



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

**Reatividade de anticorpos IgE a antígenos glicosilados
derivados de *Dermatophagoides farinae* em
pacientes atópicos**

Leandro Hideki Ynoue

Uberlândia – MG

Fevereiro - 2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E

PARASITOLOGIA APLICADAS

**Reatividade de anticorpos IgE a antígenos glicosilados
derivados de *Dermatophagoides farinae* em
pacientes atópicos**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como parte das
exigências para obtenção de título de mestre

Leandro Hideki Ynoue
Mestrando

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Orientador

Profa. Dra. Margareth Leitão Gennari Cardoso
Co-Orientadora



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

**Reatividade de anticorpos IgE a antígenos glicosilados
derivados de *Dermatophagoides farinae* em
pacientes atópicos**

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

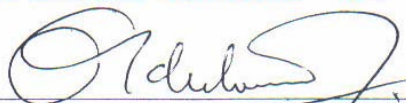
Uberlândia, 22 de fevereiro de 2006.



Prof. Dr. Dirceu Solé – UNIFESP/EPM



Prof. Dr. Milton Vieira Coelho – UFU



Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi – IC/BIM/UFU

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Y53r Ynoue, Leandro Hideki, 1980-
Reatividade de anticorpos IgE a antígenos glicosidados derivados de
Dermatophagoides farinae em pacientes atópicos / Leandro Hideki Yno-
ue. - Uberlândia, 2006.
62f. : il.
Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
ma de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Alergia - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Universidade Fede-
ral de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasi-
tologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616-056.3

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Ernesto Akio Taketomi, não apenas pela orientação, mas também pela amizade e incentivo profissional.

À professora Dra. Margareth Leitão Gennari Cardoso por sua importante colaboração no estudo, principalmente no que se diz respeito à cromatografia.

À Deise Aparecida de Oliveira e Silva, pela sua completa dedicação ao trabalho, carinho por todos e sua incrível disposição em esclarecer nossas dúvidas.

À Dra. Mônica Camargo Sopelete pela paciência, amizade e os grandes ensinamentos não só didáticos, mas também de vida.

Ao Dr. Sang Sun Joe por ceder gentilmente o material antigênico necessário para a realização do estudo.

Ao grande amigo de longa data Rafael de Oliveira Resende, pela grande amizade construída durante todos os anos que estivemos juntos e que de tanta convivência é como se fosse um irmão.

Aos demais amigos do grupo de Alergia: Priscila, Ronaldo, Karine, Cristiane, Juliana, Gesmar e Sheila, e aos amigos do Laboratório de Imunologia: Cristina, Fernando, Janaína, Carolina, Gabriele e Ana Cláudia pelos momentos de alergia e o companheirismo.

Aos secretários da Pós-graduação João Martins Neto, Lucileide de Freitas Queiroz Damásio e ao secretário do Laboratório de Imunologia Max Aor Marques por estarem sempre à disposição.

Aos meus familiares por entenderem a minha ausência em alguns momentos e por me darem à oportunidade de poder realizar mais esta etapa.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram indiretamente com este estudo, mesmo que por um segundo apenas.

E principalmente a Deus, por proporcionar todos essas amizades com os quais pude crescer tanto em conhecimento quanto principalmente em pessoa.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

SUMMARY

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Doenças alérgicas.....	1
1.2 – Fisiopatologia da resposta imune alérgica.....	2
1.3 – Ácaros da poeira domiciliar.....	4
1.4 – <i>Dermatophagoides farinae</i> e seus alérgenos.....	6
1.5 – Antígenos glicosilados.....	9
1.6 – Lectinas e Concanavalina A.....	9
2 – OBJETIVOS	13
3 – MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 – Aspectos éticos.....	14
3.2 – Local do estudo.....	14
3.3 – Extração e fracionamento dos alérgenos de <i>Dermatophagoides farinae</i>	15
3.3.1 – Preparação do extrato alergênico.....	15
3.3.2 – Fracionamento dos alérgenos derivados do extrato total de <i>D. farinae</i>	16
3.3.2.1 – Preparação da coluna.....	16
3.3.2.2 – Fracionamento do extrato Df total.....	17
3.4 – Métodos analíticos.....	17
3.4.1 – Dosagem de proteínas.....	17
3.4.2 – Dosagem de Carboidratos.....	18
3.5 – Extratos antigênicos de ácaros para teste cutâneo de puntura (TCP).....	18
3.6 – Pacientes e indivíduos não atópicos.....	18
3.7 – Termo de consentimento e avaliação clínica e física dos indivíduos do estudo.....	19
3.8 – Teste cutâneo de puntura (TCP).....	20
3.9 – Coleta de sangue.....	20
3.9.1 – Critérios de exclusão de indivíduos do estudo.....	21
3.10 – Ensaio imunoenzimático (ELISA) para IgE sérica anti <i>D. farinae</i>	22
3.11 – Ensaio imunoenzimático (ELISA) de inibição competitiva.....	23
3.12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	23
3.13 – <i>Immunoblotting</i> para detecção de IgE anti- <i>D. farinae</i>	25
3.14 – Normas de biossegurança.....	26
3.15 – Análise estatística.....	26
4 – RESULTADOS	28
4.1 – Obtenção das frações de <i>D. farinae</i> não ligantes e ligantes de ConA.....	28
4.2 – Dados gerais dos pacientes e teste cutâneo de puntura.....	29

4.3 – Níveis de anticorpos IgE específico ao extrato Df total, e as suas frações Df-nConA e Df-ConA.....	31
4.4 – Especificidade de anticorpos IgE ao extrato Df total e a fração Df-ConA.....	34
4.5 – Perfil protéico e componentes de Df total e Df-ConA ligantes de IgE.....	36
5 – DISCUSSÃO.....	39
6 – CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS	
ANEXO 1.....	58
ANEXO 2.....	59
ANEXO 3.....	60
ANEXO 4.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC/HRP	complexo estreptavidina-biotina-peroxidase
ABTS	<i>2'2'-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i>
BBS	solução salina tamponada com borato
BSA	soroalbumina bovina
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
Bt total	extrato total de <i>Blomia tropicalis</i>
°C	grau Celcius
CD1	família de moléculas MHC classI-like
CEP	comitê de ética em pesquisa
cm	centímetro
CNS	Conselho Nacional de Saúde
Con A	Concanavalina A
CONEP	Conselho nacional de ética em pesquisa
Der f 1	Alérgeno do grupo 1 de <i>Dermatophagoides farinae</i>
Der f 2	Alérgeno do grupo 2 de <i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p 1	Alérgeno do grupo 1 de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
DF+	grupo de pacientes alérgicos a <i>Dermatophagoides farinae</i>
Df-ConA	fração ligante de Concanavalina A
Df-nConA	fração não ligante de Concanavalina A
Df total	extrato total de <i>Dermatophagoides farinae</i>
D.O.	Densidade óptica
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Dpt 4	Alérgeno de <i>D. pteronyssinus</i> de 244 kDa
Dp total	extrato total de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DP	desvio-padrão
EAACI	Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
g	grama
g	força relativa da gravidade
GM-CSF	fator de estimulação de colônias de monócitos granulocíticos
h	horas
H1	receptor de histamina tipo 1
H2	receptor de histamina tipo 2
H3	receptor de histamina tipo 3
H4	receptor de histamina tipo 4
HCl	ácido clorídrico
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
I ₅₀	concentração necessária para atingir 50% de inibição
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	índice ELISA
IgE	imunoglobulina E
IL	Interleucina
ISAAC	The International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee
kDa	kilodalton
M	molaridade
m.g.	média geométrica

mg	miligrama
MG	Minas Gerais
µg	micrograma
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
Mr	massa molecular de referência
NA	grupo de indivíduos não atópicos
NaCl	Cloreto de sódio
nm	nanômetro
p	significância estatística
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)
PBS-T-BSA	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e soroalbumina bovina a 1%
PBS-TM	solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e molico a 1%
pH	potencial de hidrogênio iônico
r	grau de correlação entre duas variáveis
Rf	Mobilidade relativa
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SUS	Sistema Único de Saúde
TCP	teste cutâneo de puntura
TH2	perfil de resposta caracterizado pela presença de citocinas que induzem a proliferação de eosinófilos e a produção de IgE
TT	toxóide tetânico
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

RESUMO

Introdução: Os componentes de espécies de ácaro encontrados na poeira de casas mostraram um importante papel nas doenças respiratórias. Muitos desses componentes são glicosilados e algumas lectinas, como a Concanavalina A (ConA) mostraram afinidade à aquelas moléculas..

Objetivos: Determinar os níveis de IgE específica ao extrato Df total à fração Df-ConA em pacientes alérgicos e sua reatividade cruzada entre os extratos brutos de *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* por ELISA e ELISA.de inibição respectivamente. A presença de componentes alergênicos no extrato Df total e na fração Df-ConA reativos à IgE por *Immunoblot* também foi verificada.

Material e Métodos: A cromatografia de afinidade em coluna de afinidade ConA-Sepharose foi usada para obter frações glicosiladas com resíduos de α -D-manose and β -D-glicose do extrato bruto de *Dermatophagoides farinae* (Df total). As frações Df-nConA e Df-ConA e também o extrato Df total foi usado para avaliar a reatividade de IgE por ELISA e Immunoblot e soro de 41 pacientes com histórico de rinite alérgica e sensíveis ao ácaro e 31 indivíduos não alérgicos selecionados pelo Teste Cutâneo de Puntura.

Resultados: Todos os pacientes foram positivos ao *D. farinae* e *D. pteronyssinus*, e 93% de co-positividade à *B. tropicalis*. O ELISA mostrou uma grande positividade em todos os extratos, mas níveis mais altos de IgE foram encontrados no extrato Df total e na fração Df-nConA quando comparados à fração Df-ConA. Entretanto, ambas as frações Df-nConA e Df-ConA, mostraram uma correlação positiva com o extrato Df. O ELISA de inibição mostrou uma alta reação cruzada entre os extratos de *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*. Alta frequência de IgE reativa a bandas de alta massa molecular aparente na fração Df-ConA foram observadas pelo Immunoblot.

Conclusão: *Dermatophagoides farinae* representa uma importante fonte de alérgenos glicosilados com afinidade a Concanavalina A, os quais estão envolvidos nos mecanismos de indução da IgE na rinite alérgica.

Palavras-Chave: Rinite alérgica, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, Concanavalina A, Reatividade cruzada, Glicoconjugados

SUMMARY

Background: Components from species of mites found in the house dust showed an important role in respiratory diseases. Many of these components are glycosylated and some lectins, like Concanavalin A (ConA) showed an affinity to those molecules.

Objectives: To determine the levels of specific IgE to Df crude extract and Df-ConA bound fraction in allergic patients and their cross-reaction between *D. pteronyssinus* and *B. tropicalis* crude extracts by ELISA and Inhibition ELISA, respectively. The presence of allergic components in Df crude extract and Df-ConA bound reactive to IgE by *Immunoblot* also was verified.

Methods: Concanavalin A affinity chromatography was used to obtain glycosylated fraction with α -D-mannose and β -D-glucose residues from *Dermatophagoides farinae* (Df) crude extract. ConA-unbound and ConA-bound fractions and also Df crude extract were used to evaluate IgE reactivity by ELISA and Immunoblot in sera from 41 mite-sensitive patients with allergic rhinitis history and 31 non-allergic subjects selected by skin prick test.

Results: All allergic patients were positive SPT to *D. farinae* and *D. pteronyssinus*, and 93% of co-positivity to *B. tropicalis*. ELISA showed a great positivity in all extracts, but higher levels of IgE were found in Df crude extract and ConA-unbound fractions when comparing with ConA-bound fraction. However, both ConA-unbound and ConA-bound fractions showed a significant positive correlation with Df crude extract. Inhibition ELISA assay showed a high cross-reactivity between *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts. High frequency IgE reactivity to apparently high molecular bands in the ConA-bound fraction was observed by Immunoblot analysis.

Conclusion: *Dermatophagoides farinae* represent an important source of glycosylated allergens with Concanavalin A affinity which are involved in the mechanisms of IgE induction in allergic rhinitis.

Key Words: Allergic rhinitis · *Dermatophagoides farinae* · *Dermatophagoides pteronyssinus* · *Blomia tropicalis* · Concanavalin A · Cross-reactivity · Glycoconjugate

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Doenças alérgicas

A prevalência de doenças alérgicas aumentou consideravelmente nos últimos 20-30 anos (ISAAC, 1998; SLY, 1999), tem aumentado dessa forma doenças como asma, rinite alérgica e dermatite atópica se enquadraram dentre os principais problemas de saúde da sociedade contemporânea. Esse aumento ocorre devido à mudança de alguns hábitos e também pela existência de móveis e utensílios que provocam um aumento da poluição doméstica, e que possivelmente, têm contribuído para um maior número de indivíduos alérgicos. A maior permanência das pessoas no ambiente doméstico ou em ambientes fechados, contendo principalmente carpetes, cortinas, brinquedos felpudos e a presença constante ou não de animais domésticos, são fatores para o aumento desse tipo de poluição (PLATTS-MILLS, 1996).

O termo hipersensibilidade poderia ser usado para descrever objetivamente sintomas reprodutíveis ou sinais iniciados pela exposição a um estímulo determinado a uma dose tolerada por indivíduos saudáveis. Alergia é uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos específicos, podendo ser mediada por anticorpo ou por células. Na maioria dos pacientes com sintomas alérgicos na mucosa das vias aéreas e gastrointestinais, os anticorpos pertencem a isótipos de IgE, podendo-se dizer então, que esses pacientes tem alergia mediada por IgE (JOHANSSON, 2004).

Segundo Terreehorst et al. (2002), asma e dermatite atópica são altamente associadas com a rinite alérgica, sendo esta considerada também um fator de risco para a asma. Clinicamente, a rinite alérgica ocorre devido à exposição a um alérgeno, causando inflamação da membrana mucosa nasal, e

resultando em sintomas característicos como espirro, coriza e bloqueio das vias aéreas superiores (JOHANSSON, 2004). Além da exposição, vários estudos têm relatado que os fatores genéticos são um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas sendo que vários genes ou conjunto de genes poderiam influenciar a resposta alérgica em diferentes pacientes (BARNES; MARSH, 1998).

