. Glycosylated antigens are highly immunogenic and involved in different pathologies, including allergies. The aims of this study were to evaluate IgE, IgG1, and IgG4 responses to Concanavalin A-binding components (Bt-ConA) isolated from Bt extract in sera of allergic and non-allergic subjects and to analyze the cross-reactivity with Dp extract. Also, IgE-, IgG1- and IgG4-reactive antigenic components from both extracts were analyzed by Immunoblotting. Bt-ConA was obtained from Bt-whole extract fractionated on Con-A-Sepharose affinity chromatography and both extracts were evaluated in SDS-PAGE and ELISA for IgE, IgG1, and IgG4 in sera of 121 patients with allergic rhinitis and 36 non-allergic subjects. Subjects were skin prick tested (SPT) to Bt-whole extract. Inhibition and immunoblotting test were performed to analyze IgE, IgG1, and IgG4 responses to both extracts. SPT showed that 58% of patients were sensitized to Bt (Bt+), with 52% reactive to both mites (Bt and Dp) and 6% to Bt only. A broad spectrum of proteins (14-152kDa) were visualized in Bt-whole extract and components >27kDa in Bt-ConA extract. ELISA showed a similar profile of IgE, IgG1 and IgG4 levels to Bt-whole and Bt-ConA extracts in different groups, although Bt+ patients showed a lower IgG4 reactivity to Bt-ConA extract. Specific IgG1 levels were higher in Bt+ patients than control subjects, and IgG4 levels showed no significant difference among the groups. ELISA inhibition showed a partial IgE and total IgG1 and IgG4 cross-reactivity with Dp extract for Bt-whole and Bt-ConA extracts. Immunoblotting revealed ten antigenic components in Bt-whole extract (14-152kDa) recognized by IgE and IgG4 antibodies and five of these components (>50kDa) were recognized by IgG1 in Bt+ patients. Bt-ConA extract showed eight antigenic components (27-152kDa), from which the 152 and 123kDa bands were predominantly recognized by IgE, and only three of these components (93, 123 and 152kDa) were recognized by IgG1 while IgG4 antibodies weakly recognized the 66 and 152kDa components in Bt+ patients. It can be concluded that Con A-binding components isolated from Bt constitute major allergens and are involved in both allergen sensitization (IgE response) and homeostase maintenance (IgG1 and IgG4 responses) and that glycosylated components, particularly those of high molecular weight, are preferentially recognized by IgE and IgG1, but not by IgG4 antibodies.

**Key-words:** Allergy, *Blomia tropicalis*, house dust mite, Concanavalin-A, IgE, IgG1, IgG4.



# 1. Introdução

## 1.1. Alérgenos

As alergias são causadas por reações imunológicas a alérgenos, que são substâncias capazes de desencadear respostas IgE específicas que, em alguns indivíduos, são suficientemente fortes para serem associadas com evidência clínica de respostas de hipersensibilidade imediata (PLATTS-MILLS; SOLOMON, 1993; CROMWELL, 1997).

Muitos alérgenos, por si só são fortes imunógenos, apresentando pesos moleculares acima de 10kDa. Outros, porém, de pesos moleculares entre 1 e 6kDa podem ou não ser imunógenos e, os abaixo de 1kDa geralmente não são imunogênicos. Essas moléculas de baixo peso molecular são denominadas haptenos e, quando ligadas a moléculas maiores, chamadas carreadoras, passam a desempenhar papel imunogênico (BENJAMINI; LESKOWITZ, 1998).

Freqüentemente, alérgenos são proteínas (geralmente glicoproteínas) ou haptenos que podem ligar-se a proteínas (CROMWELL, 1997). O mais importante, contudo, é a substância ser reconhecida como estranha. O sistema imune normalmente discrimina entre próprio e não próprio, tanto que somente moléculas estranhas ao organismo são imunogênicas (PARSLOW, 1997), sendo que qualquer substância capaz de induzir uma resposta imune e causar alergia é um alérgeno em potencial (TERR, 1997a).

Os alérgenos são nomeados de acordo com um guia publicado em 1994 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos da União Internacional de Ciências Imunológicas (KING et al., 1995). O nome incorpora as três primeiras letras do gênero e a primeira letra da espécie a partir da qual o alérgeno é derivado (ou as duas primeiras para evitar ambigüidade),

mais um numeral arábico (o qual pode ser usado para denotar alérgenos homólogos estruturalmente, porém de espécies diferentes). Por exemplo, alérgenos estruturalmente similares (antígenos do grupo 5) oriundos de dois gêneros de ácaros diferentes (*Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus*) são designados Blo t 5 e Der p 5, respectivamente.

Apesar de antígenos alimentares, drogas, insetos e contactantes (o látex, por exemplo) estarem, às vezes, envolvidos em algumas doenças atópicas e de hipersensibilidade tipo I, os aeroalérgenos são os mais importantes agentes etiológicos da atopia (SMITH, 1998).

Aeroalérgenos, alérgenos transportados pelo ar, freqüentemente estão associados a partículas (grãos de pólen, fezes de ácaros, secreções animais), e são comumente subdivididos em domiciliares (por exemplo, aqueles derivados de ácaros da poeira domiciliar, de baratas e de animais de companhia) e não domiciliares (como aqueles derivados de grãos de pólen). São proteínas, relativamente pequenas, altamente solúveis em meio aquoso, o que permitem se dispersarem no muco e outros fluidos corporais (GALLI; LANTZ, 1999; CROMWELL, 1997).

## **1.2. Ácaros da poeira domiciliar**

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

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

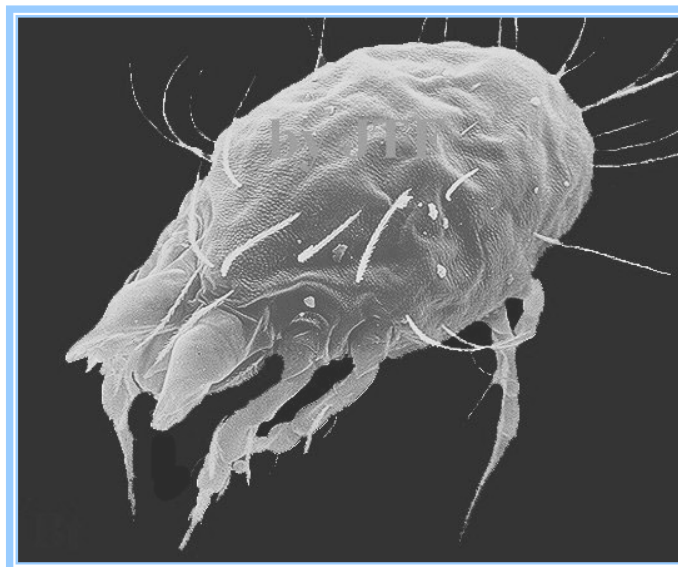
Desde então, vários estudos realizados em diversas partes do mundo têm comprovado a hipótese da exposição alergênica a ácaros como fator decisivo para a sensibilização de indivíduos susceptíveis (SPORIK et al., 1990; ARRUDA et al., 1991; TUNNICLIFFE et al., 1999).

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

Em 1993, um estudo multicêntrico por meio de testes alérgicos realizados nos países da América Latina, incluindo o Brasil, Venezuela e Colômbia, confirmou a alta prevalência de sensibilização a ácaros, notavelmente *Blomia tropicalis*, em pacientes portadores de asma (FERNÁNDEZ-CALDAS et al., 1993).

### 1.2.1. *Blomia tropicalis*

*Blomia tropicalis* foi primeiramente descrito por Van Bronswijk, De Cock e Oshima (1973), sendo inicialmente registrado como ácaro de estocagem. É um ácaro pequeno, medindo 230 a 465  $\mu\text{m}$ , de forma globular e distingue-se facilmente de outros ácaros da poeira domiciliar por apresentar um aspecto semelhante ao porco espinho, com longas antenas que saem do seu corpo (Figura 1).



**Figura 1:** *Blomia tropicalis*, ácaro da poeira domiciliar.

(<http://82.198.66.21/JTFd/index-57.html/>)

#### 1.2.1.1. Classificação taxonômica

A classificação taxonômica resumida de *B. tropicalis*, segundo Colloff (1998) é:

Reino: Metazoa

Filo: Artropode

Classe: Arachnida

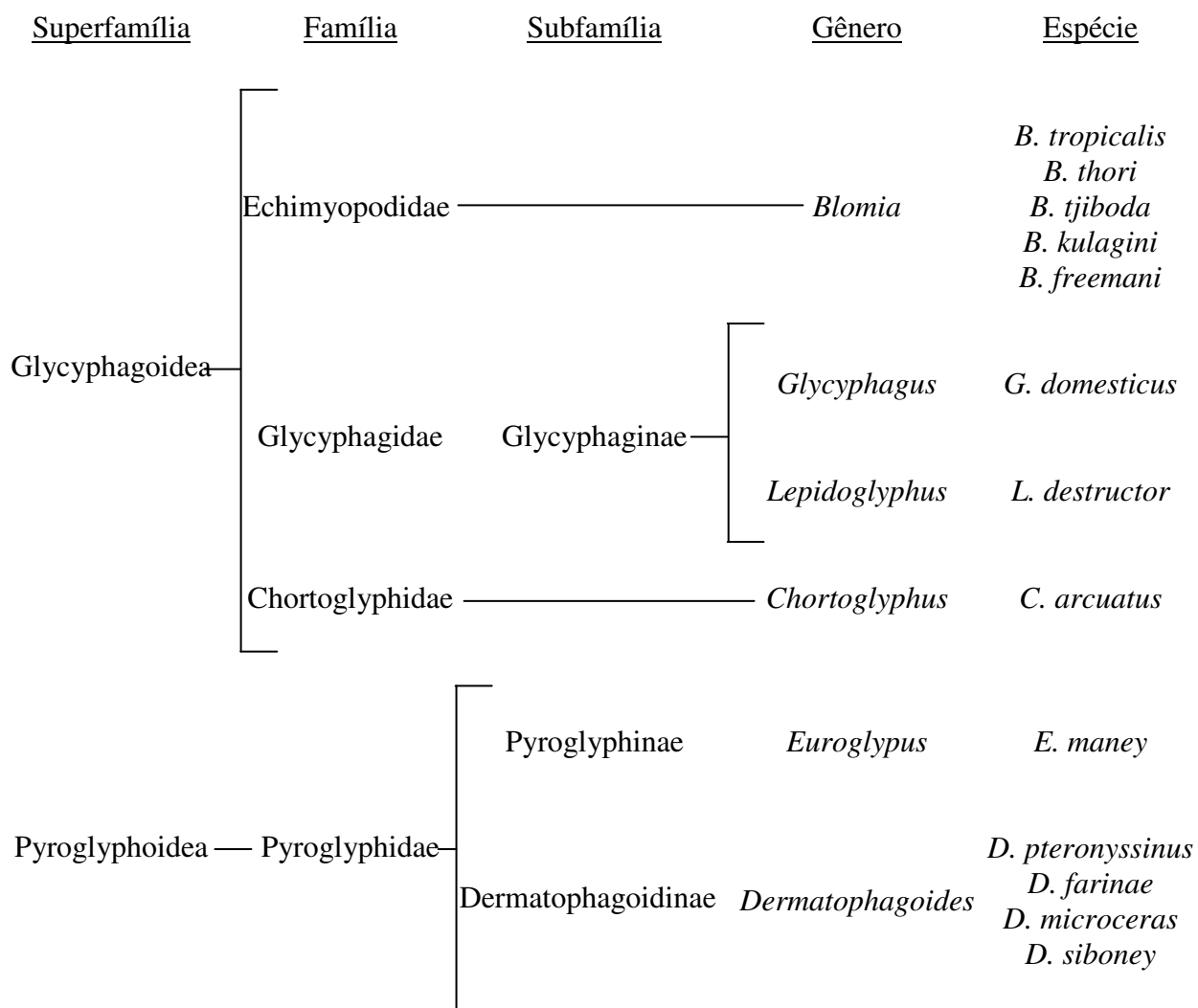
Ordem: Acarina

Família: Echimyopodidae

Gênero: *Blomia*

Espécie: *B. tropicalis*

A posição taxonômica de *B. tropicalis* em relação aos outros ácaros da poeira domiciliar segundo Puerta e colaboradores (2005) está ilustrada na figura 2.



**Figura 2.** Posição taxonômica de *B. tropicalis* e outros ácaros da poeira domiciliar.

### 1.2.2. Alérgenos de *Blomia tropicalis*

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

Até 1997, somente três alérgenos de *B. tropicalis* haviam sido clonados e caracterizados quanto às suas funções alergênicas (CARABALLO et al., 1996). Estes alérgenos incluem: (1) Blo t 5, o primeiro alérgeno de *B. tropicalis* a ser clonado, possuindo cerca de 40% de homologia na seqüência de aminoácidos ao Der p 5, um alérgeno de 14kDa de *D. pteronyssinus*. A prevalência de anticorpos IgE a Blo t 5 recombinante entre pacientes asmáticos foi de 45% (ARRUDA et al., 1995; ARRUDA et al., 1997; CARABALLO et al., 1994); (2) Blo t 13 (previamente denominado Blo t 6) de peso molecular de 14,8kDa, demonstrou baixa frequência (11%) de reatividade com IgE de soros de pacientes alérgicos a *B. tropicalis* e 42% de identidade com a Sm14, uma proteína ligante de ácidos graxos (FABP) de *Schistosoma mansoni*, (CARABALLO et al., 1997); e (3) Blo t 12 (previamente conhecido como Blo t 11a) cujo recombinante rBlo t 11a possui peso molecular de 14,2kDa e demonstrou 50% de reatividade com IgE de soros de pacientes alérgicos a *B. tropicalis* (PUERTA et al., 1996).

Assim, os alérgenos de *Blomia tropicalis* até então reportados parecem ser proteínas de baixo peso molecular, na faixa de 14-15kDa (CARABALLO et al., 1998). Entretanto, Ramos e colaboradores (2001) identificaram um alérgeno (Blo t 11), cuja sequência primária possui 90% de homologia com o Der f 11, uma paramiosina de *D. farinae* de 98kDa. O alérgeno recombinante produzido (rBlo t 11) demonstrou 52% de reatividade com IgE de soros de pacientes asmáticos reativos pelo teste cutâneo ao extrato de *B. tropicalis* (RAMOS et al., 2003).

### **1.3. Exposição e sensibilização alergênicas**

A exposição a um alérgeno pode ser através de inalação, ingestão, injeção ou contato com a pele ou mucosas (TERR, 1997a) e a sensibilização a um determinado

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

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

Acredita-se que a exposição alérgica exerça três importantes papéis no desenvolvimento da alergia respiratória: (a) a exposição a um dado alérgeno, particularmente na infância, induzirá em indivíduos geneticamente susceptíveis, o desenvolvimento de hipersensibilidade mediada por IgE; (b) em indivíduos susceptíveis, a exposição contínua ao alérgeno leva à hipersensibilidade das vias aéreas; e (c) muitos dos pacientes com hiperreatividade brônquica têm crises recorrentes de obstrução aérea, que podem ser desencadeados por múltiplos

fatores, como ar frio, fumaça de cigarro (passivo), estresse e variações diuturnas (PLATTS-MILLS et al., 1984).

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

#### **1.4. Atopia e alergia**

Atopia é uma tendência pessoal ou familiar a produzir anticorpos IgE, em resposta a baixas doses de alérgenos, frequentemente proteínas, e desenvolver doenças típicas, como asma, rinoconjuntivite ou dermatite atópica (JOHANSSON et al., 2001). O estado atópico é reconhecido por testes cutâneos, presença de IgE alérgeno-específica, elevação dos níveis de IgE sérica total e presença de eosinófilos no sangue (COOKSON, 1999).

O termo atopia foi primeiramente empregado por Coca e Cooke em 1923, para descrever um grupo de doenças que apresentavam, em comum, um mecanismo fisiopatológico envolvendo reações de hipersensibilidade do tipo I, onde os indivíduos apresentavam testes cutâneos positivos para aeroalérgenos e história familiar de asma e/ou rinite e/ou dermatite atópica (COCA; COOKE, 1923 apud JOHANSSON et al., 2001).



Para Woolcock (2000), a alergia se tornou o principal problema de saúde em muitas sociedades modernas, onde sua prevalência aumentou em até 34% em crianças e 16,3% em adultos entre as décadas de 60 e 90.

Em 1998, um estudo feito pelo comitê *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* adotando um questionário padronizado (ISAAC), revelou que os mais altos índices de prevalência da doença foram encontrados na Austrália, Nova Zelândia, Reino Unido, Estados Unidos e algumas cidades da América Latina. Ao contrário, os índices mais baixos foram encontrados em países não industrializados e áreas tipicamente rurais.

Em um estudo revisado por Ring e colaboradores (2001), diversos autores apontam hipóteses que revelam um crescimento acelerado da prevalência em alergia em países ocidentais, tidos como países de sociedade moderna. Dentre elas, destaca-se a influência de fatores químicos, físicos, biológicos e psico-sociais, como causadores e adjuvantes, além de fatores de predisposição genética populacional e fisiológica.

No Brasil, os estudos de prevalência alérgica mostram dados relevantes. Lugares públicos, como escolas e creches, são considerados locais de grande fonte de ácaros da poeira domiciliar e baratas (RULLO et al., 2002) e a exposição a estes constitui, desta forma, um importante fator de risco para desenvolvimento de asma brônquica (PLATTS-MILLS; CHAPMAN, 1987), especialmente em crianças de idade escolar (SMITH; DISNEY; WILLIAMS, 1969; SEARS; HERVISON; HOLDAWAY, 1989).

Percebe-se, também, que áreas urbanizadas apresentam maiores índices de sensibilização a ácaros da poeira domiciliar e fungos, comparadas a áreas

tipicamente rurais, reforçando ainda mais a hipótese da influência da poluição urbana no aumento de patologias respiratórias (GALVÃO; KALIL; CASTRO, 2002).

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

### **1.5. Asma**

A asma como entidade clínica distinta foi definida em 1868 por Henry Hyde Salter, que também a classificou como intrínseca e extrínseca (SALTER *apud* KALINER; MCFADEN, 1988). Como uma síndrome clínica das vias aéreas, a asma é caracterizada por obstrução reversível (ou não) do fluxo aéreo, espontaneamente ou com tratamento; inflamação da mucosa; hiperratividade brônquica a estímulos variados; episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao acordar (GRAUNDENZ et al., 1999).

