



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

Desenvolvimento de biossensor para detecção rápida de anticorpos
específicos para alérgenos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e
Dermatophagoides sp

BIANCA ULIANA PICOLO

Orientador: Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Prof. Dr. Luciano Pereira Rodrigues

Uberlândia – MG
2016



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

Desenvolvimento de biossensor para detecção rápida de anticorpos
específicos para alérgenos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e
Dermatophagoides sp

BIANCA ULIANA PICOLO

Orientador: Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Prof. Dr. Luciano Pereira Rodrigues

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

Uberlândia – MG
2016

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

P598d Picolo, Bianca Uliana, 1992
2017 Desenvolvimento de biossensor para detecção rápida de anticorpos
 específicos para alérgenos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e
 Dermatophagoides sp / Bianca Uliana Picolo. - 2017.
 52 p. : il.

Orientador: Jair Pereira da Cunha Junior.

Coorientador: Ernesto Akio Taketomi.

Coorientador: Luciano Pereira Rodrigues.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Alergia - Teses. 3. Biossensores - Teses. 4.
Ácaro - Teses. I. Cunha Junior, Jair Pereira da, 1974-. II. Taketomi,
Ernesto Akio. III. Rodrigues, Luciano Pereira, 1976-. IV. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. V. Título.

CDU: 577.1



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

Desenvolvimento de biossensor para detecção rápida de anticorpos específicos para alérgenos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides sp*

BIANCA ULIANA PICOLO

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior

Examinadores: **Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza** (Universidade Federal de Goiás)
Dra. Renata Pereira Alves Balvedi (Universidade Federal de Uberlândia)

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

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

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior

*À minha mãe, **Silvana**, minha maior
incentivadora e pessoa fundamental em
minha vida, a quem tenho o mais sincero
sentimento de gratidão por todo amor e
apoio incondicional.*

*“ Tudo tem seu apogeu e seu declínio.
É natural que seja assim, todavia, quando
tudo parece convergir para o que
supomos o nada, eis que a vida ressurgue,
triunfante e bela. Novas folhas, novas
flores, na infinita benção do recomeço! ”*

Chico Xavier

Agradecimentos

À Deus, pela oportunidade que me foi dada em completar mais essa fase da minha vida, por sempre me dar força em seguir adiante e abençoar meu caminho.

Aos meus pais, Silvana e Izael, que me deram não somente a vida, mas toda a base dos meus princípios e que sempre me apoiaram no decorrer da vida e acreditaram em mim. O amor de vocês foi fundamental.

Ao meu orientador, Jair Pereira da Cunha Junior, pela oportunidade de realização deste trabalho, por meu amadurecimento profissional, por toda a orientação e ensinamentos transmitidos que transcenderam a área acadêmica, por acreditar no meu potencial e, principalmente, pela boa convivência durante esse período de trabalho.

Ao professor Dr. Ernesto Akio Taketomi, por todas as oportunidades oferecidas que sem dúvidas me proporcionaram um grande crescimento pessoal e profissional e, pelo bom convívio durante esse tempo de trabalho.

À Dra. Ana Claudia Pajuaba, por toda dedicação e colaboração nos experimentos e pelos momentos partilhados que foram de grande importância para essa etapa de minha vida.

Aos meus colegas e amigos que passaram e os que ainda fazem parte do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica: Greice Japolla, Guilherme Nunes, Hellen Dayane, Isabella Vilas Boas, Jade Leão, Juliana Miranda, Karine Canuto, Lucas Perina, Paula Fernandes, Vinicius Oliveira pelos bons momentos vividos, amizade e disponibilidade em ajudar no que fosse preciso.

Aos técnicos de laboratório Marley, Zilda e Max, pelos serviços prestados, atenção e auxílio de grande valia.

Aos meus colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, em especial ao Allisson Justino, Mariana Zóia e Vinicius Rodovalho pelo carinho, pelas conversas, auxílio nos momentos de dificuldades e pela amizade tão valiosa.

A todos meus amigos fora do âmbito acadêmico, em especial, Daniella Cristina Borges e Malba Tormin, que me acompanharam durante essa jornada com conselhos, opiniões, risadas e carinho. Com certeza a caminhada seria mais dura sem a presença de vocês.

Aos Prof. Dr. Luciano Pereira Rodrigues e Prof^a. Dra. Renata Pereira Alves Balvedi por toda a ajuda e disponibilidade para a realização desse trabalho, por todo conhecimento transmitido e por toda atenção e paciência tida a mim.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, pela grande contribuição e parceria neste trabalho e pela disponibilidade de sempre ajudar no que fosse preciso.

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

A todos mestres e professores que me deixaram um pouco de si, sendo fundamentais para meu crescimento acadêmico e profissional.

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

A todos os voluntários por terem aceitado participar desse estudo.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma em minha caminhada até o momento.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
Apresentação	01
CAPITULO I – Fundamentação teórica	03
1. Alergia e Doenças Alérgicas	04
2. Resposta imune alérgica e fisiopatologia da alergia.....	06
3. Nomenclatura dos alérgenos.....	10
4. Ácaros da poeira domiciliar	11
5. <i>Blomia tropicalis</i>	13
6. Biossensores.....	14
7. Imunoterapia e diagnóstico de doenças alérgicas.....	16
Referências	19
CAPÍTULO II - Desenvolvimento de biossensor para detecção rápida de anticorpos específicos para alérgenos derivados dos ácaros <i>Blomia tropicalis</i> e <i>Dermatophagoides sp</i>	25
Resumo.....	27
<i>Abstract</i>	28
1. Introdução.....	29
2. Materiais e Métodos.....	31
3. Resultados e Discussão.....	38
4. Conclusão.....	50
Referências.....	51

Lista de Figuras

Capítulo I – Fundamentação teórica

Figura 1.	Processo da resposta imune alérgica.....	07
Figura 2.	Taxonomia dos principais ácaros da poeira domiciliar.....	12
Figura 3.	Esquema representativo da estruturação de um biossensor.....	15

Capítulo II – Desenvolvimento de biossensor para detecção rápida de anticorpos específicos para alérgenos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides sp*

Figura 1	Esquema representativo da construção de um biossensor.....	37
Figura 2	Produção de rBlo t 5 e extrato total de <i>B. tropicalis</i> e reatividade com anticorpos IgE.....	39
Figura 3	Caracterização morfológica de biossensores utilizados para detecção de extratos alergênicos.....	41
Figura 4	Detecção de rBlo t 5 em sistema de captura magnética.....	45
Figura 5	Caracterização morfológica de biossensores utilizados para detecção de rBlo t 5 utilizando beads magnéticas.....	46
Figura 6	Desenvolvimento de um biossensor capaz de detectar múltiplos alérgenos.....	47

Lista de tabelas

Capítulo I – Fundamentação teórica

Tabela 1.	Propriedades moleculares e reatividade à IgE dos alérgenos de <i>Blomia tropicalis</i>	14
------------------	--	----

Lista de abreviaturas

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
A	Ampere
ABTS	<i>2,2'-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i> (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzoatizolino-6 sulfônico)
AFM	<i>Atomic force microscope</i> (Microscopia de Força Atômica)
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> (Célula Apresentadora de Antígeno)
BBS	<i>Borate Buffered Saline</i> (Solução salina tamponada com borato)
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (Ácido Bicinconínico)
Bet v 1	Alérgeno de <i>Betula verrucosa</i> 1
Blo t 5	Antígeno de <i>Blomia tropicalis</i> do grupo 5
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina do Soro Bovina)
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
C	Coulomb
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DC	Células Dendríticas
Der p 1	Alérgeno de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
D.O.	Densidade Óptica
Dpt	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DRP-110STR	Eletrodo de grafite <i>screen-printed</i> modificado com estreptavidina
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
EAACI	<i>European Academy of Allergology and Clinical Immunology</i> (Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE

FcεRII	Receptor de baixa afinidade para IgE
Fel d 1	Alérgeno de gato
Ferro-ferri	Ferrocianeto/ferricianeto de potássio
g	Gramas
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
HCl	Ácido clorídrico
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (Molécula de adesão intercelular 1)
IE	Índice ELISA
IFN-γ	Interferon-gamma
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da classe G subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina da classe G subclasse 4
IL	Interleucina
Ip	Corrente de pico
IPTG	Adição isopropil-d-tiogalactopiranosídeo
ISAC	<i>Immuno Solid Phase Allergen Chip</i>
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i> (Estudo Internacional da Asma e Alergias na Infância)
IUIS	<i>International Union of Immunology Societies</i> (União Internacional das Sociedades de Imunologia)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
kDa	<i>KiloDalton</i> (Quilodalton)
LB	<i>Luria-Bertani</i>
M	Molar
mC	milicoulomb
mDC	Células dendríticas mielóides
mg	Miligramas

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
ng	Nanogramas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> (Solução salina tamponada com fosfatos)
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e Albumina do Soro Bovina (BSA)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
QeO	Carga elétrica de oxidação
rBlo t 5	Proteína recombinante Blo t 5
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio)
SIT	<i>Allergen-specific Immunotherapy</i> (Imunoterapia específica com alérgenos)
TCP	Teste Cutâneo de Puntura
TCR	<i>T cell receptor</i> (Receptor de células T)
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Fator de Transformação do Crescimento beta)
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
Treg	Linfócito T regulador
TSLP	Linfoietina Estromal Tímica
Tween 20	<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i> (Monolaurato de Polioxietileno Sorbitano)
V	Volts
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial

UFU

Universidade Federal de Uberlândia

APRESENTAÇÃO

Alergia: o mal do século. Esse termo, muito utilizado pela mídia, retrata o aumento exponencial das doenças alérgicas no mundo nos últimos anos, sendo esta considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma das quatro doenças crônicas mais comuns. Esse aumento é devido, principalmente, às mudanças de hábitos da rotina da vida moderna, à higiene pública e poluentes ambientais.

A alergia é uma reação exacerbada do sistema imunológico, quando o indivíduo geneticamente predisposto, entra em contato com alérgenos. Assim, os indivíduos são denominados atópicos ao produzirem altos níveis de anticorpos IgE sob baixas doses repetitivas de estímulos alergênicos.

As doenças alérgicas respiratórias mais comuns são a rinite alérgica e asma alérgica. Ambas são reações de hipersensibilidade do tipo I e têm alta prevalência, principalmente em países industrializados. Estas doenças são consideradas um problema de saúde pública e afetam negativamente a qualidade de vida dos pacientes.

Os ácaros são os principais responsáveis pelo desenvolvimento das doenças alérgicas respiratórias. Eles são encontrados em diferentes regiões climáticas e podem estar presentes na poeira domiciliar. Atualmente, os ácaros mais estudados são do gênero *Dermatophagoides* e *Blomia*, pois esses possuem alérgenos clinicamente relevantes para o desenvolvimento de doenças alérgicas.

O diagnóstico para a alergia pode ser feito por testes cutâneos ou por mensuração dos níveis séricos de IgE específica. O grande problema é que além de dispendiosos, em muitas das vezes o resultado pode ser demorado.

Os biossensores eletroquímicos têm despertado bastante interesse científico, devido serem de simples manuseio, terem baixo custo, resposta rápida e, principalmente, bastante sensíveis, específicos e seletivos. Esses biossensores apresentam capacidade de detecção imediata em sistemas biológicos, tanto na análise clínica quanto em análise biomédica.

Dessa maneira, visando o aprimoramento das formas de diagnóstico e consequente melhoria do tratamento de doenças alérgicas, esse trabalho teve como objetivo a utilização de biossensores eletroquímicos para a detecção dos níveis de IgE alérgeno-específico, para antígenos dos ácaros de *Blomia tropicalis*,

Dermatophagoides farinae e *Dermatophagoides pteronyssinus*. Para isso, foi utilizado um anticorpo anti-IgE biotinizado em um biossensor com a superfície de grafite modificada com estreptavidina para o reconhecimento de IgE alérgico específico presente em soros de indivíduos alérgicos. Além disso, foi desenvolvido um sistema com múltiplos alérgenos, com a adição progressiva de diferentes alérgenos, em um mesmo biossensor.

Assim, para melhor elucidação desse estudo, essa dissertação está dividida em dois capítulos, sendo o Capítulo I a fundamentação teórica que tem como objetivo expor a base conceitual dessa pesquisa e o Capítulo II que tem como finalidade expor de maneira mais detalhada como a utilização dos imunossensores eletroquímicos podem ser uma alternativa futura para diagnóstico de doenças alérgicas.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

1. Alergia e doenças alérgicas

Apesar de ser uma doença muito antiga, o termo “alergia” só passou a ser usado a partir de 1906 com os pesquisadores austríacos Clemens Von Pirquet e Béla Schick, para designar uma manifestação clínica. A origem da palavra “alergia” é grega e deriva das palavras *allos* (estranho) e *ergon* (trabalho, reação), o que significa “atividade de um corpo estranho”. Assim, o termo alergia ou hipersensibilidade imediata é utilizado para designar uma resposta imune exacerbada com ocorrência de sintomas ou sinais reprodutíveis em indivíduos geneticamente predispostos, quando expostos a determinados estímulos antigênicos (alérgenos) e cofatores ambientais que levam à sensibilização alérgica, em doses toleradas por indivíduos não alérgicos (JOHANSSON et al., 2004; TRIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009; KONRADSEN et al., 2014).

Dessa forma, o desenvolvimento de doenças alérgicas está relacionado à predisposição genética do indivíduo, exposição aos alérgenos e ainda a interação com fatores ambientais que podem amplificar a resposta alérgica inflamatória (D'AMATO et al., 2013). Portanto, na atualidade, existe evidências de que a predisposição genética à alergia envolve múltiplos genes (ARLIAN, 2002).

A exposição aos alérgenos podem ocorrer de diversas fontes, incluindo biomoléculas de natureza protéica, glicídica e mesmo lipídica. Estas biomoléculas são capazes de interagir com anticorpos da classe IgE e desencadear manifestações clínicas da alergia (ARLIAN, 2002; PLATTS MILLS; WOODFOLK, 2011). As principais fontes de alérgenos presentes no ar são biomoléculas derivadas de fungos, grãos de pólen, pêlos e epitélios de animais domésticos, barata e ácaros da poeira domiciliar. A exposição continuada à essas partículas pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas, principalmente respiratórias, como a rinite e asma alérgica (KELLY; ERWIN; PLATTS MILLS, 2012).

Assim, indivíduos que apresentam a predisposição para a biossíntese de altos níveis de anticorpos IgE, quando sensibilizados com baixas doses de alérgenos, são denominados atópicos. Portanto, a atopia é uma tendência de o

indivíduo ser sensibilizado e produzir anticorpos IgE em resposta à exposição para alérgenos (JOHANSSON et al., 2004).

Por outro lado, fatores ambientais podem potencializar respostas alérgicas em indivíduos atópicos. Um exemplo é o ar atmosférico que possui diversas partículas que transportam partículas inorgânicas, como aquelas derivadas do fumo ou queima do diesel que podem estimular e potencializar respostas alérgicas em indivíduos pré-dispostos (KELLY; ERWIN; PLATTS MILLS, 2012).

Doenças alérgicas afetam grande parte da população no mundo. As doenças alérgicas têm aumentado significativamente ao longo dos últimos anos, devido ao aumento da urbanização, mudanças do estilo de vida, higiene pública e poluentes ambientais, principalmente em países industrializados (TRAIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009; LAI et al, 2011; PLATTS-MILLS; COMMINS, 2013).

O microambiente exerce um importante papel no desenvolvimento de doenças alérgicas e, com novos hábitos da vida moderna, aumentou-se a permanência das pessoas em ambientes domésticos, escolares ou ocupacionais, onde aumenta-se a exposição à uma variedade de substâncias imunogênicas que contribuem para o aumento da sensibilização alérgica de indivíduos geneticamente predispostos, aumentando a prevalência de doenças respiratórias, como asma e rinite (PLATTS-MILLS et al., 1997).