A rinite alérgica é a condição crônica alérgica mais comum encontrada na prática médica. Sua incidência é crescente em paralelo com outras doenças mediadas por IgE, afetando de 10 a 30% dos adultos e acima de 40% das crianças. Metade dos pacientes com rinite alérgica perene apresentam sintomas em mais de 4 meses por ano, sendo que 20% destes são sintomáticos em mais de 9 meses ao ano (BERGER, 2003).

1.2 - Fisiopatologia da resposta imune alérgica

Os principais aspectos que diferenciam a inflamação alérgica dos outros tipos de inflamação, segundo Varney et al. (1992), são a síntese de IgE, ativação de mastócitos dependentes de IgE e infiltração da mucosa brônquica com linfócitos e eosinófilos.

A reação alérgica ocorre quando duas ou mais moléculas de IgE se ligam a um antígeno específico, e o receptores de IgE na superfície da célula iniciam os eventos de sinalização intracelular (COSTELLO et al., 1996). Estes sinais ativam a célula que começam a liberar mediadores pré-formados como histamina, proteases e mediadores derivados de lipídios como leucotrienos e prostaglandinas, produzindo uma reação inflamatória aguda com sintomas de asma ou rinite (METZGER, 1999; RAVETCH; KINET, 1991).

Assim como as outras doenças atópicas (asma, eczema e alergia alimentar), a rinite alérgica é parte de uma complexa doença sistêmica. Minutos após a exposição a um alérgeno, mastócitos sensibilizados liberam mediadores que resultam em sintomas imediatos, bem como o recrutamento de células inflamatórias adicionais, causando sintomas tardios e mantendo o processo da doença (GELFAND, 2004).

Asma e rinite alérgica compartilham imunopatologias e patofisiologias comuns (BOUSQUET; CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001; SIMONS, 1999). Os achados em tecido nasal e brônquico são similares, e linfócitos Th2, mastócitos, e eosinófilos estão envolvidos em ambas as condições. Tanto na rinite alérgica quanto na asma, as respostas das fases imediata e tardia podem acontecer, e o estado hiperresponsivo nas passagens nasais e nas vias aéreas em resposta a um desafio alergênico, também podem ser demonstrados (TOGIAS, 2003).

Poucos minutos após o contato com o alérgeno, a IgE sensibiliza mastócitos que degranulam e liberam uma série de mediadores pré-formados e recém sintetizados. Muitos destes mediadores iniciam sintomas característicos de rinite alérgica, incluindo espirro, coceira, coriza e congestão. Estas respostas da fase imediata são também atribuídas à liberação de leucotrienos, prostaglandinas, histamina e citocinas (WHITE; KALINER, 1992; TOGIAS, 2000). A histamina tem sido associada como causadora virtual de todas as respostas da fase imediata, através da ligação ao receptor H1, bem como pelos receptores H2, H3 e H4, que podem aumentar a expressão de moléculas de adesão e a produção de citocinas pró-inflamatórias (GELFAND, 2002).

Na fase tardia da rinite alérgica, a congestão se torna mais proeminente. Como resultado da liberação de citocinas ou mediadores, a mucosa nasal se acumulará de células inflamatórias, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, e células mononucleares, que sustentará a reação inflamatória da mucosa nasal (BOUSQUET; CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001; LEDFORD; LOCKEY, 1998; BASCOM et al., 1988). Os eosinófilos são células predominantes no processo inflamatório crônico e caracteriza a resposta na fase tardia. O influxo de eosinófilos correlaciona com o desenvolvimento e progressão desses sintomas (HARLIN et al., 1988; S. JULIUSSON et al., 1992; PIPKORN; KARLSSON; ENERBACK, 1988). Os eosinófilos liberam uma porção de mediadores, incluindo leucotrienos, proteínas catiônicas, peroxidase eosinofílica e proteínas básicas importantes e podem servir como principal fonte de IL-3, IL-5, GM-CSF e IL-13 (BJORNSDOTTIR; CYP CAR, 1999). Os leucotrienos, por sua vez possuem muitas atividades que o ligam a sintomatologia de rinite alérgica, como o recrutamento e ativação de eosinófilos (WANG et al., 1994; WANG et al., 1995; SPADA et al., 1997).

Vários estudos sugerem que a exposição a alérgenos de ácaros de poeira domiciliar pode ser uma das causas primárias ou um fator de risco no desenvolvimento da asma, e também pode agir como um sinal para exacerbação dos sintomas (PLATTS-MILLS; DE WECK, 1989; PLATTS-MILLS et al., 1992; SQUILLACE et al., 1997).

1.3 - Ácaros da poeira domiciliar

A poeira domiciliar consiste de partículas em suspensão de fontes orgânicas e inorgânicas, sendo constituída de um aglomerado de fibras

vegetais, fibras de carpetes, partículas de móveis estofados, areia, terra, peças do vestuário, escamação humana, restos alimentares, resíduos químicos e produtos de vários microorganismos (bactérias, vírus e fungos) e macroorganismos (animais domésticos, insetos e aracnídeos) (SELTZER, 1994).

Ao contrário do que algumas pessoas acreditam, os ácaros de uma forma geral, não são tão próximos filogeneticamente dos insetos, e diferem muito na sua morfologia e fisiologia. Estes microorganismos geralmente medem entre 0,1 e 0,6 mm, e não são visíveis a olho nu. Suas formas adultas possuem corpos ovais, de cor creme a um branco translúcido, possuem 4 pares de patas e são dióicos. O período para se completar o ciclo de desenvolvimento do ácaro é incerto, em torno de 2 a 6 semanas. Estime-se que cada fêmea produza de 40 a 100 ovos durante os seus 2 a 5 meses de sobrevivência (MILIÁN; DÍAZ, 2004).

Alérgenos derivados de ácaros da poeira domiciliar têm sido reconhecidos como uma importante causa na indução da síntese de IgE e as espécies de ácaros da família Pyroglyphidae (*Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*) constituem a fauna predominante na poeira domiciliar das regiões tropicais e temperadas do mundo todo (PLATTS-MILLS et al., 1992). Outro ácaro muito importante nessas regiões, *Blomia tropicalis*, da família Echimipodidae é também responsável pela sensibilização mediada por IgE em pacientes com asma e rinite alérgica (ARRUDA; CHAPMAN, 1992). Segundo Platts-Mills; De Weck (1989), os ácaros *Dermatophagoides* spp. se alimentam principalmente de descamações da pele humana e de animais domésticos, sendo que em suas fezes estão presentes os seus principais

componentes capazes de induzir uma resposta imune e causar alergia em indivíduos susceptíveis e que geralmente são proteínas ou glicoproteínas.

1.4 - *Dermatophagoides farinae* e seus alérgenos

O ácaro *D. farinae* tem sido reconhecido como importante fonte de alérgenos em todo o mundo, exercendo um relevante papel nas doenças alérgicas, particularmente asma e rinite alérgica, em indivíduos geneticamente predispostos. O crescimento e a proliferação do ácaro são dependentes de diversas condições, principalmente da temperatura e umidade, os quais parecem ser os fatores decisivos e limitantes para o seu desenvolvimento (DUFF; PLATTS-MILLS, 1992).

A classificação taxonômica de *D. farinae*, segundo Arlian; Platts-Mills (2001), pode ser resumida em: Reino Metazoa; Filo Artropoda; Classe Arachnida; Ordem Acari; Família Pyroglyphidae; Gênero *Dermatophagoides*; Espécie *Dermatophagoides farinae*.

A nomenclatura dos alérgenos é dada de acordo com um guia publicado pela *World Health Organization/International Union of Immunologic Sciences/Allergen Nomenclature Sub-committee* (KING et al., 1995). O nome incorpora as três primeiras letras do gênero e a primeira letra da espécie mais um numeral arábico (o qual pode denotar alérgenos homólogos estruturalmente). Por exemplo, alérgenos estruturalmente similares (antígenos do grupo 1) oriundos de duas espécies de ácaros (*D. pteronyssinus* e *D. farinae*) são designados Der p 1 e Der f 1, respectivamente.

Alguns alérgenos possuem fatores essenciais para sua alergenicidade. Estudos anteriores têm mostrado que alérgenos com atividade enzimática

sensibilizam a superfície da mucosa facilitando o seu próprio reconhecimento (BUFE, 1998). Os alérgenos possuem diferentes estruturas e são classificadas em diferentes famílias de proteínas de acordo com as suas funções biológicas, sugerindo que exista pouca ou nenhuma característica estrutural comum ou propriedade intrínseca entre os alérgenos tornando-os alergênicos (CHAPMAN et al., 2000). Entretanto parece existir uma importante conexão entre a função biológica, integridade estrutural e capacidade de ligação à IgE para um alérgeno em especial manter sua alergenicidade (BUFE, 1998). Para alguns alérgenos tem sido demonstrado que a ligação efetiva à IgE depende da integridade da sua estrutura tri-dimensional. Por exemplo, a dissolução das pontes dissulfeto de Der f 2 pela mutação de dois resíduos de aminoácido resultou na completa perda da atividade ligante de IgE (TAKAI et al., 1997). Outros fatores não podem ser deixados de lado como participantes da sensibilização na reação alérgica frente a um alérgeno, como predisposição genética ou defeitos na regulação das respostas de IgE de um indivíduo, infecções virais e o grau de exposição (BUFE, 1998; ROBINSON et al., 1997).

Os alérgenos de ácaro melhor estudados são aqueles do grupo 1, os quais foram identificados como cisteína protease. Segundo Stewart; Robinson (2003), outras proteínas com poder alergênico são alérgenos do grupo 3 (serina proteases), grupo 4 (amilase), grupo 6 (quimiotripsina-like protease) grupo 10 (tropomiosina – proteína estrutural) e os alérgenos dos grupos 2, 5, 7 e 12 possuem função biológica desconhecida. Algumas das principais características bioquímicas de alérgenos de *D. farinae* e a frequência com que a IgE é reconhecida em soros de pacientes alérgicos em alguns trabalhos estão apresentadas no QUADRO 1.

Alérgeno	Identidade bioquímica ou homologia	Potenciais sítios de glicosilação	Massa molecular (kDa)	Frequência de ligação à IgE (%)
Der f 1	Cisteína protease; homologia com: papaína, actidina, catepsina B e H	1	25	80
Der f 2	Função desconhecida; homologia com a proteína putativa epididimal humana	-	14	80
Der f 3	Tripsina; homologia com Der f 6 e Der p 6, e outras tripsinas de mamíferos e invertebrados	-	25	16-100
Der f 6	Quimiotripsina; homologia com Der f 3 e Der p 3, além de quimiotripsinas de mamíferos e invertebrados	-	25	40
Der f 7	Função e sítios de clivagem desconhecidos	1	22	50
Der f 10	Tropomiosina; homologia com tropomiosinas de outros invertebrados	ND	33	50-95
Der f 11	Paramiosina; homologia com paramiosinas de outros invertebrados	4	98	80
Der f 14	Semelhante a apolipofirina; identidade com M-177	ND	177 (variável)	90
Der f 15	98 kDa Quitinase	1	98	90
Der f 16	Gelsolina/vilina; homologia com a família da gelsolina	ND	40	ND
Der f 17	Alérgeno ligante de cálcio	4	40	(baixa)
Der f 18	60 kDa Quitinase	ND	60	ND

QUADRO 1. Propriedades bioquímicas dos alérgenos de *D. farinae*.

FONTE: Kawamoto et al. (2002); Stewart e Thompson (1996); Thomas, Smith e Hales (2004); www.allergen.org (2005). - ausente; ND não determinado.

Até o presente momento, mais de quinze proteínas de *D. farinae* foram identificadas como alérgenos potenciais e a maioria deles são proteínas de baixo peso molecular ou glicoproteínas com estrutura diversa e funções biológicas distintas (TSAI et al., 1998).

1.5 - Antígenos glicosilados

Muitas proteínas alergênicas são glicosiladas, aumentando a possibilidade que o grupo glicosil pode contribuir para sua alergenicidade. Isso se torna potencialmente relevante considerando a alergenicidade de proteínas transgênicas, das quais os padrões de glicosilação podem diferir substancialmente de sua correspondente nativa (JENKINGS; PAREKH; JAMES, 1996).

A maioria dos alérgenos alimentares são glicoproteínas (BURKS; SAMPSON; BANNON, 1998) e as estruturas de carboidrato dos alérgenos alimentares vegetais em particular são conhecidos como importantes epitopos de IgE (FÖTISCH et al., 1999; WILSON et al., 1998).

Antígenos glicosilados têm sido reconhecidos com papel crucial em diferentes patologias, particularmente entre os fungos patogênicos, nos quais têm se destacado altamente imunogênicos a gp43, principal glicoproteína de *Paracoccidioides brasiliensis* (PUCCIA et al., 1994); o componente de 105 kDa de *Cryptococcus neoformans*, manoproteína envolvida na resposta imune mediada por células (PITZURRA et al., 1997); a glicoproteína de 70 kDa de *Histoplasma capsulatum*, apresentando correlação entre antigenemia (antígeno presente no sangue) e terapia (GOMEZ et al., 1999).

No estudo de doenças atópicas, componentes glicosilados ricos em manana, carboidrato derivado de *Candida albicans*, são reconhecidos por anticorpos IgE de pacientes com manifestações alérgicas, incluindo asma, rinite e dermatite atópica (SAVOLAINEN, 1995).

1.6 - Lectinas e Concanavalina A

A palavra lectina (de *lectus*, o participio passado de *legere*, selecionar ou escolher) (BOYD; SHAPLEIGH, 1954) é definida como carboidrato ligante de proteínas, exceto enzimas ou anticorpos (BARONDES, 1988). As lectinas interagem com carboidratos não covalentemente de uma maneira geralmente reversível e altamente específica (LIENER; SHARON; GOLDSTEIN, 1986). As lectinas classicamente possuem dois ou mais sítios ligantes de carboidratos e se interagem por meio de forças de Van der Waals, que embora relativamente fracas, são frequentemente numerosas, contribuindo significativamente para a ligação total. As lectinas de leguminosas representam a maior e mais estudada família das lectinas. Em torno de 100 membros foram caracterizados, quase todos isolados de sementes de plantas (KONAMI, 1995).