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

A asma alérgica também é conhecida como asma atópica, imunológica ou asma extrínseca. Os pacientes geralmente apresentam história familiar de atopia e desenvolvem doença nos primeiros anos de vida. Outras manifestações de atopia, como rinite alérgica e eczema, podem coexistir. Os ataques de asma ocorrem

durante ou após a exposição a alérgenos dependendo da sensibilidade alérgica particular de cada paciente. Testes cutâneos positivos são caracterizados pela presença de pápula e eritema, a concentração de IgE sérica total freqüentemente está elevada, porém em alguns casos pode apresentar-se normal (TERR, 1997b).

A asma não alérgica também é conhecida como idiopática ou asma intrínseca. A obstrução brônquica recorrente ou crônica não está relacionada à exposição a alérgenos. Caracteristicamente, é desencadeada por exercícios físicos, infecções e outros fatores não relacionados à presença de IgE específica a um determinado antígeno. Testes cutâneos são negativos para os alérgenos usuais. Não há história pessoal ou familiar de doença alérgica (COCHRANE; REES, 1995). Geralmente aparece na infância, podendo em alguns casos ocorrer durante a vida adulta, usualmente após uma infecção respiratória. A concentração de IgE sérica total é normal, contudo, eosinofilia sanguínea e no escarro pode ser encontrada (TERR, 1997b).

De acordo com Platts-Mills e colaboradores (1995), os casos de asma não alérgica representam menos de 2% dos asmáticos ou menos de 0,2% da população em geral pertencem a essa categoria. Um estudo realizado por Beasley (2002), demonstra que a asma afeta quase 155 milhões de indivíduos no mundo inteiro, sendo que bilhões de dólares são gastos por ano, nos diversos países do mundo, para o seu tratamento.

## **1.6. Rinite alérgica**

Assim como na asma, a rinite alérgica decorre de uma resposta de hipersensibilidade a alérgenos mediada por anticorpos IgE. Os alérgenos mais

comuns envolvidos incluem pólenes, pêlos de animais, ácaros da poeira domiciliar, esporos de fungos e partículas de insetos (NACLERIO, 1995).

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

Nesta doença, o alérgeno solúvel é inspirado, entrando em contato com a mucosa nasal, onde há resposta de IgE em mastócitos e basófilos, levando localmente à liberação de mediadores farmacológicos. Sua absorção através da mucosa nasal ocorre principalmente por difusão passiva pela barreira intercelular formada por junções comunicantes (TERR, 1997b).

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

A rinite alérgica é uma doença que acomete mais de 30 milhões de americanos sem discriminar sexo, idade, raça ou condição sócio-econômica. Ocupa o sexto lugar no *ranking* das doenças crônicas mais prevalentes entre a população americana, que gasta anualmente, bilhões de dólares para o tratamento da rinite (NACLERIO, 1995). Segundo Abbas, Litchman e Pober (2003), a rinite é talvez a doença alérgica mais freqüente na população.

### 1.7. O sistema imune e a resposta alérgica

O desencadeamento de uma resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigénico e de várias etapas da resposta imune do hospedeiro. O processamento do alérgeno pela célula apresentadora de antígeno (APC) resulta na formação de peptídeos que são apresentados à célula T CD4<sup>+</sup> em associação com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II (MARONE, 1998). O reconhecimento do conjunto peptídeo/MHC II por uma célula T CD4<sup>+</sup> com receptor específico para o alérgeno, reforçado pela ligação das moléculas co-estimulatórias B7-1 (CD80)/B7-2 (CD86) e CD28, leva à ativação da célula Th (T *helper* ou T auxiliadora) primária.

O sistema imune caracteriza-se por apresentar pelo menos dois tipos distintos de células T *helper*, Th1 e Th2. O fenótipo Th1 primariamente é responsável pela imunidade a bactérias intracelulares, protozoários, vírus e produz IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ . Uma resposta imune típica de células Th1 específicas é caracterizada por respostas cutâneas de hipersensibilidade tardia e ativação de linfócitos B produtores de anticorpos IgG.

O fenótipo Th2 está associado com respostas imunes a alérgenos e helmintos. A célula Th2 ativada expressa ligante de CD40 e secreta IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, citocinas que auxiliam as células B a produzirem anticorpos IgE e IgG4. Além disso, IL-3, IL-5 e GM-CSF secretadas pelas células Th2 ativadas ativam eosinófilos, basófilos e mastócitos. A IL-4 estimula a expressão de VCAM-1 (molécula-1 de adesão celular vascular) nas células endoteliais, resultando em aumento da ligação dos linfócitos, monócitos e especialmente eosinófilos (ABBAS; LICHTMAN, 2003). A IL-5 é um importante fator de crescimento seletivo para diferenciação terminal, ativação e manutenção dos eosinófilos nos tecidos, possivelmente inibindo a sua

apoptose. Entretanto, a presença de IFN- $\gamma$ , produzido por células Th1 inibe a síntese de IgE pelas células B (BOUSQUET et al., 2000).

Uma variedade de outras citocinas e fatores têm sido implicados na modulação da síntese de IgE. IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-8, IL-10 têm sido mostrados inibir a síntese de IgE em algumas circunstâncias, enquanto que sua estimulação com IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, TNF- $\alpha$  têm sido observada (WORM; HENZ, 1997).

Weiner (1997) sugere a existência de subpopulações únicas de células T CD4+CD25+ denominadas de células T regulatórias produtoras de TGF- $\beta$ , tendo propriedades imunorregulatórias (inibitórias) para Th1 bem como de auxílio para a produção de anticorpos da classe IgA. Mais recentemente, uma subpopulação de células T CD4+CD25+ tem sido mostrado regular a resposta imune Th2, apresentando um possível papel no controle de respostas alérgicas (McHUGH; SHEVACH, 2002). Estudos indicam que o mecanismo de supressão das respostas em diferentes condições patológicas (autoimunidade, respostas alérgicas e infecciosas, entre outras) destas células é dependente da produção e secreção de mediadores como TGF- $\beta$  e/ou IL-10 (BELKALD et al., 2002; PICCIRILLO et al., 2002).

### **1.8. Fisiopatologia da reação alérgica**

Mastócitos e basófilos expressam receptor de alta afinidade para o fragmento cristalizável das moléculas de IgE (Fc $\epsilon$ RI), sendo que outros tipos celulares como monócitos (MAURER et al., 1994), células dendríticas circulantes (MAURER et al., 1996), células de Langerhans (WANG et al., 1992) e eosinófilos (GOUNNI et al., 1994) também expressam receptor Fc $\epsilon$ RI.

A ligação de um antígeno a moléculas de IgE da superfície de mastócitos/basófilos gera despolarização da membrana celular, influxo de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular e posterior liberação de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, culminando com a ativação de enzimas como miosina quinase e a fosfolipase A2, além da queda dos níveis intracelulares de AMP cíclico (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

A exocitose de histamina e outros mediadores pré-formados promovem aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema e contração de músculos lisos, fenômenos esses responsáveis pelas manifestações das reações de hipersensibilidade do tipo I ou imediata (ABBAS; LICHTMAN, 2003), ocorrendo nos primeiros 30 minutos após a exposição alergênica (TERR, 1997a). Nas doze horas que se sucedem, ocorre uma progressiva infiltração tecidual de células inflamatórias, como neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares em resposta a mediadores químicos (TERR, 1997a).

Nos mastócitos, o resultado da ativação é a produção de mediadores lipídicos, como prostaglandinas D2 ( $\text{PGD}_2$ ) ou leucotrienos ( $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  e  $\text{LTB}_4$ ) e a produção de grânulos secretores (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Os principais mediadores da resposta de fase tardia na hipersensibilidade imediata são as citocinas do tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13), os quimiotáticos celulares e as moléculas de adesão (GALLI; LANTZ, 1999).

### **1.9. Glicoconjugados e resposta de anticorpos IgE**

As lectinas (lectina – do latim: *legere*, que significa escolher, selecionar) são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, ligantes de açúcares, que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados (GOLDSTEIN et al., 1980). Lis e Sharon (1986) definiram essas moléculas como capazes de reconhecimento da

porção carboidrato da superfície de diferentes organismos, órgãos ou tecidos de um mesmo organismo. Por apresentarem essa propriedade de reconhecimento e interação específica com carboidratos, tais moléculas se tornaram valiosas ferramentas para detecção e isolamento de glicoproteínas e/ou glicoconjugados, bem como a caracterização parcial das porções de carboidratos dessas glicoproteínas, assim como o acompanhamento de mudanças que ocorrem nos açúcares da superfície das células em processos como desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (LIS; SHARON, 1986).

A primeira descrição de uma lectina foi feita há 118 anos, por Stillmark, através do estudo de semente de mamona (*Ricinus communis*), onde observou aglutinação de eritrócitos de diferentes animais. O princípio isolado foi denominado ricina. Quatro décadas mais tarde, Summer e Howell (1936), purificaram pela primeira vez a Concanavalina-A, uma lectina ligante de manose e glicose, do extrato da semente do feijão *Canavalia ensiformes*, em que analisaram sua atividade hemaglutinante, sugerindo que a aglutinação induzida pela lectina pode ocorrer por reação com açúcares na superfície eritrocitária. Além disso, foi a primeira lectina da família Leguminosae a ser seqüenciada e ter sua estrutura determinada por cristalografia de raio X (CUNNINGHAM et al., 1975; HARDMAN ; AINSWORTH, 1972; BECKER et al., 1975).

Assim, as lectinas vêm sendo utilizadas como ferramentas de investigação em situações variadas: detecção de glicosilação anormal (PAREKH et al., 1985, BROOKS; LEATHEM, 1991), glicotipagem de células animais (CUMMINGS, 1997), indução da produção de citocinas (SOUZA, 1998), identificação e separação de subpopulações linfocitárias (KEARSE; SINGER, 1994; WU-HSIEH et al., 1998), isolamento de antígenos glicosilados (GENNARI-CARDOSO, 1998).



Os extratos alergênicos são uma mistura heterogênea de proteínas, glicoproteínas e componentes não alérgicos (VERMA, 1994), sendo que os antígenos glicosilados têm sido reconhecidos com papel crucial em diferentes patologias e, dentre os fungos patogênicos, têm se mostrado altamente imunogênicos: a gp43, principal glicoproteína de *Paracoccidioides brasiliensis* (PUCCIA et al., 1994), componente de 105kDa de *Cryptococcus neoformans*, manoproteína envolvida na resposta imune mediada por células (PITZURRA et al., 1997), glicoproteína de 70kDa de *Histoplasma capsulatum*, apresentando correlação entre antigenemia e terapia (GOMEZ et al., 1999).

No estudo de doenças atópicas, componentes glicosilados ricos em manana, de *Candida albicans*, são reconhecidos por anticorpos IgE em pacientes com manifestações alérgicas, incluindo asma, rinite e dermatite atópica (SAVOLAINEN, 1995). Para tal procedimento, a lectina Concanavalina-A imobilizada em agarose, mostra-se como ferramenta de fundamental importância para isolamento de polissacarídeos e glicoproteínas (LLOYD; BITTON, 1971), por sua propriedade ligante de metil  $\alpha$ -D-manopiranosídeo, resíduo de manose.

Em ácaros, proteínas de alto peso molecular de *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* foram isoladas e caracterizadas imuno e físicoquimicamente por Baldo e Uhlenbruck (1977) e Stewart e Turner (1980), utilizando cromatografia de afinidade de Concanavalina-A, em que suas propriedades alergênicas foram avaliadas, sendo que Stewart e Turner caracterizaram diferentes isoformas do alérgeno Der p 4.

## **1.10. Avaliação da sensibilização aos alérgenos domiciliares**

A sensibilização aos alérgenos domiciliares mais comuns pode ser avaliada através de testes cutâneos ou por ensaios que determinam os níveis séricos de anticorpos IgE específicos aos alérgenos (PLATTS-MILLS, 1996).

### **1.10.1. Testes *in vivo* (cutâneos)**

O diagnóstico de alergia por meio de testes *in vivo* (testes cutâneos de puntura ou teste intradérmico) é útil para a identificação de pacientes portadores de hipersensibilidade mediada por IgE. São testes de alta especificidade e sensibilidade, de rápida e simples execução, e econômicos comparado à determinação laboratorial de IgE sérica específica. Contudo, o teste cutâneo não diagnostica a doença alérgica. Ele simplesmente determina a presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos, importantes na patogênese da doença alérgica (OWNBY, 1988).

O teste de puntura consiste na deposição de uma pequena quantidade (uma gota) do extrato alergênico sobre a pele. A introdução do alérgeno é feita através de puntura com uma agulha ou lanceta apropriada. O teste intradérmico é realizado injetando-se uma pequena quantidade (0,05 a 0,1mL) de extrato alergênico na derme (VOORHOST, 1980). Em ambos os testes, há um controle positivo, que consiste de histamina e um controle negativo, o diluente utilizado nos extratos alergênicos.

Quando um indivíduo é estimulado pela administração através da pele (intraderme) de um antígeno apropriado, o local torna-se eritematoso por congestão hemática dos vasos sanguíneos localmente dilatados. Na segunda fase, uma pápula origina-se em decorrência do extravasamento de plasma das vênulas. Na terceira

fase, os vasos sangüíneos nas margens da pápula se dilatam e ficam ingurgitados com hemáceas, resultando em eritema. A reação edematosa-eritematosa completa atinge o pico de 15 a 20 minutos depois da administração do antígeno e geralmente desaparece em menos de uma hora (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

Vários métodos são empregados para a mensuração da resposta cutânea ao teste de puntura. Tomando-se a medida da pápula, os métodos mais empregados são a média de dois diâmetros (ARRUDA et al., 1991; RIZZO et al., 1993; SQUILLACE et al., 1997) e a comparação dessa média com um controle negativo (SPORIK et al., 1990; TUNNICLIFFE et al., 1999).

Os padrões de medição e interpretação dos resultados dos testes cutâneos variam muito, contudo, são importantes para determinar o valor preditivo do teste (NIEMEIJER et al., 1993). Para teste de puntura valores limites  $\geq 3$ mm de pápula são relatados (MALLING, 1985; VOHLONEN et al., 1989; DREBORG, 1989).

Testes epicutâneos são mais fáceis, rápidos, menos dolorosos, mais baratos e com menor ocorrência de reações adversas do que testes intradérmicos. Estes por sua vez, são mais sensíveis, mas também produzem reações falso-positivas por causa da irritação local (OWNBY, 1988).

A magnitude da resposta cutânea é dependente de vários fatores, incluindo a quantidade de IgE alérgeno-específica e a quantidade e qualidade do alérgeno utilizado no teste (OWNBY, 1988).

Os testes cutâneos são ainda os mais sensíveis métodos para detecção da presença de imunoglobulina E (IgE) para um alérgeno específico. Quando corretamente realizados, são ainda o “gold standard” aos quais outros métodos diagnósticos podem ser comparados (SIRAGANIAN, 1992).

### 1.10.2. Testes *in vitro* (ELISA e RAST)

Os dois métodos *in vitro* para determinação de IgE específica mais utilizados, *Radioallergosorbent test* (RAST) e *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) têm o mesmo princípio básico.

O alérgeno é adsorvido a uma fase sólida (celulose, discos de papel, microplacas de titulação ou tubos plásticos) e exposto ao soro teste. Caso o soro contenha IgE, esta liga-se especificamente ao alérgeno, presente na fase sólida. A IgE não ligada é removida por lavagem, mas a que permanece unida à fase sólida, reage na fase seguinte, com uma anti-IgE humana marcada. A quantidade desta anti-IgE ligada ao suporte sólido é proporcional à quantidade de IgE sérica, possibilitando assim, uma estimativa da IgE específica presente no soro testado (OWNBY, 1988).

O RAST tem como suporte sólido a celulose (celulose microcristalina, *Sepharose* ou discos de papel), onde os alérgenos ligam-se covalentemente após serem ativados quimicamente por brometo de cianogênio e baseia-se numa anti-IgE humana marcada com moléculas radioativas, usualmente  $^{125}\text{I}$ , detectadas por contador gama (HAMILTON; ADKINSON, 1992). No ELISA, o suporte sólido geralmente é de poliestireno, material que constitui as microplacas, ao qual o alérgeno é adsorvido. Outra grande diferença, consiste na utilização de anti-IgE humana marcada com enzimas. Estas, por sua vez, são detectadas pela conversão de um substrato a um produto pela ação enzimática. Este produto geralmente é colorido e detectado por espectrofotômetro, podendo ser também luminescente ou fluorescente (OWNBY, 1988).

Estudos comparando os resultados dos testes *in vitro* com os testes cutâneos, observaram que os testes *in vitro* (RAST modificado) apresentam sensibilidade entre 60-80% e especificidade de aproximadamente 90% (OWNBY, 1988).

ELISA tem sido preferido ao RAST devido à sua praticidade, uma vez que materiais radioativos são instáveis, caros e potencialmente perigosos, requerendo cuidados especiais (METZGER et al., 1981). Neste contexto, nosso grupo tem desenvolvido um ELISA reverso para a medida de IgE sérica específica a Der p 2, o alérgeno principal do grupo 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus*, como uma técnica sensível para diagnóstico e possivelmente no monitoramento de imunoterapia alérgica (SILVA et al., 2001).

O emprego de testes, *in vivo* e *in vitro*, para a determinação de IgE específica a alérgenos da poeira, têm contribuído para a avaliação da sensibilização em pacientes atópicos e não atópicos. Desta forma, a determinação dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos inalantes domiciliares pode ser uma ferramenta valiosa para a avaliação da resposta imune de pacientes asmáticos atópicos.

### **1.11. Imunoterapia**

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

Durante a imunoterapia convencional, as concentrações séricas de IgE alérgeno-específicas aumentam inicialmente e a seguir, de modo lento e gradativo,

diminuem e atingem níveis mínimos ao longo dos meses (LICHTENSTEIN et al., 1973).

Dois modos de ação opostos foram atribuídos à IgG na alergia do tipo imediato. Uma pequena parte da IgG pode ter propriedades anafiláticas, apesar de não atribuir-se tais propriedades à IgG4 (KANCKO et al., 1995).

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

As subclasses de IgG podem ter efeitos diferentes sobre a resposta alérgica. Muitos estudos demonstraram que a imunoterapia induz aumentos marcantes dos níveis de IgG alérgeno-específica, particularmente IgG1 e IgG4 (AALBERSE et al., 1993). Os níveis basais de anticorpos IgG1, mas não os de IgG4, foram preditivos para o desenvolvimento da resposta tardia após a provocação com o alérgeno. O papel da IgG, em particular a secreção de anticorpos nos tecidos ou mucosas, requer mais estudos (BOUSQUET et al., 2000).

