

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

Produção de alérgeno Blo t 5 recombinante (rBlo t 5) de *Blomia tropicalis* e reatividade de anticorpos IgE a alérgenos Blo t 5 nativo e recombinante em pacientes atópicos

Carolina Guimarães Aguiar Moreira

Uberlândia
Fevereiro - 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

Produção de alérgeno Blo t 5 recombinante (rBlo t 5) de *Blomia tropicalis* e reatividade de anticorpos IgE a alérgenos Blo t 5 nativo e recombinante em pacientes atópicos

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Carolina Guimarães Aguiar Moreira

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Co-orientadora: Profa. Dra. Danielle Reis Napolitano

Uberlândia
Fevereiro - 2010

A Deus que me fortaleceu a cada amanhecer, ao meu esposo e minha mãe que foram meu aconchego de carinho durante toda essa caminhada.

*“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e
não na vitória propriamente dita. ” Mahatma Gandhi*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por serem meu esteio e fortaleza a cada momento da minha vida.

Ao meu esposo Guilherme, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo durante toda esta trajetória.

A minha mãe Márcia, por ser exemplo de amor incondicional e estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais “de coração”, Donizete e Marlúcia, por cuidarem de mim e do Guilherme com tanto carinho e amor.

Aos meus avós Messias e Juvenília, em especial a “Vó Nila”, que sempre me incentivou a alcançar voos maiores. Ficam a saudade e os ensinamentos a mim deixados.

Aos meus irmãos, Fernando, Eduardo, Flávio e Marcos, pelos momentos de alegrias e brincadeiras compartilhados.

Ao Professor Dr. Ernesto Akjo Taketomi pelos ensinamentos e confiança depositados em mim.

A Dra. Danielle Reis Napolitano, pelos ensinamentos e dedicação durante toda esse período.

A Professora Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, por ter me “adotado” durante a caminhada e transmitido mais que ensinamentos científicos. Me ensinou a olhar a vida e as pessoas de uma forma mais especial e carinhosa.

Ao Professor Dr. Jair Pereira Cunha Júnior por me auxiliar com conhecimentos científicos e práticos sempre que necessitei de sua ajuda.

Ao Dr. Carlos Roberto Prudêncio e a Dra. Janethe O. Pena, por abdicarem de seu tempo me auxiliando na concretização deste trabalho.

A amiga Luciana Calábria por estar sempre presente nos momentos difíceis.

Ao Leandro e a Daniela Beraldo, pela paciência e auxílio na realização deste trabalho.

As amigas Tatiane Monteiro, Carolina Silveira, Deusita Viana e Julianne Scalia pelos momentos agradáveis compartilhados durante a caminhada.

Aos amigos do GOU, sempre presente nas tardes de oração.

Aos demais amigos do Laboratório de Alergia: Laura, Isabella, Juliana, Bia, Ana Carolina, Núbia, Priscila, Karine, Bôscollí, Lucas, e aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia: Marley, Max, Zilda e Edilge, pelo auxílio nos momentos necessários.

Ao Coordenador Carlos Henrique pelo empenho e dedicação ao curso.

A todos os pacientes que colaboraram para a execução deste trabalho e aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a execução ou elaboração do mesmo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ABTS	2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid (Ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico])
Blo t 5	Alérgeno principal de <i>Blomia tropicalis</i> do grupo 5
BSA	Soroalbumina bovina
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
Bt-total	Extrato total de <i>Blomia tropicalis</i>
BT-	Grupo não sensibilizado a <i>Blomia tropicalis</i> , mas a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> e/ou <i>Dermatophagoides farinaei</i>
BT+	Grupo sensibilizado a <i>Blomia tropicalis</i> e/ou <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> e/ou <i>Dermatophagoides farinaei</i>
CaCl_2	Cloreto de cálcio
cDNA	Ácido desoxirribinucleico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
D.O.	Densidade óptica
DAB	3,3' diaminobenzina
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
DNA	Ácido desoxirribinucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DP	Desvio padrão
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)
Fc ϵ RI	Receptor 1 de IgE de alta afinidade
G	Gramma
G	Força relativa da gravidade
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IE	Índice ELISA
IFN- γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IPTG	Isopropyl- β -D- thiogalactopyranoside
M	Molar
Mg	Miligrama
MHC	Major histocompatibility complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm^2	Milímetro quadrado
N	Número de indivíduos