A Concanavalina A (Con A), uma lectina de feijão (*Canavalia ensiformis*), é um dos principais membros dessa família, e comumente se liga a α -D-manose e β -D-glucose e resíduos relacionados estereoquimicamente (SCRIBA, 2004). De acordo com Lloyd; Bitton (1971), a Con A imobilizada em agarose, mostra-se como uma ferramenta de fundamental importância para isolamento de polissacarídeos e glicoproteínas.

A ConA tem sido frequentemente utilizada como ferramenta no isolamento de glicoconjugados (NILSEN et al., 1990; GUPTA et al., 1996; NIGAM; GHOSH; SARMA, 2003), e a reatividade da IgE a estes componentes isolados também constitui um alvo em pesquisas envolvendo doenças alérgicas (GUPTA et al., 2004). Entretanto, poucos estudos foram conduzidos, até o momento, relacionando estes epítomos glicosilados à alergia a ácaros da poeira domiciliar. Os primeiros alérgenos glicosilados de *D. farinae* foram isolados por cromatografia de afinidade de ConA-Sepharose (BALDO;

UHLENBRUCK, 1977) e, mais tarde, esta lectina também foi utilizada no isolamento de um antígeno de alta massa molecular, identificado como Dpt 4 (244 kDa), de *D. pteronyssinus* (STEWART; TURNER, 1980). Apesar disso, nenhum destes estudos demonstraram um perfil de proteínas ligantes de ConA reconhecidas pela IgE de pacientes alérgicos, bem como a reatividade cruzada destes componentes com alérgenos de outras espécies de ácaros de importância clínica.

O ácaro *Dermatophagoides farinae* tem sido reconhecido como importante fonte de alérgenos em todo o mundo, exercendo um relevante papel nas doenças alérgicas, particularmente asma e rinite alérgica, em indivíduos geneticamente predispostos destas regiões. O crescimento e a proliferação do ácaro são dependentes de diversas condições, principalmente da temperatura e umidade, os quais parecem ser os fatores decisivos e limitantes para o seu desenvolvimento (DUFF; PLATTS-MILLS, 1992). Estudos anteriores realizados em Uberlândia (SOPELETE et al., 2000) e um estudo realizado em Goiânia (SILVA et al., 2005) sobre a exposição de indivíduos à alérgenos de ácaros da poeira doméstica, demonstraram maior concentração de Der f 1 nas poeiras doméstica e de cinemas analisadas.

Antígenos glicosilados têm demonstrado um papel crucial em diferentes patologias, pois podem apresentar alta imunogenicidade e serem reconhecidos por diferentes classes de anticorpos. Considerando a importância de se isolar e caracterizar glicoconjugados também nas manifestações alérgicas, o presente estudo foi motivado e elaborado para a identificação e caracterização parcial de componentes glicosilados de *D. farinae*, que pudessem estar envolvidos na reatividade de anticorpos IgE em pacientes alérgicos. Assim, o estudo e a

identificação de antígenos glicosilados de *Dermatophagoides farinae* reconhecidos por anticorpos IgE, podem ser relevantes para um melhor conhecimento da resposta imune a este ácaro e, conseqüentemente, serem importantes como potenciais ferramentas para avaliação da sensibilização alérgica *in vivo* (testes cutâneos) e *in vitro* (testes sorológicos) bem como para possível emprego na imunoterapia alérgeno-específica.

2 - OBJETIVOS

- Extrair os componentes antigênicos derivados do extrato total de *Dermatophagoides farinae* (Df-total) e fracioná-los por cromatografia de afinidade de ConA-Sepharose;

- Determinar os níveis de IgE específica aos extratos de Df-total e Df-ConA em pacientes alérgicos, por ensaio imunoenzimático (ELISA) ;

- Verificar a presença de reatividade cruzada entre alérgenos derivados do extrato bruto de *D. farinae* e da fração Df-ConA com o extrato bruto de *D. pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, por ELISA de inibição competitiva;

- Identificar os componentes alergênicos dos extratos Df-total e Df-ConA reconhecidos por anticorpos IgE do soro de pacientes com alergia respiratória, por *Immunoblot*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (154/04) da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), órgão do Conselho Nacional de Saúde (CNS), por meio de um adendo (ANEXO 1), tendo como base um projeto previamente aprovado (processo nº039/2002; ANEXO 2), fazendo as devidas modificações e alterações necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

3.2. Local do estudo

Todas as etapas do estudo foram realizadas no município de Uberlândia que se localiza no estado de Minas Gerais e apresenta uma população residente total de 501.214 habitantes, distribuídos em uma área de 4.115,85 km², segundo o último censo 2000-2001 (IBGE, 2004).

A seleção e o atendimento aos pacientes foram realizados no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). O HC-UFU está fisicamente inserido no Campus Umuarama e é um dos 59 estabelecimentos que prestam serviço junto ao Sistema Único de Saúde (SUS) no município.

Todas as demais técnicas adotadas neste estudo foram executadas no âmbito do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU, Instituto de Ciências Biomédicas, bloco 4C, Campus Umuarama.

3.3 - Extração e fracionamento dos alérgenos de *Dermatophagoides farinae*

3.3.1 - Preparação do extrato alergênico

A extração de proteínas dos ácaros foi realizada de acordo com Pereira e colaboradores (2005), com algumas modificações. Inicialmente, foram pesados 200 g do ácaro em meio de cultura gentilmente cedido pelo Prof. Federico Montealegre (Laboratório de Imunoquímica, Escola de Medicina de Ponce - Porto Rico, EUA) e peneirados (Peneiras Granutest-Telastem, ABNT 35, abertura em 0,50mm - TYLER 32) para separar, por retenção, o material de cultura dos corpos e fezes dos ácaros. O material acarológico (20 g) foi diluído em 100 mL de solução salina tamponada com borato (BBS) 5 mM, pH 8,0, contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF - ICN Biomedicals, Inc., Aurora, EUA) 1 mM, Benzamidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) 1 mM, Aprotinina (Sigma) 0,2% e Leupeptina (Sigma) 1 µM, como inibidores de proteases. A exaustiva maceração em gral e pistilo, na presença de nitrogênio líquido, e a subsequente transferência do material para tubos cônicos precederam a incubação deste em agitador orbital. Essa mistura ficou em agitação orbital durante 18 horas a 4°C e em seguida, centrifugada a 15.000 g durante 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e dialisado em sistema Amicom (W.R. Grace & Co., Bervely, EUA) utilizando membrana porosa YM-10 (Whatman International Ltd., Maidstane, Inglaterra), contra solução salina tamponada com fosfatos PBS 10 mM, pH 7,2. Ao término da diálise, o material retido, foi analisado quanto ao conteúdo protéico e de carboidratos e definido como extrato bruto solúvel de *D. farinae* (Df total).

3.3.2 - Fracionamento dos alérgenos derivados do extrato total de *D. farinae*

3.3.2.1 - Preparação da coluna

Para obtenção das frações ligantes e não ligantes de Concanavalina A (ConA), a resina de ConA-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech AB, Upsala, Suécia) foi aplicada em uma coluna de cromatografia e assentada através de fluxo lento e contínuo de solução Tris (Hidroximetil-aminometano – Merck, Darmstadt, Alemanha) 200 mM, contendo HCl (Quimibrás Indústrias Químicas, S.A., Rio de Janeiro, Brasil) (Tris-HCl), contendo NaCl 500 mM, pH 7,4, até atingir um volume de 5 mL de resina.

Para evitar uma possível perda de ConA junto com o material eluído, foi realizada uma ligação cruzada com glutaraldeído, consoante o protocolo descrito por Scher, Resneck e Bloch (1989), com modificações. Para tal, a resina foi lavada com 250 mL de PBS contendo L-lisina (Sigma) 200 mM, pH 8,3 e subsequentemente com 100 mL de PBS acrescido de L-lisina 200 mM e D-manose (D-manopiranosose – Sigma), pH 8,3. Em seguida, 15 µL de glutaraldeído a 25% (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado e a resina foi incubada à temperatura ambiente, em agitação orbital por 1 h. O excesso do composto orgânico foi removido pela lavagem da resina com 25 mL de solução tampão constituída de Glicina (Quimibrás Indústrias Químicas, S.A., Rio de Janeiro, Brasil), Tris-HCl 100 mM, contendo D-Manose 200 mM pH 9,2. A coluna foi novamente incubada em agitação orbital, por 10 min e, finalmente lavada com 50 mL de PBS.

Todas as lavagens foram realizadas à 25°C e em fluxo lento e contínuo.

3.3.2.2 - Fracionamento do extrato Df total

Um total de 1 mL de extrato Df total, a 13 mg de massa protéica, foi aplicado à ConA-Sepharose e mantido em repouso por 2 h, a 4°C, para a ligação dos glicoconjugados à lectina. A coluna foi então lavada com solução PBS e as frações não ligantes de ConA foram coletadas, em volumes aproximados de 2 mL e monitoradas quanto à densidade óptica (D.O.), por espectrofotometria (Espectrofotômetro Micronal, São Paulo, Brasil), a 280 nm. No momento em que os valores de D.O. atingiram valores próximos de zero, a eluição foi interrompida pela adição de metil- α -D-manopiranosídeo (Ferro Pfanstiehl Laboratories, Inc., Walkegan, EUA) 100 mM, com ulterior eluição das frações ligantes de ConA. Ao atingir novamente valores basais de D.O., a coluna foi finalmente lavada com PBS, contendo NaCl 500 mM.

As frações que apresentaram os maiores valores de D.O., eluídas pela adição de PBS ou de metil- α -D-manopiranosídeo, foram agrupadas, concentradas e dialisadas contra PBS em sistema Amicon, constituindo dois *pools* de frações: um ligante de ConA (Df-ConA) e outro não ligante de ConA (Dp-nConA).

3.4 - Métodos analíticos

3.4.1 - Dosagem de proteínas

As concentrações protéicas do extrato Df bruto e das frações obtidas por cromatografia de afinidade (Df-nConA e Df-ConA) foram determinadas segundo metodologia descrita por Lowry e colaboradores (1951).

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com os valores de D.O. da curva de calibração, na qual foi utilizada a soroalbumina bovina

(BSA – Sigma) em diluições seriadas de 500 a 15,6 µg/mL. Estes valores foram então transformados em mg/mL, pelo software Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, EUA).

3.4.2 - Dosagem de carboidratos

A quantidade de carboidratos presentes nas amostras foi determinada segundo o protocolo descrito por Yemm; Willis (1954), utilizando D-Manose (Sigma) como padrão na curva de calibração, em diluições seriadas de 1.000 a 61,5 µg/mL. A transformação dos valores de D.O. em concentração de carboidratos foi realizada de maneira similar ao procedimento descrito para dosagem de proteínas.

3.5 – Extratos antigênicos de ácaros para teste cutâneo de puntura (TCP)

Para a preparação dos extratos alergênicos utilizados nos testes cutâneos de puntura, extrato bruto de *Df* foi diluído em PBS contendo fenol a 0,4% e glicerina a 50% (Bayer Corporation, Spokane, EUA) em uma concentração protéica final de 2 mg/mL. Esta solução foi armazenada em frascos de vidro do tipo âmbar com conta-gotas, a 4°C, até a realização dos testes cutâneos.

Extratos brutos antigênicos de *D. pteronyssinus* e de *B. tropicalis* foram obtidos através de procedimentos semelhantes aos descritos acima.

3.6 - Pacientes e Indivíduos não atópicos

Foram selecionados 72 indivíduos atendidos no Ambulatório de Alergia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) que foram divididos em dois grupos: o primeiro constituiu de 41 pacientes com rinite alérgica, com base no exame clínico e histórico de sintomas respiratórios relacionados a poeira domiciliar e, o segundo grupo de 31 indivíduos não atópicos. A seleção dos pacientes e indivíduos não atópicos foi feita através de exame clínico, anamnese e um questionário clínico (Anexo 3) foi aplicado aos mesmos segundo os critérios adotados pelo International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC, 1998), para auxiliar na avaliação clínica inicial de cada paciente, supervisionado pelo médico alergologista responsável.

3.7. Termo de consentimento e avaliação clínica e física dos indivíduos do estudo

Todos os participantes deste estudo assinaram o termo de consentimento (Anexo 4) pós-informado, de acordo com as normas da Resolução CNS 196/96.

No termo de consentimento foi informado o nome da pesquisa, bem como seus objetivos, os procedimentos a que seria submetido, como coleta de sangue e teste cutâneo de leitura imediata e a possibilidade de sua saída do estudo sem necessidade de explicação ou prejuízo ao seu atendimento atual ou futuro.

Em seguida, os indivíduos foram avaliados através de exame clínico e físico pelos residentes médicos em Otorrinolaringologia sob supervisão do Prof. Dr Ernesto Akio Taketomi (Uberlândia, MG) – professor titular de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU),

chefe do Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e médico responsável pelo Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital de Clínicas da UFU (HC-UFU).

3.8. Teste cutâneo de puntura (TCP)

A hipersensibilidade imediata foi avaliada pelo método de puntura, de acordo com a Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica - EAACI (1993), descrito por Ownby (1988). Para a realização do teste, foram utilizados extratos brutos dos ácaros *D. farinae*, *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*, todos a 2 mg/mL, preparados na Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica da UFU. Solução de histamina (10 mg/mL - IPI/ASAC Brasil, São Paulo, Brasil) e solução salina (IPI/ASAC) foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

Uma gota (aproximadamente 10 μ L) de cada extrato foi depositada, a uma distância de 3 cm entre elas, na região anterior do antebraço (DÂNGELO; FATTINI, 1998), após anti-sepsia do local com álcool 70%. Uma puntura cutânea (Puntores Aiko, Rio de Janeiro, Brasil) foi feita no local de depósito da gota e depois de 15 minutos foram medidos o maior diâmetro longitudinal e o diâmetro ortogonal passando pelo ponto médio das pápulas formadas, com régua milimetrada (Morrow Disposable/Skin Test Needle Aller Guard). As pápulas que apresentaram média aritmética dos diâmetros maiores do que 3 mm em relação ao valor do controle negativo (KANCELJAK-MACAN et al, 2002) foram consideradas positivas ao teste.