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

## 2. Objetivos

- 1) Extrair, identificar e fracionar os alérgenos derivados do extrato total de *Blomia tropicalis* em resina de Concanavalina A- *Sepharose*.
- 2) Avaliar a sensibilização alérgica à *Blomia tropicalis*, pela realização de teste cutâneo de puntura.
- 3) Analisar a reatividade dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 às frações protéicas derivadas do extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total) e da fração com afinidade por Concanavalina A (Bt-ConA) em pacientes com alergia respiratória e indivíduos não atópicos por ensaio imunoenzimático (ELISA).
- 4) Avaliar a presença de reatividade cruzada de IgE, IgG1 e IgG4 a alérgenos presentes nos extratos totais de *B. tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus* e à fração Bt-ConA, por imunoenaios de inibição competitiva.
- 5) Identificar, por *immunoblotting*, as frações alérgicas de Bt total e Bt-ConA reconhecidas por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos éticos**

O presente estudo foi submetido e aprovado sem restrições junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Conselho Nacional de Saúde (CNS), Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos (Anexo 1 e 2).

A concordância em participar da pesquisa foi confirmada pela assinatura de um Termo de Consentimento pós-informado (Anexo 3) pelo indivíduo da pesquisa, de acordo com as normas da Resolução CNS 196/96. No termo de consentimento consta o nome da pesquisa, seu objetivo, os procedimentos a serem realizados, como coleta de sangue e teste cutâneo de leitura imediata, e a possibilidade de saída do estudo sem necessidade de explicação prévia ou prejuízo ao atendimento atual ou futuro dos indivíduos da pesquisa.

Em seguida, os indivíduos responderam a uma breve ficha de identificação e a um questionário clínico elaborado segundo ISAAC (1998), com algumas modificações, que foi aplicado com a presença de um médico alergologista para maior conhecimento da sua história clínica (Anexo 4).

#### **3.2. Local do estudo**

Os indivíduos participantes do estudo eram moradores da cidade de Uberlândia, situada no sudeste do Brasil (longitude 48°W, latitude 18°S), na região conhecida como Triângulo Mineiro e distante 563km de Belo Horizonte, capital do Estado de Minas Gerais. Com uma área territorial de 4.116km<sup>2</sup> de extensão e



população estimada de 570.042 habitantes segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004), é uma cidade com clima do tipo tropical chuvoso que se caracteriza pelo inverno seco. A média anual da temperatura é de 22°C. Os meses de Outubro a Março são os mais quentes (24,7°C) e os mais frios são Junho e Julho (18,8°C) (UFU, 2005).

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

### **3.3. Seleção dos pacientes**

Foram selecionados 121 pacientes apresentando rinite alérgica perene associado ou não a asma (intermitente ou persistente, leve ou moderada), de ambos os sexos e idade entre 18 e 60 anos, que foram atendidos no Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) no período de maio de 2002 a setembro de 2005.

O diagnóstico clínico de rinite alérgica foi estabelecido com base na presença de manifestações de espirros, rinorréia e/ou obstrução nasal intermitentes, relacionadas à exposição a alérgenos inaláveis e na história pessoal e/ou familiar de doenças atópicas (NORMAN, 1985). O diagnóstico clínico de asma foi estabelecido considerando a presença de episódios de dispnéia e sibilância, obedecendo aos critérios estabelecidos pelo *National Asthma Education Program Coordinating Committee* (SLY, 1997).

Como controle, um grupo de 36 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos, sem sintomas ou histórico clínico de doenças alérgicas, com resultados negativos ao teste cutâneo de puntura (TCP) para os extratos alergênicos de *Blomia tropicalis* (Bt), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e

*Dermatophagoides farinae* (Df) foi também incluído no estudo. Os indivíduos foram selecionados entre os alunos dos cursos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários da UFU e de membros da população de Uberlândia, durante o mesmo período, e também assinaram o termo de consentimento pós-informado bem como responderam ao questionário.

Os critérios de exclusão para este estudo foram:

- Indivíduos em uso dos seguintes medicamentos, por via oral ou tópica:
  - Anti-histamínicos de primeira e segunda geração entre 24 e 72 horas antes do teste cutâneo (BERNSTEIN; STORMS, 1995);
  - Corticosteróides sistêmicos por tempo prolongado (> 20mg/dia por mais de sete dias) (SLOTT; ZWEIMAN, 1974);
  - Corticosteróides tópicos até 3 semanas anteriores ao teste cutâneo (PIPKORN; HAMMERLUND; ENERBAECK, 1989);
- Presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;
- Idade inferior a 18 ou superior a 60 anos;
- Recusa em participar do estudo.

### **3.4. Teste cutâneo de puntura**

A hipersensibilidade imediata foi determinada por meio de teste cutâneo de puntura (TCP), utilizando extratos alergênicos glicerizados padronizados de *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (IPI/ASAC, Brasil) na concentração de 2mg/mL.

Após anti-sepsia da face interna do antebraço com álcool 70%, um volume de 10µL de cada extrato foi depositado a uma distância de 3cm um do outro, realizando-se em seguida a puntura com auxílio de uma lanceta de metal estéril

(Bayer Co., EUA). Como controle positivo, foi utilizado cloridrato de histamina a 10mg/mL (Bayer Co., EUA) em solução salina fisiológica contendo glicerol a 50%, diluente que foi utilizado como controle negativo da reação (SQUILLACE et al., 1997).

Após 15 minutos da realização do teste, as pápulas foram medidas com uma régua específica graduada em milímetros (Morrow Brown Disposable/Skin Test Needle Aller Guard®, Topeka, KS, EUA) nos seus dois diâmetros (o maior e o perpendicular a este) e um teste cutâneo positivo foi definido por uma pápula com diâmetro médio maior que 3mm que a do controle negativo.

### **3.5. Coleta de sangue**

Paralelamente ao teste cutâneo de puntura, amostras de sangue (10mL) foram coletadas de cada indivíduo, utilizando tubos de coleta a vácuo (Vacutainer® - Precision Glide/Becton Dickson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, EUA) e agulhas (25 x 8mm) para punção venosa na região do antebraço. Após a formação do coágulo, os tubos foram centrifugados a 700 x *g* por 10 minutos e os soros obtidos foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

### **3.6. Preparação de extratos alergênicos**

A extração dos alérgenos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* foi realizada de acordo com o protocolo anteriormente descrito (PEREIRA et al., 2005). Em resumo, aproximadamente 200g de material seco de cultivo dos ácaros, gentilmente cedido pelo Dr. Federico Montealegre (Immunochemistry Laboratory, Medical School of Ponce, Porto Rico, EUA), foram peneirados (Granutest-Telastem Peneiras para

Análise LTDA, ABNT 35, abertura em mm = 0,50/TYLER 32) para separar corpos e fezes dos ácaros do restante do material de cultivo. Em seguida, 5g do material peneirado foram misturados a 50mL de solução salina tamponada com borato a 5mM (pH 8,0) contendo inibidores de proteases: Leupeptina 1 $\mu$ M (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1mM (Sigma), Benzamidina 1mM (Sigma) e Aprotinina 10 $\mu$ g/mL (Sigma). Essa mistura foi exaustivamente macerada em nitrogênio líquido para ruptura dos ácaros, distribuída em tubos cônicos de 50mL e incubada durante 18 horas a 4°C em agitação orbital.

Posteriormente, o material foi centrifugado por duas vezes a 3.000 x *g* por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante novamente centrifugado a 20.000 x *g* durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante final (extrato total) foi concentrado e dializado em Amicon (W.R. Grace & Co., Beverly, EUA) com membrana YM-10 (*cut off* de 10kDa, Whatman International Ltd, Maidstone, Inglaterra) contra solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2 (PBS), sob agitação suave. Para eliminar agregados produzidos durante o processo de concentração e diálise, foi realizada uma nova centrifugação a 10.000 x *g* por 30 minutos a 4°C. Os extratos alergênicos (Bt total e Dp total) foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C. O conteúdo protéico dos extratos foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951), conforme descrito a seguir.

### **3.7. Obtenção do extrato de *B. tropicalis* em coluna de afinidade**

#### **3.7.1. Preparação da coluna de Concanavalina A-Sepharose para cromatografia**

A resina de Concanavalina A (ConA)-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Upsala, Suécia) foi preparada em coluna de fracionamento cromatográfico.

Anterior ao processo cromatográfico, foi efetuado o *crosslinking* da Concanavalina A às esferas de *Sepharose* com glutaraldeído para otimização do processo, conforme descrito por Scher, Resneck e Bloch (1989) com modificações. Em resumo, a resina de Con A-*Sepharose* foi lavada com 50mL de PBS contendo 0,2M de trietanolamina (Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, Brasil), ajustado para pH 6,2 com HCl e 50mL de PBS contendo 0,2M de metil $\alpha$ -D-manopiranosídeo (Ferro Pfanstiehl Laboratories Inc., Waukegan, IL, EUA). Em seguida, acrescentou-se 15 $\mu$ L de glutaraldeído 25% (Merk, Darmstadt, Alemanha) para cada mL de gel empacotado e incubados por 1 hora à temperatura ambiente misturando-se a suspensão lentamente a cada 10 minutos. Para remoção do excesso de glutaraldeído, a resina foi novamente lavada com 25mL de tampão glicina (Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, Brasil) e Tris (Hydroxymethyl aminometan, Merk, Darmstadt, Alemanha) a 1M (pH 9,2) contendo metil  $\alpha$ -D-manopiranosídeo a 0,2M, incubada por 10 minutos sob agitação suave. Em seguida, a coluna foi incubada por duas vezes de 10 minutos com o mesmo tampão sem adição de carboidrato. A coluna foi equilibrada com 50mL de PBS e utilizada para cromatografia.

### **3.7.2. Fracionamento do extrato antigênico**

Aproximadamente 2mL do extrato total de *B. tropicalis* (concentração protéica de 9mg/mL) foram aplicados em 5mL de resina de Con A-*Sepharose* previamente equilibrada como acima descrito. Após incubação por 2 horas a 4°C, a resina foi lavada com aproximadamente 200mL de PBS e as proteínas que ficaram retidas na resina foram eluídas através da adição de PBS contendo 0,05M de metil $\alpha$ -D-manopiranosídeo a 0,05M. A cada dois minutos de incubação com esta solução, as

frações foram coletadas em volumes de 2,0mL e a leitura e monitoramento quanto à presença de proteínas foi realizada em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, SP, Brasil) a 280nm.

As frações que apresentaram densidade óptica  $> 0,02$  foram misturadas, concentradas e dialisadas em Amicon utilizando membrana YM-10 (*cut-off* 10kDa) contra PBS a 4°C. A fração de *B. tropicalis* com afinidade para ConA (fração Bt-ConA) foi distribuída em alíquotas e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.8. Dosagem Protéica**

As concentrações protéicas dos extratos alergênicos totais (Bt total e Dp total), da fração protéica não retida pela coluna (Bt-void) e da fração eluída por afinidade para ConA (Bt-ConA) foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

Para a curva de calibração da dosagem protéica foi utilizado soroalbumina bovina (BSA, Sigma) em diluições duplas seriadas de 500 a  $8\mu\text{g}/\text{mL}$  em PBS. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, SP, Brasil) a 660nm. Os valores de densidade óptica obtidos foram convertidos em  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com base na curva padrão, utilizando o programa *Microplate Manager* 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

### **3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio**

Os componentes protéicos dos extratos Bt total, Bt-void e Bt-ConA foram visualizados por meio de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 12% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em condições desnaturantes e

não-redutoras (LAEMMLI, 1970), utilizando um sistema para mini-gel (SE 215 Mighty Small Multiple Caster, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, CA, EUA).

O gel de separação foi preparado utilizando-se Tris-HCl (Hydroxymethyl aminomethane, Sigma) a 0,375M (pH 8,8), SDS (Dodecil sulfato de sódio, Sigma) a 1%, EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético, Quimibrás Indústrias Químicas S.A.) a 2mM, solução de acrilamida a 30% e bis-acrilamida a 0,8% (Pharmacia-LKB, Produtos AB, Bromma, Suécia), TEMED (N,N,N,N-tetrametil etilenodiamino, Pharmacia-LKB) a 0,125% e PSA (Persulfato de amônio, Pharmacia-LKB) a 0,125%.

Para o gel de empilhamento utilizou-se Tris-HCl a 0,125M (pH 6,8), SDS a 0,1%, EDTA a 2mM, solução acrilamida/bis-acrilamida a 5%, TEMED a 0,125% e PSA a 0,125%.

O tampão de corrida (pH 8,3) consistiu de glicina (Sigma) a 0,19M, Tris a 0,025M, SDS (Sigma) a 0,075% e EDTA (Quimibrás Indústrias Químicas S.A.) a 1,95M.

Imediatamente antes da aplicação no gel, as amostras foram centrifugadas (20.000 x *g* por 5 minutos), o sobrenadante diluído em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2%, glicerol a 20%) e aquecido a 100°C durante 5 minutos. As amostras foram aplicadas nos poços do gel, paralelamente aos padrões de peso molecular (Sigma Marker, Sigma).

A eletroforese foi realizada sob condições de corrente a 20mA e voltagem a 100V (Sistema LKB-BROMMA-2301 Macrodrive 1, Pharmacia, Suécia) por aproximadamente 1 hora. Após a corrida, os géis foram submetidos à coloração por *Coomassie Blue* (Coomassie brilliant blue-R250, Sigma).

### 3.10. ELISA para detecção de anticorpos IgE específicos a *B. tropicalis*

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para a detecção de anticorpos IgE anti-*B. tropicalis* em amostras de soros de pacientes atópicos e não atópicos, segundo técnica descrita por Silva e colaboradores (2001), com algumas modificações.

Placas de microtitulação de alta afinidade, com 96 poços (Corning Incorporated Costar®, Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), foram sensibilizadas com os extratos Bt total ou Bt-ConA na concentração protéica de 20µg/mL (50µL/poço) diluídos em tampão carbonato 0,06M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. Como controle do extrato Bt-ConA, poços foram paralelamente sensibilizados com Concanavalina A (Sigma) a 20µg/mL.

As placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate, Sigma) (PBS-T) por três vezes e os sítios ativos foram bloqueados (100µL/poço) com PBS-T acrescido de 1% de BSA (PBS-T-BSA) por uma hora à temperatura ambiente.

As amostras de soros foram diluídas a 1:2 em PBS-T-BSA, adicionadas (50µL/poço) em duplicata e incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Em cada placa, foram utilizados três soros controles negativos de pacientes não atópicos e o diluente PBS-T-BSA como controle dos soros. As placas foram submetidas a novo ciclo de lavagens com PBS-T por seis vezes e, subseqüentemente, foi adicionado (50µL/poço) o anticorpo secundário biotilado anti-IgE-humana (Kirkegaard e Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, EUA) na diluição de 1:500 em PBS-T-BSA. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e lavadas novamente por seis vezes com PBS-T. Em seguida, foi adicionado



(50µL/poço) o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) na diluição de 1:500 em PBS-T-BSA durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após um novo ciclo de lavagens, as placas foram reveladas por meio da adição do substrato enzimático consistindo de solução de 2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid (ABTS, Sigma) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M (pH 4,2) contendo 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma).

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA) a 405nm. O limiar de positividade (*cut off*) da reação foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Os níveis de anticorpos IgE foram arbitrariamente expressos por índice ELISA (IE) calculado segundo a fórmula:  $IE = DO_{amostra} / cut\ off$ , onde:

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

$Cut\ off = DO\ média\ de\ soros\ controles\ negativos + 3\ desvios\ padrões$

Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos.

### **3.11. ELISA para detecção de IgG1 e IgG4 específicos a *B. tropicalis***

Placas de microtitulação de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas por 18 horas a 4°C com os extratos Bt-total ou Bt-ConA na concentração de 20µg/mL. As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-BSA por uma hora à temperatura ambiente. Nas etapas subseqüentes, foi utilizado PBS-T-BSA como diluente e as placas foram lavadas com PBS-T após cada etapa da reação.

As amostras de soros foram diluídas 1:5 e incubadas por uma hora a 37°C em câmara úmida. Subseqüentemente, foram incubados os respectivos anticorpos

secundários consistindo de anti-IgG1 humana biotinizada (1:250; Sigma) e anti-IgG4 humana biotinizada (1:1000; Sigma) por uma hora a 37°C. Na etapa final, o conjugado estreptavidina-peroxidase foi adicionado na diluição de 1:500 durante 30 minutos à temperatura ambiente.

A reação foi revelada por meio da adição de ABTS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03%. Os níveis de anticorpos IgG1 e IgG4 específicos a *B. tropicalis* foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE) conforme acima descrito.

### **3.12. ELISA de inibição competitiva**

A especificidade dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para IgE, IgG1 e IgG4 foi avaliada utilizando um ensaio de inibição competitiva, conforme descrito por Pereira e colaboradores (2005). Para curvas de inibição foram realizadas diluições decimais seriadas de 10<sup>2</sup> a 10<sup>-4</sup> μg/mL dos extratos Bt total, Bt-ConA, Dp total e ConA (controle negativo) em diluente PBS-T-BSA. Cada diluição dos antígenos foi misturada (v:v) com uma diluição (1:2,5) de um soro controle positivo predeterminado e a mistura foi pré-incubada por 18 horas a 4°C. O soro incubado somente com diluente foi utilizado como controle positivo.

Em seguida, as misturas antígenos-soro foram testadas em ELISA para IgE, IgG1 e IgG4 como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em porcentagens de inibição da reação em relação à ausência do antígeno inibidor, e calculados segundo a fórmula: Inibição (%) = [1,0 – (DO amostra / DO controle positivo)] x 100.

### **3.13. Immunoblotting para detecção de IgE, IgG1 e IgG4 anti-*Blomia tropicalis***

Imediatamente após a separação eletroforética em SDS-PAGE, os componentes protéicos dos extratos Bt total e Bt-ConA foram transferidos para membranas de nitrocelulose (0,45 $\mu$ m, MILLIPORE, Bedford, Mass., EUA) embebidas em tampão de transferência (Glicina a 0,04M, Tris a 0,05M, SDS a 0,04% e Metanol a 20%).