N°	Número
NA	Grupo de pacientes atópicos
nBlo t 5	Proteína nativa do grupo 5 de <i>Blomia tropicalis</i>
Ni-NTA	Coluna de níquel
NK	Células Natural Killer
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pET14b	Plasmídeo de expressão
pET14b-Blo t 5	Plasmídeo de expressão com o inserto Blo t 5
pTZ57R/T	Plasmídeo de clonagem
pTZ57R/T-Blo t 5	Plasmídeo de clonagem com o inserto Blo t 5
rBlo t 5	Proteína recombinante de Blo t 5 expressa em sistema procarioto <i>E.coli</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Enzima ribonuclease
RNA _{total Bt}	RNA total de <i>Blomia tropicalis</i>
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SP	Estado de São Paulo
Tampão EB	10 mM Tris-CL, pH8
Tampão TE	10mM Tris Cl; 1mM EDTA, pH8
TCP	Teste cutâneo de puntura
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TNF	Fator de necrose tumoral
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Atopia e alergia	13
1.2 Ácaros de poeira doméstica e imunoterapia	14
1.3 Fisiopatologia da resposta imune alérgica	15
1.4 <i>Blomia tropicalis</i>	17
1.5 Alérgenos de <i>Blomia tropicalis</i>	19
1.6 Alérgenos Recombinantes	21
1.7 Alérgeno Blo t 5	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Aspectos éticos	25
3.2 Seleção dos pacientes	25
3.3 Teste cutâneo de puntura (TCP) e coleta de sangue	25
3.4 Preparação dos extratos alergênicos de ácaros	26
3.5 Pesquisa de seqüências do gene dos antígeno Blo t 5 de <i>B. tropicalis</i>	27
3.6 Extração de RNA total de <i>B. tropicalis</i>	27
3.7 Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase (PCR)	27
3.8 Clonagem e transformação de bactérias competentes	28
3.8.1 Ligação cDNA Blo t 5 ao vetor pTZ57R/T	28
3.8.2 Transformação de <i>E.coli</i> DH5- α	28
3.9 Extração do plasmídeo pTZ57R/T- Blo t 5 de <i>E. coli</i> DH5- α	29
3.10 Digestão dos vetores	30
3.10.1 Padronização da digestão do vetor pTZ57R/T-Blo t 5	30
3.10.2 Digestão dos vetores pTZ57R/T-Blo t 5 e pET14b	31
3.11 Purificação e reação de ligação do inserto Blo t 5 ao vetor pET14b	31
3.12 Produção de células competentes (Rosetta DE 3)	31
3.13 Reação de Transformação do vetor pET14b-Blo t 5 em <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	32
3.14 Expressão de Blo t 5 em <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	32
3.14.1 Teste de Expressão de Blo t 5 em <i>E.coli</i> Rosetta (DE3)	32
3.14.2 Produção de Blo t 5 em <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) em larga escala	33
3.15 SDS-PAGE 15%	33
3.16 SDS-PAGE 5-22%	34
3.17 Extração e purificação da proteína recombinante Blo t 5	34
3.18 Dot-blot e Slot-blot para rBlo t 5	35
3.19 Mensuração de IgE específica ao extrato total de <i>Blomia tropicalis</i> e rBlo t 5	36
3.20 Mensuração de IgE específica a Blo t 5 nativa	37
3.21 Análise estatística	37
3.22 Biossegurança	38
4. RESULTADOS	39
4.1 Dados clínicos, demográficos e teste cutâneo dos pacientes	39