3.9. Coleta de sangue

Por meio de punção venosa na região anterior do cotovelo, foram coletados 10 mL de sangue de cada indivíduo, com a utilização de tubos a vácuo (Vacutainer - Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA) e agulhas 21G1 (Vacutainer). Após coagulação os tubos com as amostras de sangue foram submetidos à centrifugação (Centrífuga Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 4°C durante 10 minutos a 2.000 *g*. Os soros obtidos foram aliquotados em microtubos de polipropileno do tipo *eppendorf* e armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.9.1 Critérios de exclusão de indivíduos do estudo

Foram excluídos do estudo os pacientes e indivíduos não atópicos que apresentaram pelo menos uma das seguintes características:

- Com idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos;
- Que apresentaram lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;
- Em tratamento com drogas anti-inflamatórias esteroidais e/ou anti-histamínicos de primeira ou segunda geração, no período inferior a 2 semanas que antecederam o atendimento (KANCELJAK-MACAN et al, 2002);
- Que foram submetidos à prévia imunoterapia com extratos de ácaros da poeira domiciliar;
- Que não assinaram o Termo de Consentimento;
- Que se recusaram a participar do estudo por qualquer motivo.

3.10 - Ensaio imunoenzimático (ELISA) para IgE sérica anti-*D. farinae*

A dosagem de anticorpos IgE séricos específicos a *D. farinae* foi realizada segundo Pereira e colaboradores (2005), com modificações. Placas de alta afinidade (*Corning Incorporated Costar*®, *Corning Laboratories Inc.*, NY, EUA) foram sensibilizadas por 18 horas a 4°C com os extratos Df-total, Df-nConA e Df-ConA na concentração protéica de 20 µg/mL em um volume de 50 µL/poço. As placas foram lavadas com PBS+Tween 20 (Sigma) 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T acrescidos de soroalbumina bovina (BSA, Sigma) 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Nas etapas subseqüentes, foi utilizado PBS-T-BSA 1% como diluente e as placas foram lavadas com PBS-T após cada etapa da reação. As amostras de soros foram diluídas 1:2 e incubadas a 37°C por uma hora em câmara úmida.

Subseqüentemente, foi incubado o anticorpo secundário consistindo de anti-IgE humana biotinizada (*Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.*, Gaithersburg, MD, EUA) em diluição 1:1.000 por 1 hora a 37°C. Na etapa final, o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) foi adicionado na diluição de 1:500 durante 30 minutos à temperatura ambiente.

A reação foi revelada por meio da adição de 2,2'-diazino do ácido etil-benzotiazolino sulfônico (ABTS) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de água oxigenada (Sigma).

A densidade óptica (D.O.) foi determinada a 405 nm em leitor de ELISA (*Titertek Multiskan Plus MKII*, *Flow Laboratories*, McLean, VA, EUA) em tempos variados. Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE) de acordo com a seguinte fórmula: $IE = \text{D.O. amostra} / \text{cut off}$, sendo que o *cut-off* foi

determinado pela média dos valores de D.O. dos soros controles negativos de cada placa, acrescidos de três desvio-padrões.

Assim, IE > 1,2 foram considerados positivos quanto à presença de IgE específica a alérgenos de *D. farinae*.

3.11 - Ensaio imunoenzimático (ELISA) de inibição competitiva

A especificidade do ELISA para IgE foi avaliada utilizando um ensaio de inibição competitiva como descrito por Pereira e colaboradores (2005), com modificações. Foram realizadas diluições decimais seriadas de 100 a 0,001 µg/mL em PBS-T-BSA 1% dos extratos de Df-total, Df-nConA Df-ConA, Dp, Bt ou toxóide tetânico (TT; Sigma) e Concanavalina A (ConA; Sigma) como antígenos irrelevantes. Cada diluição dos diversos antígenos foi misturada 1:1 com uma diluição (1:5) de um painel de 6 soros controles positivos e então incubadas por 18 horas a 4°C. Os soros incubados somente com diluente foram utilizados como controles positivos.

Em seguida, as misturas antígenos-soros foram testadas por ELISA para IgE com extrato Df-total e Df-ConA à na concentração protéica de 20 µg/mL previamente incubados para sensibilização das microplacas de ELISA. As etapas posteriores da reação procederam-se como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em porcentagens de inibição em relação à ausência do antígeno inibidor (controle positivo) e calculados como se segue: $[1,0 - (D.O. amostra / D.O. controle positivo)] \times 100$.

3.12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As bandas polipeptídicas derivadas do extrato total de *D. farinae* bem como as frações obtidas por cromatografia de afinidade em colunas de Con-A/Sepharose foram analisadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12%, segundo Laemmli com modificações (1970).

Antes da aplicação no gel, as amostras foram diluídas em tampão de amostra (T.A.) 2X contendo Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% e glicerol a 20% ou T.A. 10X contendo Tris-HCl 500 mM, pH 6,8, SDS a 10%, azul de bromofenol a 0,25%, EGTA 200mM e Sacarose a 20%, e submetidas a um aquecimento de 95°C (Termobath ALB64 – Finemould Precision Ind., Co., Seul, Coréia do Sul) por 5 minutos. O padrão de peso molecular *Wide Range* (Sigma) foi utilizado como recurso para o cálculo dos pesos moleculares relativos das bandas protéicas presentes nas amostras.

O sistema utilizado foi preparado o de mini-gel (SE 215 *Mighty Small Multiple Caster* (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA e o gel foi submetido a uma corrente constante de 20 mA por aproximadamente 1h30min, para a migração das frações protéicas. Posteriormente, o gel de separação a 12% foi corado com nitrato de prata, segundo Friedman (1982).

Os pesos moleculares aparentes das bandas polipeptídicas foram estimados por regressão linear, segundo o padrão de peso molecular de referência, a partir do cálculo da mobilidade relativa (R_f), utilizando o programa computacional KODAK 1D Image Analysis (Eastman Kodak Co., Rochester, EUA).

3.13 - Immunoblotting para detecção de IgE anti-*D.farinae*

Os extratos Df-total, Df-nConA e Df-ConA (100 µg/poço) foram submetidos à eletroforese vertical em SDS-PAGE 12% e imediatamente transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond-C Pure, Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) com uma corrente de 0,8 mA por cm² de gel por 2 h utilizando sistema semi-úmido de transferência (*Multiphor II Electrophoresis Unit*, Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia) conforme a técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979). O sucesso da transferência foi confirmado pela visualização das frações protéicas coradas com Ponceau 0,5% (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As membranas eletrotransferidas foram cortadas em tiras de aproximadamente 0,3 cm de largura e subseqüentemente bloqueadas com aproximadamente 800 µL de solução salina tamponada com Fosfatos, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) acrescida de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) a 5% por 2 horas à temperatura ambiente, para bloquear sítios ativos ligantes de proteínas.

Subseqüentemente, para identificar os componentes reativos de IgE presentes no extrato Df total e nas frações Df-nConA e Df-ConA, as tiras foram incubadas com as amostras de soros de pacientes TCP+ e de indivíduos não atópicos, diluídas em PBS-T acrescida de leite em pó desnatado a 1% (PBS-TM), em diluição de 1:2 por 18 h a 4°C sob agitação lenta.

Os procedimentos de lavagens das tiras de nitrocelulose, realizados após cada etapa da reação, consistiram de 6 ciclos de 5 minutos com solução de PBS-T.

Em seguida, as tiras foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgE

humana biotinilado (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc) em diluição 1:250 em PBS-TM por 4 h a 4°C. Após novas lavagens, as tiras foram incubadas com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC/HRP, Dako Corporation, Carpinteria, LA, EUA) diluído a 1:200 em PBS-TM e incubado por 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente às lavagens finais, as bandas polipeptídicas foram visualizadas através de revelação por meio da adição de 2,2'-diazino do ácido etil-benzotiazolino sulfônico (ABTS) a 10 mM em solução salina 200 mM tamponada com Tris 20 mM pH 7,2 contendo 0,03% água oxigenada.

Os pesos moleculares aparentes das bandas foram estimados por regressão linear, segundo o padrão de peso molecular de referência, a partir do cálculo da mobilidade relativa (Rf), utilizando o programa computacional KODAK 1D Image Analysis (Eastman Kodak Co).

3.14 - Normas de biossegurança

Todos os procedimentos, desde a coleta até o manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização de equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Chaves-Borges; Mineo (1997).

3.15 - Análise estatística

Inicialmente, para análises de comparações de média os valores de índice ELISA foram transformados em log e após teste de normalidade verificou-se que as variáveis não apresentavam uma distribuição normal.

As diferenças entre as porcentagens do teste cutâneo de puntura foram analisadas pelo teste Qui-quadrado ou pelo Teste de Probabilidade Exato de Fisher quando apropriado. As diferenças no tamanho médio da pápula obtida com os extratos empregados no TCP e os níveis de IgE específica a *D. farinae* entre os extrato Df-total e frações Df-nConA e Df-ConA foram avaliados pelo teste de *Kruskal-Wallis* usando como *post-hoc* teste, o teste múltiplo de comparação de *Dunn*. Correlações entre os níveis de anticorpos IgE ao extrato Df total e às frações Df-nConA e Df-ConA foram determinadas pelo teste de correlação de Spearman. Os Índices ELISA foram expressos em média geométrica e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantivos.

4 - Resultados

4.1 - Obtenção das frações de *D. farinae* não ligantes e ligantes de ConA

O ensaio de cromatografia de afinidade utilizando ConA-Sepharose foi utilizado para separar o extrato Df total em duas frações distintas: uma não ligante de ConA (Df-nConA) e uma ligante de ConA (Df-ConA).

A Figura 1 apresenta o cromatograma representativo do ensaio realizado. Cada tubo coletor conteve aproximadamente 2 mL de amostra fracionada pela coluna, sendo estes monitorados por espectrometria.

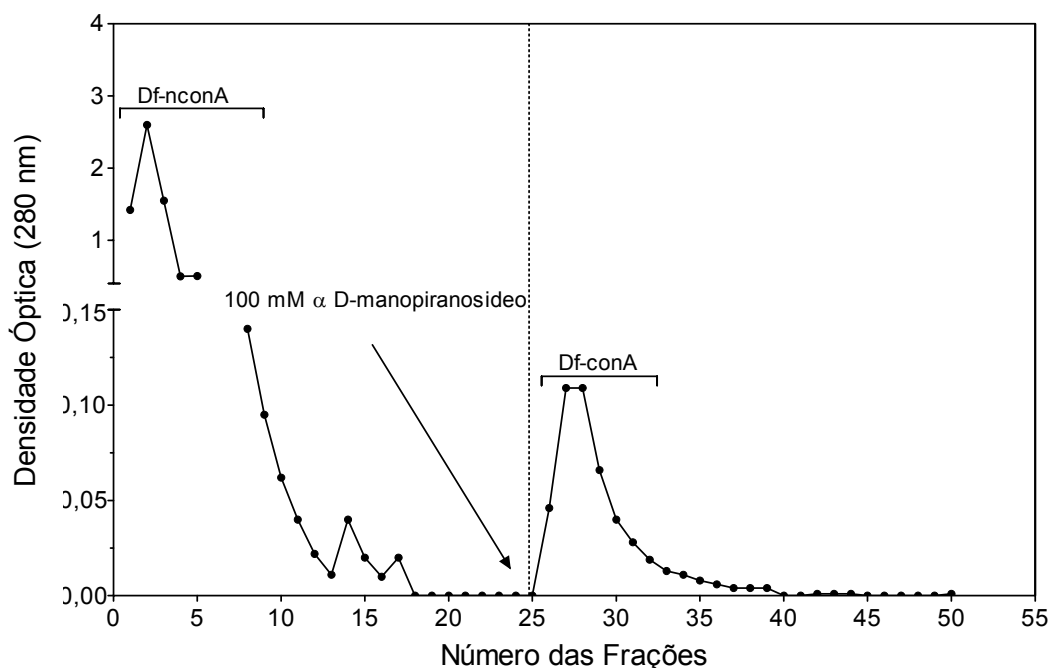


Figura 1. Eluição do extrato total de *D. farinae* (13 mg) em coluna de Concanavalin A-Sepharose (ConA). As frações não ligantes de ConA foram eluídas com 10 mM PBS e as frações ligantes de ConA foram eluídas com 100 mM metil α -D-manopiranosídeo. Ambas as frações foram misturadas, de acordo com os valores de densidade óptica, constituindo e então constituíram as frações Df-nConA e Df-ConA, respectivamente.

Um total de 13 mg de proteínas, em volume de 1 mL, foi aplicado na coluna de ConA-Sepharose, onde a eluição com PBS a 10 mM resultou em um pico formado pelas frações de 1 a 9. Estas foram misturadas, concentradas (2 mL) e após diálise constituíram a fração Df não ligante de ConA (Df-nConA).

Após alcançar níveis de densidade óptica próximos de zero (frações 23 a 25), um pico (frações 26 a 33) foi obtido pela eluição com 100 mM de metil α -D-manopiranosídeo. Essas frações foram misturadas, concentradas (2 mL) e dialisadas constituindo a fração Df ligante de ConA (Df-ConA).

Após diálise e concentração, o extrato Df total e as frações Df-nConA e Df-ConA apresentaram níveis protéicos de 13 mg/mL, 1,1 mg/mL e 0,6 mg/mL, respectivamente. Os níveis de carboidrato foram de 9,8 mg/mL para o extrato total, 3,5 mg/mL para a fração Df-nConA e 2,3 mg/mL para a fração Df-ConA.

4.2 - Dados gerais dos pacientes e teste cutâneo de puntura

As características demográficas e imunológicas dos indivíduos presentes no estudo estão demonstradas na tabela 1. Todos os pacientes alérgicos apresentando quadro de rinite e positivos ao extrato total de *D. farinae* ao TCP foram incluídos no grupo DF+, enquanto que os indivíduos não atópicos e que foram negativos ao TCP a todos os extratos de ácaros testados, constituíram o grupo NA. Assim, o grupo DF+ constituiu-se de 41 pacientes (16 homens e 25 mulheres) com idade média de $25,7 \pm 8,8$ anos, enquanto que o grupo NA foi composto de 31 indivíduos (6 homens e 25 mulheres) com $30,5 \pm 12,1$ anos de idade. A faixa etária dos recrutados para o estudo foi entre 18 e 51 anos.