Um sistema de transferência semi-úmido (Multiphor II Electrophoresis Unit, Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia) foi utilizado conforme técnica descrita por Towbin, Stsehelin e Gordon (1979). A corrente utilizada foi de 0,8mA por cm<sup>2</sup> do gel durante duas horas. O sucesso da transferência foi confirmado pela visualização das frações do padrão de peso molecular sobre a membrana de nitrocelulose por meio de coloração com solução de Ponceau a 0,5%.

As membranas eletrotransferidas foram cortadas em tiras de 3mm de largura, depositadas em canaletas apropriadas e bloqueadas com 800 $\mu$ L de PBS-T contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) por duas horas à temperatura ambiente. Amostras de soros foram diluídas (1:5) em PBS-T contendo 1% de leite desnatado (PBS-T-M) e adicionadas num volume de 500 $\mu$ L sobre as tiras de nitrocelulose previamente lavadas com PBS-T-M após o período de bloqueio. Após incubação por aproximadamente 15 horas à temperatura ambiente sob agitação lenta, as tiras de nitrocelulose foram submetidas a seis ciclos de lavagem com PBS-T por 5 minutos. Em seguida, as tiras foram incubadas com 500 $\mu$ L dos anticorpos secundários anti-IgE humana biotinizada (1:250), anti-IgG1 humana biotinizada (1:200) ou anti-IgG4 humana biotinizada (1:250) diluídos em PBS-T-M por 4 horas à temperatura ambiente.

Após novas lavagens como anteriormente descrito, as tiras foram incubadas com 500 $\mu$ L do conjugado Estreptavidina/Peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluído a 1:200 em PBS-T-M durante duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente ao ciclo final de lavagem, as bandas protéicas foram visualizadas através da revelação por quimioluminescência (ECL<sup>TM</sup>, Western Blotting detection reagents, Buckinghamshire, Inglaterra). Como controles da reação, foram omitidos, em duas tiras de nitrocelulose para cada placa, anticorpos primários e/ou secundários, ou seja, substituindo-os somente pelo diluente PBS-T-M.

As massas moleculares das bandas protéicas foram estimadas por regressão linear, segundo o padrão de peso molecular de referência, a partir do cálculo da mobilidade relativa (Rf).

### **3.14. Análise estatística**

A análise estatística consistiu na utilização dos programas *GraphPad Prism* 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EUA), *Statistics for Windows* (StatSoft, Inc.) e *Microsoft Excel* 1997 (Microsoft Co., EUA) para os cálculos de freqüência, média, desvio padrão, correlações e associações, bem como para construção dos gráficos.

Para comparações das médias dos níveis de anticorpos expressos em índice ELISA (IE), inicialmente foi realizado o teste de normalidade para avaliar o comportamento das variáveis analisadas (teste de Kolmogorov-Smirnov seguido do teste Dallal-Wilkinson-Lilliefor para cálculo do valor de p). Para os dados que não apresentaram distribuição normal ou Gaussiana, foram utilizados testes não-paramétricos.

Comparações entre extratos alergênicos e grupos de pacientes quanto aos níveis de IgE, IgG1 e IgG4 específica foram realizadas pelos testes de Kruskal-Wallis, usando como post-hoc teste, o teste múltiplo de comparação de Dunn.

Correlações entre os níveis de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos ao extrato Bt total e Bt-ConA foram determinadas utilizando-se os testes de correlação de Spearman. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **3.15. Normas de biossegurança**

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

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características dos indivíduos do estudo

Os indivíduos do estudo foram distribuídos em grupos e subgrupos de acordo com a positividade ao TCP, como segue:

- 1) Grupo Bt+: pacientes atópicos com TCP positivo ao extrato de *B. tropicalis*;
  - Subgrupo Bt+/Dp+: pacientes atópicos com TCP positivo a ambos extratos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*;
  - Subgrupo Bt+/Dp-/Df-: pacientes atópicos com TCP positivo ao extrato de *B. tropicalis* e negativo aos extratos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*;
- 2) Grupo Bt-: pacientes atópicos com TCP negativo ao extrato de *B. tropicalis*;
  - Subgrupo Bt-/Dp+: pacientes atópicos com TCP negativo ao extrato de *B. tropicalis* e positivo ao extrato de *D. pteronyssinus*;
  - Subgrupo Bt-/Dp-/Df-: pacientes atópicos com TCP negativo aos extratos de *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae*;
- 3) Grupo NA: indivíduos não atópicos com TCP negativo aos extratos de *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae*.

As características demográficas e clínicas dos pacientes com rinite alérgica com ou sem asma (grupos Bt+ e Bt-) e indivíduos não atópicos (grupo NA) estão demonstradas na tabela 1.

**Tabela 1.** Características demográficas e clínicas de pacientes com rinite alérgica e indivíduos não atópicos de Uberlândia, MG.

Características	Grupos		
	Bt+	Bt-	NA
Número de indivíduos (n)	70	51	36
Idade (anos)			
Média ± desvio padrão	27,7 ± 10,1	31,7 ± 11,7	28,1 ± 11,7
Sexo (Masculino/Feminino)	26/44	11/40	12/24
Diagnóstico Clínico (n, %)			
Rinite	54 (77%) <sup>a</sup>	48 (94%) <sup>c</sup>	0
Rinite+Asma	16 (23%) <sup>b</sup>	3 (6%) <sup>d</sup>	0
TCP e Positividade (mm, %)§			
<i>B. tropicalis</i> (Bt)	6,6 ± 2,8 <sup>a</sup>	0	0
	100% <sup>a</sup>	0	0
<i>D. pteronyssinus</i> (Dp)	7,9 ± 4,2 <sup>b</sup>	6,3 ± 2,8 <sup>b</sup>	0
	90% <sup>b</sup>	37% <sup>c</sup>	0
<i>D. farinae</i> (Df)	7,1 ± 3,2 <sup>a,b</sup>	6,0 ± 2,3 <sup>b</sup>	0
	96% <sup>a,b</sup>	31% <sup>c</sup>	0

Bt+ : pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo ao extrato de *B. tropicalis*;

Bt- : pacientes com TCP negativo ao extrato de *B. tropicalis*;

NA: indivíduos não-atópicos com TCP negativo aos extratos de ácaros testados;

§ Positividade ao TCP foi determinada a partir do diâmetro médio da pápula e estabelecida como  $\geq 3$ mm em relação ao controle negativo da reação. Os dados estão representados como média ± desvio padrão do tamanho da pápula e porcentagem de positividade.

<sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Segundo o diagnóstico clínico dos pacientes, rinite sem asma foi o diagnóstico predominantemente observado em ambos grupos de pacientes ( $p < 0,0001$ ), com frequência significativamente maior em pacientes Bt- (94%) do que em pacientes Bt+ (77%) ( $p = 0,001$ ). Entretanto, a frequência de rinite associada com asma foi significativamente maior no grupo Bt+ (23%) do que no grupo Bt- (6%) ( $p = 0,01$ ).

Quanto à reatividade cutânea aos ácaros testados, os pacientes do grupo Bt+ (TCP positivo ao extrato de *B. tropicalis*) apresentaram positividade a *D. pteronyssinus* (90%) e *D. farinae* (96%) significativamente maior do que os pacientes do grupo Bt- (37% e 31%, respectivamente) ( $p < 0,0001$ ). Além disso, o tamanho médio das pápulas para *D. pteronyssinus* ( $7,9 \pm 4,2\text{mm}$ ) foi significativamente maior que para *B. tropicalis* ( $6,6 \pm 2,8\text{mm}$ ) ( $p < 0,05$ ) dentro do grupo de pacientes Bt+. Não houve diferença significativa entre o tamanho médio das pápulas para *D. pteronyssinus* ( $6,3 \pm 2,8\text{mm}$ ) e *D. farinae* ( $6,0 \pm 2,3\text{mm}$ ) ( $p = 0,7345$ ) dentro do grupo Bt-.

#### **4.2 Teste cutâneo de puntura aos extratos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus***

Os resultados do TCP aos extratos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* realizado nos pacientes com rinite alérgica estão demonstrados na tabela 2.

Dos 121 pacientes, 70 (57,9%) apresentaram reatividade cutânea ao extrato total de *B. tropicalis* (Bt+), dos quais 63 (52,1%) foram também reativos ao extrato total de *D. pteronyssinus* (Bt+/Dp+) e somente 7 (5,8%) pacientes foram positivos a um único ácaro (*B. tropicalis*) individualmente (Bt+/Dp-). Dos 51 (42,1%) pacientes com TCP negativo ao extrato total de *B. tropicalis* (Bt-), 19 (15,7%) foram reativos somente a *D. pteronyssinus* (Bt-/Dp+) e 32 (26,4%) não apresentaram reatividade cutânea a ambos ácaros (Bt-/Dp-).



**Tabela 2.** Teste cutâneo de puntura (TCP) aos extratos de *B. tropicalis* (Bt) e *D. pteronyssinus* (Dp) em 121 pacientes com rinite alérgica de Uberlândia, MG.

TCP	Número (%)
Bt +	70 (57,9)
Bt + / Dp +	63 (52,1)
Bt + / Dp –	7 (5,8)
Bt –	51 (42,1)
Bt – / Dp +	19 (15,7)
Bt – / Dp –	32 (26,4)

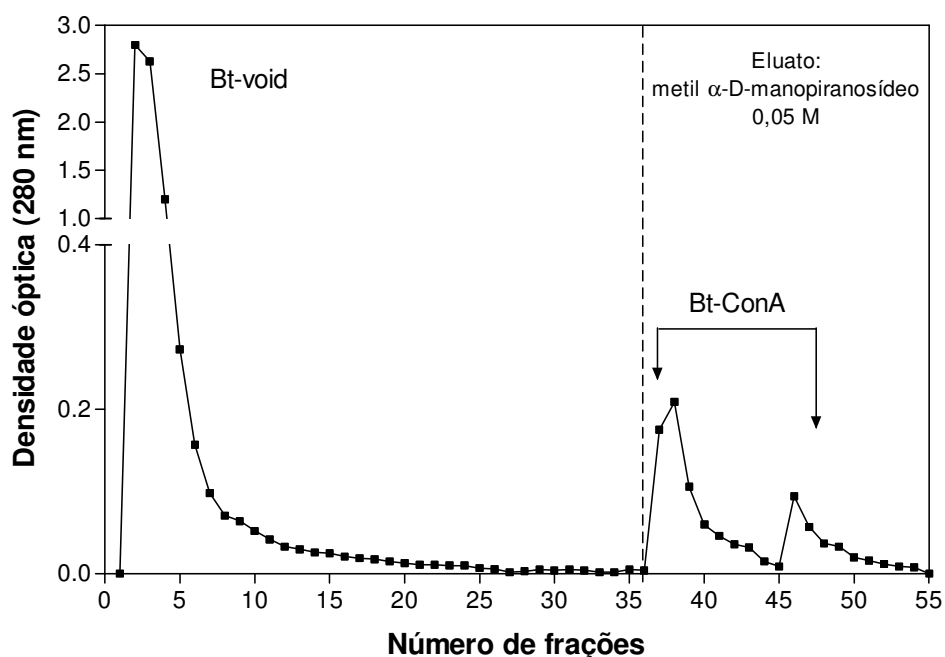
(+): Positivo; (–): Negativo.

#### 4.3. Obtenção do extrato Bt-ConA de *Blomia tropicalis*

O perfil cromatográfico das frações do extrato total de *B. tropicalis* obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A-*Sepharose* está ilustrado na figura 3.

O primeiro pico representa as frações protéicas que não foram retidas pela resina de ConA (Bt-void) e apresentou um valor de densidade óptica (DO) máxima de 2,800 (fração 2). As frações que interagiram por afinidade com a resina (Bt-ConA) são formadas pelo segundo e terceiro picos e foram eluídas através da adição de PBS contendo 0,05M de metil  $\alpha$ -D-manopiranosídeo, apresentando uma DO máxima de 0,209 (fração 38).

As frações 37 a 43 e 46 a 49 foram reunidas, constituindo o “pool” das frações que interagiram com a resina (extrato Bt-ConA).



**Figura 3.** Perfil cromatográfico das frações do extrato total de *Blomia tropicalis* obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A-Sepharose. O 1º pico representa o Bt-void, e a fração Bt-ConA está indicada nos 2º e 3º picos, eluídos pela adição de PBS contendo 0,05M de metil  $\alpha$ -D-manopiranosídeo. Volume da resina: 5,0mL; amostra aplicada: 18mg em um volume de 2,0mL.

#### 4.4. Concentração protéica

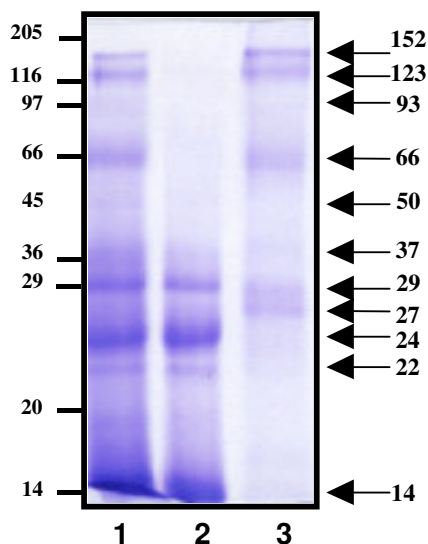
A concentração protéica dos extratos e frações obtidas foram: Bt total = 9.000 $\mu$ g/mL; Bt-void = 3.800 $\mu$ g/mL e Bt-ConA = 490 $\mu$ g/mL (após concentração e diálise em PBS).

#### 4.5. Análise eletroforética dos extratos e frações de *B. tropicalis*

A figura 4 ilustra o perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12% do extrato Bt total, da fração Bt-void e da fração Bt-ConA após coloração com *Coomassie blue*.

O extrato Bt total apresentou componentes protéicos por toda a extensão do gel de eletroforese, com massas moleculares aparentes variando de 14 a 152kDa (14, 22, 24, 29, 37, 50, 66, 93, 123 e 152kDa). A fração Bt-void apresentou

componentes protéicos abaixo de 30kDa (14, 22, 24, 29kDa) enquanto a fração Bt-ConA apresentou componentes protéicos com massas moleculares aparentes predominantemente acima de 27kDa (27, 29, 37, 50, 66, 93, 123 e 152kDa).



**Figura 4.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) dos extratos e frações de *Blomia tropicalis*. Bt total (pista 1), Bt-void (pista 2) e Bt-ConA (pista 3). Os padrões de massas moleculares (kDa) estão indicadas à esquerda e os componentes protéicos estimados dos extratos de *B. tropicalis* estão representados à direita.

#### 4.6. Anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos a *B. tropicalis*

##### 4.6.1. Níveis de IgE, IgG1 e IgG4 aos extratos Bt total e Bt-ConA

Os níveis de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos aos extratos Bt total e Bt-ConA determinados por ELISA em soros de pacientes com TCP positivo (Bt+) e negativo (Bt-) a *B. tropicalis* e indivíduos não-atópicos (NA) estão demonstrados na figura 5.

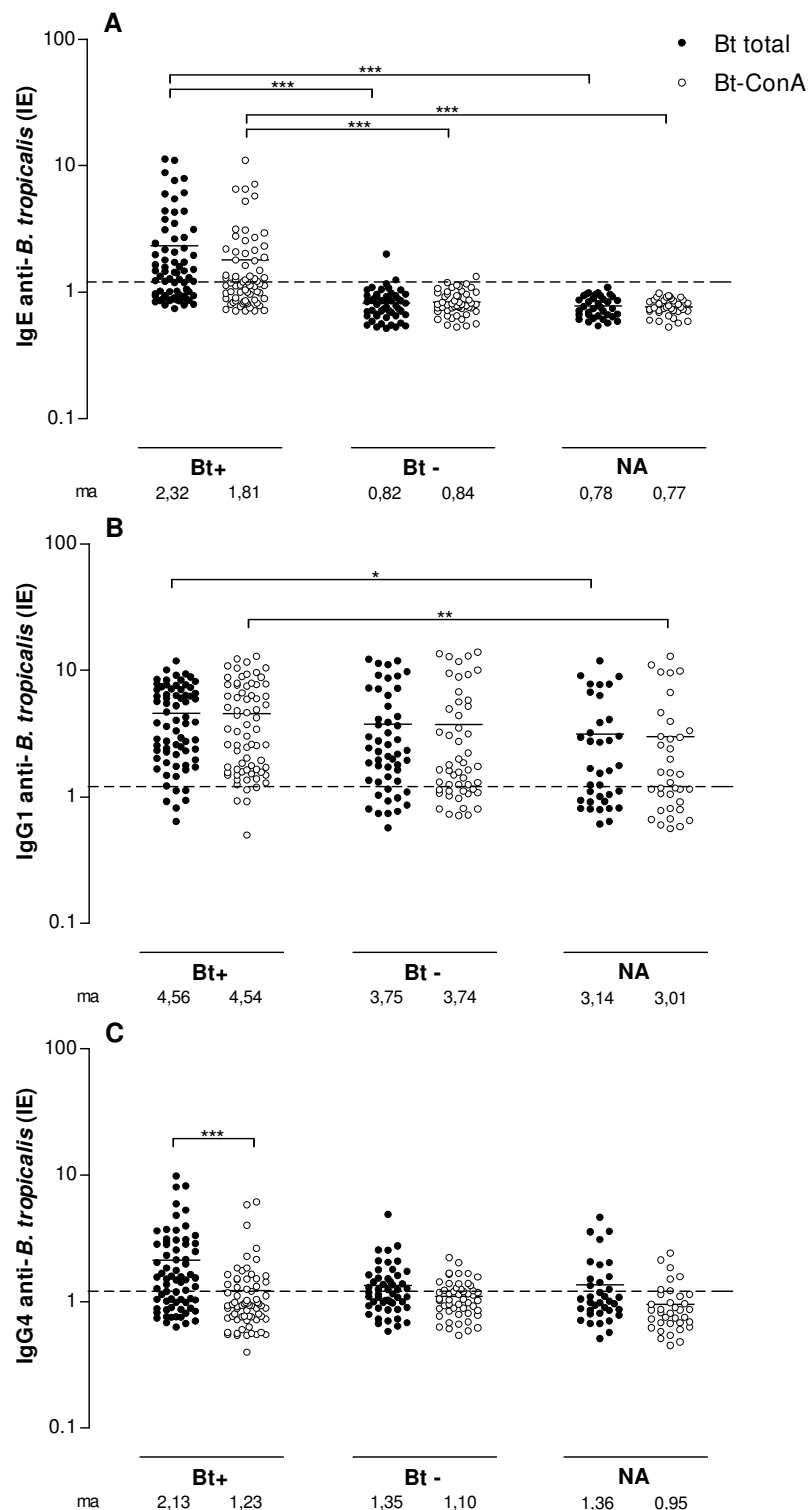
As médias dos níveis de IgE anti-Bt total (Figura 5A) foram significativamente maiores no grupo Bt+ (IE = 2,32) quando comparadas ao grupo Bt- (IE = 0,82) ou ao grupo NA (IE = 0,78) ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma, os níveis médios de IgE anti-Bt-

ConA foram significativamente maiores no grupo Bt+ (IE = 1,81) quando comparados ao grupo Bt- (IE = 0,84) e ao grupo NA (IE = 0,77) ( $p < 0,001$ ).