Rinite alérgica, asma alérgica e dermatite atópica constituem as principais doenças alérgicas, sendo a última menos frequente. Dermatite atópica tem como principais sintomas o prurido intenso e grave, secura e descamação excessiva da pele. É uma doença inflamatória crônica da pele caracterizada por episódios de eczema agudo alternada com períodos de remissão e, estima-se sua prevalência entre 10 e 15% na população (AUBERT et al., 2013).

As reações de hipersensibilidade do tipo I, como a rinite e asma alérgica, têm prevalência de 5% a 30% em países industrializados (TRAIDL-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009). A rinite é definida como inflamação do revestimento das mucosas nas vias aéreas superiores. Assim, apresenta sintomas como obstrução nasal, espirros, prurido nasal e palatal (JOHANSSON et al., 2004; BEARD, 2014).

Em um diagnóstico para rinite alérgica deve-se considerar outras condições coexistentes, como asma alérgica. A asma é a doença respiratória crônica mais comum em crianças, a qual afeta 30% das crianças e 10% dos adultos no Ocidente e, causa grande impacto na qualidade de vida do indivíduo (JACKSON et al., 2011; FU; TSAI, 2014). Esta apresenta um perfil imunológico semelhante à rinite, diferindo pelos sintomas característicos de obstrução e inflamação das vias aéreas inferiores, como tosse, dispneia, opressão torácica e sibilância (LEMANSKE; BUSSE, 2003; MARTINEZ; VERCELLI, 2013).

2. Resposta imune alérgica e fisiopatologia da alergia

A alergia, ou hipersensibilidade do tipo I, é uma reação imune exacerbada que ocorre quando há exposição do indivíduo à uma substância exógena, que são associadas com a inflamação crônica caracterizada pelo intenso fluxo de eosinófilos e acúmulo de mastócitos nas lesões, bem como o aumento na produção de anticorpos da classe IgE (OBOKI et al., 2008).

Os tipos de células T *helper* (Th) com perfil de citocinas do tipo 1 (Th1) e do tipo 2 (Th2), são caracterizadas com funções antagônicas. O balanço entre Th1 e Th2, com seus diferentes perfis de citocinas, incluindo o desenvolvimento de células T reguladoras, promovem a manutenção da homeostase do sistema imunológico do organismo. Assim, o desequilíbrio dessa regulação entre Th1 e Th2 pode conduzir a uma ativação excessiva de células Th1, podendo resultar no desenvolvimento de doenças autoimunes, ou a predominância de células Th2 poderá induzir o aparecimento de doenças alérgicas (OBOKI et al., 2008).

Células apresentadoras de antígenos (APC) são essenciais para a diferenciação de células T naíve em subpopulações de T helper (Th), através da secreção de citocinas e cofatores. Quando diferenciadas, as células T migram dos tecidos periféricos para os órgãos linfoides secundários, onde produzem citocinas efetoras características de seu perfil (JUTEL; AKDIS, 2011).

Assim, o início do desenvolvimento da alergia se dá pela geração de células T *helper* CD4⁺ alérgeno-específica. As células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos, células B e células dendríticas, reconhecem o alérgeno e, realizam o processamento e a apresentação dos peptídeos resultantes para as

células T CD4⁺ via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Além das moléculas CD4, outras moléculas acessórias associadas ao receptor de células T (TCR), como CD3 e CD45, participam da ativação de células T. Sob influência da interleucina 4 (IL-4), as APCs ativam as células T *naïve* que se diferenciam, principalmente, em células do perfil Th2 (ARLIAN, 2002; JUTEL et al., 2006; OBOKI et al., 2008; KUCUKSEZER et al., 2013).

As células Th2 apresentam como fator de transcrição GATA-3 e, sob expressão desse fator, as células produzem e liberam citocinas, principalmente as interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) (CORRY; KHERADMAND, 1999; AKDIS, 2006; JUTEL; AKDIS, 2011). Estas citocinas são responsáveis por realizar diferentes funções reguladoras e efetoras, como a mudança (*switch*) de classe em células B para a síntese de anticorpos da classe IgE (IL-4 e IL-13), maturação e ativação de eosinófilos (IL-3, IL-5 e GM-CSF) e basófilos (IL-3 e IL-4). Estas últimas células juntamente com os mastócitos são as principais células efetoras produtoras e secretoras de mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia das doenças alérgicas (HOLGATE; POLOSA, 2008; KUCUKSEZER et al., 2013).

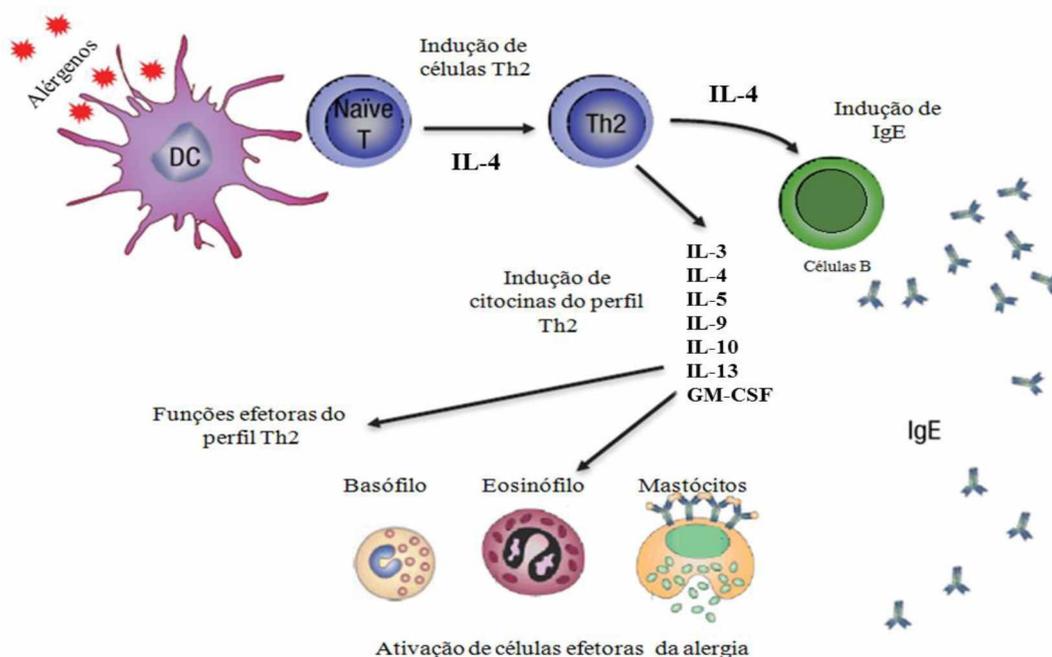


Figura 1. Processo da resposta imune alérgica. Os alérgenos são apresentados por células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas (DC), para células T naïve. A liberação da citocina IL-4 induz a diferenciação das células T naïve em células do perfil Th2, que produzem citocinas específicas para a ativação de células efetoras da alergia, ou relacionadas ao switch de células B para a produção de IgE. Adaptado de KUCUKSEZER, 2013.

Assim, neste cenário imune indivíduos não atópicos apresentam baixos níveis de anticorpos IgE alérgeno-específicos, em contrapartida, indivíduos atópicos possuem altos níveis de IgE sérica alérgeno-específica, produzidos pelas células B, além de mastócitos e eosinófilos com maior número de receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) em suas superfícies (FUJITA et al., 2012).

Dessa forma, a reação alérgica, propriamente dita, inicia-se quando duas ou mais moléculas de IgE presentes nos receptores FcεRI se ligam em um determinado alérgeno, desencadeando uma cascata de sinalizações intracelulares, que promovem a degranulação dos mastócitos e basófilos seguido da liberação de mediadores pró-inflamatórios pré-formados, como histamina, prostaglandinas, leucotrienos, quimiocinas e outras citocinas (KUCUKSEZER et al., 2013; AKDIS; AKDIS, 2015; OZDEMIR et al., 2016). Após a liberação dos mediadores inflamatórios, estes promovem o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema e contração dos músculos lisos, que são responsáveis pela manifestação clínica da fase imediata das reações alérgicas (METZGER; NYCE, 1999; OZDEMIR et al., 2016), sendo estas observadas nos primeiros 30 minutos após o contato com o alérgeno.

Os anticorpos IgE também podem se ligar em FcεRI em células dendríticas e monócitos, assim como nos receptores de baixa afinidade (FcεRII) presentes na superfície das células B. Essa interação permite o reconhecimento e apresentação dos alérgenos pelas APCs e, a liberação de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, pelas células Th2, contribuindo para o desenvolvimento, sobrevivência e recrutamento de linfócitos, eosinófilos, basófilos e mastócitos no sítio de inflamação, particularmente nas fases tardias das reações alérgicas, com evolução para cronicidade (LARCHÉ, 2006).

Além dos mecanismos descritos, a linfopoiética estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33 têm sido reportadas como citocinas envolvidas com a iniciação e desenvolvimento da resposta imune do tipo Th2 (LIAO et al., 2015; VANNELLA et al., 2016) e, com importante papel no desencadeamento da resposta imune alérgica (LICONA-LIMÓN et al., 2013; FARAHANI et al., 2014). A citocina IL-25 é produzida por células epiteliais em resposta à um alérgeno e pode ser considerada um iniciador da resposta alérgica, por induzir a produção de TSLP, eosinófilos e formação de muco (FORT et al., 2001; ANGKASEKWINAI et al., 2007). Em

humanos, TSLP é produzida principalmente por células epiteliais, mastócitos e basófilos, e é capaz de ativar células dendríticas mielóides (mDC). Essas mDC ativadas expressam MHC-II e moléculas acessórias, como OX-40L, responsáveis pela ativação de células T, promovendo a diferenciação de células TCD4⁺ naíve em células do tipo Th2 (HUSTON; LIU, 2006). Assim, a TSLP está diretamente relacionada com doenças alérgicas respiratórias, como asma, devido à indução da resposta do tipo Th2 (YING et al., 2005; WATSON; GAUVREAU, 2014). Além disso, TSLP também pode ser expresso por queratinócitos em pacientes com pele lesionada, devido à dermatite atópica (LIU, 2006).

A citocina IL-33, membro da família de IL-1 e, contribui para a resposta alérgica, por estar diretamente envolvida com a ativação de basófilos. Além disso, é responsável por induzir aumento da expressão de moléculas de adesão, como ICAM-I, e a sobrevida de eosinófilos (CHOW et al., 2010). Em humanos, os níveis de IL-33 presentes no sangue de paciente atópicos aumentam durante o choque anafilático, por ativarem mastócitos que liberam mediadores químicos (PUSHPARAJ et al., 2009).

Apesar de as células Th1 e Th2 terem maior destaque nas respostas imunológicas, nos últimos anos, têm sido caracterizadas novas subpopulações de células T *helper*, como Th9, Th22, Th17 e T reguladoras (Treg) (AKDIS; AKDIS, 2015).

As células Th17 possuem perfil inflamatório, com produção e liberação, predominantemente, de citocinas inflamatórias como IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26 (MANNI; ROBINSON; ALCORN, 2014). Estas células exercem importante papel de proteção contra patógenos extracelulares e participam na inflamação tecidual, além de terem participação na patogênese de doenças autoimunes (OBOKI et al., 2008). A expressão exacerbada de IL-17 pode levar à inflamação das vias respiratórias e aumento da produção de muco, sugerindo uma correlação entre a gravidade da doença e os níveis desta citocina (WANG et al., 2010).

Em contrapartida células T reguladoras (Treg) são uma subpopulação de células T que possuem propriedades reguladoras do sistema imunológico e são caracterizadas pela expressão da molécula CD25, CD127 e do fator de transcrição Foxp3 (JUTEL et al., 2006; MELO; CARVALHO, 2009; RODRIGUEZ-PEREA et al., 2016). São reconhecidas por secretarem as citocinas IL-10 e TGF- β (fator

transformador de crescimento beta), que inibem a resposta Th1, Th2 e Th17, sugerindo que elas exercem um importante papel na inibição e desenvolvimento de doenças alérgicas (AKDIS, 2006).

As células Treg inibem a ativação de células Th2 alérgeno-específicas, diminuindo a produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que são citocinas essenciais durante a fase efetora da reação alérgica, além de inibirem a inflamação alérgica através de ação direta sobre os mastócitos, basófilos e eosinófilos. Assim, a IL-10 produzidas por células Treg podem suprimir células B diminuindo a produção de IgE alérgeno-específica, além do que a IL-10 é responsável pela estimulação de células B para induzir a mudança de isotipo de anticorpo para IgG4 específica aos alérgenos (PALOMARES et al., 2010).

3. Nomenclatura dos alérgenos

A maioria dos alérgenos bem caracterizados são de natureza protéica e pertencem a grupos particulares de proteínas que podem exercer mecanismos imunopatológico similares ou mesmo compartilhar epítomos importantes para indução do processo alérgico. Assim, é de extrema importância a unificação da nomenclatura dos alérgenos já caracterizados. Dessa forma, foi proposto um sistema de nomenclatura para alérgenos, baseada em propostas do Subcomitê da União Internacional das Sociedades de Imunologia (IUIS) (KING et al., 1995). O método para designação da nomenclatura dos alérgenos consiste nas primeiras três letras do gênero do organismo, a primeira letra da espécie e o número arábico, o qual é empregado de acordo com a ordem de descoberta e purificação. O nome do alérgeno não deve ser em itálico e possui um espaço entre cada um dos elementos, por exemplo: Der p 1, Bet v 1, Blo t 5 e Fel d 1 (KING et al., 1995; TRAILD-HOFFMANN; JAKOB; BEHRENDT, 2009).

Além disso, a nomenclatura abrange diferentes formas moleculares do mesmo alérgeno (isoalérgeno ou isoformas). Os isoalérgenos são alérgenos com diferentes formas moleculares que possuem reatividade cruzada para IgE e ainda podem conter propriedade bioquímica semelhantes, funções semelhantes e ainda que tenham alta identidade entre a sequência de aminoácidos, maior que 67%.

Assim, isoalérgenos são distinguidos por números adicionais, por exemplo Bet v 1.01, Bet v 1.31 etc (ARLIAN, 2002; CHAPMAN et al., 2007).

Em contrapartida, o termo isoforma ou variante, refere-se a variantes polimórficas do mesmo alérgeno, ou seja, são aqueles que normalmente possuem 90% de identidade da sequência de aminoácidos. As isoformas são diferenciadas na nomenclatura pela inclusão de dois números, por exemplo Bet v 1.0101 (CHAPMAN et al., 2007).

Para manter a integridade do sistema de nomenclatura, apenas alérgenos com reatividade maior que 5% com IgE são incluídos nesse sistema. Além disso, um alérgeno é considerado como “principal” quando mais de 50% dos indivíduos testados possui reatividade com IgE (LARSEN; LOWERSTEIN, 1996; ARLIAN, 2002).

4. Ácaros da poeira domiciliar

Aeroalérgenos são alérgenos facilmente carregados pelo ar, os quais são pequenos e solúveis, o que permite sua dispersão no muco e outros fluidos corporais, e desempenham um importante papel na patogênese de doenças alérgicas (GALLI; LANTZ, 1999; ASSAREHZADEGAN; SHAKURNIA; AMINI, 2013). Estes estão presentes naturalmente tanto no ambiente extradomiciliar, como em grãos de polens, quanto no ambiente domiciliar, como em epitélio de animais domésticos, fungos, baratas e ácaros da poeira domiciliar (ASSAREHZADEGAN; SHAKURNIA; AMINI, 2013).

Em 1964, Voorhost e colaboradores, demonstraram que os ácaros da poeira domiciliar eram responsáveis por causar doenças alérgicas através da inalação (RAULF et al., 2015). Assim, atualmente os ácaros da poeira domiciliar são reconhecidos como a causa mais comum de doenças alérgicas no mundo (THOMAS; HALES; SMITH, 2010). Os ácaros encontrados na poeira são originados principalmente de colchões, tapetes, móveis estofados, devido às condições oferecidas que favorecem a sobrevivência desses organismos. Além disso, os ácaros da poeira domiciliar podem responder de maneira dependente à algumas condições ambientais, como temperatura e umidade do ar elevada, que favorecem o crescimento e proliferação. As diferenças ambientais determinam as

diferenças geográficas e sazonais na prevalência e concentração de determinadas espécies de ácaros (MUNIR et al., 1995).