O Teste cutâneo de puntura (TCP) foi utilizado como ensaio *in vivo* para verificar a reatividade dos indivíduos frente aos extratos de *D. farinae*, *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*. Um resultado de TCP positivo foi dado pelo diâmetro médio da pápula acima de 3 mm em relação ao controle negativo.

Tabela 1. Idade, sexo, história clínica e resultado de TCP (diâmetro médio de pápula e positividade) de pacientes TCP positivo a extrato de *D. farinae* (DF+) e de indivíduos não atópicos (NA). Ao TCP um resultado positivo foi determinado a partir do diâmetro médio de duas medidas perpendiculares da pápula formada e definido como > 3 mm em relação ao controle negativo da reação.

Características	Grupos	
	DF+	NA
Número de indivíduos	41	31
Média de idade ± DP (ano)	25,7 ± 8,8	30,5 ± 12,1
Sexo (M/F)	16/25	6/25
TCP positivo (tamanho médio da pápula, mm)		
<i>D. farinae</i>	9,0 ± 2,9 ^a	0
<i>D. pteronyssinus</i>	9,8 ± 3,3 ^a	0
<i>B. tropicalis</i>	7,7 ± 3,1 ^b	0
Histamina	7,0 ± 1,6	6,4 ± 1,6
Co-positividade ao TCP entre os ácaros de poeira doméstica (n, %)		
<i>D. farinae</i> + / <i>D. pteronyssinus</i> +	41 (100%) ^a	0
<i>D. farinae</i> + / <i>D. pteronyssinus</i> -	0 ^b	0
<i>D. farinae</i> + / <i>B. tropicalis</i> +	38 (93%) ^a	0
<i>D. farinae</i> + / <i>B. tropicalis</i> -	3 (7%) ^b	0

DF+: pacientes alérgicos com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a *D. farinae*; NA: indivíduos não atópicos. Resultado positivo ao TCP(+). Resultado negativo ao TCP (-).

^{a, b} Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os extratos, como indicado pelo teste de *Kruskal-Wallis* usando como *post-hoc* teste, o teste múltiplo de comparação de *Dunn* para o tamanho médio das pápulas, e o teste Qui-quadrado ou o teste de probabilidade Exato de Fisher para a positividade ao TCP ($p < 0,05$).

Assim, no TCP o diâmetros médios das pápulas observadas para os extratos totais de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* no grupo DF+ foram similares ($9,0 \pm 2,9$ mm e $9,8 \pm 3,3$ mm, respectivamente), mas significativamente maiores do que para o extrato total de *B. tropicalis* ($7,7 \pm 3,1$ mm; $p < 0,05$). Como parte do processo de agrupamento dos indivíduos participantes do estudo, todos os pacientes (100%) do grupo DF+ apresentaram positividade ao extrato de *D. farinae*. Adicionalmente, todos os pacientes do grupo DF+, também tiveram 100% de positividade entre extratos totais de *D. farinae* e de *D. pteronyssinus* e tiveram uma alta co-positividade a *B. tropicalis* (93%), $p < 0,05$ (tabela 1).

Nenhum indivíduo do grupo NA apresentou positividade no TCP aos extratos totais de ácaros utilizados.

4.3 – Níveis de anticorpos IgE específico ao extrato Df total, e as suas frações Df-nConA e Df-ConA

O ensaio imunoenzimático ELISA foi utilizado para determinar os níveis de IgE específica ao extrato Df total e suas frações nos soros de pacientes TCP positivos ao extrato do ácaro (grupo DF+) e de indivíduos não atópicos (grupo NA) (figura 2). Os níveis médios de IgE ao extrato Df total e as frações Df-nConA e Df-ConA foram significativamente maiores nos pacientes do grupo DF+ (5,3, 6,0, e 2,3 IE, respectivamente) quando comparados aos indivíduos do grupo NA (0,8, 0,9, 0,7 IE, respectivamente) ($p < 0,001$). Uma diferença significativa foi observada entre os níveis médios de IgE ao extrato Df total e a fração Df-ConA em pacientes do grupo DF+ (5,3 vs 2,3 IE; $p < 0,01$). Os níveis médios de IgE a fração Df-nConA também foram maiores do que a fração Df-ConA (6,0 vs 2,3 IE; $p < 0,001$). Entretanto, não se observou diferença

significativa entre as médias dos níveis de IgE ao extrato Df total e a fração Df-nConA (5,3 vs 6,0 IE; $p > 0,05$).

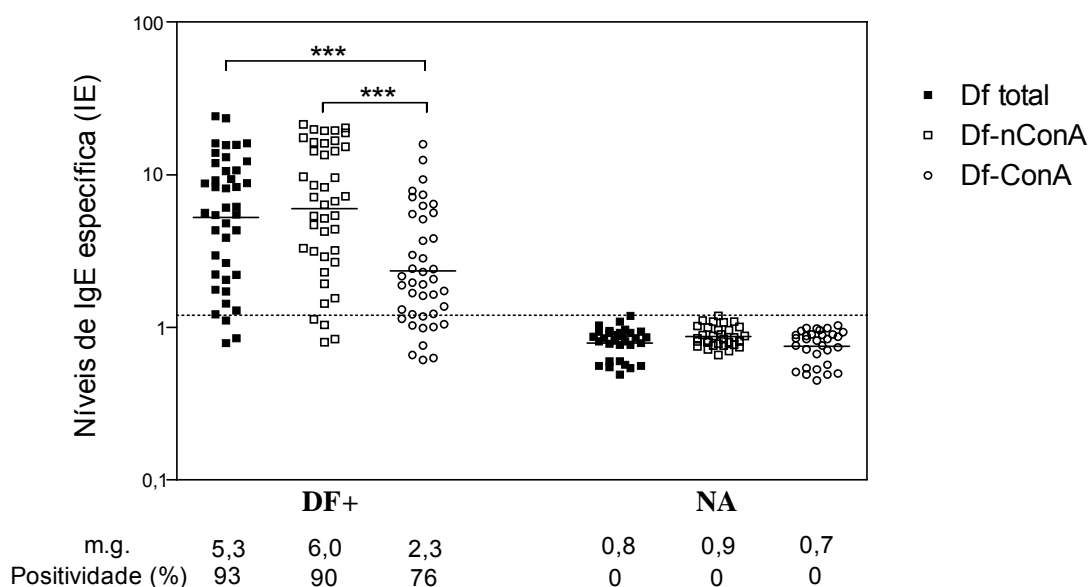


Figura 2. Níveis de IgE sérica específica ao extrato total de *D. farinae* (Df total), e as frações Df-nConA e Df-ConA, expressos como índice ELISA (IE) no soro de 41 pacientes com TCP positivo a *D. farinae* (DF+) e 31 indivíduos não atópicos (NA). As barras horizontais indicam a média geométrica (m.g.). A linha pontilhada representa o limiar de positividade (IE = 1,2). As percentagens das positivities encontradas para o extrato e suas frações também estão indicados.

O limiar de positividade no teste ELISA para detecção de IgE específica a alérgenos de *D. farinae* no extrato Df total e em suas frações ligante e não ligante de ConA foi considerado 1,2 IE, com o objetivo de excluir valores próximos a IE = 1,0, possíveis de ocorrer quando a D.O da amostra é igual ao *cut off* da reação. Assim, trinta e oito pacientes do grupo DF+ (93%) mostraram níveis de IgE ao extrato total acima do limiar de positividade (IE = 1,2) enquanto que 37 (90%) e 31 (76%) desses pacientes mostraram positividade a IgE frente às frações Df-nConA e Df-ConA, respectivamente.

Nenhuma das amostras de soro de indivíduos do grupo NA apresentou níveis acima do limiar de positividade ao extrato e às frações testadas.

Uma correlação positiva significativa entre os níveis de IgE ao extrato Df total e a fração Df-nConA foi observada ($r = 0,7000$; $p < 0,001$) (figura 3A), mas o maior coeficiente de correlação encontrado foi entre o extrato Df total e a fração Df-ConA ($r = 0,8244$; $p < 0,001$) (figura 3B).

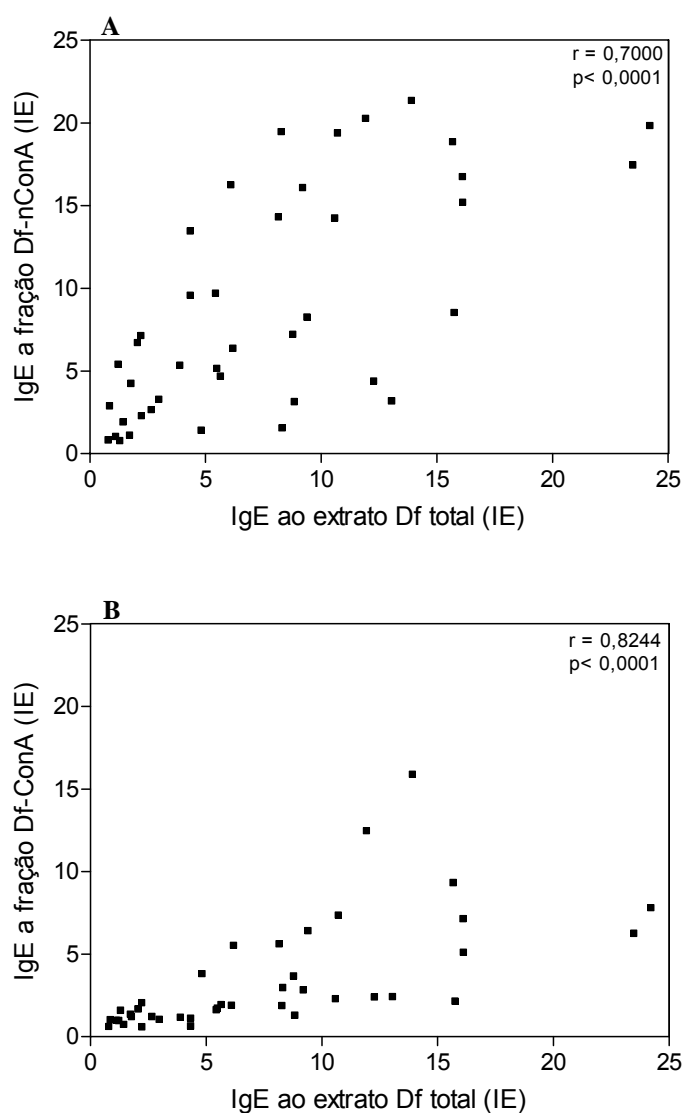


Figura 3. Correlação entre os níveis de IgE ao extrato total de *D. farinae* (Df total) e as frações Df-ConA (A) ou Df-nConA (B), expressos em índice ELISA (IE) no soro de 41 pacientes com TCP positivo a *D. farinae* (grupo DF+). O coeficiente de correlação foi calculado usando o teste de correlação de Spearman.

4.4 - Especificidade de anticorpos IgE ao extrato Df total e a fração Df-ConA

A especificidade antigênica dos ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgE específica a alérgenos do extrato Df bruto e Df-ConA foi avaliada através de imunoensaio de inibição competitiva, empregando-se como inibidores extratos Df, Dp e Bt totais, Df-ConA e antígenos irrelevantes, como Concanavalina A (ConA) e toxóide tetânico (TT) (Figura X) e soro de pacientes do grupo DF+. A porcentagem de inibição indicou a presença de reatividade cruzada entre o extrato Df total e Df-ConA frente aos extratos homólogos e heterólogos e a antígenos irrelevantes (figura 4).

Assim, todos os componentes utilizados como inibidores apresentaram curvas dose-dependentes, em concentrações crescentes de Df total, Df-ConA, Dp e Bt totais e antígenos irrelevantes (TT e ConA).

Quando o extrato total de *D. farinae* foi aplicado na fase sólida (figura 4A), uma alta inibição homóloga (Df total e Df-ConA) foi observada, com a reatividade a IgE sendo eficientemente inibida a concentração máxima de 100µg/mL de cada inibidor (89% e 85%, respectivamente). As concentrações destes componentes, com 50% de inibição (I_{50}) foram 0,2 and 3,1 µg/mL, respectivamente. Em relação à inibição heteróloga, curvas de inibição dose-resposta similares foram observadas entre os extratos totais de *D. farinae* e *D. pteronyssinus*, com I_{50} sendo alcançado a baixas concentrações dos inibidores (0,2 e 1,8 µg/mL, respectivamente). Assim, uma alta inibição heteróloga foi visto com o extrato Dp total (69%), mas não com Bt total (23%) na concentração máxima dos inibidores. Os antígenos irrelevantes (ConA e TT) não exibiram inibição significativa (0% e 5,0%, respectivamente).