Os soros dos pacientes Bt+ apresentaram níveis significativamente maiores de IgG1 anti-Bt total (IE = 4,56) quando comparados aos do grupo NA (IE = 3,14) ( $p < 0,05$ ) (Figura 5B). Em contraste, pacientes Bt- não mostraram diferença significativa nos níveis de IgG1 anti-Bt total (IE = 3,75) em relação aos pacientes Bt+ e aos indivíduos NA ( $p > 0,05$ ). Do mesmo modo, os níveis de IgG1 específica a Bt-ConA foram significativamente maiores no grupo Bt+ (IE = 4,54) quando comparados aos do grupo NA (IE = 3,01) ( $p < 0,01$ ), não havendo diferença significativa entre os grupos de pacientes Bt+ e Bt- e entre o grupo Bt- (IE = 3,74) e o grupo NA ( $p > 0,05$ ).

Como demonstrado na figura 5C, somente os pacientes Bt+ apresentaram níveis significativamente maiores de IgG4 anti-Bt total (IE = 2,13) em relação à fração Bt-ConA (IE = 1,23) ( $p < 0,001$ ), não havendo diferenças significativas entre os grupos de pacientes (Bt+ e Bt-) e indivíduos não-atópicos frente a ambos extratos.

Todos os soros foram paralelamente testados frente à Concanavalina A (controle da fração Bt-ConA) e não mostraram qualquer reatividade, apresentando valores de IE abaixo do ponto de corte (IE < 1,2) (dados não mostrados).



**Figura 5.** Níveis séricos de IgE (A), IgG1(B) e IgG4 (C) ao extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total) e à fração com afinidade por Con-A (Bt-ConA) em pacientes e indivíduos não atópicos (NA) de acordo com o teste cutâneo de puntura (TCP) a *B. tropicalis* (Bt), expressos em índices ELISA (IE). Pacientes com TCP positivo a Bt (Bt+, n = 70), TCP negativo (Bt-, n = 51) e indivíduos NA (n = 36). A linha pontilhada indica o limiar de positividade da reação (IE = 1,2). As barras horizontais representam as médias (ma) obtidas para cada grupo. \* p < 0,05. \*\* p < 0,01. \*\*\* p < 0,001.

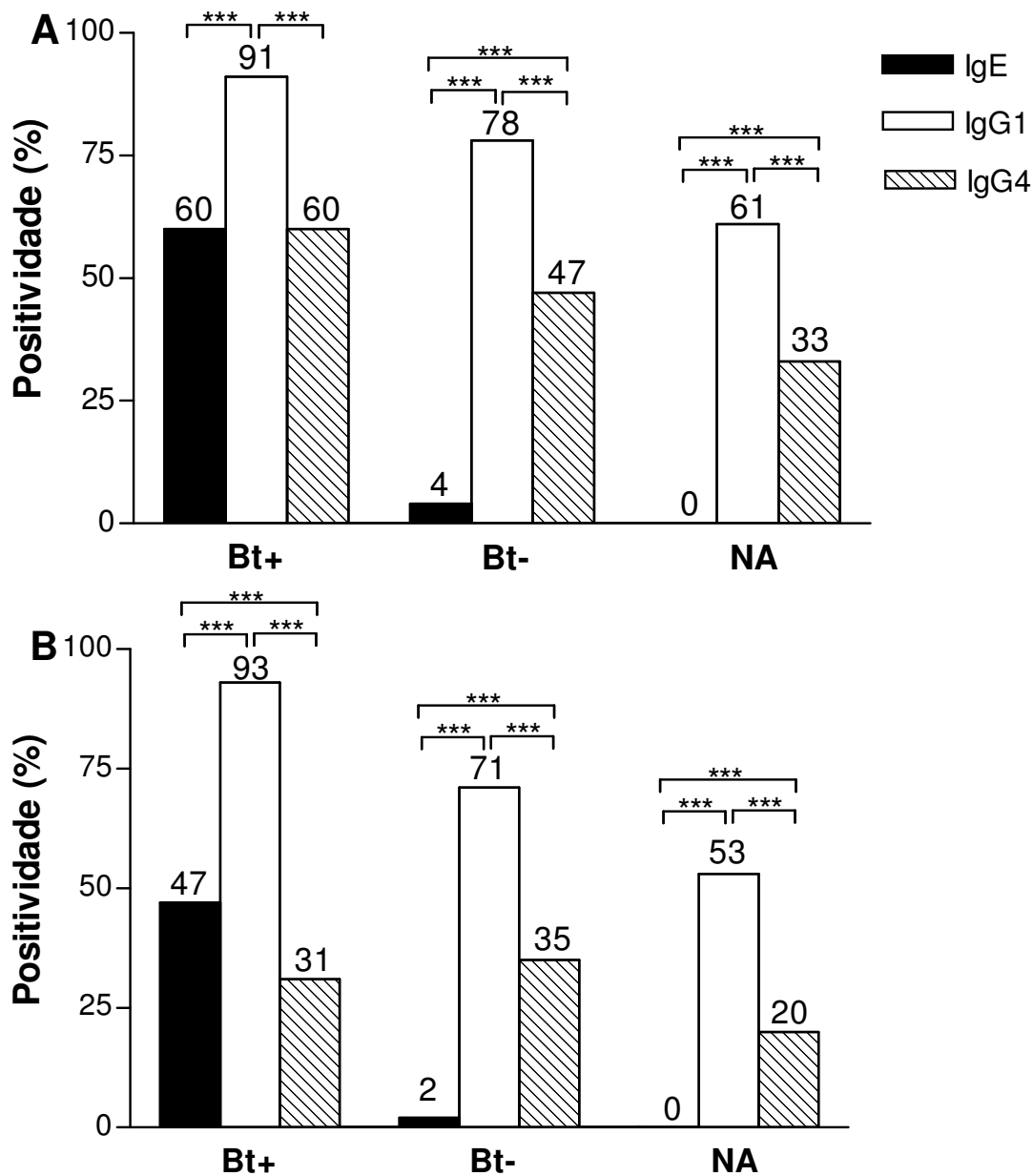
#### 4.6.2. Positividade de IgE, IgG1 e IgG4 aos extratos Bt total e Bt-ConA

A positividade de IgE, IgG1 e IgG4 específicos aos extratos Bt total e Bt-ConA determinados por ELISA em soros de pacientes com TCP positivo (Bt+) e negativo (Bt-) a *B. tropicalis* e indivíduos não-atópicos (NA) está demonstrada na figura 6.

Dos 70 pacientes Bt+, 42 (60%) soros foram positivos para IgE, 64 (91%) para IgG1 e 42 (60%) para IgG4 anti-Bt total (Figura 6A). Das 51 amostras de soros de pacientes Bt-, 2 (4%) apresentaram IgE anti-Bt total, 40 (78%) tinham IgG1 anti-Bt total e 24 (47%) mostraram IgG4 anti-Bt total. Todas as 36 amostras de soros de indivíduos não-atópicos (grupo NA) foram negativas para IgE, mas 22 (61%) foram positivas para IgG1 e 12 (33%) para IgG4 frente ao extrato Bt total.

Frente ao extrato Bt-ConA (Figura 6B), no grupo Bt+, 33 (47%) pacientes apresentaram positividade para IgE, 65 (93%) para IgG1 e 22 (31%) para IgG4. Nos pacientes do grupo Bt-, apenas 1 (2%) foi positivo para IgE, enquanto 36 (71%) foram positivos para IgG1 e 18 (35%) para IgG4. No grupo NA, nenhum paciente apresentou reatividade para IgE, sendo que 19 (53%) foram positivos para IgG1 e 7 (20%) para IgG4 contra a fração Bt-ConA.

Todos os grupos demonstraram uma positividade para IgG1 significativamente maior tanto para IgE quanto para IgG4 ( $p < 0,001$ ) em ambos extratos analisados. Os grupos Bt- e NA apresentaram positividade de IgG4 significativamente maior do que IgE ( $p < 0,001$ ) para Bt total e Bt-ConA. Taxas de positividade para IgE significativamente mais altas que IgG4 foram encontradas no grupo Bt+ para Bt-ConA ( $p < 0,001$ ).



**Figura 6.** Positividade (%) de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 ao extrato total de *Blomia tropicalis* (A) e à fração com afinidade por Con-A (B) em amostras de soros de pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a Bt (Bt+, n = 70) e negativo (Bt-, n = 51) a *B. tropicalis* e indivíduos não atópicos (NA, n = 36). Diferenças estatísticas significativas estão representadas por \*\*\* p < 0,001.

#### **4.6.3. Correlação e associação entre os níveis de IgE, IgG1 ou IgG4 ao extrato Bt total e Bt-ConA**

Correlações e associações entre os níveis séricos de anticorpos IgE, IgG1 ou IgG4 ao extrato Bt total e Bt-ConA foram analisadas somente nos pacientes do grupo Bt+ (Figura 7).

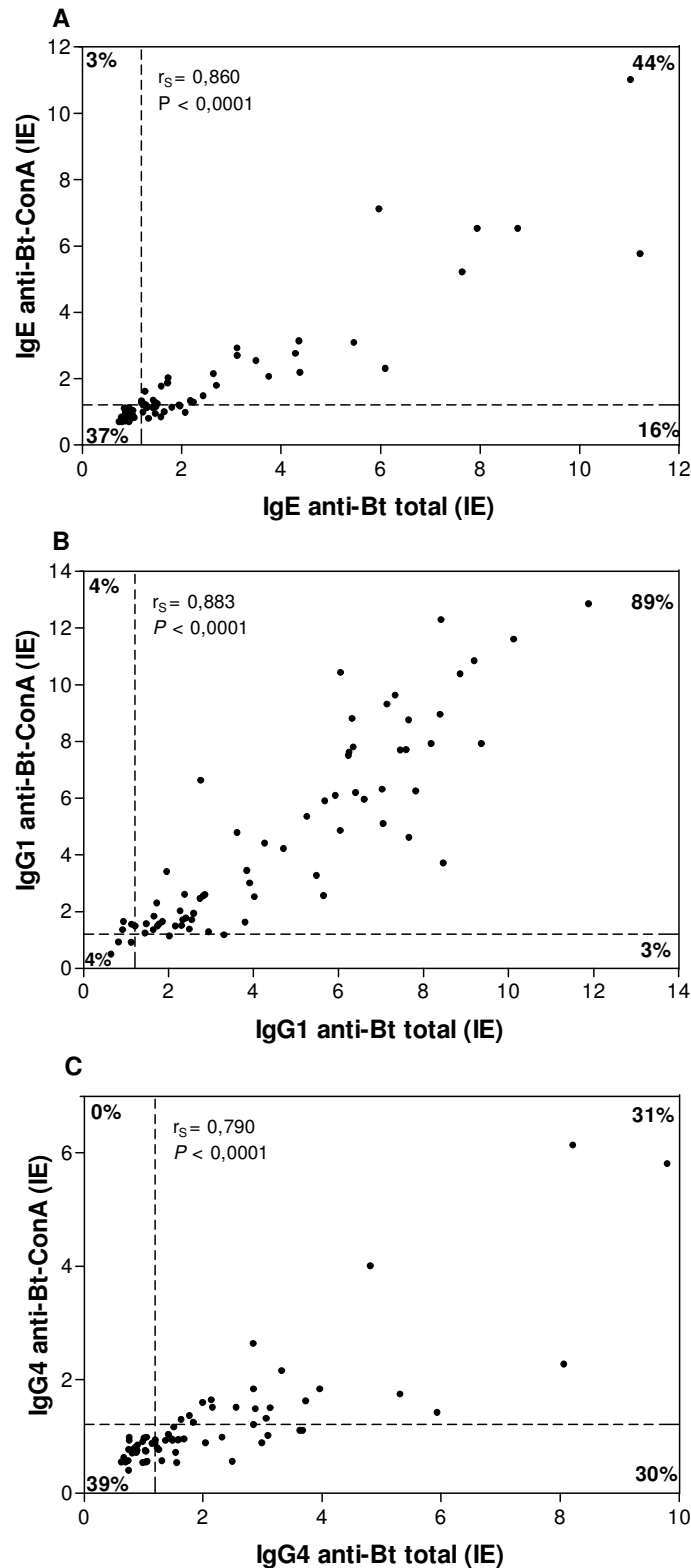
Foi observado uma significativa correlação positiva entre os anticorpos IgE ( $r_s = 0,860$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 7A), IgG1 ( $r_s = 0,883$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 7B) e IgG4 ( $r_s = 0,790$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 7C) ao extrato Bt total *versus* Bt-ConA. Além disso, observou-se uma freqüência de pacientes duplo-positivos de 44% para IgE, 89% para IgG1 e 31% para IgG4. Uma associação duplo-negativa foi encontrada para IgE (37%) e IgG4 (39%), sendo que apenas 4% dos pacientes foram duplo-negativos para IgG1. A porcentagem de pacientes reativos apenas para Bt total foi de 16% para IgE, 3% para IgG1 e 30% para IgG4. Houve uma baixa freqüência de pacientes positivos somente a Bt-ConA: 3% para IgE, 4% para IgG1 e nenhum paciente (0%) para IgG4.

#### **4.6.4. Especificidade dos ELISAs para IgE, IgG1 e IgG4 a *Blomia tropicalis***

A especificidade dos ELISAs para IgE, IgG1 e IgG4 a *Blomia tropicalis* foi demonstrada através de testes de inibição competitiva frente aos extratos Bt total ou Bt-ConA, utilizando como inibidores os extratos solúveis de Bt total e Bt-ConA (inibição homóloga), Dp (inibição heteróloga) ou Con-A (inibição irrelevante) (Figura 8).

Os testes de inibição para IgE, IgG1 e IgG4 frente ao extrato Bt total (Figuras 8A, 8B e 8C, respectivamente) ou à fração Bt-ConA (Figuras 8D, 8E e 8F, respectivamente), apresentaram curvas de inibição dose-dependente em





**Figura 7.** Correlação e associação entre os níveis séricos de IgE (A), IgG1(B) ou IgG4 (C) ao extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total) e à fração com afinidade por Con-A (Bt-ConA) em pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a *B. tropicalis* (Bt+, n=70), expressos em índices ELISA (IE). O coeficiente de correlação ( $r_s$ ) foi calculado pelo teste de correlação de Spearman. As linhas pontilhadas indicam o limiar de positividade da reação (IE = 1,2). As porcentagens de duplo positivo, duplo negativo ou simples positivo para cada extrato estão indicadas nos quadrantes correspondentes.

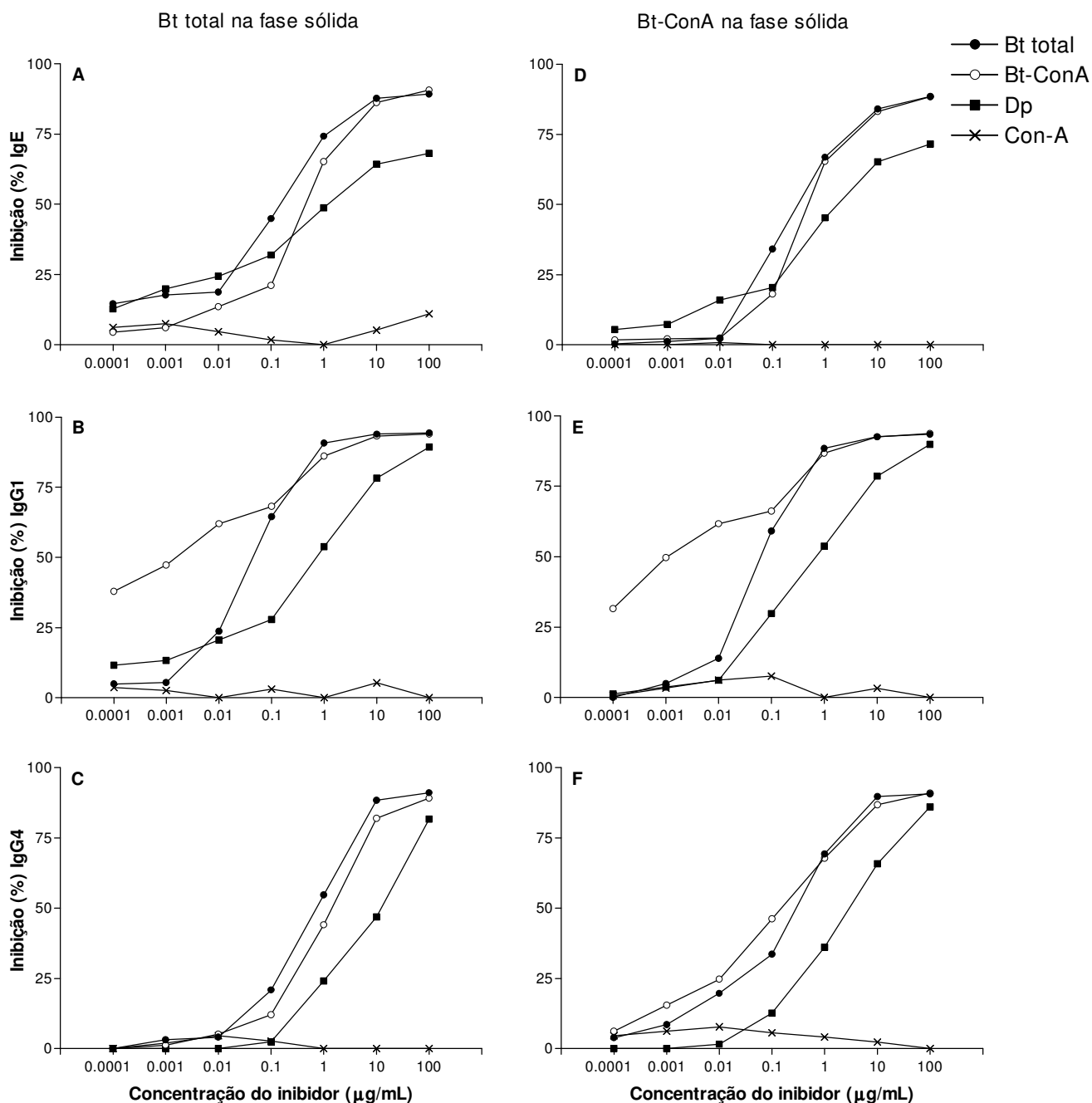
concentrações crescentes dos extratos solúveis de Bt, Bt-ConA e Dp, demonstrando reatividade cruzada com o extrato de Dp. Na concentração de 100 µg/mL dos inibidores Bt total, Bt-ConA e Dp, observou-se uma máxima reatividade cruzada frente a ambos extratos para todas as classes de anticorpos analisados.