Já foi relatada a relação entre os ácaros da poeira domiciliar e doenças como asma e, estima-se que a concentração de alérgeno dos ácaros da poeira domiciliar necessária para a sensibilização alérgica do indivíduo seja de 2 µg/g de poeira, enquanto que para o desencadeamento dos sintomas de asma, a concentração é deve ser maior ou igual a 10 µg/g de poeira (PLATTS-MILLS; De WECK, 1988; PLATTS-MILLS et al., 1997).

Embora acredita-se que a principal fonte de alérgenos dos ácaros da poeira domiciliar seja por exposição à aeroalérgenos, há evidências de que a ingestão oral de ácaros também seja uma das fontes de exposição ao alérgeno (SANCHEZ-BORGES et al., 1997; SANCHEZ-BORGES et al., 2012).

Ácaros da poeira domiciliar foram descritos a partir das famílias Acaridae, Glycophagidae, Chortoglyphidae, Pyroglypidae e Echimyopodidae (Figura 2). Ácaros pertencentes às famílias Pyroglypidae e Echimyopodidae são fontes de alérgenos de maior importância (CHUA et al., 2007). As espécies pertencentes à família Pyroglypidae, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*, têm grande importância devido à potencialidade alérgica intrínseca destas espécies e pela ampla distribuição das mesmas em diferentes regiões climáticas, onde em clima temperado a tropical são encontrados principalmente ácaros da espécie *D. pteronyssinus* e em regiões mais secas são encontrados *D. farinae*. A espécie *Blomia tropicalis* está em maior incidência em climas tropicais, mas podem ser encontrados em clima temperado, prevalecendo sobre *Dermatophagoides sp.*(ARLIAN, 2002; CHUA et al., 2007).

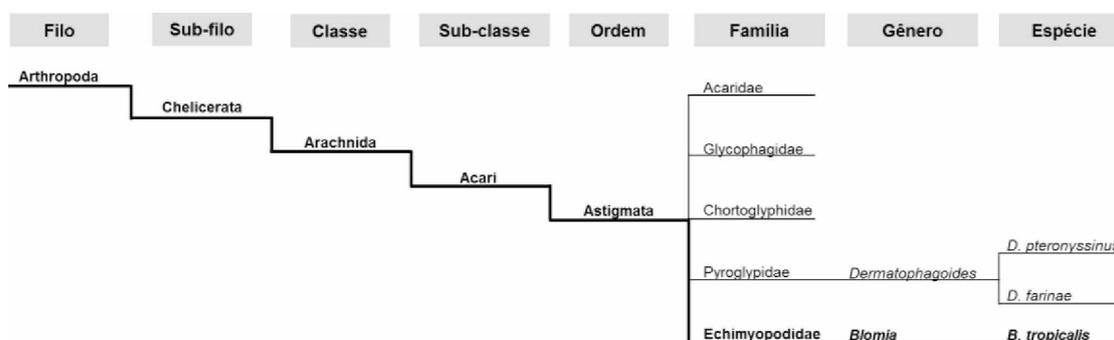


Figura 2. Taxonomia dos principais ácaros da poeira domiciliar. Adaptado de CHUA et al., 2007.

5. *Blomia tropicalis*

Blomia tropicalis é um ácaro pertencente à família Echimypodidae e, apesar de ser comumente encontrado em regiões tropicais e subtropicais, também pode existir em regiões de clima temperado (CARABALLO et al., 1994; JULIÁ-SERDÁ et al., 2012). Esse ácaro foi descrito em 1973 por Van Bronswijk e colaboradores, o qual possui forma globular e tamanho entre 230 e 365 µm. *Blomia sp* é considerado um ácaro de estocagem, entretanto é encontrado altas concentrações desse ácaro na poeira domiciliar de países de clima tropical e subtropical (ARRUDA et al., 1991).

Esse ácaro é reconhecido como importante fonte de alérgenos que exercem forte influência no desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias, como asma e rinite alérgica (ARRUDA et al., 1997; RIZZO, et al., 1996). Em países tropicais a sensibilização com alérgenos de *B. tropicalis* corresponde a aproximadamente 60% a 80% em indivíduos atópicos (LLERENA et al., 1991; FERNANDEZ-CALDAS et al., 1993).

Os principais alérgenos do gênero *Dermatophagoides* os principais alérgenos estão presentes no grupo 1 e 2, enquanto que *Blomia* tem seu principal alérgeno no grupo 5 (CHUA et al., 2007). Assim, muitos alérgenos têm sido reconhecidos em extratos de *Blomia tropicalis*, sendo o mais importante deles a Blo t 5, a qual possui 14 kDa e, aproximadamente 92% dos indivíduos alérgicos são sensibilizados por esse alérgeno (CARVALHO et al., 2013) e, 70% dos pacientes asmáticos possuem reatividade com Blo t 5 (CHUA et al., 2007). O peptídeo sinal de Blo t 5 consiste em 17 resíduos de aminoácidos seguido de uma proteína madura de 117 resíduos de aminoácidos, totalizando, assim, um montante de 134 resíduos de aminoácidos (CHUA et al., 2007).

Os avanços nas técnicas de biologia molecular facilitam a identificação e produção de alérgenos recombinantes, os quais oferecem vantagens por serem moléculas quimicamente definidas e podem ser formuladas de maneira normalizada e reprodutível, sendo de extrema importância para imunoterapia de doenças alérgicas respiratórias (LARCHÉ, 2006), além de serem importantes para análises aprofundadas no âmbito molecular e bioquímico. Já foram identificados e descritos pela literatura pelo menos 21 alérgenos de *Blomia tropicalis*.

Aproximadamente 13 alérgenos recombinantes foram caracterizados molecularmente e imunologicamente e depositados no banco de dados de alérgeno, de acordo com a União Internacional das Sociedades de Imunologia (IUIS), como pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades moleculares e reatividade à IgE dos alérgenos de *Blomia tropicalis*

Alérgenos	Identidade Bioquímica	Isoalérgenos e variantes	Massa molecular (kDa)	Reatividade com IgE
Blo t 1	Cisteína protease	1.0101; 1.0201	39	62-90%
Blo t 2	-	2.0101; 2.0102; 2.0103	14	-
Blo t 3	Tripsina	3.0101	25	50-57%
Blo t 4	Alfa amilase	4.0101	56	<15%
Blo t 5	-	5.0101	14	43-92%
Blo t 6	Quimotripsina	6.0101	25	<10%
Blo t 8	Glutaciona S-transferase	8.0101	27	-
Blo t 10	Tropomiosina	10.0101	33	29%
Blo t 11	Paramiosina	11.0101	110	12-52%
Blo t 12	-	12.0101	14	50%
Blo t 13	Proteína Ligante de Ácido Graxo	13.0101	15	11%
Blo t 19	Peptídeo homólogo antimicrobiano	19.0101	7	3%
Blo t 21	-	21.0101	13	-

Fonte: Subcomitê de Nomenclatura dos alérgenos (IUIS) (www.allergen.org); CHUA et al., 2007.

6. Biossensores

Biossensores são dispositivos responsáveis em converter uma resposta biológica em um sinal elétrico (MEHROTRA, 2016). O primeiro biossensor desenvolvido em 1962 pelos pesquisadores Clark e Lions, o qual era conhecido como eletrodo enzimático. Esse utilizava de uma enzima, glicose oxidase, imobilizada na superfície de um eletrodo de oxigênio, o qual detectava o consumo de oxigênio sob altos potenciais de redução. Segundo Clark e Lions (1962), o sistema de detecção eletroquímica gerava informações rápidas com pouca utilização de reagentes e manipulação química. A partir de então, diversos tipos de biossensores têm sido desenvolvidos com o intuito de diversificar análises da área médica e biológica, indústrias alimentícias e agrícolas, proteção ambiental e pesquisa farmacológica, gerando resultados mais rápidos e precisos (KLOS-WITKOWSKA, 2016; MEHROTRA, 2016).

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), biossensor pode ser definido como um equipamento integrado, o qual o receptor é conectado ao transdutor que é capaz de converter um sinal biológico em sinal elétrico, gerando informações analíticas específicas, de forma quantitativa ou semiquantitativa, a partir de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico).

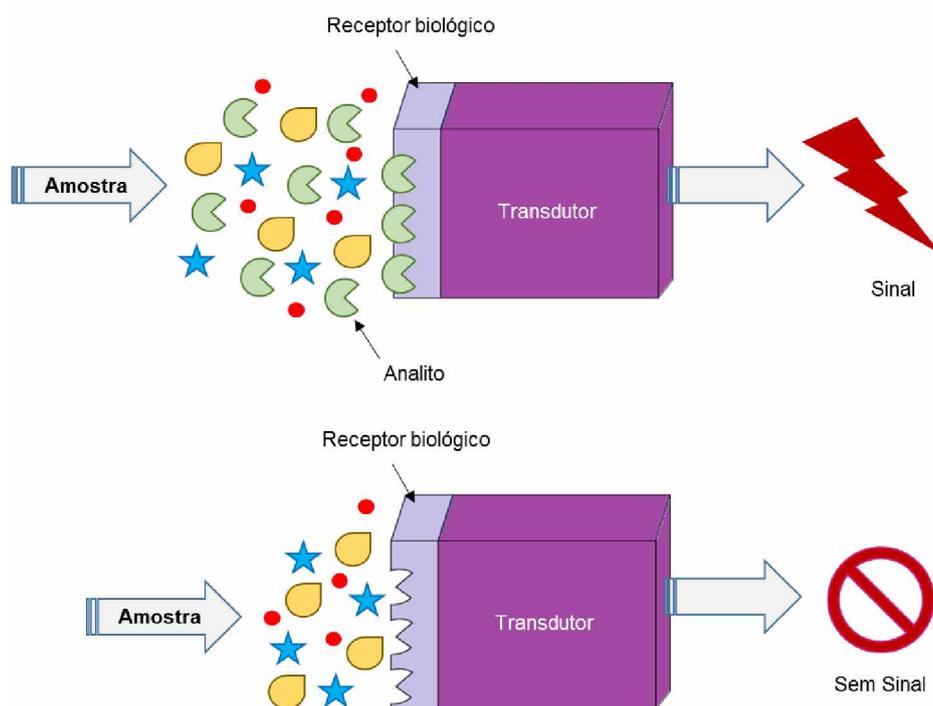


Figura 3. Esquema representativo da estruturação de um biossensor

Os biossensores podem ser classificados como eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos e sensores calorimétricos, baseando-se nos elementos de transdução de acordo com os princípios da transdução de sinal e reconhecimento dos elementos biológicos (THÉVENOT et al., 2001; KOYUN et al., 2012).

Dentre os diferentes tipos, pode-se citar os *imunossensores*, os quais foram estabelecidos na alta afinidade e especificidade da ligação entre antígeno e anticorpo ou interação com componentes do sistema imunológico; *biossensores baseados em enzimas*, que utilizam de métodos de imobilização enzimática na superfície do eletrodo como elementos bioreceptores; *biossensores de DNA*, baseados na imobilização de uma sonda e seu reconhecimento através da

complementariedade das fitas de DNA; *biossensores magnéticos*, os quais conseguem detectar nano ou micropartículas magnéticas; *biossensores pizoelétricos*, baseados em um cristal de quartzo e um dispositivo de onda acústica de superfície, no qual a medição é realizada através das alterações na frequência de ressonância de um cristal pizoelétrico, devido à alteração de massa da estrutura desse cristal; *biossensores calorimétricos*, que utilizam o calor gerado pelas reações catalisadoras de enzimas exotérmicas, com objetivo de quantificar a concentração do analito; *biossensores ópticos*, fundamentados na detecção das alterações das propriedades ópticas das substâncias, a fim de monitorar a concentração do analito (LEATHERBARROW; EDWARD, 1999; AKYILMAZ; YORGANCI; ASAV, 2010; WANG, 1998; SCOGNAMIGLIO et al., 2014; HELI et al., 2016; KŁOS-WITKOWSKA, 2016; MEHROTRA, 2016).

Biossensor eletroquímico é um sensor com um transdutor eletroquímico, o qual pode ser do tipo potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, impedimétrico ou carga iônica (ou efeito de campo) (THÉVENOT et al., 2001). Esses sensores são os mais utilizados e estudados em análises clínicas e biológicas e, se baseiam em eletrodos quimicamente modificados com materiais biológicos imobilizados (SOARES, 2010). Além disso, possuem a vantagem de serem simples de manuseio, sensíveis, confiáveis e de resposta rápida, além de terem baixo custo e permitirem determinações analíticas em uma ampla faixa de concentração (THÉVENOT et al., 2001; SILVA, 2011).

7. Imunoterapia e diagnóstico de doenças alérgicas

Para o diagnóstico da alergia, podem-se realizar métodos como testes cutâneos (*in vivo*) ou determinação dos níveis de IgE específica em soro (*in vitro*). Dentre os testes cutâneos, o teste cutâneo de puntura é altamente empregado, visto que apresenta a reação alérgica mediada por IgE com alta especificidade e sensibilidade e baixo custo. Entretanto, esse teste apenas determina a presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos, ou seja, não tem a capacidade de diagnosticar a doença alérgica (OWNBY, 1988).

Os testes de determinação dos níveis de IgE específica em soros são utilizados para confirmação do teste cutâneo ou quando não é possível a realização

de testes cutâneos por diversos fatores, seja por lesões presentes na pele, como eczema ou dermatografismo; uso de medicamentos que interfiram no teste; histórico ou pós-quadro de anafilaxia; ou quando o teste cutâneo possa oferecer riscos de reações sistêmicas, como por exemplo teste à venenos de insetos ou alimentos específicos. Semelhantemente ao teste cutâneo de puntura, o resultado positivo não deve ser utilizado como diagnóstico à doença alérgica (DAHER et al., 2009).

Com o aumento da prevalência de doenças alérgicas, o principal objetivo é criar alternativas que visam a diminuição das respostas biológicas exacerbadas frente aos alérgenos (BOUSQUET, LOCKEY, MALLING, 1998; VALENTA et al., 2011). Uma vez diagnosticada a alergia, os tratamentos são realizados com uso de medicamentos, como corticoides, anti-histamínicos e anti-inflamatórios, ou ainda o uso de imunoterapia específica com alérgenos (SIT).

A imunoterapia consiste em administrar gradualmente quantidades de extratos de um determinado alérgeno, até atingir uma concentração máxima, com subsequente exposição ao alérgeno por um período de manutenção que varia de indivíduo para indivíduo, a fim de reduzir os sintomas associados à doença através da indução da tolerância imunológica (FUJITA et al., 2012; WANBRE, 2015), com consequente redução do uso de medicamentos.

A imunoterapia específica com alérgenos tem sido retratada como o tratamento mais eficaz para doenças alérgicas respiratórias, tendo como mecanismos imunológicos a indução de tolerância imunológica específica para o alérgeno (DHAMI et al., 2016). Esta imunotolerância pode ser definida como o estabelecimento a longo prazo da ausência dos sintomas da alergia após a exposição aos alérgenos (AKDIS; AKDIS, 2015).

Dessa maneira, há diferentes hipóteses sobre os mecanismos que garantem o sucesso da imunoterapia, como os que visam desviar a resposta do perfil Th2 induzindo respostas de células do tipo Th1, as quais são responsáveis pela produção de IFN- γ , ou ainda com a indução de células Treg que produzem as citocinas imunomodulatórias IL-10 e TGF- β (JUTEL et al., 2006; LARCHE, 2006).

Esse desvio de resposta para o tipo Th1 ou Treg e a secreção de citocinas desses perfis, colaboram para o aumento dos níveis de IgG alérgenos específicos, favorecendo a biossíntese de anticorpos IgG1 e IgG4 específicas que atuam como anticorpos bloqueadores do alérgeno, sendo eles antagônicos aos efeitos

mediados por IgE por competirem pelo mesmo sítio de ligação do alérgeno (KOWALSKI; JUTEL, 1998; MOTHEs et al., 2003; OZDEMIR et al., 2011).