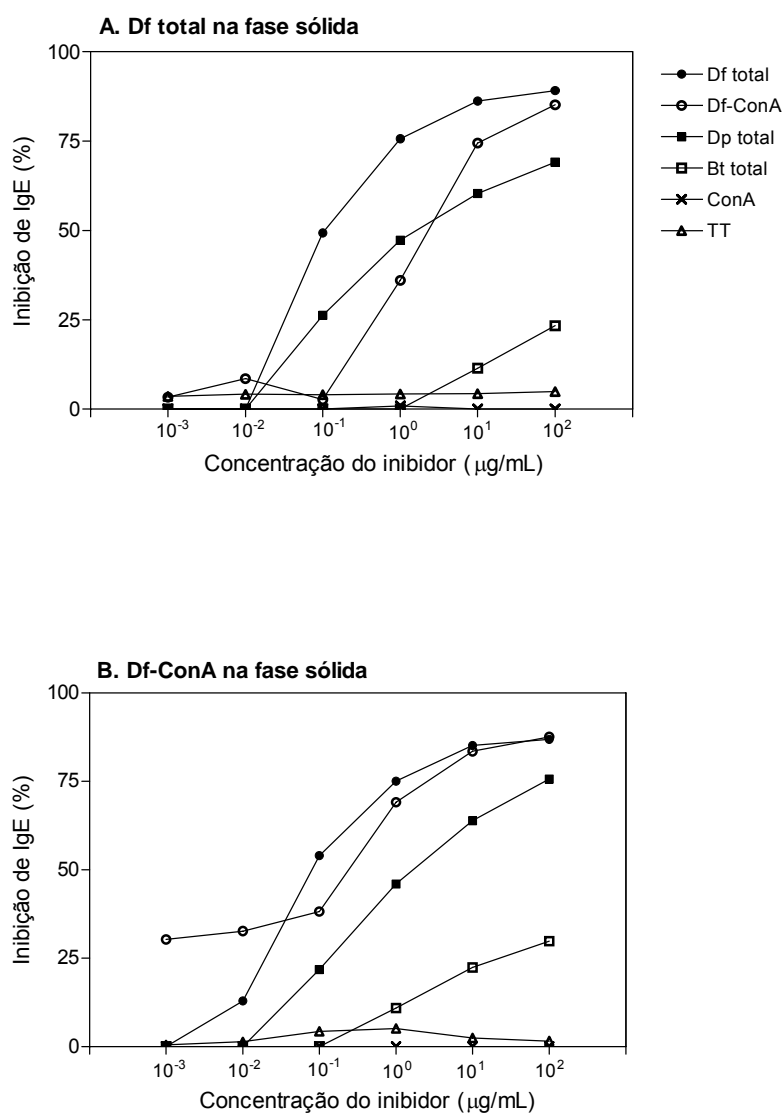


Figura 4. Curvas de inibição de IgE com o extrato total de *D. farinae* (A) e com a fração Df-ConA (B) na fase sólida. Um pool de 6 soros de pacientes DF+ foram pré-incubados por 18h a 4°C com diferentes diluições decimais seriadas de 10² a 10⁻³ µg/mL em solução diluente de PBS-T-BSA dos extratos de Df total, Dp total, Bt total como inibidores. Concanavalina A (ConA) e toxoide tetânico (TT) foram utilizados como antígenos irrelevantes.

Quando a fração Df-ConA foi aplicada na fase sólida, curvas de inibição similares em um comportamento dose-dependente foram observadas para os inibidores Df total, Df-ConA e Dp total. Altas inibições homólogas (86% e 87% para Df total e Df-ConA, respectivamente) e heteróloga (75% para Dp total) foram observadas na máxima concentração dos inibidores. Sendo que os

valores de I_{50} para os extratos Df total e para a fração Df-ConA (0,13 $\mu\text{g/mL}$ e 0,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) diferiram um pouco em relação ao extrato Dp total (2,1 $\mu\text{g/mL}$). Inibições baixas e insignificantes foram observadas com Bt total (30%) e com os antígenos irrelevantes ConA e TT (0% e 1,5%, respectivamente).

4.5 - Perfil protéico e componentes de Df total e Df-ConA ligantes de IgE

O perfil protéico do extrato total de *D. farinae*, e das frações Df-nConA e Df-ConA foram visualizados em SDS-PAGE 12% (figura 5A, linhas 1, 2 e 3, respectivamente). Foram visualizados componentes protéicos de Df total por toda extensão do gel (Figura 5, coluna 1), com massas moleculares variando de 14 a 120 kDa, porém, muitas bandas não foram bem individualizadas. O extrato total de *D. farinae* mostrou uma marcação mais proeminente das bandas com massas moleculares aparentes em torno de 14, 22, 25, e 110 kDa. Um perfil diferente foi observado na fração Df-nConA, com marcação predominante de bandas protéicas com massas moleculares aparentes abaixo de 25 kDa enquanto que a fração Df-ConA mostrou um perfil protéico quase complementar a fração Df-nConA, com bandas protéicas acima de 17 kDa, particularmente aquelas de altas massas moleculares aparentes em torno de 120, 110, 96, 84, e 76 kDa.

O perfil de afinidade do extrato total de *D. farinae* e da fração Df-ConA pela IgE foi determinado por *Immunoblot* em 10 amostras séricas de pacientes selecionadas do grupo DF+ e 10 soros de indivíduos do grupo NA sendo que três soros representativos estão demonstrados para o extrato Df total e para a fração Df-ConA na figura 5B (linhas 4 a 6 e 7 a 9, respectivamente).

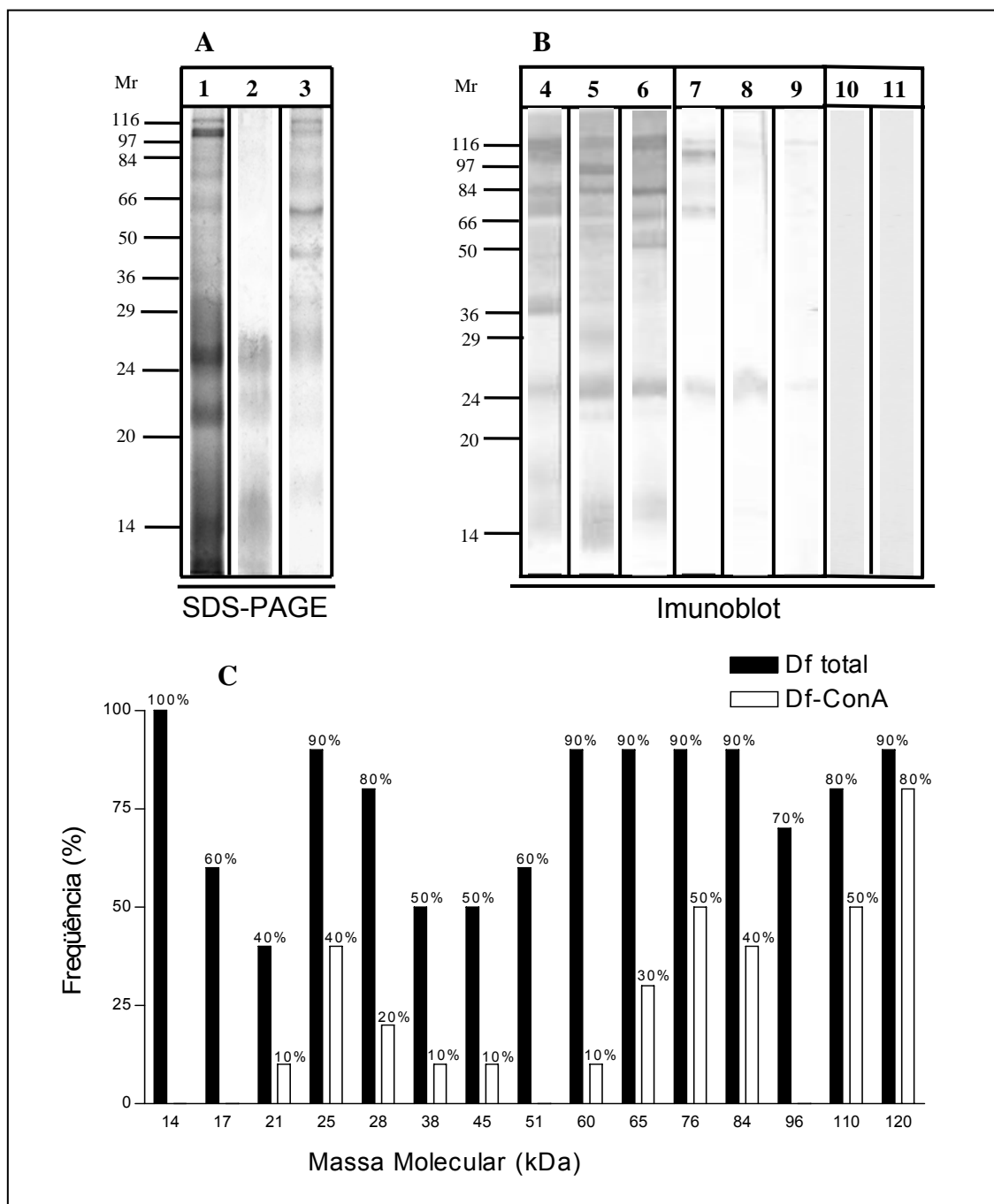


Figura 5. Perfil protéico (A) do extrato total de *D. farinae* (Df total, linha 1), e das frações Df-nConA (linha 2) e Df-ConA (linha 3) em SDS-PAGE a 12% com marcação por nitrato de prata. Immunoblots (B) foram usados para detectar proteínas de Df total ligantes de IgE (linhas 4, 5 e 6) e da fração Df-ConA (linhas 7, 8 e 9) em três soros (1:2 v/v) do grupo DF+. Um soro de indivíduo não atópico também foi usado na reação com o extrato Df total (linha 10) e com a fração Df-ConA (linha 11). Marcadores de massa molecular (Mr) estão indicados em kDa. Frequência (%) das bandas protéicas reconhecidas pela IgE (C) em 10 soros do grupo DF+ também estão representados.

No extrato Df total uma banda alergênica em torno de 14kDa mostrou a maior frequência de reconhecimento de IgE (100%), seguido pelas de 25, 60,

60, 65, 76, 84 e 120 kDa todas com 90% de reconhecimento. Outras bandas com altas freqüências de reconhecimento foram as de 28 e 110 kDa (80%) e 96 kDa (70%), e as bandas menos reconhecidas foram as de 21 kDa (40%), 38 e 45 kDa (50%). (figura 5C). Na fração Df-ConA, a maioria das bandas protéicas tiveram um decréscimo $\geq 50\%$ na freqüência em relação a Df total, enquanto que as bandas de 120, 110, e 76 kDa tiveram os menores decréscimos em suas freqüências (10%, 30%, e 40%, respectivamente). Já as bandas com massa molecular aparente em torno de 14, 17, 51 e 96 kDa foram reconhecidas apenas no extrato Df total com freqüências de 100%, 60%, 60%, e 70%, respectivamente. Todos os soros testados do grupo DF+ (100%) apresentaram reatividade de IgE ao extrato Df e a sua fração Df-ConA, enquanto que nenhum dos extratos mostrou componentes ligantes de IgE pelos soros dos indivíduos não atópicos (figura 5B, linhas 10 e 11).

nenhum indivíduo não atópico apresentou anticorpos IgE que reconheceram bandas protéicas nos extratos e frações analisadas por *Immunoblot*.

5 - Discussão

Ácaros da poeira domiciliar possuem um importante papel na sensibilização alérgica e têm sido considerados importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças respiratórias. Altos níveis de alérgenos de *Dermatophagoides farinae* ($> 2 \mu\text{g}$ de Der f 1/g de poeira) foram encontrados na maioria das amostras de poeira região de Uberlândia (SOPELETE et al., 2000; SILVA et al., 2005).

Muitas proteínas alérgicas são glicosiladas, aumentando a possibilidade que o grupo glicosil possa contribuir para sua alergenicidade (HUBY; DEARMAN; KIMBER, 2000) uma vez que qualquer relevância da glicosilação protéica na indução da resposta alérgica às proteínas ainda tem que ser demonstrado definitivamente.

Devido a afinidade por moléculas de carboidrato, lectinas, como a ConA tem sido utilizadas para obter frações contendo essas moléculas (GUPTA et al., 1996; NIGAM; GHOSH; SARMA, 2003). A ConA comumente se liga a resíduos comuns de α -D-manose e β -D-glucose relacionados estereoquimicamente (SCRIBA, 2004) e alguns estudos têm sido conduzidos para isolar esses componentes e determinar sua função por ensaios imunobioquímicos (WEATHERMAN et al., 1996; GOLDSTEIN et al., 2001).

Em nosso estudo, as frações Df-nConA e Df-ConA foram obtidas do extrato Df total passando por coluna de afinidade ConA-Sepharose. O SDS-PAGE mostrou um perfil complementar entre as frações Df-nConA e Df-ConA. Na fração Df-nConA pode ser observado bandas de baixo peso molecular aparente (14 a 25 kDa), possivelmente constituído por polipeptídeos ou glicoproteínas sem resíduos de α -D-manose, β -D-glucose. Enquanto a fração

Df-ConA mostrou bandas com massa molecular aparente de 28 a 120 kDa e bandas similares, comparando com a fração Df-nConA (17, 21 e 25 kDa), constituído por resíduos que foram separados pela cromatografia em coluna de afinidade ConA-Sepharose.

De acordo com Thomas; Smith (1999), os alérgenos dos grupos 1, 2, 3 e 11 (25, 14, 25, 92/98 kDa, respectivamente), são reconhecidos por mais de 70% dos pacientes alérgicos. Neste estudo, o SDS-PAGE mostrou um amplo espectro de bandas ou arrastes com massas moleculares em torno de 14, 22, 25, 60, 76, 84, 96, 110 e 120 kDa. Segundo Kawamoto et al. (2002), os alérgenos do grupo 1, 7, 11, 15 e 17 (25, 22, 92-98 e 40 kDa), possuem potenciais sítios de glicosilação. Possivelmente, polipeptídeos glicosilados estão presentes na fração Df-ConA uma vez que foram observadas bandas com peso molecular semelhante.

Dentre os alérgenos de *Dermatophagoides* spp. que podem ser encontrados em grandes quantidades na poeira domiciliar e importantes na sensibilização, Heymann et al, (1989) têm relatado altos níveis de alérgenos do grupo 1 e 2 (25 kDa [20 µg/g de poeira] e 14 kDa [100 µg/g de poeira], respectivamente), os quais são reconhecidos em mais de 80% dos pacientes alérgicos. O alérgeno natural do grupo 1 foi descrito possuir atividade de cisteína protease (SIMPSON et al., 1989; ANDO et al., 1991), tendo homologia de 25-30% com outras cisteínas proteases e os resíduos em torno do seu sítio ativo e a seqüência ligante de substrato mostraram ser altamente conservados (TOPHAM et al, 1994; ROBINSON et al., 1997). O alérgeno do grupo 2, não tem função conhecida, embora sua seqüência, tamanho e distribuição seja

similar a resíduos de cisteína da família das proteínas epididimais (THOMAS; CHUA, 1995).

Outro alérgeno encontrado em altas concentrações é o grupo 11 (92-98 kDa) que se caracteriza pela homologia com paramiosinas de outros invertebrados, sendo reconhecido em mais de 80% dos pacientes alérgicos (THOMAS; SMITH, 1999). Alérgenos encontrados em menores quantidades e que possuem importância na sensibilização de pacientes alérgicos (>80%), são os grupos 3, 10, 14 e 15 (25, 33, 177 e 98 kDa) (THOMAS; SMITH, 1999).