Para detecção de IgE específica frente a Bt total, observamos uma percentagem de inibição sem diferença significativa para Bt total (89,3%), Bt-ConA (90,6%) e Dp (68,1%) ( $p > 0,05$ ) (Figura 8A). Da mesma forma, não houve diferença significativa nos níveis de inibição frente a Bt-ConA para Bt total (88,5%), Bt-ConA (88,5%) e Dp (71,5%) ( $p > 0,05$ ) (Figura 8D).

Para detecção de IgG1 específica frente a Bt total, observamos uma percentagem de inibição sem diferença significativa para Bt total (94,4%), Bt-ConA (93,9%) e Dp (89,3%) ( $p > 0,05$ ) (figura 8D). Da mesma forma, não houve diferença significativa nos níveis de inibição frente a Bt-ConA para Bt total (93,4%), Bt-ConA (93,8%) e Dp (89,8%) ( $p > 0,05$ ) (Figura 8E).

Da mesma forma, para detecção de IgG4 específica frente a Bt total, observamos uma porcentagem de inibição sem diferença significativa para Bt total (91,1%), Bt-ConA (89,1%) e Dp (81,7%) ( $p > 0,05$ ) (Figura 8C), não havendo diferença significativa nos níveis de inibição frente a Bt-ConA para Bt total (90,7%), Bt-ConA (90,9%) e Dp (86,1%) ( $p > 0,05$ ) (Figura 8F).

Na concentração de 100µg/mL Con-A, mostrou inibição irrelevante de 11% frente a Bt total e de 0% para Bt-ConA na detecção da IgE específica. Nessa concentração, Con-A não mostrou inibição (0%) para ambos extratos na detecção de IgG1 e IgG4, demonstrando ser um antígeno irrelevante na inibição desses anticorpos.



**Figura 8.** Especificidade do ELISA para os anticorpos IgE (A, D), IgG1 (B, E) e IgG4 (C, F) anti-*B. tropicalis* (Bt) utilizando ensaios de inibição competitiva. Extratos de Bt total, Bt-ConA, *D. pteronyssinus* (Dp) ou Concanavalina-A (Con-A, controle negativo) foram submetidos a diluições decimais seriadas de  $10^2$  a  $10^{-4}$  µg/mL em solução diluente de PBS-T-BSA e incubados com um *pool* de 6 soros de pacientes do grupo Bt+. As misturas antígenos-soro foram analisadas nos ELISAs frente aos extratos de Bt total (A, B, C) ou de Bt-ConA (D, E, F) na fase sólida. O soro incubado somente com diluente foi utilizado como controle positivo. Porcentagem de inibição foi calculada a partir da fórmula:  $[1,0 - (\text{DO amostra} / \text{DO controle positivo})] \times 100$ .

#### **4.7. Immunoblotting para detecção de componentes antigênicos de *Blomia tropicalis* reconhecidos por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4**

Para determinar os componentes antigênicos dos extratos Bt total e Bt-ConA reconhecidos por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 por *immunoblotting*, foram selecionadas amostras de soros positivos no ELISA para IgE (n = 17), IgG1 (n = 13) e IgG4 (n = 13) de pacientes do grupo Bt+. Nos grupos Bt- e NA, foram selecionadas quatro (grupo Bt-) e três (grupo NA) amostras de soros positivos no ELISA para IgG1 e IgG4 (Figura 9).

Como demonstrado na Figura 9A, dez componentes antigênicos do extrato Bt total, com peso molecular variando de 14 a 152kDa (14, 22, 24, 29, 37, 50, 66, 93, 123 e 152kDa), foram reconhecidos por anticorpos IgE e IgG4 em pacientes do grupo Bt+. Entretanto, apenas cinco destes componentes (50, 66, 93, 123 e 152kDa) foram reconhecidos por anticorpos IgG1 no grupo Bt+. Os componentes antigênicos do extrato Bt total predominantemente (> 50%) reconhecidos por anticorpos IgE no grupo Bt+ foram as bandas de 152kDa (94%), 66kDa (71%), 123kDa (65%), 14 e 93kDa (53%). Os anticorpos IgG1 detectaram principalmente os componentes de 123kDa (100%), 93kDa (77%) e 152kDa (61%). Os anticorpos IgG4 reconheceram predominantemente os componentes de 24 e 66kDa (69%) e 14kDa (61%).

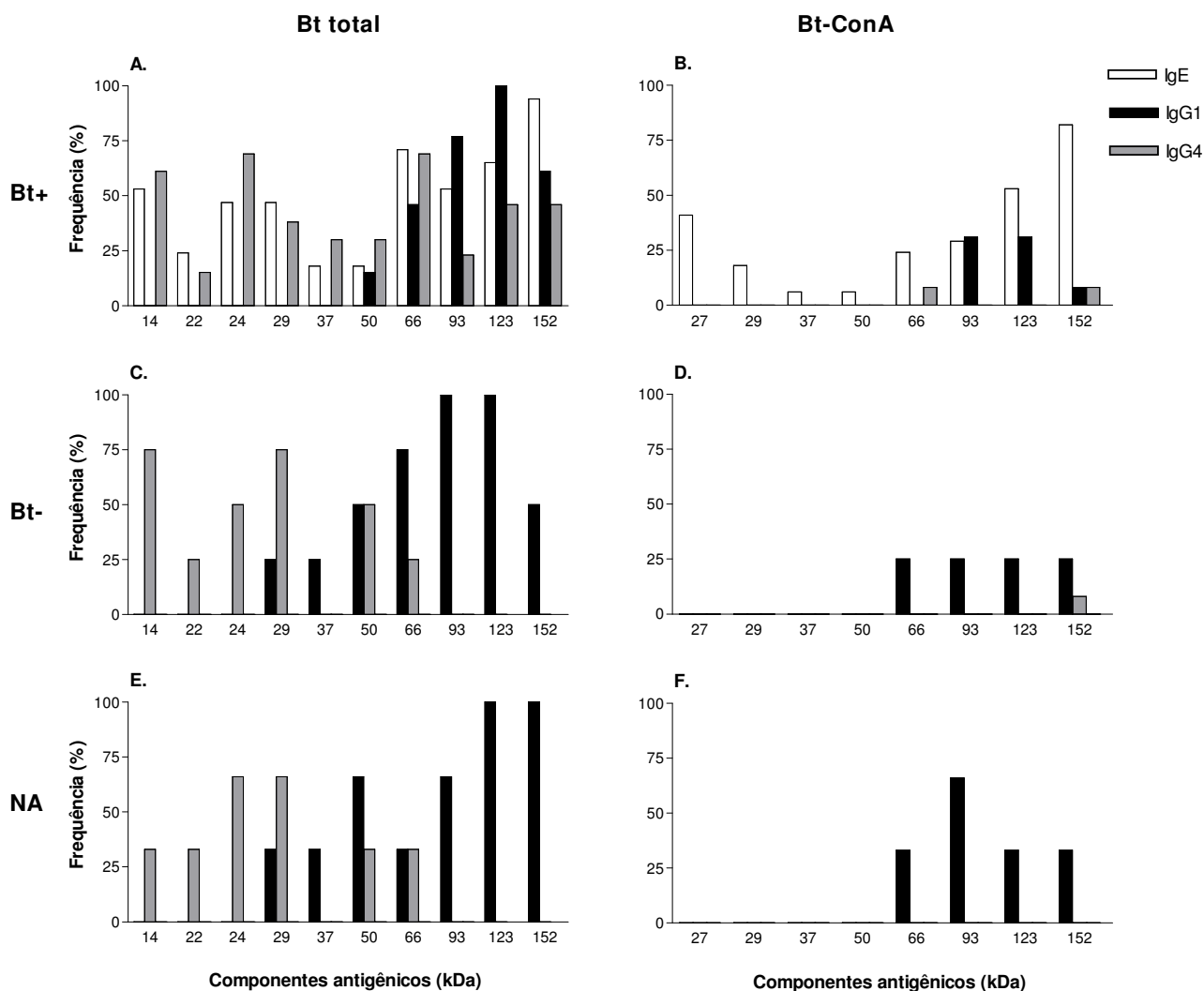
Como demonstrado na figura 9B, oito componentes antigênicos do extrato Bt-ConA, com peso molecular variando de 27 a 152kDa (27, 29, 37, 50, 66, 93, 123 e 152kDa), foram reconhecidos por anticorpos IgE em pacientes do grupo Bt+. Entretanto, apenas três destes componentes (93, 123 e 152kDa) foram reconhecidos por anticorpos IgG1 e anticorpos IgG4 reconheceram somente componentes antigênicos de 66 e 152kDa. Os componentes antigênicos da fração Bt-ConA predominantemente (> 50%) reconhecidos por anticorpos IgE no grupo Bt+

foram as bandas de 152kDa (82%) e 123kDa (53%). Nenhum componente antigênico foi predominantemente reconhecido por anticorpos IgG1 ou IgG4, embora foi observada uma freqüência de 31% de detecção das bandas de 93 e 123kDa por anticorpos IgG1 e 8% para as bandas de 66 e 152kDa reconhecidas por anticorpos IgG4.

No grupo Bt<sup>-</sup>, anticorpos IgG1 reconheceram bandas antigênicas do extrato Bt total acima de 29kDa, particularmente as bandas de 50, 66, 93, 123 e 152kDa enquanto anticorpos IgG4 reconheceram componentes antigênicos acima de 66kDa, especialmente as bandas de 14, 24, 29, 50kDa (Figura 9C). No extrato Bt-ConA, anticorpos IgG1 reconheceram bandas antigênicas acima de 66kDa, enquanto anticorpos IgG4 reconheceram somente o componente antigênico de 152kDa (Figura 9D).

No grupo NA, anticorpos IgG1 reconheceram bandas antigênicas do extrato Bt total acima de 29kDa, particularmente as bandas de 50, 93, 123 e 152kDa enquanto anticorpos IgG4 reconheceram componentes antigênicos acima de 66kDa, especialmente as bandas de 24 e 29kDa (Figura 9E). No extrato Bt-ConA, anticorpos IgG1 reconheceram bandas antigênicas acima de 66kDa, preferencialmente a banda de 93kDa, enquanto nenhum componente antigênico foi reconhecido por anticorpos IgG4 (Figura 9F).

Os perfis antigênicos do extrato Bt total e da fração Bt-ConA reconhecidos por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 em amostras representativas de soros de pacientes alérgicos dos grupos Bt<sup>+</sup> e Bt<sup>-</sup> e de indivíduos não atópicos (NA) estão demonstrados na figura 10. O controle da reação (diluyente em substituição ao soro) não mostrou qualquer reatividade com as diferentes classes de anticorpos tanto para o extrato Bt total (Figura 10A) como para Bt-ConA (Figura 10B).



**Figura 9.** Frequência (%) de componentes antigênicos do extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total) (A, C, E) e da fração com afinidade por Con-A (Bt-ConA) (B, D, F) reconhecidos através de *immunoblotting* por anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 entre soros que apresentaram-se positivos nos ensaios de ELISA, nos grupos de pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a Bt (Bt+, n = 13, 17) (A, B) e negativo (Bt-, n = 4) (C, D) à *B. tropicalis* e indivíduos não atópicos (NA, n = 3) (E, F).

**A. Bt total***Mr*

kDa

205

97

66

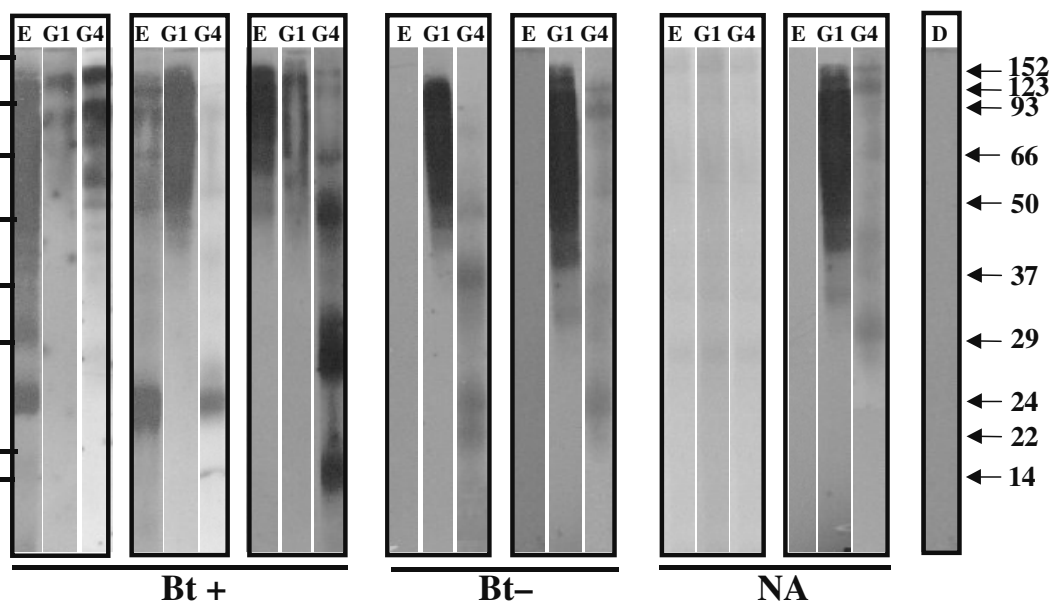
45

36

29

20

14

**B. Bt-ConA***Mr*

kDa

205

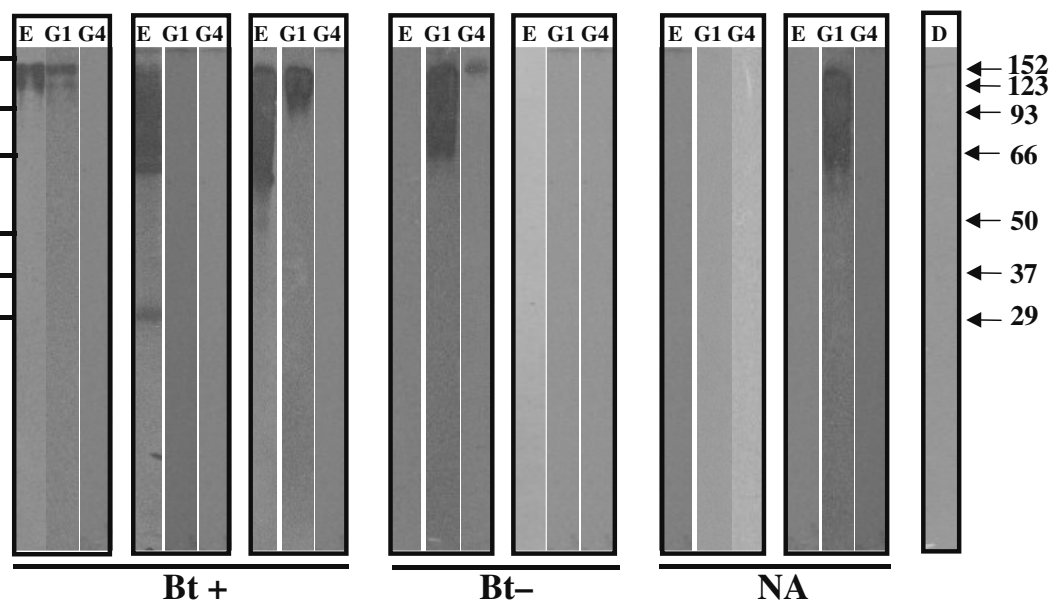
97

66

45

36

29



**Figura 10.** Perfil antigênico (*immunoblotting*) do extrato total de *Blomia tropicalis* (A) e fração com afinidade por Con-A (Bt-ConA) (B) de acordo com a reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4. Estão demonstrados três *immunoblots* representativos do grupo Bt+ e dois para os grupos Bt- e indivíduos não atópicos. D representa o controle da reação somente com diluente. As massas moleculares relativas (*Mr*) expressas em kDa estão indicadas à esquerda. Os componentes alergênicos imunodominantes de Bt total e Bt-ConA estão representados à direita (setas).

## 5. DISCUSSÃO

Alérgenos de ácaros são importantes agentes sensibilizantes, particularmente na asma e rinite alérgicas. Em regiões de clima temperado, ácaros das espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae* são predominantes e de maior importância clínica na asma (PLATTS-MILLS et al., 1992), enquanto, aliado a eles, *B. tropicalis* é uma importante fonte de alérgeno de ácaro em países de clima tropical e subtropical (ARRUDA et al., 1991; GELLER; ESCH; FERNANDEZ-CALDAS, 1993). Vários estudos anteriores têm demonstrado a importância desses ácaros na sensibilização de pacientes atópicos no Brasil (ARRUDA et al., 1991; GELLER; ESCH; FERNANDEZ-CALDAS, 1993; RIZZO et al., 1993; SARINHO et al., 1996).

No presente estudo, a resposta de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 específicos a diferentes componentes antigênicos presentes no extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt total) e na fração ligante de Concanavalina-A (Bt-ConA) foi avaliada em soros de pacientes com rinite alérgica e indivíduos não atópicos.

Com relação ao diagnóstico clínico, todos os pacientes apresentaram predominantemente o quadro de rinite alérgica sem asma, indicando que rinite deva ser a doença alérgica mais freqüente nesta população, assim como observado por Berger (2003). Entretanto, a rinite alérgica associada com asma foi mais freqüente nos pacientes com TCP positivo a *B. tropicalis* (grupo Bt+), sugerindo que o ácaro *Blomia tropicalis* possa estar exercendo um papel importante no desenvolvimento de ambas doenças alérgicas. Da mesma forma, a reatividade cutânea aos ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae* foi mais predominante no grupo de pacientes Bt+ indicando que, além de *B. tropicalis*, outros ácaros prevalentes no nosso meio possam estar contribuindo no desenvolvimento destas doenças alérgicas.