Além disso, o aumento da produção de IL-10, secretadas por Treg, induzem a tolerância de células T alérgeno específicas, através da supressão da proliferação de células Th1 e Th2 e secreção de citocinas induzidas por alérgenos (JUTEL et al., 2006). Além dessa geração de células Treg e Th1 e regulação de IgE e IgG4, os mecanismos da imunoterapia incluem a dessensibilização precoce de mastócitos e basófilos e diminuição do número de células e atividade de eosinófilos e mastócitos (AKDIS; AKDIS, 2014).

Para efetuar a imunoterapia específica com alérgenos, é necessário avaliar alguns fatores importantes para o processo, como as características estruturais e dosagem dos alérgenos, a via e o tempo de exposição ao alérgeno e a existência de outras substâncias no alérgeno que estimulam a resposta imune inata (JUTEL et al., 2016).

As abordagens utilizadas para aumentar a eficácia e segurança da imunoterapia, incluem vacinas que utilizam alérgenos recombinantes hipoalergênicos (JUTEL; AKDIS, 2014). Para o aumento da eficácia da imunoterapia, esses alérgenos recombinantes podem ter modificações estruturais, baseadas em características moleculares e imunológicas, a fim de gerar uma atividade alergênica reduzida. Em contrapartida, quando a finalidade é o diagnóstico da alergia, essas proteínas recombinantes devem manter os epítomos de IgE mais relevantes que estão presentes nos extratos naturais (VRTALA, 2008).

Dessa forma, o uso de alérgenos recombinantes podem ajudar a melhorar o diagnóstico da alergia e a determinar o perfil de sensibilização dos pacientes alérgicos, além de serem usados como pré-requisito para selecionar os alérgenos a serem utilizados em imunoterapia específica para o indivíduo. Assim, diante do aumento das doenças alérgicas no mundo, pesquisas que envolvam estratégias para desenvolver ou aprimorar as formas de diagnóstico ou tratamento da alergia, podem impactar positivamente na qualidade de vida dos pacientes. Dessa maneira, a utilização de biossensores eletroquímicos para a detecção de anticorpos alérgenos-específicos, pela sensibilidade, rápido resultado e baixo custo, pode ser uma alternativa no futuro para diagnóstico de doenças alérgicas.

REFERÊNCIAS

- AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. **World Allergy Organization Journal**, v. 8, n. 1, p. 1, 2015.
- AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 11, p. 4678-4680, 2014.
- AKDIS, M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 738-744, 2006.
- AKYILMAZ, E.; YORGANCI, E.; ASAV, E. Do copper ions activate tyrosinase enzyme? A biosensor model for the solution. **Bioelectrochemistry**, v. 78, n. 2, p. 155-160, 2010.
- ANGKASEKWINAI, P. et al. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 7, p. 1509-1517, 2007.
- ARLIAN, L. G. Arthropod allergens and human health. **Annual review of entomology**, v. 47, n. 1, p. 395-433, 2002.
- ARRUDA, L. K. et al. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in Sao Paulo, Brazil. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 21, n. 4, p. 433-439, 1991.
- ARRUDA, L. K. et al. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 155, n. 1, p. 343-350, 1997.
- ASSAREHZADEGAN, M. A.; SHAKURNIA, A.; AMINI, A. The most common aeroallergens in a tropical region in Southwestern Iran. **World Allergy Organization Journal**, v. 6, p. 1-7, 2013.
- AUBERT, H. et al. Atopic dermatitis of the child. **Revue du Praticien**, v. 63, p. 1271-1281, 2013.
- BEARD, S. Rhinitis. **Primary Care**, v. 41, p. 33-46, 2014.
- BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.; & MALLING, H. J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. **Journal Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, p. 558-562, 1998.
- CARABALLO, L. et al. Identification of allergens from the mite *Blomia tropicalis*. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 24, n. 11, p. 1056-1060, 1994.
- CARVALHO, K. dos A. et al. *Blomia tropicalis* Blo t 5 and Blo t 21 recombinant allergens might confer higher specificity to serodiagnostic assays than whole mite extract. **BMC immunology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.
- CHAPMAN, M. D. et al. Nomenclature and structural biology of allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 2, p. 414-420, 2007.

- CHOW, J. Y. et al. Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33: implications for allergic inflammation. **Cellular & molecular immunology**, v. 7, n. 1, p. 26-34, 2010.
- CHUA, K. Y. et al. The *Blomia tropicalis* allergens. **Protein and peptide letters**, v. 14, n. 4, p. 325-333, 2007.
- D'AMATO, G. et al. Climate change, air pollution and extreme events leading to increasing prevalence of allergic respiratory diseases. **Multidisciplinary Respiratory Medicine**, v. 8, p. 1-12, 2013.
- DAHER, S. et al. Diagnóstico em doenças alérgicas mediadas por IgE. **Rev Bras Alerg Immunopatol**, v. 32, n. 1, p. 3-8, 2009.
- DHAMI, S. et al. Allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis: protocol for a systematic review. **Clinical and translational allergy**, v. 6, n. 1, p. 1, 2016.
- FARAHANI, R. et al. Cytokines (interleukin-9, IL-17, IL-22, IL-25 and IL-33) and asthma. **Advanced biomedical research**, v. 3, n. 1, p. 127, 2014.
- FERNÁNDEZ-CALDAS, E. et al. Mite fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergen levels in a tropical environment. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 23, n. 4, p. 292-297, 1993.
- FORT, M. M. et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. **Immunity**, v. 15, n. 6, p. 985-995, 2001.
- FU, L. S.; TSAI, M. C. Asthma exacerbation in children: a practical review. **Pediatrics & Neonatology**, v. 55, n. 2, p. 83-91, 2014.
- FUJITA, H. et al. Mechanisms of immune tolerance to allergens. In: **New Trends in Allergy and Atopic Eczema**. Karger Publishers, 2012. p. 30-38.
- GALLI, S.J.; LANTZ, C. S. Allergy. In: PAUL, W. E. *Fundamental Immunology*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1999. p. 1127-1174.
- HELI, H. et al. An electrochemical genosensor for *Leishmania major* detection based on dual effect of immobilization and electrocatalysis of cobalt-zinc ferrite quantum dots. **Talanta**, v. 156, p. 172-179, 2016.
- HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v.8, n.3, p. 218-230, 2008.
- HUSTON, D. P.; LIU, Y. J. Thymic stromal lymphopoietin: a potential therapeutic target for allergy and asthma. **Current allergy and asthma reports**, v. 6, n. 5, p. 372-376, 2006.
- JACKSON, D. J. et al. Asthma exacerbations: origin, effect, and prevention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 128, n. 6, p. 1165-1174, 2011.
- JOHANSSON, S. G. O. et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 113, n. 5, p. 832-836, 2004.
- JULIÁ-SERDÁ, G. et al. Prevalence of sensitization to *Blomia tropicalis* among young adults in a temperate climate. **Journal of Asthma**, v. 49, n. 4, p. 349-354, 2012.

- JUTEL, M. et al. International Consensus on Allergen Immunotherapy II: mechanisms, standardization, and pharmacoconomics. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 2, p. 358-368, 2016.
- JUTEL, M. et al. Mechanisms of allergen specific immunotherapy - T-cell tolerance and more. *Allergy*, v. 61, p. 796-807, 2006.
- JUTEL, M.; AKDIS, C. A. Novel immunotherapy vaccine development. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 14, n. 6, p. 557-563, 2014.
- JUTEL, M.; AKDIS, C. A. T-cell subset regulation in atopy. **Current allergy and Asthma Reports**, v. 11, n. 2, p. 139-145, 2011.
- KELLY, L. A.; ERWIN, E. A.; PLATTS-MILLS, T. A. The indoor air and asthma: the role of cat allergens. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 18, n. 1, p. 29, 2012.
- KING, T. P. et al. Allergen nomenclature. **Allergy**. v. 50, n. 9, p. 765-774, 1995.
- KŁOS-WITKOWSKA, A. The phenomenon of fluorescence in immunosensors. **Acta biochimica Polonica**, v. 64, 2016.
- KONRADSEN, J. R. et al. Allergy to furry animals: new insights, diagnostic approaches, and challenges. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2014.
- KOWALSKI, M. L.; JUTEL, M. Mechanisms of specific immunotherapy of allergic diseases. **Allergy**, v. 53, n. 5, p. 485-492, 1998.
- KOYUN, A. et al. Biosensors and their principles. **A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones**, p. 115-143, 2012.
- KUCUKSEZER, U. C. et al. Mechanisms of immune tolerance to allergens in children. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 56, p. 505-513, 2013.
- LAI, X. et al. Specific IgG4 production during house dust mite immunotherapy among age, gender and allergic disease populations. **International archives of allergy and immunology**, v. 160, n. 1, p. 37-46, 2012.
- LARCHÉ, M. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. **Current opinion in immunology**, v. 18, n. 6, p. 745-750, 2006.
- LARSEN, J. N.; LOWERSTEIN, H. Allergen nomenclature. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, p. 577-718, 1996.
- LEATHERBARROW, R. J.; EDWARDS, P. R. Analysis of molecular recognition using optical biosensors. **Current opinion in chemical biology**, v. 3, n. 5, p. 544-547, 1999.
- LEMANSKE, R. F. JR; BUSSE, W. W. Asthma. *Journal of Allergy and clinical Immunology*, v. 111, p. s502-s519, 2003.
- LIAO, B. et al. Interaction of thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and their receptors in epithelial cells in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Allergy**, v. 70, n. 9, p. 1169-1180, 2015.

- LICONA-LIMÓN, P. et al. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. **Nature immunology**, v. 14, n. 6, p. 536-542, 2013.
- LIU, Y.J. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 2, p. 269-273, 2006.
- LLERENA, L. P. et al. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides* spp-allergic individuals. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 88, n. 6, p. 943-950, 1991.
- MANNI, M. L.; ROBINSON, K. M.; ALCORN, J. F. A tale of two cytokines: IL-17 and IL-22 in asthma and infection. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 8, p. 25-42, 2014.
- MARTINEZ, F. D.; VERCELLI, D. Asthma. **Lancet**, v. 182, n. 9901, p. 1360-1372, 2013.
- MEHROTRA, P. Biosensors and their applications—A review. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2016.
- MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 32, p. 184-188, 2009.
- METZGER, W. J.; NYCE, J. W. Oligonucleotide therapy of allergic asthma. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 104, p. 260-266, 1999.
- MOTHES, N. et al. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduce seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 1198-1208, 2003.
- MUNIR, A. K. et al. Mite allergens in relation to home conditions and sensitization of asthmatic children from three climatic regions. **Allergy**, v. 50, p.55-64, 1995.
- OBOKI, K. et al. Th17 and allergy. **Allergology International**, v. 57, n. 2, 2008.
- OWNBY, D. Allergy testing: in vivo versus in vitro. **Pediatric Clinics of North America**, v.35, n. 5, p. 995-1009, 1988.
- OZDEMIR, C. et al. Mechanisms of Aeroallergen Immunotherapy: Subcutaneous Immunotherapy and Sublingual Immunotherapy. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 71-86, 2016.
- OZDEMIR, C. et al. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 41, p. 1226-1234, 2011.
- PALOMARES, O. et al. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 1232-1240, 2010.
- PLATTS-MILLS, T. A. E. et al. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, n. 6, p. S2-S24, 1997.
- PLATTS-MILLS, T. A. E.; COMMINS, S. P. Emerging antigens involved in allergic responses. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, p. 769–774, 2013.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; WOODFOLK, J. A. Allergens and their role in the allergic immune response. **Immunological reviews**, v. 242, n. 1, p. 51-68, 2011.

PLATTS-MILLS, T.A.E; De WECK, A.L. REPORT, International Workshop. Dust mite allergens and asthma: a worldwide problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 66, n. 6, p. 769, 1988.

PUSHPARAJ, P. N. et al. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 24, p. 9773-9778, 2009.

RAULF, M. et al. Mites and other indoor allergens—from exposure to sensitization and treatment. **Allergo journal international**, v. 24, n. 3, p. 68-80, 2015.

RIZZO, M. C. et al. IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in São Paulo, Brazil. **Journal of investigational allergology & clinical immunology**, v. 7, n. 4, p. 242-248, 1996.

RODRÍGUEZ-PEREA, A. L. et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells in humans and rodents. **Clinical & Experimental Immunology**, p.1 -36, 2016.

SANCHEZ-BORGES, M. et al. Anaphylaxis from ingestion of mites: pancake anaphylaxis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 1, p. 31-35, 2012.

SANCHEZ-BORGES, M. et al. Mite-contaminated foods as a cause of anaphylaxis. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 99, n. 6, p. 738-743, 1997.

SCOGNAMIGLIO, V. et al. Biosensing technology for sustainable food safety. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 1-10, 2014.

SILVA, L. M. C. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental**. Rio de Janeiro, 2011. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SOARES, J. C. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol**. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1, p. 121-131, 2001.

THOMAS, W. R.; HALES, B. J.; SMITH, W. A. House dust mite allergens in asthma and allergy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, p. 321-328, 2010.

TRIDL-HOFFMANN, C.; JAKOB, T.; BEHRENDT, H. Determinants of allergenicity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 3, p. 558-566, 2009.

VALENTA, R. et al. Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. **Allergy**, v. 66, p.775-783, 2011.

VANNELLA, K. M. et al. Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. **Science translational medicine**, v. 8, n. 337, p. 337ra65-337ra65, 2016.

VRTALA, S. Review article: from allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment. **Allergy**, v. 63, n. 3, p. 299-309, 2008.

WAMBRE, E. Effect of allergen-specific immunotherapy on CD4+ T cells. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 15, n. 6, p. 581-587, 2015.

WANG, J. DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, p. 757-762, 1998.

WANG, Q. et al. The overexpression of heparin-binding epidermal growth factor is responsible for Th17-induced airway remodeling in an experimental asthma model. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 834-841, 2010.

WATSON, B.; GAUVREAU, G. M. Thymic stromal lymphopoietin: a central regulator of allergic asthma. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 18, n. 7, p. 771-785, 2014.

YING, S. et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 8183-8190, 2005.

Capítulo II

Desenvolvimento de biossensor para detecção rápida de anticorpos específicos para alérgenos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides sp*

CAPÍTULO II

Desenvolvimento de biossensor para detecção rápida de anticorpos específicos para alérgenos derivados dos ácaros *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides sp*

Autores

Bianca Uliana Picolo¹, Karine Canuto Loureiro de Araújo¹, Ana Claudia Arantes Marquez Pajuaba¹, Carlos Priminho Pirovani², Luciano Pereira Rodrigues³, Renata Pereira Alves Balvedi³, Luiz Ricardo Goulart³, Ernesto Akio Taketomi¹, Jair Pereira da Cunha Junior^{1*}

Instituição

¹ Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

² Centro de Biotecnologia e Genética, Laboratório de Proteômica, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Ba, Brasil

³ Laboratório de Nanotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

*** Autores Correspondentes**

Jair Pereira da Cunha Junior, Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Campus Umuarama, Bloco 4C, Sala 01, 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil. Telefone: +55 34 3225 8674. jair.cunha.junior@gmail.com

Resumo

No decorrer dos últimos anos, aumentou-se a prevalência de doenças alérgicas no mundo. Atualmente, técnicas como teste cutâneo de puntura, ELISA e immunoCap são amplamente utilizadas na área clínica como diagnóstico dessas doenças. Biossensores eletroquímicos podem atuar como uma perspectiva de melhoria do diagnóstico das doenças alérgicas, por ser uma plataforma mais sensível, específica e seletiva, quando comparada com outras técnicas de diagnóstico. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos com a superfície modificada com estreptavidina para a detecção de múltiplos alérgenos derivados de *B. tropicalis*, *D. farinae* e *D. pteronyssinus* em soro de indivíduos IgE positivos. Esse estudo mostrou que é possível a detecção de rBlo t 5 e antígenos de *B. tropicalis* em indivíduos atópicos, através da técnica de captura magnética. Além disso, foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico capaz de reconhecer múltiplos alérgenos dos principais ácaros da poeira domiciliar em soros de indivíduos atópicos. Assim, pode-se concluir que biossensores eletroquímicos são importantes para a clínica de doenças alérgicas, e podem ser mais eficazes para o diagnóstico dessas doenças que outras técnicas mais comumente utilizada, sendo esses altamente sensíveis e específicos.