Antígenos com massas moleculares abaixo de 10 kDa que são importantes em alguns indivíduos alérgicos a ácaros, foram caracterizados como antígenos possuindo significantes atividades alergênicas *in vitro* e *in vivo* (KODA et al., 1987; TAMURA et al., 1991). A diálise em sistema Amicon utilizado nesse estudo explica possivelmente a ausência dessas bandas protéicas, pois foram utilizadas membranas com ponto de corte igual a 10 kDa, implicando em perda de componentes protéicos menores a esse valor.

Adicionalmente, deve-se avaliar a importância de se usar inibidores de proteases com objetivo de reduzir a proteólise, fator importante na estabilidade de extratos alergênicos. Inibidores de proteases em sua maioria são proteínas que usadas no processo de extração serão adicionadas ao extrato de ácaro e assim comporão o perfil de proteínas administradas aos pacientes quando da realização de teste cutâneo de puntura. No presente estudo, possivelmente todos os inibidores de proteases adicionados ao extrato foram removidos com o processo de diálise, uma vez que nenhum componente abaixo de 15 kDa foi identificado ao SDS-PAGE e todos os inibidores de protease empregados

apresentam massa molecular abaixo do valor de *cut off* (6.000-8.000 MW) da membrana de diálise utilizada nesse estudo.

A seleção dos pacientes participantes desse estudo foi feita por meio de avaliação clínica e TCP. Com relação ao diagnóstico clínico, todos os pacientes alérgicos selecionados apresentaram sintomas característicos de rinite alérgica.

Voorhorst et al. (1967) associaram a presença de ácaros do gênero *Dermatophagoides* na poeira domiciliar à prevalência de distúrbios respiratórios, incluindo rinite e asma. No presente estudo, todos os pacientes alérgicos foram positivos ao TCP para os extratos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, sendo que a alta frequência de positividade a este último, através do TCP, pode ser explicada pelos altos índices do alérgeno (Der f 1) desse ácaro encontrado no município de Uberlândia, por Sopelete et al. (2000), maiores inclusive que os de *D. pteronyssinus* (Der p 1) por meio de coleta de poeira domiciliar e dosagem *in vitro* desses alérgenos por ELISA.

Nesse estudo, a reatividade cruzada alergênica entre espécies de ácaros foi observada com uma co-variação significativa da sensibilização. A maioria dos pacientes alérgicos estava co-sensibilizada a *D. farinae* e *D. pteronyssinus*, provavelmente devido a homologia de 80% e 88% observada nos alérgenos de 25 kDa (grupo 1) e 14 kDa (grupo 2), respectivamente, como relatado anteriormente por Sidenius e colaboradores (2001).

No presente estudo, foi avaliada a resposta de IgE a *D. farinae* (Df total) e seus componentes ligantes de ConA (Df-ConA) por ELISA e Immunoblot. Nas últimas décadas, investigações similares foram realizadas (BALDO;

UHLENBRUCK, 1977; STEWART; TURNER, 1980), mas o perfil de reconhecimento de IgE por Immunoblot não foi ainda descrita.

Altos níveis de IgE específica a alérgenos presentes no extrato total de *D. farinae* poderia ser explicado pela alta alergenicidade dos extratos do ácaro devido as altas concentrações dos seus principais alérgenos, especialmente Der f 2. A reatividade de IgE a fração Df-ConA mostrou baixos níveis de IgE quando comparada com o extrato Df total e a fração Df-nConA nos pacientes do grupo DF+ determinados por ELISA. Esta redução se deve muito provavelmente devido a ausência do alérgeno principal do grupo 2 (Der f 2) na fração Df-ConA, uma vez que 80% dos pacientes sensibilizados ao ácaro *D. farinae* mostram reatividade alérgica a este alérgeno (VAN DER ZEE et al., 1988; TROMBONE et al., 2002).

Os níveis de IgE sérica ao extrato Df total e à fração Df-nConA foram similares entre si, porém diferiram quanto à fração Df-ConA. Uma possível explicação seria a separação de epítomos. Nesse contexto, o fracionamento de Df bruto, por cromatografia de afinidade de ConA-*Sepharose* foi responsável por isolar componentes antigênicos que foram reconhecidas pela IgE de alguns pacientes. Devido à diminuição na quantidade de componentes presentes na fração Df-ConA, pela seleção cromatográfica, alguns soros não reconheceram esses epítomos, que certamente estariam na fração Df-nConA. A presença de epítomos imunodominantes selecionados nessa fração seria um importante fator de reflexão sobre a utilização desse extrato em imunoterapia hipossensibilizante, uma vez que aumentaria sua especificidade, diminuindo os efeitos adversos e ainda poderia diminuir a sensibilização dos pacientes a novos epítomos, pois a imunoterapia com extrato bruto expõe os pacientes a

todas as proteínas presentes no extrato bruto mesmo a aquelas que antes eles não eram reativos. Para isto, será necessária uma exploração a respeito do mecanismo de resposta imune aos componentes presentes na fração Df-ConA, no contexto de apresentação antigênica, ativação e proliferação de células T e perfil de produção de citocinas.

A alta positividade e as correlações significantes verificadas entre o extrato de *D. farinae* e suas frações reflete na similaridade alergênica e a ligeira correlação superior observada entre o extrato Df total e a fração Df-ConA em relação ao extrato Df total e a fração Df-nConA, possivelmente aconteceu pela alta similaridade entre o extrato Df total e a fração Df-ConA, considerando que a fração Df-nConA mostrou exclusivamente um perfil de bandas de baixo peso aparente.

A reatividade cruzada de IgE é observada quando epítomos similares em diferentes alérgenos reconhecem a mesma molécula de IgE com afinidade similar (JOHANNESSEN et al., 2005). Nossos resultados confirmaram a reatividade cruzada, uma vez que inibição heteróloga foi observada entre os extratos Df e Dp total, quando tanto o extrato Df total ou a fração Df-ConA foram aplicados na fase sólida do ELISA de inibição. Os alérgenos de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* possuem de 80 a 90% de identidade, então não haveria razão para suspeitar que exista qualquer diferença na alergenicidade de proteínas homólogas de cada espécie (THOMAS; SMITH, 1999). Enquanto que a baixa taxa de inibição de *D. farinae* utilizando *B. tropicalis* como inibidor, pode ser explicada pela menor homologia entre os seus alérgenos, e que em um estudo analisando reatividade cruzada entre Der p 1 e Blo t 1, revelou menos de 35% de homologia entre os eles (CHEONG et al., 2003).

Muitos componentes protéicos de *D. farinae* foram identificados como importantes alérgenos, e na sua maioria eles aparecem em uma faixa entre 14 e 60 kDa (KAWAMOTO et al., 2002; THOMAS et al., 2002). Em nosso estudo, o Immunoblot revelou algumas bandas alergênicas tanto no extrato Df total quanto na fração Df-ConA. Os pacientes do grupo DF+ mostraram um amplo perfil de reconhecimento ao extrato Df total, enquanto que na fração Df-ConA eles reconheceram mais frequentemente bandas de alto peso molecular aparente. Isso demonstra a importância das proteínas de massa molecular relativamente altas nas doenças alérgicas, e que provavelmente ocorre devido ao fato da fração Df-ConA ser constituída por algumas biomoléculas, incluindo glicoproteínas, as quais demonstram imunogenicidade variável.

Alguns estudos de *immunoblot* frequentemente demonstram o reconhecimento de alérgenos de ácaros de alta massa molecular, em torno de 100 kDa, pela IgE (TOVEY; BALDO, 1987; NAKANISHI; SHIMOKATA, 1990). Entretanto a grande maioria de alérgenos caracterizados possui massas moleculares relativamente baixas (14 a 60 kDa), sendo estas proteínas ou glicoproteínas com estrutura e propriedade bioquímica diferentes (KAWAMOTO et al., 2002; THOMAS et al., 2002).

Alguns estudos demonstraram uma grande quantidade de alérgenos glicosilados de *D. farinae*, como por exemplo, bandas protéicas de 22, 25, 40, 61, 92, e 98 kDa (THOMAS; SMITH, 1998; KAWAMOTO et al., 2002), os quais correspondem aos grupos 7, 1, 17, 15, e as últimas 2 bandas ao alérgeno do grupo 11, respectivamente. Algumas proteínas podem degradar no extrato, como a paramiosina (grupo 11), no qual os produtos da sua degradação são proteínas que migram para bandas de 92 e 98 kDa. Estes componentes

também são glicosilados, os quais poderiam produzir heterogeneidade na resposta imune (TSAI et al., 1998).

As lectinas interagem com as moléculas de carboidratos de maneira não covalente e reversível, porém com um alto grau de especificidade (GOLDSTEIN; PORETZ, 1986). Devido a essas características, as lectinas podem ser utilizadas em aplicações envolvidas na purificação e na caracterização de glicoconjugados. Assim, o perfil similar de bandas encontrado nas frações Df-nConA e Df-ConA poderia ser explicado possivelmente pela presença de outras proteínas ou alérgenos sem os possíveis sítios de glicosilação ligantes de ConA na fração Df-nConA. Uma destas bandas similares poderia representar alérgenos do grupo 3 e 6, previamente descritos sem estes sítios de glicosilação, mas com o mesmo peso molecular do alérgeno do grupo 1 (25 kDa), o qual é uma glicoproteína em potencial (KAWAMOTO et al., 2002).

Este estudo confirma a complexidade do extrato de *D. farinae* e a importância da identificação de seus padrões protéicos ligantes de IgE de seus alérgenos clinicamente relevantes. Assim, a relação dos polipeptídeos encontrados nesse estudo com os alérgenos já estabelecidos poderia ser confirmada com a caracterização desses componentes por estudos de inibição ou por reconhecimento de anticorpos específicos, mapeamento e sequenciamento peptídico, ou clonagem de cDNA para melhor entendimento da estrutura bioquímica e os mecanismos de apresentação alérgica.

Além disso, a utilização desta fração como uma potencial ferramenta em estudos de exposição, sensibilização e imunoterapia específica poderão ser também avaliadas.

6 - Conclusões

1. A cromatografia de afinidade de ConA-*Sepharose* é uma importante ferramenta para o fracionamento de componentes glicosilados derivados de *Dermatophagoides farinae*.
2. A alta taxa de positividade ao TCP e os altos níveis de IgE específica por ELISA sugerem a importância dos antígenos de *D. farinae* na sensibilização de pacientes com rinite alérgica.
3. As frações Df-nConA e Df-ConA derivadas de *D. farinae* constituem-se de componentes capazes de induzir a síntese de IgE em pacientes alérgicos
4. A alta soropositividade de IgE reativas a fração Df-ConA demonstra a importância dos seus alérgenos, apesar de reconhecer níveis menores de IgE em relação ao extrato Df-total e a fração Df-nConA.
5. Alérgenos presentes no extrato bruto de *D. farinae* e na fração Df-ConA apresentam reatividade cruzada com alérgenos de *D. pteronyssinus* frente a IgE de pacientes alérgicos, devido a alta homologia entre os seus componentes.
6. Alta frequência de reconhecimento de alérgenos de alto peso molecular pela IgE tanto no extrato Df total quanto na fração Df-ConA demonstram a importância dessas moléculas na sensibilização alérgica induzida por *D. farinae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ALLERGEN NOMENCLATURE. Disponível em: <www.allergen.org/list.htm>. Visitado em: 04 fev. 2006.

ANDO, T.; INO, Y.; HAIDA, M.; HONMA, R.; MAEDA, H.; YAMANAKA, H.; IWAKI, M.; OKUDAIRA, H. Isolation of cysteine protease in the crude mite extract, *Dermatophagoides farinae*. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, Basel, v. 96, n. 3, p. 199-205, Dec. 1991.

ARLIAN, L. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v.107, p. S406-S413, Mar. 2001. Supplement. 3.

ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M.D. A review of recent immunochemical studies of *Blomia tropicalis* and *Euroglyphus maynei* allergens. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 16, n. 1-2, p. 129-140, Nov. 1992.

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

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

BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 13, n. 12, p. 480-482, Dec. 1988.

BASCOM, R.; PIPKORN, U.; LICHTENSTEIN, L. M.; NACLERIO, R.M. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge. Effect of systemic steroid pretreatment. **The American Review of Respiratory Disease**, Baltimore, v. 138, n. 2, p. 406-412, Aug. 1988.

BERGER, W. E. Overview of allergic rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v.90, p. 7-12, Jun. 2003. Supplement. 3.

BJORNSDOTTIR, U.S.; CYPCAR, D.M. Asthma: an inflammatory mediator soup. **Allergy**, Copenhagen, v. 54, p. 55-61, 1999. Supplement. 49.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 108, p. s147-s334, Nov. 2001. Supplement. 5.

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

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, Washington v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.

BUFE, A. The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 117, n. 4, p. 215-219, Dec. 1998.

BURKS, W.; SAMPSON, H. A.; BANNON, G. A. Peanut allergens. **Allergy**, Copenhagen, v. 53, n. 8, p. 725-730, Aug. 1998.

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

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

CHEONG, N.; SOON, S. C.; RAMOS, J. D.; KUO, I. C.; KOLATKAR, P. R.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blo t 1 and Der p 1. **Allergy**, Copenhagen, v. 58, n. 9, p. 912-920, Sep. 2003.

COSTELLO, P. S.; TURNER, M.; WALTERS, A. E.; CUNNINGHAM, C. N.; BAUER, P. H.; DOWNWARD, J.; TYBULEWICZ, V. L. Critical role for the tyrosine kinase Syk in signaling through the high affinity IgE receptor of mast cells. **Oncogene**, v. 13, n. 12, p. 2595-2605, Dec. 1996.

DÂNGELO, J.; FATTINI, C. Membro inferior. In-**Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar**, Rio de Janeiro, Brasil, 1998, p. 177-263.

DUFF, A. L.; PLATTS-MILLS, T. A. E., Allergens and asthma. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 39, n. 6, p. 1277-1291, Dec. 1992.

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

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

GELFAND, E.W. Inflammatory mediators in allergic rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 114, p. S135–S138, Nov. 2004. Supplement. 5.

GELFAND, E.W. Role of histamine in the pathophysiology of asthma: Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of H1-receptor antagonists.

The American Journal of Medicine, New York, v. 113, p. 2S–7S, Dec. 2002. Supplement. 9A.