4.2 Sequência Gênica e dedução de aminoácido de Blo t 5	39
4.3 Obtenção de RNA total de <i>B. tropicalis</i> e gene de Blo t 5	39
4.4 Transformação de <i>E.coli</i> DH5α e <i>E. coli</i> Rosetta DE3	40
4.5 Expressão e purificação de Blo t 5 recombinante	40
4.6 Imunodeteccção de Blo t 5 recombinante	41
4.7 Níveis séricos de IgE e positividade ao extrato total de <i>B. tropicalis</i> , rBlo t 5 e nBlo t 5	41
4.8 Análise estratificada dos níveis séricos de IgE e positividade ao extrato total de <i>B. tropicalis</i> , rBlo t 5 e nBlo t 5	42
4.9 Correlação entre níveis de IgE ao extrato total <i>B. tropicalis</i> , rBlo t 5 e nBlo t 5	42
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO 1	72
ANEXO 2	73
ANEXO 3	74

RESUMO

Alergias são reações imunológicas causadas por substâncias capazes de desencadear respostas específicas de anticorpos IgE em indivíduos geneticamente predispostos, denominadas alérgenos. Em regiões tropicais e subtropicais, alérgenos provenientes de *Blomia tropicalis* são causas importantes de sensibilização mediada por respostas específicas de imunoglobulina E (IgE) entre os pacientes com asma e rinite alérgica. O objetivo deste estudo foi produzir o alérgeno recombinante Blo t 5 e avaliar a sua reatividade a IgE no soro de pacientes atópicos, em comparação com suas contrapartes nativas de *B. tropicalis* utilizando testes imunoenzimáticos. O DNA codificando para Blo t 5 foi obtido a partir do RNAm de *B. tropicalis* utilizando transcriptase reversa. A sequência de cDNA foi amplificada e subclonada em vetor de expressão *E. coli*, sendo a proteína rBlo t 5 expressa e purificada. A reatividade de IgE ao alérgeno nBlo t 5 e rBlo t 5 foi determinada por ELISA. rBlo t 5 foi capaz de se ligar a IgE, revelando a preservação de outros epítomos únicos de IgE a Blo t 5 ao grupo BT+ (36%) e BT- (31,2%). Este estudo comparativo confirmou a produção e purificação do alérgeno Blo t 5 recombinante, sendo que esta apresentou reatividade ao IgE nos soros dos pacientes que foram utilizados, com moderada correlação de reatividade de IgE entre os alérgenos rBlo t 5, extrato total de Bt e nBlo t 5.

PALAVRAS-CHAVE: *Blomia tropicalis*; Blo t 5; alergia; asma; rinite alérgica; alérgenos recombinante.

ABSTRACT

Allergies are caused by immunological reactions to allergens, which are substances capable of triggering specific IgE responses in genetically predisposed subjects. In tropical and subtropical regions, allergens derived from *B. tropicalis* are important causes of IgE-mediated sensitization among patients with asthma and allergic rhinitis. The aim of this study was to produce the recombinant Blo t 5 allergen and to evaluate its reactivity to IgE in sera from atopic patients compared to its native counterpart and *B. tropicalis* crude extract using immunoenzymatic assays. A full-length cDNA encoding Blo t 5 was cloned from a mRNA Bt using a transcriptase reverse and PCR. The cDNA was PCR-amplified, sequenced and subcloned into *E.coli* expression vector and recombinant protein rBlo t 5 was purified. Immunoglobulin E (IgE) reactivity of the nBlo t 5 and rBlo t 5 allergens was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). rBlo t 5 was capable of binding to IgE revealing the preservation of additional unique IgE epitopes in rBlo t 5 BT+ group (36%) and BT- (31,2%). This comparative study confirmed production and purification the recombinant Blo t 5. The recombinant protein showed great, when patients sera was used, presenting moderate correlation of human IgE reactivity between rBlo t and crude Bt extract, rBlo t 5 and nBlo t 5 in these sera in patients in Brazil.

KEY-WORDS: *Blomia tropicalis*; Blo t 5; allergy; asthma; recombinat allergen; allergic rhinitis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alergia e atopia

As doenças alérgicas apresentaram um expressivo aumento em sua prevalência e na morbidade nas últimas décadas. Fatores como o melhor reconhecimento da doença, maior reatividade imunológica, maior exposição ambiental, mudança no estilo de vida, aumento da permanência em ambientes fechados, modificações dos hábitos alimentares, aumento dos fatores infecciosos, concentração exacerbada de poluentes são alguns dos diversos fatores que explicam o elevado número de doentes e da sensibilização a alérgenos, na asma e rinite (YUNGINGER et al., 1992; MOSGES, 2002; PLATTS-MILLS, 2004; SOARES et al., 2007). Mesmo com os progressos na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e do maior arsenal terapêutico disponível, ainda não se consegue um controle efetivo das doenças alérgicas (BACHERT et al., 2008).