Do total dos indivíduos analisados, a maioria (58%) dos pacientes com rinite estava sensibilizada a *B. tropicalis*, sendo 52% com TCP positivo a ambos ácaros (*B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*) e apenas 6% a *B. tropicalis* (pacientes monossensibilizados). Estes resultados foram muito similares aos nossos achados anteriores obtidos em outro grupo de pacientes com rinite dessa mesma região (PEREIRA et al., 2005), confirmando que a alta proporção desta sensibilização concomitante tem certamente dificultado a avaliação do papel de *B. tropicalis* para estes pacientes, particularmente em regiões tropicais e subtropicais onde ambas espécies de ácaros coexistem.

Embora não há relatos sobre a prevalência do ácaro *B. tropicalis* em nossa região, uma alta frequência deste ácaro tem sido encontrada em amostras de poeira domiciliar das áreas urbana e rural de Salvador, BA (MEDEIROS Jr. et al., 2002), contrastando aos níveis baixíssimos ou até mesmo não detectáveis do seu alérgeno principal Blo t 5 quando determinado por ELISA *sandwich* (LUCZYNSKA et al., 1989). Este fato sugere que outros componentes alergênicos importantes derivados do extrato de *B. tropicalis* poderiam estar presentes e ser reconhecidos por soros de pacientes atópicos, ou ainda que a sensibilidade do ELISA para mensurar o alérgeno Blo t 5 deva ser melhor avaliada em ensaios futuros (MEDEIROS Jr. et al., 2002).

Em isolamento de alérgenos de ácaros, estudos utilizando lectinas como Con-A têm sido pouco realizados, sendo que um dos primeiros estudos com esta lectina possibilitaram a caracterização de diferentes isoformas do alérgeno Der p 4 de *D. pteronyssinus* (STEWART; TURNER, 1980). Neste contexto, no presente estudo, o extrato total de *B. tropicalis* foi fracionado em coluna de cromatografia de afinidade em resina de Concanavalina A-*Sepharose* resultando em frações não ligantes (Bt-

void) e em frações ligantes (Bt-ConA) de Con-A. De forma interessante, um perfil eletroforético distinto entre essas duas frações foi observado, com Bt-void apresentando predominantemente componentes de baixo peso molecular (< 30kDa) e Bt-ConA com predominância de componentes de alto peso molecular (> 27kDa). Estudos prévios têm demonstrado que alérgenos glicosilados são até cem vezes mais imunogênicos que antígenos não glicosilados (AGNES; TAN; JORDENS, 1998). Assim, a fração Bt-ConA poderia conter importantes componentes alergênicos ou imunogênicos do extrato total de *B. tropicalis*.

Os resultados sorológicos utilizando ELISA demonstraram um perfil similar de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 dirigidos a ambos extratos (Bt total e Bt-ConA) em diferentes grupos de pacientes, exceto para o grupo de pacientes com TCP positivo a *B. tropicalis* (Bt+) que apresentou uma menor reatividade de anticorpos IgG4 ao extrato Bt-ConA. Este fato sugere que diferentes epítomos podem ser reconhecidos por diferentes classes de anticorpos e que anticorpos IgE e IgG1 parecem reconhecer mais epítomos glicosilados contendo resíduos de manose que os anticorpos IgG4. Adicionalmente, os níveis significativamente maiores de IgE anti-Bt total e anti-Bt-ConA em pacientes do grupo Bt+ quando comparados com pacientes dos grupos Bt- e NA indicam que ELISA-IgE poderia ser considerado uma ferramenta adicional na avaliação da resposta de anticorpos IgE a *B. tropicalis* em pacientes com rinite alérgica.

No presente estudo, níveis de IgG4 e, especialmente, IgG1 contra ambos extratos foram detectados nos três grupos estudados, indicando que estes indivíduos estavam expostos a repetidos estímulos antigênicos por alérgenos de *B. tropicalis*. É interessante observar que maiores níveis de IgG1 específicos foram encontrados em pacientes do grupo Bt+ quando comparados ao grupo NA, enquanto

níveis de IgG4 específicos não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Estes resultados sugerem que anticorpos IgG1 e, em menor extensão, IgG4 podem estar relacionados com a exposição ambiental, refletindo assim uma conseqüência de resposta imune protetora natural e servindo para limitar reações de hipersensibilidade imediata em pacientes alérgicos.

As significativas correlações e associações encontradas entre IgE, IgG1 ou IgG4 aos extratos Bt total e Bt-ConA indicam que os antígenos glicosilados contendo resíduos de manose constituem alérgenos principais de *B. tropicalis* e podem estar envolvidos na sensibilização alérgica, uma vez que 44% dos pacientes Bt+ apresentaram IgE a ambos extratos, bem como na manutenção da homeostasia, como demonstrada pela alta proporção (89%) de pacientes Bt+ com IgG1 a ambos extratos mas, em menor extensão (31%), com anticorpos IgG4.

Analisando os ensaios de inibição competitiva, ELISAs para IgE, IgG1 e IgG4 a ambos extratos (Bt total e Bt-ConA) mostraram alta inibição homóloga correspondente. Entretanto, uma alta reatividade cruzada foi encontrada com o extrato de *D. pteronyssinus*, particularmente em altas concentrações do inibidor (10 a 100µg/mL). Esta reatividade cruzada foi parcial para IgE e total para IgG1 e IgG4 a ambos extratos de Bt total e Bt-ConA na fase sólida, indicando que subclasses de IgG mais do que IgE, estão preferencialmente envolvidas nesta reatividade cruzada e podem estar reconhecendo diferentes epítomos nos extratos alérgicos. Neste contexto, Arruda e colaboradores (1997) têm demonstrado uma reatividade cruzada de 33% de *B. tropicalis* com *D. pteronyssinus* e uma seqüência homóloga de 43% entre alérgenos Blo t 5 e Der p 5, sugerindo que algumas proteínas ligantes de IgE de *B. tropicalis* podem ser parcialmente inibidas por *D. pteronyssinus*.

Tsai e colaboradores (1998) relataram 14 proteínas de *B. tropicalis* reconhecidas por IgE e detectadas por *immunoblotting*, utilizando um sistema de revelação com substrato cromógeno. Por outro lado, outros pesquisadores têm identificado 21 diferentes proteínas reconhecidas por IgE detectadas através de radioimuno eletroforese cruzada (ARLIAN; VYSZENSKI-MORBER; FERNANDEZ-CALDAS, 1993) e 25 antígenos detectados por *immunoblotting* utilizando análise de autoradiografia (CARABALLO et al., 1994) no extrato total de *B. tropicalis*. No presente estudo, utilizando sistema de revelação por quimioluminescência, ensaios de *immunoblotting* com o extrato Bt total revelaram pelo menos dez componentes protéicos (14 a 152kDa) que foram reconhecidos por anticorpos IgE e IgG4 em soros de pacientes do grupo Bt+, confirmando os nossos achados anteriores de que o perfil antigênico do extrato Bt total revelado por IgG4 é comparável ao de IgE, indicando um mecanismo semelhante de mudança de classe para citocinas Th2 (PEREIRA et al., 2005). Por outro lado, o extrato Bt-ConA mostrou um perfil de oito bandas protéicas (27 a 152kDa), particularmente aquelas de alto peso molecular (123 e 152kDa) que foram reconhecidas preferencialmente por anticorpos IgE, mas não IgG4, indicando que diferentes epítomos são reconhecidos por diferentes classes de anticorpos e sugerindo que epítomos glicosilados contendo resíduos de manose parecem ser mais alergênicos do que imunogênicos.

Estudos de imunoterapia têm evidenciado um papel para IgG4 como anticorpo bloqueador das reações alérgicas, já que títulos de IgG4 específica aumentam durante a terapia com alérgenos específicos (AALBERSE et al., 1993). Os resultados do presente estudo indicam que a fração Bt-ConA não pode ser considerada um bom indutor de anticorpos IgG4 por exposição natural, limitando portanto, seu potencial uso em imunoterapia específica com alérgenos de *B.*

*tropicalis*. Estudos adicionais utilizando eletroforese bidimensional deverão ser conduzidos para melhor identificar e caracterizar o perfil de reatividade de anticorpos IgE e das subclasses de IgG direcionados contra diferentes isoformas dos componentes antigênicos presentes nos extratos Bt total e Bt-ConA.

A proteína de 152kDa foi o principal componente alergênico reconhecido em mais de 94% dos soros dos pacientes Bt+, embora outros quatro componentes alergênicos, 66 (71%), 123kDa (65%), 93 e 14kDa (53%) também tenham sido predominantemente detectados. Recentemente, Ramos e colaboradores (2001) identificaram pela primeira vez um alérgeno de *B. tropicalis* de alto peso molecular (Blo t 11), uma proteína de 98kDa com 52% de reatividade com IgE em soros de pacientes atópicos, contrastando com os resultados de outros dois estudos anteriores (TSAI et al., 1998 e CARABALLO et al., 1994), que têm considerado como principais alérgenos, as proteínas de 14 e 11-13kDa, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que os pacientes deste estudo parecem estar sensibilizados a componentes alergênicos de pesos moleculares maiores, embora também tenha sido detectada sensibilização a componentes de baixo peso molecular no extrato Bt total. Portanto, considerando o potencial papel das frações alergênicas derivadas do extrato total de *B. tropicalis*, essas frações deveriam ser posteriormente avaliadas para elucidar o papel dos componentes ligantes de ConA em manifestações alérgicas.

Anticorpos IgG1 reconheceram preferencialmente proteínas de pesos moleculares maiores tanto no extrato Bt total (acima de 29kDa) como na fração Bt-ConA (acima de 66kDa) em soros de pacientes atópicos e indivíduos controles, sugerindo que estes componentes antigênicos deveriam ser avaliados como potenciais antígenos candidatos em estudos de exposição, sensibilização ou

imunoterapia alergênicas. Assim, o reconhecimento preferencial de componentes de alto peso molecular (> 66kDa) do extrato Bt total e Bt-ConA por anticorpos IgG1 indicam que estes componentes parecem exercer um papel relevante na manutenção da homeostase na exposição alergênica natural.

A maior parte da reatividade cruzada entre os extratos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* tem sido atribuída aos componentes alergênicos de baixo peso molecular, em particular aos alérgenos BtM/Blo t 5 e Der p 5 (14kDa) ou Blot 3 e Der p 3 (25kDa) (CARABALO et al., 1998; YANG et al., 2003). No presente estudo, nós demonstramos uma importante reatividade cruzada entre os extratos de *B. tropicalis* (Bt total ou Bt-ConA) e o extrato de *D. pteronyssinus* sugerindo que componentes alergênicos de alto peso molecular podem também estar envolvidos na reatividade cruzada. Estudos de inibição por *immunoblotting* deverão ser realizados usando extratos Bt total e Bt-ConA para melhor caracterizar os componentes que possuem ou não reatividade cruzada com *D. pteronyssinus*.

Nossos resultados mostraram um amplo perfil antigênico dos extratos de Bt total e Bt-ConA confirmando a heterogeneidade da resposta de diferentes classes de anticorpos. Como o número de alérgenos identificados nos extratos alergênicos depende da população estudada e do número de soros testados (PUERTA et al., 2005), há a possibilidade de que outros componentes alergênicos de *B. tropicalis* possam ser identificados através da avaliação de um maior número de amostras de soros e de pacientes de outras regiões.

Estudos futuros deverão ser conduzidos para confirmar a presença de sítios glicosilados na fração Bt-ConA e esclarecer aspectos importantes sobre sua composição bioquímica e sua imunogenicidade. Adicionalmente, pesquisas deverão ser direcionadas para detectar outros possíveis componentes alergênicos de *B.*

*tropicalis* e também avaliar o papel dos componentes alergênicos de Bt-ConA como potenciais antígenos em estudos de exposição e sensibilização alérgica.

## 6. CONCLUSÕES

1. Componentes ligantes de Concanavalina-A contendo resíduos de manose isolados de *Blomia tropicalis* constituem alérgenos principais deste ácaro e estão envolvidos tanto na sensibilização alérgica (resposta de IgE) quanto na manutenção da homeostase (resposta de IgG1 e, em menor extensão, de IgG4).
2. Anticorpos IgE e IgG1 parecem reconhecer mais epítomos glicosilados contendo resíduos de manose em componentes antigênicos de *B. tropicalis* que anticorpos IgG4.
3. Níveis de IgG4 e, especialmente, IgG1 contra ambos extratos (Bt total e Bt-ConA) foram detectados tanto em pacientes atópicos como em indivíduos não atópicos, indicando que estes indivíduos estavam expostos a repetidos estímulos antigênicos por alérgenos de *B. tropicalis*.
4. Ensaio de inibição competitiva em ELISAs para detecção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 a ambos extratos (Bt total e Bt-ConA) revelaram alta inibição homóloga, mas também uma significativa reatividade cruzada com o extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*, particularmente para subclasses de IgG.
5. Ensaio de *immunoblotting* identificaram dez componentes protéicos (14 a 152kDa) do extrato Bt total que foram reconhecido por anticorpos IgE e



IgG4 em soros de pacientes atópicos, indicando que o perfil antigênico revelado por IgG4 é comparável ao de IgE.

6. A proteína de 152kDa foi o principal componente alergênico de ambos extratos (Bt total e Bt-ConA) que foi reconhecido pela maioria dos soros do grupo Bt+, demonstrando que os pacientes deste estudo parecem estar sensibilizados a componentes alergênicos de alto peso molecular.
7. A fração Bt-ConA apresentou um perfil de oito componentes protéicos (27 a 152kDa) que foram reconhecidos preferencialmente por anticorpos IgE, mas não IgG4, particularmente aqueles de alto peso molecular (123 e 152kDa), indicando que diferentes epítomos são reconhecidos por diferentes classes de anticorpos e sugerindo que epítomos glicosilados contendo resíduos de manose parecem ser mais alergênicos do que imunogênicos.
8. O reconhecimento preferencial de componentes de alto peso molecular (> 66kDa) dos extratos Bt total e Bt-ConA por anticorpos IgG1 indicam que estes componentes parecem exercer um papel relevante na manutenção da homeostase na exposição alergênica natural.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS <sup>1</sup>

- AALBERSE, R. C.; VAN MILLIGEN, F.; TAN, K Y.; STAPEL, S. O. Allergen-specific IgG4 in atopic disease. **Allergy**, Copenhagen, v. 48, p. 559-569, 1993.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5. ed. Philadelphia, PA, USA: Saunders. p. 432-452, 562p, 2003.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
- AGNES, M.C.; TAN, A.; JORDENS, R. Strongly increased efficiency of altered peptide ligands by mannosilation. **International Immunology**, v. 10, p. 1299, 1998.
- ARLIAN, L. G.; VYSZENSKI-MOBER, D.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Allergenicity of the mite *Blomia tropicalis*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 91, p.1042-1050, 1993.
- ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D. A review of recent immunochemical studies of *Blomia tropicalis* and *Euroglyphus maynei* allergens. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 16, p. 129-140, 1992.
- ARRUDA, L. K.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; NASPITZ, C. K.; MONTEALEGRE, F.; VAILES, L. D.; CHAPMAN, M. D. Identification of *Blomia tropicalis* allergen Blo t 5 by cDNA cloning. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 107, p. 456-457, 1995.
- ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; NASPITZ, C. K. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 21, p. 433-439, 1991.
- ARRUDA, L. K.; VAILES, L. D.; PLATTS-MILLIS, T. A. E.; CHAPMAN, M. D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; MONTEALEGRE, F.; LIN, K-L.; CHUA, K-Y.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 155, p. 343-350, 1997.
- BAGGIO, D.; AMBROZIO, J. L. C.; ANTILA, M. Ácaros ambientais e as manifestações alérgicas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 12, p. 56-58, 1989.
- BALDO BA, UHLENBRUCK G. Selective isolation of allergens. I. Reaction of house dust mite extracts with tridacnin and concanavalin A and examination of the allergenicity of the isolated components. **Clinical Allergy**, Oxford, v. 7, p. 429-443, 1977.
- BEASLEY, R. The burden of asthma with specific reference to the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 109, S482-489, 2002.
- BECKER, J.W.; REEKE, G.N.; WANG-Jr, J.L.; CUNNINGHAM, B.A.; EDESMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, p. 1513-1524, 1975.
- BELKALD, Y.; PICCIRILLO, C.A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E.M.; SACKS, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, London, v. 420, p. 502-507, 2002.

<sup>1</sup>SILVA, M. A.; PINHEIRO, M. S. F.; FREITAS, N. E. **Guia para normatização de trabalhos técnicos-científicos**: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses. 2.ed. Uberlândia, EDUFU, 159p. 2002.

- BENJAMINI, E.; LESKOWITZ, S. Immunogens and antigens. In: **Immunology a short course**. New York: Alan R. Liss, p. 31-42, 1998.
- BERGER, W.E. Overview of allergic rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v. 90 (suppl. 3), p. 7-12, 2003.
- BERNSTEIN, I. L.; STORMS, W. W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v. 75, n. 6 Pt 2, p. 543-625, 1995.
- BOGDANOV, A. Deux àcaréens, trouvés par M. Schyremetewsky sur l'homme. **Bull. Soc. Imp. Nat.** Moscou, v. 37, p. 341-345, 1864.
- BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.F.; MALLING, H. J. Imunoterapia com alérgenos: vacinas terapêuticas para doenças alérgicas. **Revista Brasileira Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 23, p. 05-38, 2000.
- BROOKS, S.A.; LEATHEM, A.J. Prediction of lymphonode involvement in breast cancer by detection of altered glycosylation in the primary tumour. **Lancet**, London, v. 338, p.71-74, 1991.
- CARABALLO, L.; AVJIOGLO, A.; MARRUGO, J.; PUERTA, L.; MARSH, D. Cloning and expression of complementary DNA coding for na allergen with common antibody-binding specificities with three allergens of house dust mite *Blomia tropicalis*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 98, p.573-579, 1996.
- CARABALLO, L.; MERCADO, D.; JIMÉNEZ, S.; MORENO, L.; PUERTA, L.; CHUA K.Y. Analysis of the cross-reactivity between BtM and Der p 5, two group 5 recombinant allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 117, p. 38-45, 1998.
- CARABALLO, L.; PUERTA, L.; JIMÉNEZ, S.; MARTINEZ, B.; MERCADO, B.; AVJIOGLO, A.; MARSH, D. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 112, p. 341-347, 1997.
- CARABALLO, L.; PUERTA, L.; MARTINEZ, B.; MORENO, L. Identification of allergens from *Blomia tropicalis*. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 24, p. 1056-1060, 1994.
- CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratório**. EDUFU, Uberlândia, 55p., 1997.
- COCHRANE, G. M.; REES, P. J. **Atlas Colorido da Asma**. Barcelona: Mosby/Doyma Libros, v.1, 40p., 1995.
- COLLOFF, M. J. Taxonomy and identification of dust mites. **Allergy**, Copenhagen, v.53, p. 7-12, Supplement 48, 1998.
- COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, London ,v. 402, p. 18-23, 1999.
- CROMWELL, O. Biochemistry of allergens. In: KAY, A.B. **Allergy and allergic diseases**, Oxford: Blackwell Science Ltd., v.2, p. 797-810, 1997.
- CUMMINGS R. D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. In: GABIUS, H.J. & GABIUS, S. **Glyco-sciences, status and perspectives**. Chapman & Hall GmbH, p. 191-1136, capítulo 10, 1997.
- CUNNINGHAM, B.A.; WANG, J.L.; WAXDAL, M.J.; EDELMAN, G.M. The covalent and tree-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F3. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, p. 1503-1512, 1975.