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

GOLDSTEIN, I. J.; WINTER, H. C.; MO, H., MISAKI, A.; VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J. Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin II. Binding of laminaribiose oligosaccharides and beta-glucans containing beta1,6-glucosyl end groups. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 268, n. 9, p. 2616-2619, May 2001.

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

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

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

HARLIN, S.L.; ANSEL, D.G.; LANE, S.R.; MYERS, J.; KEPHART, G.M.; GLEICH, G.J. A clinical and pathologic study of chronic sinusitis: the role of the eosinophil. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 81, n. 5, p. 867–875, May 1988.

HEYMANN, P. W.; CHAPMAN, M. D.; AALBERSE, R. C.; FOX, J. W., PLATTS-MILLS, T. A. E. Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 83, n. 6, p. 1055-1067, Jun. 1989.

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

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004. **Unidades Federativas**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat>>. Acesso em 07 Fev. 2006.

ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic

rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) steering committee. **Lancet**, London, v.351, n. 9111, p. 1225-1232, Apr. 1998.

JENKINGS, N.; PAREKH, R.B.; JAMES, D.C. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, n. 8, p. 975-981, Aug, 1996.

JOHANNESSEN, B. R.; SKOV, L. K.; KASTRUP, J. S.; KRISTENSEN, O.; BOLWIG, C.; LARSEN, J. N.; SPANGFORT, M.; LUND, K.; GAJHEDE, M. Structure of the house dust mite allergen Der f 2: Implications for function and molecular basis of IgE cross-reactivity. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 579, n. 5, p. 1208-1212, Feb. 2005.

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

JULIUSSON, S.; PIPKORN, U.; KARLSSON, G.; ENERBACK, L. Mast cells and eosinophils in the allergic mucosa response to allergen challenge: changes in distribution and signs of activation in relation to symptoms. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 90, n. 6, p. 898-909, Dec, 1992.

KANCELJAK-MACAN, B.; MACAN, J.; PLAVEC, D.; KLEPAC, T.; MILKOVIC-KRAUS, S. The 3 mm skin prick test (SPT) threshold criterion is not reliable for *Tyrophagus putrescentiae*: the re-evaluation of SPT criterion to dust mites. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n. 12, p. 1187-1190, Dec. 2002.

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

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

KODA, A.; INAGAKI, N.; TSURUOKA, N.; DAIKOKU, M.; NAGAI, H.; YAGI, A.; NISHIOKA, I. Specific suppression of antigen antibody reactions by a dialyzates from *Dermatophagoides farinae*. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, Tokyo, v. 10, p. 104-111, 1987.

KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K.; OSAWA, T.; IRIMURA, T. A putative carbohydrate-binding domain of the lactose-binding *Cytisus sessilifolius* anti-

H(O) lectin has a similar amino acid sequence to that of the L-fucose-binding *Ulex europaeus* anti-H(O) lectin. **Glycoconjugate Journal**, Boston, v. 12, n. 2, p. 128-134, Apr. 1995.

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

LEDFORD, D.K.; LOCKEY, R.F. Allergic rhinitis: Understanding the process (a major contributor to health problems and on the rise). **The Journal of Respiratory Disease**, Greenwich, v. 19, n. 7, p. 576-584, Jul. 1998.

LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. IN: LIS, H., SHARON, N. **Lectins**. Academic Press Inc., 1986, p. 294-357.

LLOYD, K.O.; BITTON, M.A. Isolation and purification of a peptidoglycan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 107, n. 3, p. 663-671, Sep. 1971.

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

METZGER, H. It's spring and thoughts turn to ... allergies. **Cell**, Cambridge, v. 97, n. 3, p. 287-290, Apr. 1999.

MILÍAN, E.; DIÁZ, A. M. Allergy to house dust mites and asthma. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 23, n. 1, p. 47-57, Mar. 2004.

NAKANISHI, K.; SHIMOKATA, K. Immunoblot analysis of *Dermatophagoides farinae* antigen. **Annals of Allergy**, McLean, v. 64, n. 2, p. 219-231, Feb. 1990.

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

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

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

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

PIPKORN, U.; KARLSSON, G.; ENERBACK, L. The cellular response of the human allergic mucosa to natural allergen exposure. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 82, n. 6, p. 1046–1054, Dec. 1988.

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

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

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

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

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

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

ROBINSON, C.; KALSHEKER, N. A.; SRINIVASAN, N.; KING, C. M.; GARROD, D. R.; THOMPSON, P. J.; STEWART, G. A. On the potential significance of the enzymatic activity of mite allergens to immunogenicity. **Clinical and Experimental Allergy**, oxford, v. 27, n. 1, p. 10-21, Jan. 1997.

SAVOLAINEN, J. A standardized densitometric immunoblotting analysis of *Candida albicans* protein allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 357-363, Apr. 1995.

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

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

SELTZER, J. Biological contaminants. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 94, n. 2, p. 318-326, Aug. 1994.

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

SILVA, M. C.; JUSTINO, C. M.; PEREIRA, F. L.; SILVA SEGUNDO, G. R.; SILVA, D. A. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Exposição alérgica em cinemas na cidade de Goiânia, GO. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 194-197, 2005.

SIMONS, F. E. Allergic rhinobronchitis: the asthma-allergic rhinitis link. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 104, n. 3, p. 534–540, Sep. 1999.

SIMPSON, R. J.; NICE, E. C.; MORITZ, R. L.; STEWART, G. A. Structural studies on the allergen Der p I from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*: similarity with cysteine proteinases. **Protein Sequences & Data Analysis**. Berlin, v. 2, n. 1, p. 17-21, 1989.

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

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

SPADA, C.S.; KRAUSS, A.H.; NIEVES, A.L.; WOODWARD, D.F. Effects of leukotrienes B4 (LTB4) and D4 (LTD4) on motility of isolated normodense human eosinophils and neutrophils. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 400B, p. 699–706, 1997.

SQUILLACE, S. P.; SPORIK, R. B.; RAKES, G.; COUTURE, N.; LAWRENCE, A.; MERRIAM, S.; ZHANG, J.; PLATTS-MILLS, A.E. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. Multiple regression analysis of a population-based study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 156, n. 6, p. 1760-1764, Dec.1997.

STEWART, G. A.; ROBINSON, C. The immunobiology of allergenic peptidases. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 3-6, Jan. 2003.

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

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

TAKAI, T.; YOKOTA, T.; YASUE, M.; NISHIYAMA, C.; YUUKI, T.; MORI, A.; OKUDAIRA, H.; OKUMURA, Y. Engineering of the major house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, n. 8, p. 754-758, Aug. 1997.

TAMURA, H.; MOCHIZUKI, H.; SHIGETA, M.; ARAKAWA, H.; KUROUME, T. Studies of dialyzates from *Dermatophagoide farinae*: partial purification and haptenic properties of dialyzates from *Dermatophagoide farinae*. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, Basel, v. 96, n. 4, p. 322-330, 1991.

TERREEHORST, I.; OOSTING, A. J.; TEMPELS-PAVLICA, Z.; DE MONCHY, J. G.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C. A.; HAK, E.; VAN WIJK, R.G. Prevalence and severity of allergic rhinitis in house dust mite-allergic patients with bronchial asthma or atopic dermatitis. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 1160-1165, Aug. 2002.

THOMAS, W. R.; CHUA, K. Y. The major mite allergen Der p 2 – a secretion of the male mite reproductive tract? **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 667-669, Jul. 1995.

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

THOMAS, W. R.; SMITH, W. A.; HALES, B. J. The Allergenic Specificities of the House Dust Mite. **Chang Gung Medical Journal**, Taipei, v. 27, p. 563-569, 2004.

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

THOMAS, W. R., SMITH, W. Towards defining the full spectrum of important house dust mite allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 29, n. 12, p. 1583-1587, Dec. 1999.

TOGIAS, A. Rhinitis and asthma: evidence for respiratory system integration. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 111, n. 6, p. 1171-1184, Jun. 2003.

TOGIAS, A. Unique mechanistic features of allergic rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 105, p. S599-S604, Jun. 2000. Supplement. 6.

- TOPHAM, C. M.; SRINIVASAN, N.; THORPE, C. J.; OVERINGTON, L. P.; KALSHEKER, N. A. Comparative modelling of major house dust mite allergen Der p I: structure validation using an extent environmental amino acid propensity table. **Protein Engineering**, Oxford, v. 7, N. 7, p. 869-894, 1994.
- TOVEY, E. R.; BALDO, B. A. Comparison by electroblotting of IgE binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite culture. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 79, n. 1, p. 93-102, Jan. 1987.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, I. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4352, Sep. 1979.
- TROMBONE, A. P.; TOBIAS, K. R.; FERRIANI, V. P.; SCHUURMAN, J.; AALBERSE, R. C.; SMITH, A. M.; CHAPMAN, M. D.; ARRUDA, L. K. Use of a chimeric ELISA to investigate immunoglobulin E antibody responses to Der p 1 and Der p 2 in mite-allergic patients with asthma, wheezing and/or rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 32, n. 9, p. 1323-1328, Sep. 2002.
- TSAI, L. C.; CHAO, P. L.; SHEN, H. D.; TANG, R. B.; CHANG, T. C.; CHANG, Z. N.; HUNG, M. W.; LEE, B. L.; CHUA, K. Y. Isolation and characterization of a novel 98-kd *Dermatophagoides farinae* mite allergen. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 102, n. 2, p. 295-303, Aug. 1998.
- VAN DER ZEE, J. S.; VAN SWIETEN, P.; JANSEN, H. M.; AALBERSE, R. C. Skin tests and histamine release with P1-depleted *Dermatophagoides pteronyssinus* body extracts and purified P1. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 81, n. 5, p. 884-895, May 1988.
- VARNEY, V. A.; JACOBSON, M. R.; SUDDERICK, R. M.; ROBINSON, D. S.; IRANI, A. M.; SCHWARTZ, L. B.; MACKAY, I. S.; KAY, A. B.; DURHAM, S. R. Immunohistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis. Identification of activated T lymphocytes, eosinophils, and neutrophils. **The American Review of Respiratory Disease**, Baltimore, v. 146, n. 1, p. 170-176, Jul. 1992.
- VOORHORST, R.; SPIEKSMAN, F. T. M.; VAREKAMP, H.; LEUPEN, M. J.; LYKLEMA, A. W. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces. Identity with the house dust allergen. **Journal of Allergy**, St. Louis, v. 39, p. 325-339, 1967.
- WANG, D.; CLEMENT, P.; SMITZ, J.; DERDE, M. P. Concentrations of chemical mediators in nasal secretions of patients with hay fever during natural allergen exposure. **Acta Oto-Laryngologica**, Stockholm, v. 114, n. 5, p. 552-555, Sep. 1994.

WANG, D.; CLEMENT, P.; SMITZ, J.; DE WAELE, M.; DERDE, M. P. Correlations between complaints, inflammatory cells and mediator concentrations in nasal secretions after nasal allergen challenge and during natural allergen exposure. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 106, n. 3, p. 278–285, Mar. 1995.

WEATHERMAN, R. V.; MORTELL, K. H.; CHERVENAK, M.; KIESSLING, L. L.; TOONE, E. J. Specificity of C-glycoside complexation by mannose/glucose specific lectins. **Biochemistry**, Washington, v. 35, n. 11, p. 3619-3624, Mar. 1996.

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

WHITE, M.V., KALINER, M.A. Mediators of allergic rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 90, n. 4, p. 699–704, Oct. 1992.

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

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 154/04

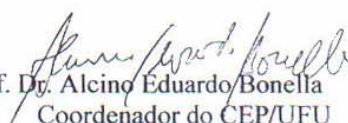
Registro CEP: 039/2002

Projeto Pesquisa: “*Identificação de frações alergênicas e avaliação da resposta imune humoral a Dermatophagoides pteronyssinus*”.

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação da extensão do projeto de pesquisa proposto, desde que seguidas as exigências anteriormente previstas na primeira aprovação.

Uberlândia, 18 de junho de 2004.


 Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
 Coordenador do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

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

ANEXO 2

Universidade Federal de Uberlândia**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

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

Uberlândia, 02 de maio de 2002.

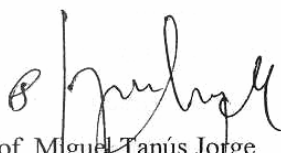
Processo nº 039/2002

PROJETO DE PESQUISA: “Identificação de Frações Alergênicas e Avaliação da Resposta Imune Humoral a Dermatophagoides Pteronyssinus”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ernesto Akio Taketomi

PARECER:

O projeto acima identificado, foi **aprovado** para ser realizado conforme os autores se comprometem.



Prof. Miguel Tanús Jorge
CEP/UFU

ANEXO 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Laboratório de Imunologia

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

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

Nome: _____ Prontuário HC: _____

Data do questionário: ____ / ____ / ____

Idade: _____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Sexo: () masculino () feminino

Grau de escolaridade: () Ensino fundamental () Ensino Médio

() Ensino Superior e/ou pós-graduação

Nível sócio-econômico (*renda familiar total*):

() até 1 salário mínimo

() de 5 a 10 salários mínimos

() de 1 a 2 salários mínimos

() mais de 10 salários mínimos

() de 2 a 5 salários mínimos

Questionário 1 (Módulo Asma)

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

() Sim

() Não

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

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

() Sim

() Não

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

Nenhuma crise ()

1 a 3 crises ()

4 a 12 crises ()

mais de 12 crises ()

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

Nunca acordou com chiado ()

Menos de uma noite por semana ()

Uma ou mais noites por semana ()

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

() Sim

() Não

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

() Sim

() Não

- 7) Nós últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?
 Sim Não
- 8) Alguma vez na vida você teve asma?
 Sim Não

Questionário 2 (Módulo Rinite)

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

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

ANEXO 4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Laboratório de Imunologia

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO (aprovado por CEP/UFU 154/04)

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado “**Reatividade de anticorpos IgE, IgG1 e IgG4 a antígenos glicosilados derivados de *Dermatophagoides farinae* em pacientes atópicos**”, cujo principal objetivo é fracionar proteínas alergênicas e avaliar suas reações com os anticorpos de indivíduos alérgicos.

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

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

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

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

Uberlândia, _____ de _____ de 200__.

ASSINATURA

TESTEMUNHA