Palavras-chave: Biossensores eletroquímicos, alergia, rBlo t 5, extrato de *B. tropicalis*

Abstract

Over the past years, the prevalence of allergic diseases has increased substantially in the world. Techniques such as skin prick test, ELISA and ImmunoCAP are widely used in the medical field for diagnosis of allergies. Electrochemical biosensors may be valuable approach for improvement of the allergic diseases diagnosis, because it may be more sensitive, specific and selective platform in comparison with other diagnostic technologies. This study aimed to develop multifunctional electrochemical biosensors with the streptavidin-modified surface for the detection of IgE antibodies, from allergic patients, specific to allergens from *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. The biosensor produced with magnetic capture-structured was able to detect IgE antibodies from serum samples specific to whole *B. tropicalis* allergens and also to the major *B. tropicalis* allergen, Blo t 5. In addition, the biosensor developed was also able to detect IgE antibodies specific to multiple allergens from different sources of house dust mites, specially when minimal volumes of serum samples from multi-sensitized atopic individuals were probed. In conclusion, the biosensor developed in this study may be an innovative and powerful platform that may be relevant to the monitoring of respiratory allergic diseases, contributing to clinical management in allergen-specific immunotherapy and also to the healthcare promotion of patients with allergic diseases.

Keywords: Electrochemical biosensors, allergy, Blo t 5, *Blomia tropicalis* extract, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*.

1. Introdução

As doenças alérgicas afetam grande parte da população mundial e sua incidência têm aumentado significativamente devido a fatores de risco como predisposição genética e aumento da exposição alergênica devido ao aquecimento global, aumento da urbanização, fatores psicossociais, higiene pública e poluentes ambientais, como os aeroalérgenos (TRAIDL-HOFFMANN et al., 2009; LAI et al., 2011; KELLY et al., 2012; D'AMATO et al., 2013; PLATTS-MILLS; COMMINS, 2013).

As principais doenças alérgicas respiratórias são a rinite e asma alérgica. Segundo a organização mundial da saúde (OMS), a asma é a doença não transmissível mais comum em crianças e, a estimativa é de que 235 milhões de pessoas sofrem de asma. Essa doença afeta a qualidade de vida do indivíduo e é considerada um problema de saúde pública, a qual o índice de mortalidade é maior em países de baixa renda.

Os ácaros da poeira domiciliar são reconhecidos como a causa mais comum de doenças alérgicas no mundo (THOMAS et al., 2010). Os ácaros das espécies *Dermatophagoides sp* e *Blomia sp*. possuem alérgenos considerados clinicamente relevantes no desenvolvimento de doenças alérgicas, em regiões tropicais e subtropicais (CHUA et al., 2007). *Blomia sp*. é considerado um ácaro de estocagem, apesar de ser encontrado em altas concentrações na poeira domiciliar (ARRUDA et al., 1991). Estima-se que 60% a 80% dos indivíduos atópicos sejam sensibilizados com alérgenos de *B. tropicalis* (LLERENA et al., 1991; FERNANDEZ-CALDAS et al., 1993). Blo t 5 é o principal alérgeno desse ácaro, o qual possui 14 kDa e, estima-se que aproximadamente 92% dos indivíduos alérgicos são sensibilizados por esse alérgeno e, 70% dos pacientes asmáticos possuem reatividade com Blo t 5 (CHUA et al., 2007; CARVALHO et al., 2013).

O diagnóstico para doenças alérgicas pode ser realizado por métodos *in vivo* (teste cutâneo de puntura) ou *in vitro* (mensuração dos níveis séricos de IgE). Uma vez diagnosticada, a alergia pode ser tratada a partir de uso de medicamentos ou através de imunoterapia específica com alérgenos, sendo esta a mais eficaz para doenças alérgicas respiratórias (DHAMI et al., 2016).

O processo de imunoterapia específica com alérgeno visa o desvio da resposta imune do perfil Th2 para o perfil Th1 ou mecanismos de supressão de proliferação de células T, pela indução de células T regulatórias (Treg), incluindo a produção de anticorpos bloqueadores, como IgG1 induzida por IFN- γ e IgG4 induzida pela IL-10 (KOWALSKI; JUTEL, 1998; MOTHEs et al., 2003; JUTEL et al., 2006; LARCHE, 2006; OZDEMIR et al., 2011).

A utilização de biossensores na área clínica e biológica tem sido cada vez mais constante, com a finalidade de gerar resultados relativamente mais rápidos e precisos, além de terem baixo custo (KLOS-WITKOWSKA, 2016; MEHROTRA, 2016). Biossensores eletroquímicos se baseiam em eletrodos quimicamente modificados com materiais biológicos imobilizados (SOARES, 2011). A utilização de sensores biológicos é uma ferramenta que podem garantir a melhoria da sensibilidade do diagnóstico laboratorial.

Assim, estratégias que visam o desenvolvimento ou aprimoramento de formas de diagnóstico e que auxiliem no tratamento da alergia, podem causar um impacto positivo na qualidade de vida do indivíduo alérgico. Dessa maneira, esse trabalho visa o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos acoplados a proteína estreptavidina e modificados com anticorpos anti-IgE biotinizados para detecção de anticorpos específicos para alérgenos de ácaro das espécies de *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides sp.*, podendo este ser uma alternativa no futuro para diagnóstico de doenças alérgicas.

2. Material e métodos

2.1. Indivíduos e teste cutâneo de puntura (TCP)

Participaram dessa pesquisa dezenove indivíduos, homens ou mulheres, com idade entre 19 e 57 anos, dentre os quais 11 relataram histórico de quadro alérgico com rinite ou asma alérgica. Foram considerados como critérios de inclusão dos indivíduos atópicos aqueles que tiveram TCP positivos à alérgenos de *Blomia tropicalis*, histórico clínico de sintomas respiratórios relacionados à exposição a poeira domiciliar e que tinham idade entre 18 e 65 anos. Em contrapartida, para os critérios de exclusão do estudo, foram considerados aqueles indivíduos que se recusaram a participar do estudo, que estiveram sob tratamento com anti-histamínicos ou corticosteróides por via oral até uma semana anterior ao teste, gestantes, presença de lesões dermatológicas na área da realização do teste cutâneo de puntura ou aqueles que realizaram procedimentos de imunoterapia à alérgenos de ácaros da poeira domiciliar.

A reação de hipersensibilidade imediata foi aferida através do teste cutâneo de puntura (TCP), seguindo as normas recomendadas pela *European Academy of Allergology and Clinical Immunology* (EAACI) (HEINZERLING et al., 2013). Para a realização do teste, foram utilizados extratos alérgênicos comerciais (FDA Allergic Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) de aeroalérgenos como ácaros da poeira domiciliar (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*), epitélio de animais domésticos (*Canis familiaris* e *Felis domesticus*), baratas (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*), fungo (*Alternaria alternata*) e grãos de pólen (*Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum* e Gramíneas).

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia, e o aceite dos participantes na pesquisa foi feito através do preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os protocolos de pesquisa foram submetidos e aprovados junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob processo nº 322/08, e ainda aprovado junto a CIBio-UFU.

2.2. Preparação dos extratos alergênicos de *B. tropicalis*

A extração de antígenos de *B. tropicalis* foi realizada utilizando o protocolo anteriormente descrito por Pereira e colaboradores (2005). Dessa forma, material seco de cultivo dos ácaros, cedido pelo Dr. Federico Montealegre (Laboratório de Imunoquímica, da Escola de Medicina de Ponce, Porto Rico, Estados Unidos), foi macerado exaustivamente em nitrogênio líquido e os alérgenos de *B. tropicalis* foram extraídos em tampão borato salino (BBS) 5mM, pH 8,0, na presença de inibidores de protease (Leupeptina 1µM; Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1µM; Benzamidina 1mM e; Aprotinina 10µg.mL⁻¹. A concentração do conteúdo proteico foi determinada utilizando o método do ácido bicinonínico (BCA) (Smith et al., 1985).

2.3. Indução e expressão da proteína Blo t 5 recombinante

O gene de Blo t 5 foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers Forward 5'GCTCAAGAGCATATGCCAGAGAAGG3' e Reverse 5'TTATTGGGATCCAATATCCTTCAC3' a partir de plasmídeos contendo o gene de interesse, sintetizados quimicamente pela empresa Genscrip corporation (www.genscript.com). O produto da reação de PCR foi restringido com as enzimas NdeI e BamHI e, em seguida clonados no vetor de expressão pET28a (Novagen). O vetor de expressão pET28a foi utilizado para transformação genética de bactérias *E. coli* das cepas BL21 (DE3), o qual foi incubado com cloreto de cálcio 50mM e submetidos a choque térmico. As bactérias submetidas a transformação foram plaqueadas em placas contendo meio LB ágar com antibióticos cloranfenicol e canamicina. As colônias transformadas foram crescidas em cultura LB líquido e a indução da expressão da proteína de interesse foi realizada com adição isopropil-d-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1 mM.

2.4. Purificação da proteína Blo t 5 recombinante

As bactérias foram coletadas por centrifugação e lisadas utilizando tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, sacarose 200 mM, NaCl 50 mM, imidazol 10 mM,

Triton X-100 0,2% suplementado com 1 mg/ml de lisozima), seguido de ciclos de criólise e sonicação. A fração da lise foi submetida a centrifugação sobrenadante e foi utilizada para o processo cromatográfico em resina de afinidade de níquel (Ni-sepharose, GE Bioscience), para purificação de Blo t 5 recombinante.

A coluna de níquel foi equilibrada com tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50mM pH 8,0; NaCl 500mM; TritonX-100 0,2%; Imidazol 10mM) e a eluição ocorreu com tampão de eluição com 75mM de Imidazol (Tris-HCl 50mM pH 8,0; Imidazol 75mM), seguida da aplicação do tampão de eluição com 250mM de Imidazol (Tris-HCl 50mM pH 8,0; Imidazol 250mM). As proteínas eluídas foram dialisadas em PBS em membranas de dialise de 6kDa. A concentração do conteúdo proteico foi determinada utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA) (Smith et al., 1985).

2.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgE

As amostras de soro de indivíduos atópicos e não atópicos foram coletadas e avaliadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para a detecção de anticorpos IgE sérico, como previamente descrito (QUEIRÓS et al., 2008; SIMAN et al., 2013). Assim, placas de alta afinidade (Costas, Corning Laboratories Inc, New York, NY, EUA) foram sensibilizadas com extrato total de *B. tropicalis* (3 µg/poço) ou com a proteína recombinante Blo t 5 (3 µg/poço). O bloqueio foi realizado com solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2 (PBS) acrescido de Tween-20 a 0,05% (PBS-T) e 1% de soroalbumina bovina (BSA). As amostras de soro foram incubadas na razão 1:2, por 2 horas a 37°C. Em seguida, foi adicionado anticorpo secundário anti-IgE-humano biotilado (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, EUA) diluído em PBS-T-BSA na proporção 1:1000, por 1 hora a 37°C, com subsequente adição do conjugado com estreptavidina-peroxidase (Sigma), diluído em PBS-T-BSA 1:500, incubado à temperatura ambiente, por 30 minutos, protegido da luz. A reação foi revelada através do reagente 2,2'-diazino do ácido etil-benzotiazolino sulfônico (ABTS; Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, EUA). A densidade óptica foi determinada por espectrofotometria em leitor de placas (Epoch Microplate Spectrophotometer - BioTek) a 405 nm.

2.6. Biossensores eletroquímicos

Eletrodos de grafite screen-printed modificados com estreptavidina (DropSens[®], LLanera, Spain - DRP-110STR) foram utilizados para o desenvolvimento do biossensor. No primeiro e no terceiro ensaio, esses eletrodos foram funcionalizados para construção de uma sonda de reconhecimento biológico convencional. Uma segunda estratégia foi desenvolvida com a construção de uma sonda de reconhecimento biológico acoplada a beads magnéticas, como demonstrado no segundo ensaio.

2.6.1. Caracterização de um biossensor convencional

Para esse primeiro ensaio, o eletrodo DRP-110STR modificado com estreptavidina foi funcionalizado com 3 μL de anticorpos anti-IgE-humano biotinizados (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, EUA) previamente diluídos em PBS na razão 1:100.000. A incubação ocorreu por 15 minutos a temperatura ambiente na superfície do eletrodo DRP-110STR. Após, uma lavagem utilizando 1 mL de água Milli-Q foi realizada, para remover o excesso de anti-IgE biotinizada que não se ligou a estreptavidina, configurando assim, após a secagem, uma sonda de reconhecimento biológico para o biossensor convencional proposto. Procedimento simultâneo de incubação também por 15 minutos foi realizado em Eppendorf, na temperatura ambiente, com as amostras de soros utilizadas de indivíduos atópicos, contendo o alvo (IgE), diluídas previamente na razão 1:10 em PBS com $0,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de alérgeno (Blo t 5 ou extrato total de Bt). 1,5 μL das amostras foram adicionadas sobre a sonda de reconhecimento biológico permanecendo em contato por mais 15 minutos. Em seguida ocorreu novamente uma lavagem com 1 mL de água Milli-Q e posterior secagem. Testes similares foram realizados com soros de indivíduos não atópicos, sendo esses considerados como controle negativo, seguindo o mesmo protocolo acima descrito.

Foram obtidas imagens topográficas usando um sistema de microscopia de força atômica modelo XE-70 de fabricação Park System[®] e SPM-9600[®] (Shimadzu). As imagens obtidas pelo AFM foram varridas em uma área de $10 \mu\text{m}^2$, utilizando o modo não contato com resolução real de 10 nm do eletrodo DRP-

110STR antes e após a adição dos anticorpos anti-IgE-humano biotinilados, assim como após a adição de soro de indivíduos atópicos e não atópicos, contendo Blo t 5 ou extrato total de Bt.

2.6.2. Construção de um biossensor usando beads magnéticas

O esquema ilustrativo da Figura 1A mostra um sistema de detecção eletroquímico utilizando beads magnéticas modificadas com estreptavidina. Assim, 5 μL de beads magnéticas modificadas com estreptavidina ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) foram funcionalizadas através do acoplamento com 5 μL de anticorpos anti-IgE-humano biotinilados (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, EUA) diluídos previamente em PBS na razão 1:100.000, por incubação de 15 minutos a temperatura ambiente.

Após lavagem com tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, utilizando captura magnética para remoção de espécies não ligadas, temos uma sonda de reconhecimento biológico magnética para o biossensor proposto em solução disponível em Eppendorf. Neste, posteriormente foram adicionadas 5 μL de amostras de soro de indivíduos atópicos contendo o alvo (IgE) diluídos previamente em PBS na razão de 1:10 e mais 5 μL de alérgeno Blo t 5 ($0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$), para outra incubação de 15 minutos a temperatura ambiente. Após, novo ciclo de lavagem com respectiva captura magnética, 3 μL dessa solução foi adicionada sobre a superfície do eletrodo DRP-110STR e através de um ímã de neodímio por aproximadamente 1 minuto, a sonda de reconhecimento biológico magnética acoplada ao alvo foi migrada para superfície do eletrodo DRP-110STR. Então foi adicionado 97 μL da sonda redox indicadora composta de ferrocianeto/ferricianeto de potássio 5 mol.L^{-1} para mensuração de sinal usando voltametria de pulso diferencial (VPD) com o potenciostato PalmSens3, cujos voltamogramas foram fornecidos pelo Software PStTrace 4.0. As medidas de VPD foram conduzidas na faixa de potencial entre -0,4 V a 0,4 V na velocidade de varredura de $0,015 \text{ V.s}^{-1}$. Testes similares foram realizados com soros de indivíduos não atópicos, sendo esses considerados como controle negativo, seguindo o protocolo acima descrito.

Adicionalmente, foram obtidas imagens por AFM, como descrito em 2.6.1.

2.6.3. Construção de um biossensor convencional para detecção de múltiplos alérgenos

O esquema ilustrativo da Figura 1B mostra a detecção de alvos múltiplos em adições sucessivas em um único eletrodo.