DREBORG, S. 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**, Copenhagen, v. 44, s. 10, p. 1-59, 1989.

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

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

FOTO *Blomia tropicalis*. Disponível em: <<http://82.198.66.21/JTFd/index-57html>>. Acesso em: 03 out. 2005.

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

GALVÃO, C.E.S.; KALIL, J.; CASTRO, F.F.M. Sensibilização a aeroalérgenos em dois grupos escolares nas zonas rural e urbana de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 25, n. 1, 2002.

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**, Rio de Janeiro, v.153, n. 4, p.174-175, 1993.

GENNARI-CARDOSO, M.L. **Paracoccina: lectina de *Paracoccidioides brasiliensis*, ligante de N-acetil-glicosamina interage com componentes de matriz extracelular**. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1998.

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

GOLDSTEIN, I. J.; HUGES, R. C.; MOSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, London v. 285, p. 256-258, 1980.

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

GOMEZ, B.L.; FIGUEROA, J.I.; HAMILTON, A.J.; DIEZ, S.; ROJAS, M.; TOBON, A.; RESTREPO, A.; HAY, R.J. Detection of the 70kDa *Histoplasma capsulatum* antigen in histoplasmosis patients: correlation between antigenemia and therapy follow-up. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 3, p. 675-680, 1999.

GOUNNI, A. S.; LAMKHLOUED, B.; OCHIAI, K.; TANAKA, Y.; LAPORTE, E.; CAPRON, A.; KINET, J. P.; CAPRON, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. **Nature**, London, v. 367, n. 6459, p.183-186, 1994.

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

HAMILTON, R. G.; ADKINSON, N.F.J. Measurement of total serum immunoglobulin E and allergen-specific immunoglobulin E antibody. In: ROSE, N.R.; MACARIO, E.C.; FAHEY, J.L.; FRIEDMAN, H.; PENN, G.M. **Manual of Clinical Laboratory Immunology**, 4 ed., Washington: American Society for Microbiology, p. 689-701, 986p, 1992.

HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C.F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**, New York, v. 11, p. 4910-4919, 1972.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidades@>>. Acesso em: 12 jun. 2005.

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

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

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

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

KEARSE, K.P.; SINGER, A. Isolation of immature and mature T cell receptor complexes by lectin affinity chromatograph. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 167, p. 75-81, 1994.

KING, T. P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 25, p. 27-37, 1995.

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

LICHTENSTEIN, L.; ISHIZAKA, K.; NORMAN, P.; SOBOTKA, A.; HILL, B. IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and results of immunology the results of immunotherapy. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 52, p. 472-482, 1973.

LIERL, M. B. Allergy of upper respiratory tract. In: LAWLOR Jr., G. J.; FISCHER, T. J.; ADELMAN, D. C. **Manual of Allergy and Immunology**, 3 rd. ed. Boston: Little, Brown and Company, p. 94-102, 590p., 1995.

LLOYD, K.O.; BITTON, M.A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 107, p. 663-671, 1971.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.55, p. 35-67, 1986.

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

LUCZYNSKA, C. M.; ARRUDA, L. K.; PLATTS-MILLIS T. A. E.; MILLER, J. D.; LOPEZ, M.; CHAPMAN, M. D. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, Der p I and Der f I. **Journal Immunological Methods**, v. 118, p. 278-235, 1989.

MALLING, H-J. Methods of skin testing. **Allergy**, Copenhagen, v. 48, p. 55-56, 1993.

MANNINO, H. J. Reproducibility of skin sensitivity using a quantitative skin prick test. **Allergy**, Copenhagen, v. 40, p.100-404, 1998.

MARONE, G. Asthma: recent advances. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 5-9, 1998.

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

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

McHUGH; R.S.; SHEVACH, E.M. The role of suppressor T cells in regulations of immune responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 110, n. 5, p. 693-702, 2002.

MEDEIROS JR., M.; TAKETOMI, E.A.; SILVA, D. A. O.; TERRA, A. S.; FIGUEIREDO, J. P.; ALMEIDA, M. C.; AMORIM, W. W.; PINHO, R. S.; ARAÚJO, M. I.; CARVALHO, E. M. Association between mite allergen (Der p I, Der f I, Blo t 5) levels and microscopic identification on skin prick test among asthmatic subjects. **International Archives of Allergy and Immunology**, 2002.

METZGER, W.J.; BUTLER, J.E. SWABSON, P.; REIDERES, E.; RICHERDSON, H.B. Amplification of the enzyme-linked immunosorbent assay for measuring allergens-specific IgE and IgG antibodies. **Clinical Allergy**, Oxford, v. 11, p. 523, 1981.

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

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

NIEMEIJER, N.R.; GOEDEWAAGEN, B; KAUFFMAN, H.F.; MONCHY, J.G.R. Optimization of skin testing. **Allergy**, Copenhagen, v. 48, p. 491-497, 1993.

NORMAN, P.S.; Allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 75, n. 5, p. 531-542, 1985.

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

PAREKH, R.B.; DWEK, R.A; SUTTON,D.J.; FERNANDES, D.J.; LEUNG, A.; STANWORTH, D.; RADEMARCHER, T.W.; MIZOUCHI, T.; TANAGUCHI, T.; MATSUDA, A.K.; TAKEUCHI, F.; NAGONO,Y.; MIYAMOTO, T.; KOBATA,A. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of serum IgG. **Nature**, London, v. 316, p. 452-457, 1985.

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

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

PICCIRILLO, C.A.; LETTERIO, J.J.; THORNTON, A.M.; McHUGH, R.S.; MAMURA, M.; MIZUHARA, H.; SHEVACH, E.M. CD24+CD25+ regulatory T cells mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor  $\gamma$ 1 production and responsiveness. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 2, p. 237-245, 2002.

PIPKORN, U.; HAMMARLUND, A.; ENERBACK, L. Prolonged treatment with topical corticosteroids results in an inhibition of the allergen-induced wheal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 19-25, 1989.

PITZURRA, L.; VECCHIARELLI, A.; PEDUCCI, R.; CARDINALI, A.; BISTONI, F. Identification of a 105kDa *Cryptococcus neoforms* mannoprotein involved in human cell-mediated immune response. **Journal of Medicine and Veterinary Mycology**, v.35, n.4, p.299-303, 1997.

PLATTS-MILLS, T. A. E. Estimation of allergen concentration in indoor environments? Prediction of health-related effects. In: GAMMAGE, R.B.; BERVEN, B.A. (Ed). **Indoor air and human health**, 2 ed, Boca Raton CRC Press, p. 197-210, 1996.

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

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

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

PLATTS-MILLS, T.A.E.; SOLOMON, W.R. Aerobiology and inhalant allergens. In: MIDDLETON, E. et al. **Allergy: principles and practice**, St. Louis, USA: Mosby-Year Book, p. 469-528, 1993.

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

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. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 89, n. 5, p.1046-1060, 1992.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R.; RODRIGUES, E.G.; CARMONA, A.K.; OLIVEIRA, M.C.; JULIANO, L. Purification of the specific exocellular antigen gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological and proteolytic activities, In: MARESKA, B.; KOBAYASHI, G.S. (ed.) **Molecular biology of pathogenic fungi: a laboratorial manual**. New York: Telos Press, p. 507-515. 1994.

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

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

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

RAMOS, J.D.A.; TEO, A.S.M.; OU, K.L.; TSAI, L.C.; LEE, B.W.; CHEONG, N.; CHUA, K.Y. Comparative allergenicity studies of native and recombinant *Blomia tropicalis* Paramyosin (Blot 11). **Allergy**, Copenhagen, v. 58, p. 412-419, 2003.

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

RIZZO, M. C.; ARRUDA, L.K.; CHAPMAN, M.D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T.A.E.; NASPITZ, C.K. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. **Annals of Allergy**, Mc Lean, v. 71, n. 2, p. 152-158, 1993.

RULLO, V.E.V.; RIZZO, M.C.; ARRUDA, L.K.; SOLÉ, D.; NASPITZ, C.K. Daycare centers and schools as sources of exposure to mites, cockroach, and endotoxin in the city of São Paulo, Brazil. **Jornal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 110, n. 4, 2002.

SARINHO, E.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; JUST, E.; SOLÉ, D. Ácaros da poeira domiciliar em residências de crianças asmáticas e controles da cidade do Recife – Pernambuco. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v.19, p. 228-230, 1996.

SAVOLAINEN, J. A standardized densitometric immunoblotting analysis of *Candida albicans* protein allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 25, p. 357-363, 1995.

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

SEARS, M.R.; HERVISON, G.P.; HOLDAWAY, M.D. The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite, and cat dander in the development of childhood asthma. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 19, p. 419-424, 1989.

SELTZER, J. Biological contaminants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v.94, p.318-326, 1994.

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**, Arlington, v. 86, n. 5, p. 545-550, 2001.

SIRAGANIAN, R. P. Allergic diseases. In: ROSE, N.R.; MACARIO, E.C.; FAHEY, J.L.; FRIEDMAN, H.; PENN, G.M. **Manual of Clinical Laboratory Immunology**, 4 ed. Washington: American Society for Microbiology, p. 689-701, 986p., 1992.

SLOTT, R. I.; ZWEIMAN, B. A Controlled study of the effect of corticosteroids on immediate skin test reactivity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 54, n. 4, p. 229-235, 1974.

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

SMITH, J. M.; DISNEY, M. E.; WILLIAMS, J. D. Clinical significance of skin reactions to mite extracts in children with asthma. **British Medical Journal**, Edinburgh, v. 1, p. 723-726, 1969.

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 exposure and allergic symptoms. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York, v. 86, p. 102-109, 1998.

SOUZA, M.A. **Lectina KM de *artocarpus integrifolia* induz produção de interleucina e proteção contra a infecção por *Leishmania major***. Ribeirão Preto, SP, p.123. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1998.

SPORIK, R.; HOLGATE, S. T.; PLATTS-MILLS, T, A, E.; COGSWELL, J. J. Exposure to house-dust mite allergen (Der p1) and the development to asthma in childhood. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 323, n. 8, p. 502-507, 1990.

SQUILLACE, S. P.; SPORIK, R. B.; RAKES, G.; COUTURE, N.; LAWRENCE, A.; MERRIAM, S.; ZHANG, J.; PLANTTS-MILLS, T. A. E. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 156, p. 1760-1764, 1997.



STAR, M.; WEINSTOCK, M. Studies in pollen allergy. The relation between blocking antibody levels, and symp-tomatic relief following hyposensitization with allpyral in hay fever subjects. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 38, p. 514-521, 1970.

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

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

TERR, A. I. Mechanisms of hypersensitivity. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Medical Immunology**. 9.ed. Stamford: Appleton & Lange, p.376-388, 900p, 1997a.

TERR, A. I. The atopic diseases. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Medical Immunology**. 9.ed. Stamford: Appleton & Lange, p.389-408, 900p., 1997b.

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

TSAl, J-J.; WU, H. H.; SHEN, H-D.; HSU, E-L.; WANG, S-R.; Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 115, p. 144-149, 1998.

TUNNICLIFFE, W. S.; FLETCHER, T. J.; HAMMOND, K.; ROBERTS, K.; CUSTOVIC, A.; SIMPSON, A.; WOODCOCK, A.; AYRES, J. G. Sensitivity and exposure to indoor allergens in adults with differing asthma severity. **The European Respiratory Journal**, Copenhagen, v.13, n. 3, p. 654-659, 1999.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. Disponível em <[www.sbbd.sbe2005.ufu.br/uberlandia.aspx#clima](http://www.sbbd.sbe2005.ufu.br/uberlandia.aspx#clima)>. Acesso em: 03 out. 2005.

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

VERMA, J.; PASHA, S.; GANGAL, S.V. Purification and characterization of Fus sl<sub>3596</sub>, a 65kDa allergen of *Fusarium solani*. **Mol Cell. Biochem.**, v. 131, p. 157-166, 1994.

VOHLONEN, I.; TERHO, E. O.; KOIVIKKO, A.; VANTO, T.; HOLMEN, A.; HEINONEN, O. P. Reproducibility of the skin prick test. **Allergy**, Copenhagen, v. 44, p. 525-531, 1989.

VOORHOST, R. Perfection of skin testing technique. **Allergy**, Copenhagen, v. 35, p. 247, 1980. In: MOTTA, A.A.; KALIL, J.; BARROS, M.T. Testes cutâneos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 73-83, 2005.

WANG, B.; RIEGER, A.; KILGUS, O.; OCHIAI, K.; MAURER, D.; FODINGER, D.; KINET, J. P.; STINGL, G. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeris IgE via FcεR1. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 175, p. 1353-1365, 1992.

WEINER, H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune disiaes. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 18, n. 7, p. 335-343, 1997.

WOOLCOCK, A. J. The busben of asthma. **American Concrete Institute Supplement**, Michigan, v. 1, p. 53-56, 2000.

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

WU-HSIEH, B.A.; CHEN, W.; LEE, H.J. Nitric oxide synthase expression in macrophages of *Histoplasma capsulatum* – infected mice is associated with splenocyte apoptosis and unresponsiveness. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5520-5526, 1998.

YANG, L.; CHEONG, N.; WANG, D.Y.; LEE, B.W.; KUO, I.C.; HUANG, C.H.; CHUA, K.Y. Generation of monoclonal antibodies against Blo t 3 using DNA immunization with in vivo electroporation. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford v. 33, p. 663-668, 2003.

**ANEXOS****Anexo 1****Universidade Federal de Uberlândia****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
CEP -38400-089 ☎(034) 239 4131 - 235-2078

**PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA N.º 46/2000**

**PROJETO DE PESQUISA:** *“Identificação das frações alergênicas e avaliação da resposta imune humoral a Blomia tropicalis entre pacientes atópicos”.*

**DEPARTAMENTO:** Laboratório de Imunologia

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

**MÉRITO:** Noventa pacientes portadores de asma e/ou rinite alérgica serão selecionados junto ao ambulatório de alergia do hospital de clínicas da UFU e submetidos a teste cutâneo de hipersensibilidade imediata, pela técnica de punctura, com extrato brutus Dermatophagoides pteronyssinus, dermatophagoides farinae e Blomia tropicalis

**PARECER:** Somos de parecer favorável à sua execução.

Uberlândia 08 de Novembro de 2000.

  
Prof. Humberto Eustáquio Coelho  
CEP/ UFU

## Anexo 2



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 (034) 239-4131

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 099/04

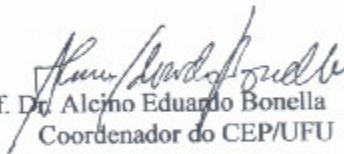
Registro CEP: 46/2000

Projeto Pesquisa: *"Identificação de frações alergênicas e avaliação da resposta imune humoral a Blomia Tropicalis"*.

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

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

Uberlândia, 10 de maio de 2004.

  
 Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella  
 Coordenador 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 requeriram 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.c). 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 3**

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu, \_\_\_\_\_, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado **“Identificação das frações alergênicas e avaliação da resposta imune humoral a ácaros da poeira domiciliar”**, cujo principal objetivo é fracionar proteínas alergênicas e avaliar suas reações com os anticorpos de indivíduos alérgicos.

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

- Necessidade de coleta de sangue para dosagem de anticorpos específicos a aeroalérgenos.
- Realização de exames complementares tais como teste cutâneo com alérgenos inaláveis.

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

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

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_.

---

TESTEMUNHA

---

ASSINATURA

**Anexo 4**

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

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

Grau de escolaridade: ( ) Primeiro grau ( ) Segundo grau ( ) Faculdade

Nível sócio-econômico (renda familiar):

- ( ) até 1 salário mínimo ( ) de 5 a 10 salários mínimos  
 ( ) de 1 a 2 salários mínimos ( ) mais de 10 salários mínimos  
 ( ) de 2 a 5 salários mínimos

**Questionário 1 (Módulo Asma)**

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

( ) Sim ( ) Não

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

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

( ) Sim ( ) Não

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

- Nenhuma crise ( )  
 1 a 3 crises ( )  
 4 a 12 crises ( )  
 mais de 12 crises ( )

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

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

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

( ) Sim ( ) Não

6) Alguma vez na vida você teve asma?

( ) Sim ( ) Não

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

( ) Sim ( ) Não

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

### Questionário 2 (Módulo Rinite)

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

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

### Questionário 3 (Módulo Eczema)

- 1) Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses?  
 Sim       Não  
Se você respondeu não, passe para a questão número 6
- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve essas manchas na pele (eczema)?  
 Sim       Não

- 3) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?  
 Sim       Não
- 4) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) desapareceram completamente nos últimos doze meses?  
 Sim       Não
- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa dessa coceira na pele?
- |                                   |                          |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Nunca nos últimos 12 (doze) meses | <input type="checkbox"/> |
| Menos de uma noite por semana     | <input type="checkbox"/> |
| Uma ou mais noites por semana     | <input type="checkbox"/> |
- 6) Alguma vez na vida você teve eczema?  
 Sim       Não



## Teste Alérgico de Punctura

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Antígeno	Pápula	Eritema
Der p (2)		
Der f (4)		
Blo t (6)		
Cão (3)		
Gato (5)		

Antígeno	Pápula	Eritema
<i>Periplaneta sp.</i> (8)		
<i>B. germanica</i> (7)		
<i>A. alternata</i> (9)		
Controle (1)		
Histamina (10)		

Valores de Referência:

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

**NEGATIVO:** diâmetros ortogonais menores do que 3mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.