Para esse primeiro ensaio, o eletrodo DRP-110STR modificado com estreptavidina foi funcionalizado com 3 μL de anticorpos anti-IgE-humano biotinizados (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, EUA) previamente diluídos em PBS na razão 1:100.000. A incubação ocorreu por 15 minutos a temperatura ambiente na superfície do eletrodo DRP-110STR. Após, uma lavagem utilizando 1 mL de água Milli-Q foi realizada, para remover o excesso de anti-IgE biotinizada que não se ligou a estreptavidina, configurando assim, após a secagem, uma sonda de reconhecimento biológico para o biossensor convencional proposto. Procedimento simultâneo de incubação também por 15 minutos foi realizado em microtubos, na temperatura ambiente, com as amostras de soros utilizadas de indivíduos atópicos, contendo o alvo (IgE), diluídas previamente na razão 1:10 em PBS, e com $0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de alérgeno. $1,5 \mu\text{L}$ das amostras foram adicionadas sobre a sonda de reconhecimento biológico permanecendo em contato por mais 15 minutos. A etapa de detecção eletroquímica foi iniciada com $1,5 \mu\text{L}$ do alérgeno Blo t 5 ($0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e, em seguida ocorreu novamente uma lavagem com 1 mL de água Milli-Q e posterior secagem, então foi adicionado $100 \mu\text{L}$ da sonda redox indicadora composta de ferrocianeto/ferricianeto de potássio 5 mol.L^{-1} para mensuração de sinal usando VPD com o potenciostato PalmSens3, cujos voltamogramas foram fornecidos pelo Software PSTrace 4.0. As medidas de VC foram conduzidas na faixa de potencial entre $-0,4 \text{ V}$ a $0,4 \text{ V}$ na velocidade de varredura de $0,05 \text{ V.s}^{-1}$. Na sequência foram adicionados consecutivamente $1,5 \mu\text{L}$ dos demais alérgenos, sendo eles extrato total de Bt, extrato total de *Dermatophagoides farinae* (Df) e extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt). As condições de incubação e das lavagens antes e após a detecção foram mantidas conforme descrito acima.

Testes similares foram realizados com soros de indivíduos não atópicos, sendo esses considerados controle negativo, seguindo o mesmo procedimento experimental descrito acima.

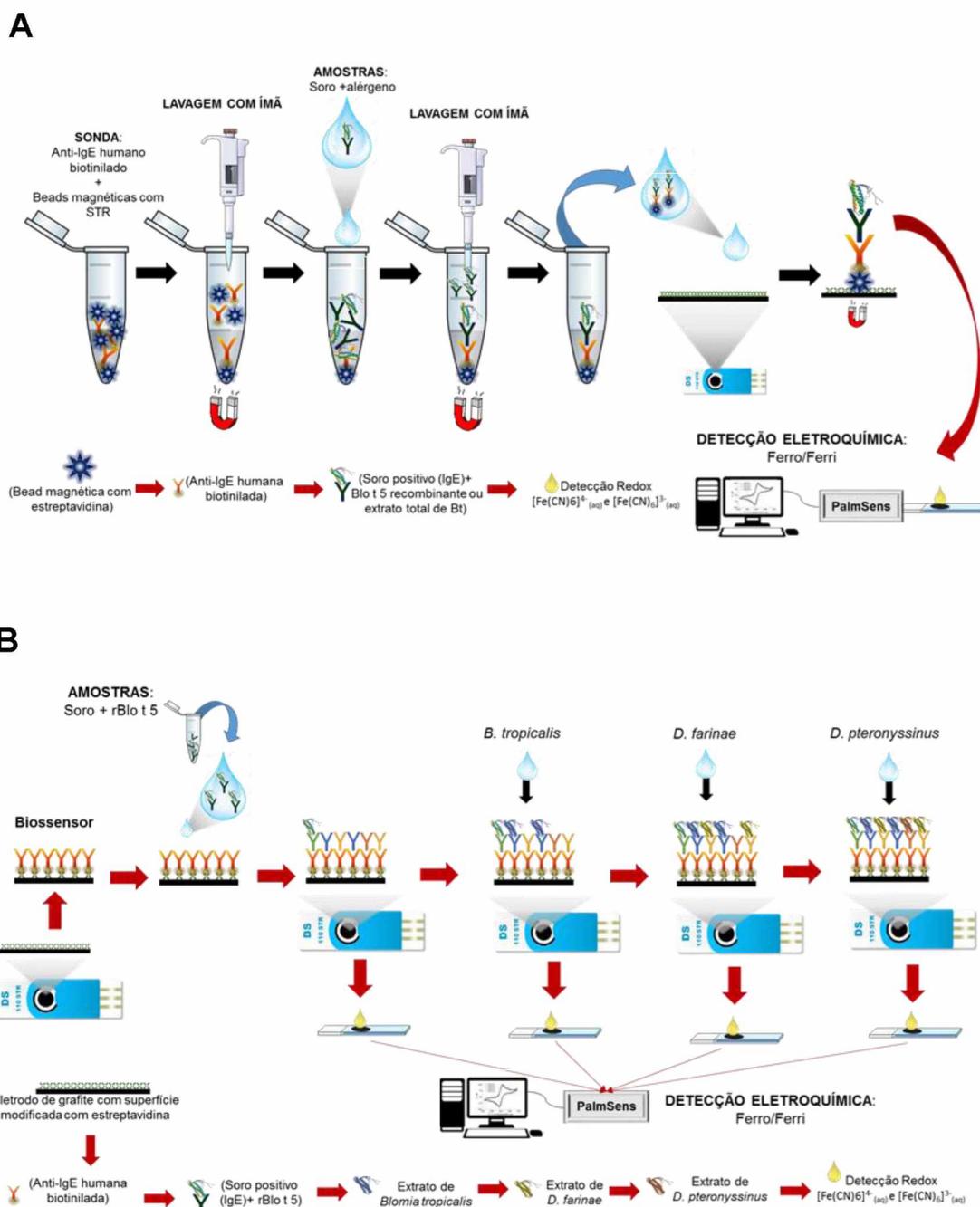


Figura 1. Esquema representativo da construção de um biossensor. (A) Utilização de beads magnéticas acopladas à sonda (anti-IgE biotinizada) para captura magnética de anticorpos específicos para rBlo t 5 presente em soros de indivíduos atópicos e não atópicos. **(B)** Detecções consecutivas de IgE específica de indivíduos atópicos para proteína rBlo t 5, extrato total de *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*.

3. Resultados e discussão

3.1. Anticorpos IgE séricos alérgeno-específico reconhecem a proteína recombinante Blo t 5 e antígenos do extrato total de *B. tropicalis*

A proteína recombinante rBlo t 5 foi obtida após a cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-sepharose. A figura 2A-B, demonstra o processo cromatográfico com as proteínas que não interagem com a resina saem no volume excluído (*Flow through* - F), representadas pelo primeiro pico do cromatograma. Já o segundo pico corresponde a eluição com notória presença da proteína recombinante rBlo t 5. Estas frações estão destacada entre as linhas pontilhadas do cromatograma (Figura 2A) e na análise eletroforética (Figura 2B), onde observa-se uma banda fortemente corada em aproximadamente 14,2 kDa, a qual apareceu em alto grau de pureza nas frações 4, 6 e 7. Estes dados estão de acordo com os dados previamente descritos no em trabalho científico que descreveu a clonagem e expressão da proteína Blo t5 como uma proteína de aproximadamente 15 kDa (ARRUDA et al., 1995).

Como esperado a análise eletroforética do extrato total de *B. tropicalis* (Figura 2C), apresentou componentes protéicos variando de 124 kDa a 7 kDa, comprovando a eficiência de extração desses alérgenos em nossas condições experimentais. A determinação protéica dos alérgenos de Bt total e rBlo t5, foi determinada pelo método de BCA, e demonstrou que as concentrações obtidas das proteínas foram de 4,2 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente (dados não mostrados).

Para validação dos antígenos produzidos, a reatividade de anticorpos IgE ao extrato Bt total e rBlo t 5 foram mensurados por ELISA indireto utilizando amostras de soros de indivíduos atópicos (TCP positivos para *B. tropicalis* - Bt+) e indivíduos não atópicos (TCP negativo para *B. tropicalis* – Bt-). Assim, conforme demonstrado na figura 2D como esperado, os indivíduos Bt+ apresentaram os níveis de IgE significativamente maiores em comparação aos indivíduos atópicos, para ambos os antígenos analisados (extrato total de Bt, $p > 0,05$; rBlo t 5 $p > 0,001$). Já no grupo de indivíduos não atópicos, não foi encontrada positividade para anticorpos IgE para nenhum dos antígenos analisados. Nesta análise uma maior reatividade média foi obtida quando antígenos de rBlot 5 foram utilizando no

imunoensaio em comparação aos extrato total. De maneira similar aos nossos dados, Carvalho e colaboradores (CARVALHO et. al., 2013), também demonstraram maior sororeatividade para alérgenos Blo t 5 ou Blo t 21 em comparação ao extrato total de *Blomia Tropicalis*. Assim, a introdução de antígenos recombinantes podem produzir uma sensibilidade equivalente ou mesmo superior em comparação ao emprego de aos extratos totais, quando utilizados no sorodiagnóstico de doenças alérgicas. Por outro lado, com base nestas análises foi possível selecionar indivíduos com altos valores de IE para o seguimento desse trabalho.

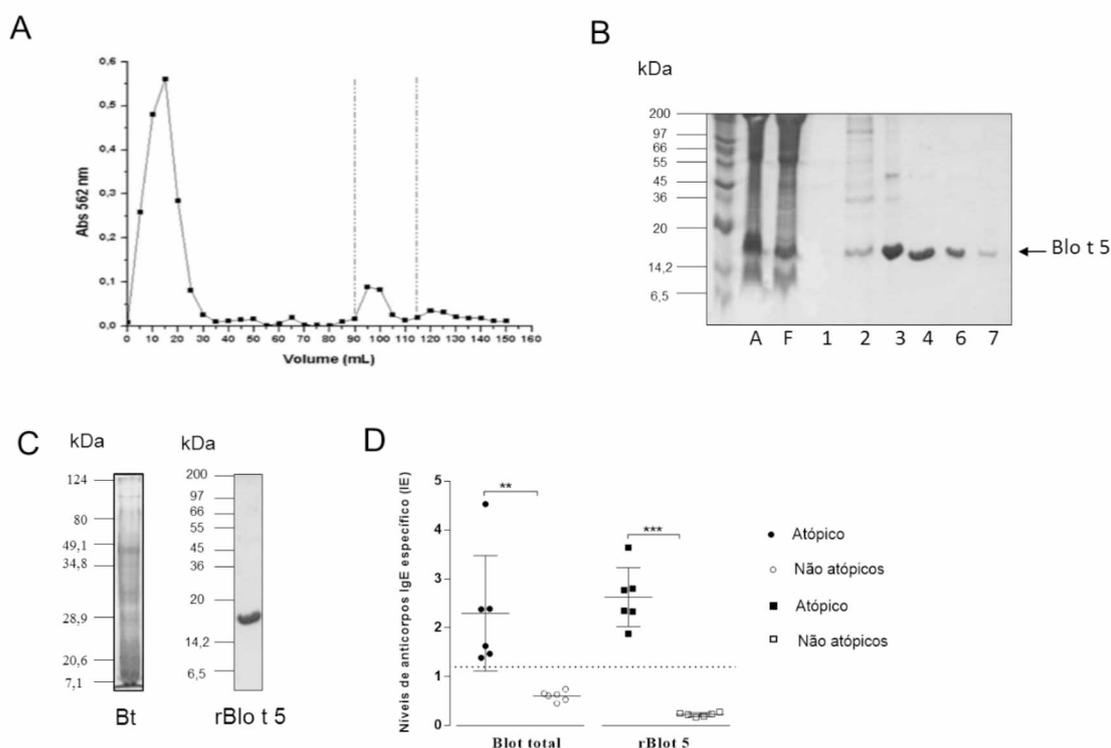


Figura 2. Produção de rBlo t 5 e extrato total de *B. tropicalis* e reatividade com anticorpos IgE. (A) Perfil cromatográfico do processo de purificação da proteína recombinante Blo t 5 obtido por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-sepharose. O primeiro pico representa o volume excluído (F- flow through) da extração proteína de bactérias. As frações purificadas da proteína Blo t 5 está representada a partir do segundo, eluídas com a adição de 75 mM de imidazol e estão destacadas entre linhas pontilhadas. **(B)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 18%) representativo da purificação da proteína recombinante Blo t 5, onde indicado A- Extrato total bacteriano aplicado, F – Volume excluído e 1-6 as frações eluídas da resina. **(C)** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 14%) do extrato total de Bt, extraído com tampão borato 5 mM, pH 8,0 e da proteína recombinante Blo t 5 purificada (SDS-PAGE 18%). **(D)** Níveis de anticorpo IgE específico para extrato total de *B. tropicalis* ou para a proteína recombinante Blo t 5 em amostras de soros de indivíduos atópicos e não atópicos. Dados expressos em valores de índice ELISA (IE). A comparação entre os níveis de anticorpos IgE foi realizada com o teste T-student para amostras independentes (** $p > 0,001$; ** $p > 0,05$).

3.2. Biossensores convencionais sensibilizados com anticorpos IgE detectam proteínas alergênicas

Imunossensores eletroquímicos são biossensores analíticos altamente sensíveis que combinam reações imunoquímicas com as características convencionais de um biossensor, tendo várias vantagens sobre campo de diagnóstico convencional, como baixo custo, fácil manuseio e, detecção rápida do imunocomplexo antígeno-anticorpo (SHARMA et al., 2016).

Assim, foi desenvolvido um biossensor com eletrodo de grafite com a superfície modificada com estreptavidina tendo como alvos de detecção anticorpos específicos para os antígenos rBlo t 5 e extrato total de *B. Tropicalis* (Bt total). A caracterização desses eletrodos, foi realizada pela caracterização morfológica desses eletrodos por meio de microscopia de força atômica (AFM). Essa técnica detecta forças atuantes entre uma ponteira ('cantilever') e a amostra (eletrodo), que oscila em uma frequência específica e consegue detectar a diferença topográfica entre diferentes regiões da amostra.

A Figura 3 apresenta as imagens obtidas por AFM, evidenciando a topografia durante cada etapa a construção do biossensor e as alterações da superfície durante o reconhecimento dos diferentes alvos biológicos. Os valores de rugosidade (Rq) do eletrodo DRP-110STR aumentam de 65 nm para 89 nm, após a imobilização do anticorpo anti-IgE-humano biotilado, demonstrado pela alteração topográfica na AFM e, portanto, indicativo de sucesso na primeira etapa de construção do biossensor (Figura 3G).

Os dados de AFM ainda apontam um aumento na superfície após a adição de soros (positivos e negativos) e os antígenos Blot 5 e Bt total, em comparação ao eletrodo acoplado somente com anticorpos anti-IgE; demonstrando claramente que após a adição do complexo antígenos-anticorpo ao biossensor fica funcionalizado com anticorpos IgE que podem reconhecer antígenos específicos (figura 3G). Os dados de AFM também, confirmam a especificidade do biossensor desenvolvido, os valores de rugosidade (Rq). Conforme demonstrado na figura 3G, os valores de Rq são consideravelmente maiores para eletrodos que receberam soropositivo do que aqueles que receberão soronegativos e ainda a adição rBlot 5 (138 nm e 90 nm respectivamente). Isto pode ser explicado pela interação na superfície do

eletrodo de anticorpos IgE (provenientes de soros positivos) com o antígenos recombinante Blo t 5. De maneira similar, diferença significativa foi observada quando soros positivos para Bt total foram utilizados em comparação ao soros negativos para o mesmo antígeno (241 nm – 98 nm, respectivamente). A diferença neste caso é ainda maior a diferença entre valores de Rq quando soros positivos e negativos para Bt total são utilizados no biossensor (Figura 3G). Este fenômeno de aumento de Rq em biossensores pode ser explicado pelo reconhecimento por anticorpos IgE policlonais aos múltiplos antígenos presentes em Bt total.

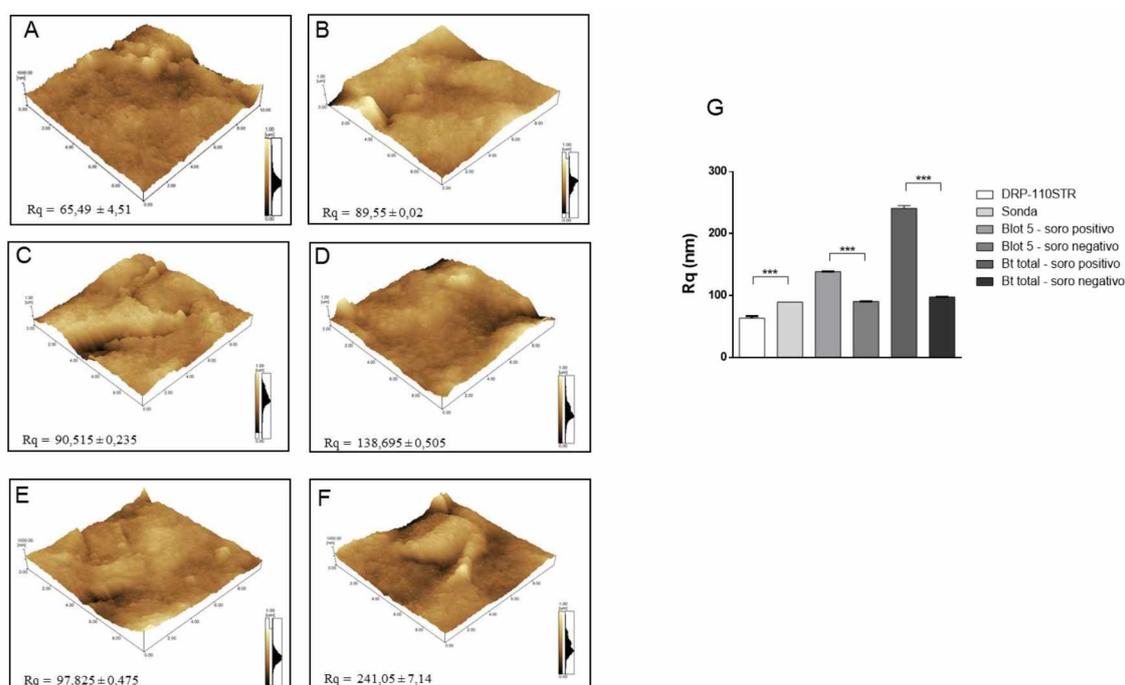


Figura 3. Caracterização morfológica de biossensores utilizados para detecção de extratos alergênicos. (A) DRP-110STR; **(B)** Sonda do biossensor – anti-IgE humana biotinilada. **(C)** anti-IgE humana biotinilada sensibilizada com rBlo t 5 e soros de pacientes IgE negativos para rBlo t 5; **(D)** Sonda do biossensor sensibilizada com rBlo t 5 soros de pacientes IgE positivos para rBlo t 5; **(E)** Sonda do biossensor sensibilizada com extrato total de Bt e soros de pacientes IgE negativos para extrato total Bt; **(F)** Sonda do biossensor sensibilizada com extrato total de Bt e soros de pacientes IgE positivos para extrato total Bt; **(G)** Gráfico de barras representativo dos valores de rugosidade (Rq - *Roughness values*) para biossensor sensibilizado com rBlo t 5 e soros de pacientes positivos ou negativos para Blo t 5 e incubados com rBlo t 5 e, sensibilizado com extrato total de Bt e soros de pacientes positivos ou negativos para *B. tropicalis*. A comparação da rugosidade entre os grupos foi realizada com o teste One way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (**** $p > 0,0001$).

3.3. Biossensores detectam anticorpos IgE específicos para rBlo t 5 através de captura magnética

Após a análise morfológica do biossensor capaz de detectar proteínas alergênicas em soros de indivíduos alérgicos, por métodos convencionais, foram realizados testes com a utilização de sondas (anti-IgE humana biotinizada) acopladas à beads magnéticas com estreptavidina. O uso de sondas de reconhecimento biológico magnéticas é interessante para promover a reutilização dos eletrodos tipo *screen-printed*, diminuindo substancialmente o custo da análise.

Dessa forma, anti-IgE acoplada à beads magnéticas foram sensibilizados com soros de indivíduos IgE positivo ou negativo para rBlo t 5 juntamente com a proteína alergênica Blo t 5, para captura magnética em eletrodos DRP-110STR. A Figura 4 apresenta voltamogramas de pulso diferencial para a detecção do alérgeno rBlo t 5 nesse sistema de captura magnética.

A sonda redox indicadora Ferro/Ferri difunde através do seio da solução até a superfície do eletrodo polarizado pela aplicação de potencial no sentido anódico (positivo) e catódico (negativo). Na superfície do eletrodo as espécies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}_{(\text{aq})}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}_{(\text{aq})}$ sofrem seus processos redox com mais facilidade ou não, dependendo do arranjo biológico que está na camada adjacente ao grafite. Normalmente, quanto mais obstruída está essa camada, menores valores de corrente de pico (I_p) em Ampere (A) e carga elétrica de oxidação (Q_{eo}) em coulomb (C) são encontrados, possibilitando assim monitorar reconhecimentos biológicos (SANTOS et al., 2012).

Atualmente, os imunossensores têm uma ampla aplicação em área de diagnóstico clínico e possuem grande potencial para comercialização. Entretanto, a utilização desse tipo de biossensor enfrenta desafios para alcançar um método de funcionalização da superfície, que seja simples, robusto, com baixo custo e compatível com técnica em massa de fabricação (SANCHEZ et al., 2016). Para a funcionalização da superfície dos biossensores, em muitas vezes requerem uma modificação bioquímica ou da superfície ou da biomolécula que, podem ser dispendiosos, demorados e difícil de implementar na produção em larga escala.

Dessa forma, os biossensores *screen-printed* de carbono com a superfície modificada com estreptavidina podem ser uma alternativa em resposta a esses

desafios. A estreptavidina possui alta afinidade estável para biomoléculas biotiniladas (DIAZ-GONZALEZ et al., 2005), sendo essa uma ligação não covalente de força $K_a = 10^5 \text{ mol.L}^{-1}$.

A diminuição de I_p relativa ao eletrodo DRP-110STR virgem após o acoplamento dos anticorpos anti-IgE-humano biotinilado, comprova a imobilização dessa sonda, viabilizada pela interação da biotina do anticorpo com a estreptavidina ligada superfície de grafite, demonstrando o sucesso na construção do biossensor (Figura 4).

Assim, esse resultado indica que a utilização desses biossensores com superfície modificada com estreptavidina, permitiu a imobilização dos anticorpos anti-IgE humana biotinilada, assegurando maior estabilidade do imunocomplexo formado, graças a ligação de reagentes biotinilados à estreptavidina sendo, portanto, eficazes para imobilização de proteínas ou anticorpos (DARAIN et al., 2003; DIAZ-GONZALEZ et al., 2005; IKONOMOVA et al., 2016; ZHU et al., 2015).

A relação percentual de corrente de pico entre o controle positivo e negativo é de 82% na técnica de VPD. Nesta técnica pode ocorrer uma discriminação mais acentuada entre a corrente capacitiva, resultante da formação da dupla camada elétrica na polarização do eletrodo, e a corrente faradaica, resultante do processo difusional das espécies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}_{(\text{aq})}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}_{(\text{aq})}$.

Conforme pode ser visto na Figura 4, houve uma tendência na diminuição da corrente (Figura 4A e C) ou da carga de oxidação (Figura 4B e D) dos biossensores que utilizaram soros de pacientes alérgicos para a detecção do alérgeno Blo t 5 em relação aos soros de pacientes não alérgicos, embora estes dados não atingiram a significância. No entanto, foi detectada uma diminuição estatisticamente significativa entre o biossensor com eletrodo acoplado somente à sonda (anti-IgE humana biotinilada) e aqueles que apresentaram biossensores com eletrodos que continham soro de indivíduos IgE positiva para rBlo t 5. Estes dados em conjunto indicam que o biossensor está adequadamente funcionalizado e que ajustes nas concentrações de soros e antígenos podem permitir o incremento da sensibilidade do biossensor permitindo detectar diferenças significativas entre amostras de soros positivos e negativos para rBlo t 5.

Por outro lado, a incapacidade de detectar diferenças estatísticas entre soros positivos e negativos com esta técnica também pode estar relacionada ao

pool de soros utilizados neste ensaio. Nossas amostras são de pacientes concomitantemente sensibilizados com antígenos de *Dermatophagoides pteronissinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis* (SIMAN et. al, 2013) e desta forma anticorpos específicos para o gênero *Dermatophagoides* podem reduzir a densidades de anticorpos IgE específicos para Blo t 5 no eletrodo, reduzindo a sensibilidade no biossensor eletroquímico. Isso reforça a necessidades de maiores ajustes nas concentrações de soros e antígenos para atingir diferenças significantes entre a reatividade de soros positivos e negativos com esta metodologia.

Reações utilizando técnicas eletroquímicas são muito sensíveis possuem caráter promissor quando comparadas à métodos tradicionais, que se baseiam em arranjos como ELISA, devido ao potencial de miniaturização da reação, baixos volumes de amostras e reagentes, além de rápida análise com precisão, sensibilidade e especificidade. Entretanto, algumas desvantagens como o número de biomoléculas acessíveis a seres reconhecidas, a influência do eletrodo sobre a cinética de reação do complexo antígeno-anticorpo e, a possibilidade de ocorrer danos aos eletrodos devidos aos passos de lavagens entre as reações podem estar presentes. Assim, a utilização de beads magnéticas é interessante para reduzir os riscos do não funcionamento das reações eletroquímica (RICI et al., 2012). Já foi relatado o sucesso do acoplamento de partículas magnéticas em biossensores eletroquímicos, como por exemplo em eletrodo de platina para a captura e detecção proteínas alimentares (CADKOVA et al., 2015).

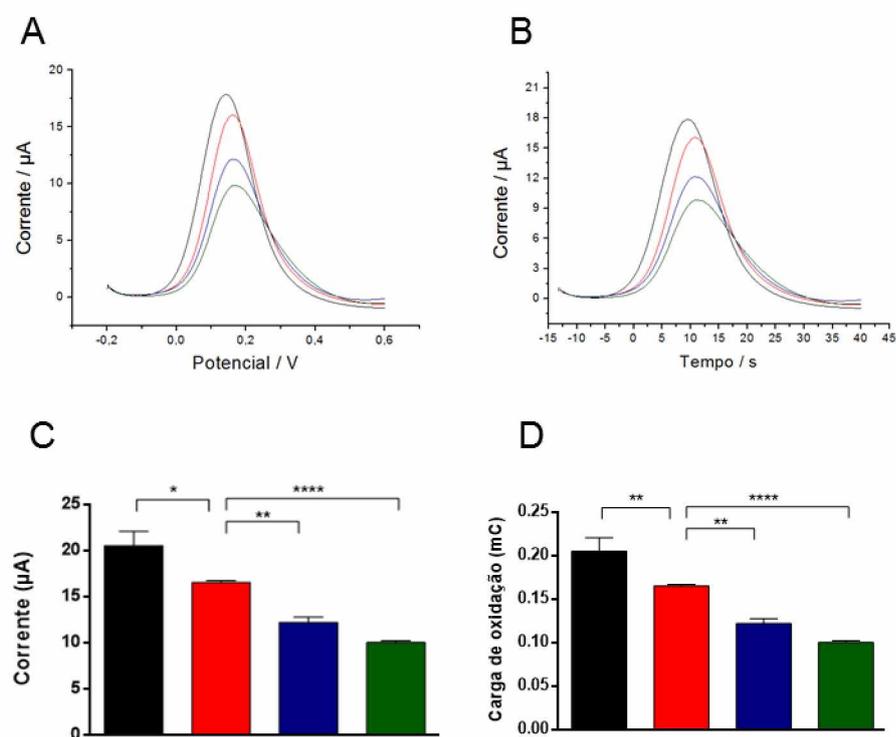


Figura 4. Detecção de rBlo t 5 em sistema de captura magnética (A) Voltamograma de pulso diferencial do biossensor usando beads magnéticas na detecção a proteína recombinante Blo t 5 como proteína alergênica; **(B)** Curva de corrente vs. tempo na detecção a proteína recombinante Blo t 5 como proteína alergênica por VPD; **(C)** Gráfico de barras representativo da corrente de pico obtida pelo biossensor usando beads magnéticas na detecção de Blo t 5 recombinante proteína alergênica; **(D)** Gráfico de barras representativo da carga de oxidação do biossensor usando beads na detecção da proteína Blo t 5 recombinante como proteína alergênica; Para todas as curvas (—) DRP-110STR, (—) DRP-110STR + Biossensor, (—)DRP-110STR + Biossensor + controle negativo e (—)DRP-110STR + Biossensor + controle negativo. A comparação da corrente e da carga de oxidação entre os grupos foi realizada com o teste One way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (**** p > 0,0001).

Para a confirmação da eficiência de detecção de rBlo t 5 no sistema de captura magnética, através do acoplamento da sonda anti-IgE humana biotinizada sensibilizada a proteínas rBlo t 5 e com soros de indivíduos IgE rBlo t 5, foi realizada a caracterização morfológica desses eletrodos pela técnica de AFM.

As imagens obtidas por AFM, evidenciaram a topografia durante a construção do biossensor usando beads magnéticas acopladas à anti-IgE humana biotinizada como sondas de reconhecimento biológico e as alterações da superfície durante a migração dessas, usando imã de neodímio. As medidas de AFM foram realizadas antes de efetuar as respectivas medidas eletroquímicas, usando os controles positivo e negativo para o alérgeno rBlo t 5 (Figura 5).

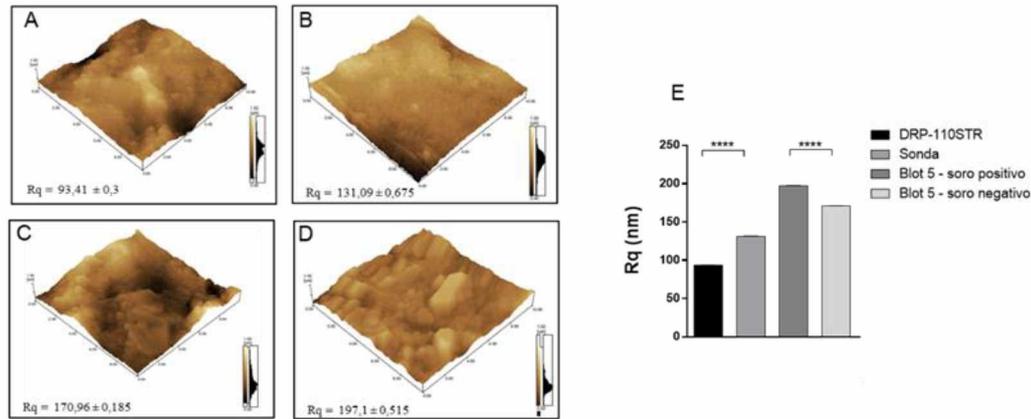


Figura 5. Caracterização morfológica de biossensores utilizados para detecção de rBlo t 5 utilizando beads magnéticas. (A) DRP-110STR; (B) Sonda do biossensor – anti-IgE humana biotinizada. (C) anti-IgE humana biotinizada sensibilizada com rBlo t 5 e soros de pacientes IgE negativos para rBlo t 5; (D) anti-IgE humana biotinizada sensibilizada com rBlo t 5 e soros de pacientes IgE positivos para rBlo t 5; (E) Gráfico de barras representativo dos valores de rugosidade (Rq - Roughness values) para biossensor sensibilizado com soros de pacientes positivos ou negativos para Blo t 5 e incubados com rBlo t 5. A comparação da rugosidade entre os grupos foi realizada com o teste One way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (** $p > 0,0001$).**

O comportamento topográfico do biossensor utilizando beads magnéticas com estreptavidina é semelhante ao observado para o biossensor convencional, todavia foram encontrados valores de rugosidade mais elevados em todas as imagens. Isso pode ser explicado, pois todas as medidas foram realizadas utilizando beads magnéticas de aproximadamente 4 μm adsorvidas na superfície do eletrodo DRP-110STR. Além disso, é interessante ressaltar o aumento de rugosidade observado após o reconhecimento do biossensor usando beads magnéticas à amostras de indivíduos com IgE específica para rBlo t 5 é estatisticamente significativo quando comparado com biossensor sensibilizado com amostras de indivíduos não atópicos, comprovando a especificidade do biossensor e corroborando com os resultados eletroquímicos obtidos por VPD.

3.4. Biossensor eletroquímico é capaz de detectar consecutivamente alérgenos de *B. tropicalis*, *D. farinae* e *D. pteronyssinus*

As técnicas eletroquímicas apresentam algumas vantagens em relação ao ELISA para detecção de amostras biológicas, como por exemplo os alérgenos, pois são mais sensíveis, permitem a obtenção do resultado em menor tempo e ainda

utilizam um menor volume de amostra. Nesse sentido, intentou-se fazer a detecção de múltiplos alvos em um único eletrodo, usando um bioeletrodo convencional, para minimizar perdas de espécies específicas, durante as múltiplas lavagens suportadas, e usando a voltametria de pulso diferencial para obter maior sensibilidade.

É sabido ácaros da poeira domiciliar desempenham um importante papel na patogênese de doenças alérgicas respiratórias, como a rinite e asma alérgica. Assim, foi desenvolvido um biossensor para detecção de anticorpos específicos para os alérgenos dos principais ácaros responsáveis em desencadear resposta alérgica em indivíduos atópicos: rBlo t 5, *B. tropicalis*, *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Para tal, foram obtidos voltamogramas após as adições sucessivas de alérgenos (Figura 6). A minimização de corrente após as adições sucessivas de diferentes antígenos, demonstra que o biossensor é capaz de identificar múltiplos alvos seletivamente (Figura 6A).

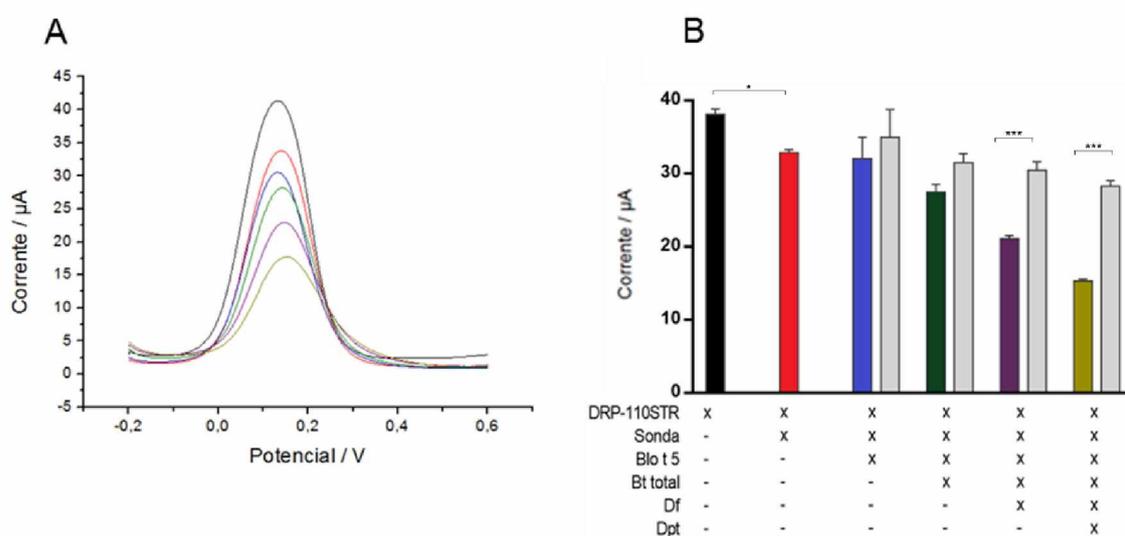


Figura 6. Desenvolvimento de um biossensor capaz de detectar múltiplos alérgenos. (A) Voltamograma de pulso diferencial do biossensor convencional utilizando eletrodo DRP-110STR (—) acoplado com anti-IgE humana biotinizada (—) para detecção consecutiva de proteína alergênica Blo t 5 recombinante (—), extratos de: *Blomia tropicalis* (—), *Dermatophagoides farinae* (—) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (—). **(B)** Gráfico de barras representativo da corrente de pico média obtida pelo biossensor convencional ao adicionar amostras de soro IgE negativa (—) ou positivas para os alérgenos de rBlo t 5 (—), *B. tropicalis* (—), *Dermatophagoides farinae* (—) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (—). A comparação da corrente entre os grupos foi realizada com o teste One way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (* $p > 0,005$; *** $p > 0,0001$).

A adição de amostras de soros de indivíduos IgE negativa para esses alérgenos testados, resultou em um o sinal de corrente de pico semelhante aquele registrado somente com biossensor na ausência de anticorpos e alérgenos alvos (Figura 6B - Barras vermelha e cinzas).

A diferença dos valores médios de corrente apresentados após a detecção de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* em amostras de indivíduos IgE positivo foi estatisticamente maior, quando comparados com aqueles dados de corrente das amostras de indivíduos com IgE negativa. Neste tipo de análise, também detectamos um tendência de redução nos valores médios de corrente para os soros positivos e os negativos para os alérgenos rBlo t 5 e Bt total, contudo sem atingir significância (figura 6B). Estes dados suportam a ideia que o biossensor eletroquímico apresenta uma maior capacidade de discriminar soros positividade para alérgenos de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* em amostras de indivíduos em comparação aos de *Blomia tropicalis*. Estes dados corroboram com a hipótese que o pool de soros utilizados de pacientes fortemente sensibilizados *D. farinae* e *D. pteronyssinus* possam produzir o fenômeno de maior sensibilidade do biossensor para detecção de anticorpos específicos para aeroalérgenos de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* ao invés de alérgenos de *Blomia tropicalis*.

Na atualidade a detecção de anticorpos IgE específicos a alérgenos particulares (isolados) podem fornecer informações valiosas, em comparação ao diagnóstico com extratos totais, para a determinação do perfil de sensibilização dos pacientes alérgicos e ainda auxiliar na seleção de alérgenos a serem utilizados em tratamentos no tratamento das doenças alérgicas, com particular atenção à imunoterapia específica para alérgenos. Portanto, as mudanças do diagnóstico convencional com extratos alergênicos para aqueles que empreguem alérgenos isolados (diagnóstico molecular), devem requerem na necessidade de infraestrutura complexa e ainda recursos humanos treinados que não estão disponíveis em todos os serviços de saúde (CHAPMAN et. al, 2015), particularmente em um país em desenvolvimento como o Brasil.

Além disso, a tecnologia de detecção de múltiplos alérgenos em um curto período de tempo é interessante para inovação da área de diagnóstico clínico. Desta forma, a mudança para o diagnóstico molecular envolve o emprego de

diferentes plataformas de diagnóstico para a detecção de anticorpos alérgenos-específicos que incorporem as tecnologias multiplex e ainda dispositivos inovadores que possam fornecer resultados do teste em 15 minutos, tempo equivalente para realizar um teste cutâneo no consultório de um alergista, sendo essa uma técnica menos invasiva e mais eficiente (CHAPMAN et. al, 2015).

Técnicas multiplex, como ImmunoCap ISAC utilizadas no diagnóstico de alergias, são capazes de detectar 112 alérgenos reconhecidos por IgE de indivíduos alérgicos. Apesar de possuir vantagens como necessitar de baixo volume de sangue dos pacientes alérgicos e conseguir detectar alto número de antígenos simultaneamente, é um método semi-quantitativo, realizado de forma manual que possui baixa sensibilidade e maior coeficiente de variação por possuir maior variabilidade na análise interensaio para determinados alérgenos (CANONICA et al., 2013).

Assim, nossos resultados estabelecem uma “*prova de conceito*” de um biosensor eletroquímico capaz de realizar a detecção rápida e sequencial anticorpos IgE específicos para de múltiplos aeroalérgenos de ácaros da poeira domiciliar utilizando um mesmo eletrodo e utilizando pequenos volumes de amostras. Esta plataforma inovadora poderá contribuir para o monitoramento de doenças alérgicas respiratória e ainda contribuir para conduta clínica na imunoterapia alérgeno-específica, favorecendo a promoção a saúde de pacientes com doenças alérgicas.

4. Conclusão

Nesse trabalho foi possível realizar a expressão e purificação de Blo t 5 recombinante e selecionar indivíduos com IgE específica para essa proteína, bem como para extrato total de *B. tropicalis*.

Além disso, foi desenvolvido um biossensor capaz de detectar proteínas alergênicas, como rBlo t 5 ou extrato total de *B. tropicalis*, em soros de indivíduos atópicos, utilizando o método de voltametria de pulso diferencial. Teste utilizando captura com beads magnéticas com estreptavidina acopladas à sonda do biossensor (anti-IgE biotinizada) e os sinais obtidos a partir de voltametria de pulso diferencial, além de diminuir o custo de análise devido a possibilidade de reutilização dos eletrodos, melhoram a especificidade da reação.

Por fim, foi possível o desenvolvimento de um biossensor, o qual foi capaz de detectar alérgenos de *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*, simultaneamente. Esses resultados são promissores para propor uma alternativa de diagnóstico para doenças alérgicas, substituindo ou complementando testes clínicos realizados rotineiramente, como teste cutâneo de puntura ou testes para mensuração sérica de anticorpos IgE alérgeno-específica, os quais podem ter resultado demorado além de serem dispendiosos.

Assim, plataformas utilizando biossensores podem ser uma alternativa que visa melhorar a especificidade do diagnóstico de doenças alérgicas, sendo esse um método sensível, de resposta rápida, e baixo custo.

REFERÊNCIAS

- Arruda, L. K., Fernandez-Caldas, E., Naspitz, C. K., Montealegre, F., Vailes, L. D., Chapman, M. D., 1995. *Int Arch Allergy Immunol* ,107, 456-457.
- Arruda, L.K., Rizzo, M.C., Chapman, M.D., Fernandez-Caldas, E., Baggio, D., Platts-Mills, T.A., Naspitz, C.K., 1991. *Clin Exp Allergy*, 21, 433-39.
- Čadková, M., Metelka, R., Holubová, L., Horák, D., Dvořáková, V., Bílková, Z., Korecká, L. 2015. *Anal. Biochem*, 484, 4-8.
- Carvalho, K. dos A., de Melo-Neto, O.P., Magalhães, F.B., Ponte, J.C., Felipe, F.A., dos Santos, M.C., dos Santos Lima, G., Cruz, Á.A., Pinheiro, C.S., Pontes-de-Carvalho, L.C., Alcantara-Neves, N.M. 2013, *BMC Immunol*, 14, 1.
- Chapman, M. D., Wuenschmann, S., King, E., Pomés, A. 2015. *Curr Allergy Asthma Rep*, 15, 1-7.
- Chua, K.Y., Cheong, N., Kuo, I.C., Lee, B.W., Yi, F.C., Huang, C.H., Liew, L.N., 2007. *Protein Pept Lett*, 14, 325-33.
- D'amato, G., Baena-Cagnani, C.E., Cecchi, L., Annesi-Maesano, I., Nunes, C., Ansotegui, I., D'amato, M., Liccardi, G., Sofia, M., Canonica, W. G., 2013. *Multidiscip Respir Med*. 08, 1-12.
- Darain, F., Park, S. U., Shim, Y. B., 2003., *Biosens Bioelectron* , 18, 773-780.
- Dhami, S., Nurmatov, U., Roberts, G., Pfaar, O., Muraro, A., Ansotegui, I.J., Calderon, M., Cingi, C., Demoly, P., Durham, S., van Wijk, R.G., Halken, S., Hamelmann, E., Hellings, P., Jacobsen, L., Knol, E., Linnemann, D.L., Lin, S., Maggina, V., Oude-Elberink, H., Pajno, G., Panwanker, R., Pastorello, E., Pitsios, C., Rotiroti, G., Timmermans, F., Tsilochristou, O., Varga, E.M., Wilkinson, J., Williams, A., Worm, M., Zhang, L., Sheikh, A., 2016. *Clin Transl Allergy*, 6, 1.
- Díaz-González, M., Hernández-Santos, D., González-García, M. B., Costa-García, A. 2005, *Talanta*, 65, 565-573.
- Fernández-Caldas, E., Puerta, L., Mercado, D., Lockey, R.F., Caraballo, L.R., 1993. *Clin Exp Allergy*, 23, 292-97.
- Ikonomova, S. P., He, Z., Karlsson, A. J., 2016. *J. Immunol. Methods*.
- Jutel, M., Akdis, M., Blaser, K., Akdis, C. A., 2006. *Allergy*, 61, 796-807.
- Kelly, L.A., Erwin, E.A., Platts-Mills, T.A.E., 2012. *Curr Opin Pulm Med*,18, 29-34.
- Kłos-Witkowska, A., 2016. *Acta Biochim Pol*. 64.
- Kowalski, M. L., Jutel, M., 1998. *Allergy*, 53, 485-492.
- Lai X, Li J., Xiao, X., Liu E., Zhang, C., Wang, H., Gjesing, B., Zhong, N., Spangfort, M.D. 2012. *Int Arch Allergy Immunol*, 160, 37-46.
- Larché, M., 2006. *Curr Opin Immunol*, 18, 745-750.
- Llerena, L. P., Fernández-Caldas, E., Caraballo Gracia, L.R., Lockey, R.F., 1991. *J Allergy Clin Immunol*, 88, 943-50.

- Mehrotra, P., 2016. *J Oral Biol Craniofac Res.* 6, 153-159.
- Mothes, N., Heinzkill, M., Drachenberg, K. J., Sperr, W. R., Krauth, M. T., Majlesi, Y., Valenta, R., 2003. *Clin Exp Allergy*, 33, 1198-1208.
- Ozdemir, C., Kucuksezer, U. C., Akdis, M., Akdis, C. A., 2011. *Clin Exp Allergy*, 41, 1226-1234.
- Pereira, E. A. L., Silva, D. A. O., Cunha-Júnior, J. P., Almeida, K. C., Alves, R., Sung, S. J., Taketomi, E. A., 2005. *Allergy*, 60, 401-406.
- Platts-Mills, T.A.E., Commins, S.P., 2013, *Curr Opin Immunol.* 25, 769-74.
- Queirós, M. G. J., Silva, D. O., Alves, R., Chiba, H. F., de Amaral, V. S., De Almeida, K. C., de Sousa Moreira, P. F., 2008. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 18, 84.
- Ricci, F., Adornetto, G., Palleschi, G., 2012. *Electrochim Acta*, 84, 74-83.
- Sánchez, J. L. A., Fragoso, A., Joda, H., Suárez, G., McNeil, C. J., O'Sullivan, C. K., 2016. *Anal. Bioanal. Chem.*, 1-10.
- Santos, P. S., Nascimento, R., Rodrigues, L. P., Santos, F. A., Faria, P. C., Martins, J. R., Goulart, L. R., 2012. *PloS one*, 7, e33045.
- Sharma, S., Raghav, R., O'Kennedy, R., Srivastava, S., 2016. *Enzyme Microb Technol*, 89, 15-30.
- Siman, I. L., de Aquino, L. M., Ynoue, L. H., Miranda, J. S., Pajuaba, A. C. A. M., Cunha-Júnior, J. P., Taketomi, E. A., 2013 *Clin Dev Immunol*, 2013.
- Smith, P., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., Klenk, D. C., 1985. *Anal. Biochem.*, 150, 76-85.
- Thomas, W.R., Hales, B.J., Smith, W.A., 2010. *Trends Mol Med.* 16, 321-28.
- Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., Behrendt, H., 2009. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 558-566.
- Zhu, Q., Chai, Y., Zhuo, Y., Yuan, R., 2015. *Ann Allergy Asthma Immuno*, 68, 42-48.