A tendência pessoal ou familiar de produzir anticorpos IgE em resposta às baixas doses de alérgenos ambientais, tais como proteínas antigênicas de ácaros, fungos, pólenes, e o desenvolvimento de doenças, como asma, rinite ou dermatite atópica é designado como atopia (JOHANSSON et al., 2001). Clemens Von Pirquet (1906) utilizou pela primeira vez o termo “alergia” (que vem do grego “*Allos*”, significando alteração do estado original), para designar “uma capacidade alterada do organismo de reagir a uma substância estranha”. Atualmente alergia é definida como parte de respostas do sistema imune, denominada reações de hipersensibilidade (CRONWELL, 1997; CHARLES et al., 2006).

As principais causas de reações imunológicas são as alergias a alérgenos, que são substâncias capazes de desencadear respostas IgE específicas. Após determinado estímulo alergênico os indivíduos apresentam manifestações clínicas, sendo estes geneticamente predispostos (JOHANSSON et al., 2004). As manifestações mais comuns das doenças alérgicas são a asma e a rinite que geralmente são desencadeadas após exposição aos alérgenos do meio ambiente (CAMARGOS et. Al., 2007). Elas são consideradas as principais doenças alérgicas respiratórias no Brasil e no mundo.

A rinite alérgica atinge aproximadamente 10 a 25% da população mundial e sua importância sócio-econômica é relevante, devido ao aumento de sua incidência em todas as partes do mundo (VON MUTIUS, 1998; BEASLEY et al., 2000). Na população brasileira, a prevalência média de rinite é de 27% a 34%. Ela causa vários desgastes, uma vez que ocasiona modificações na vida social dos pacientes e afeta o desempenho escolar e a

produtividade no trabalho (SOLE et al., 2004; BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001).

Segundo a Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia (1994), o evento fisiopatológico básico na asma é a inflamação das vias aéreas, que caracteriza-se por obstruções reversíveis e hiperreatividade dos brônquios a vários estímulos diferentes. Estes processos são desencadeados por reações alérgicas, acometendo pessoas de várias idades e diferentes classes sociais, persistindo com alta morbidade e mortalidade (FERRARI et al., 1998).

1.2 Ácaros de poeira doméstica e imunoterapia

Uma das mais importantes fontes de alérgenos em todo o mundo são ácaros de poeira domiciliar que foram descritos a partir das famílias Acaridae, Glycophagidae e Pyroglyphidae. Os ácaros da família Acaridae, *Acarus siro* e *Tyrophagus putrescentiae*, são fontes de menor importância entre os alérgenos da poeira doméstica. Para a família Glycophagidae, *Lepidoglyphus destructor* é considerado um ácaro essencialmente de armazenamento, enquanto família Echimypodidae a *Blomia tropicalis* tem emergido como um importante ácaro da poeira doméstica em regiões tropicais e regiões subtropicais. Os ácaros da família Pyroglyphidae, *Dermatophagoides pteronyssinus*, são distribuídos a partir de regiões com clima temperado para tropical, enquanto *Dermatophagoides farinae* são encontrados em regiões mais secas. Por outro lado, o *Euroglyphus maynei* é encontrado em regiões temperadas, mas em menor abundância (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001, THOMAS; HALES; SMITH, 2003).

Mais de 40 espécies de ácaros são encontradas na poeira doméstica e alimentam-se de várias fontes de proteínas, especialmente descamação de células mortas da pele humana. Eles necessitam de água em sua alimentação diária. As condições mais favoráveis para a procriação de ácaros são a umidade relativa de 80 a 90% e a temperatura de 23 a 30°C. Um grama de poeira pode conter várias centenas de milhares de ácaros. Eles são encontrados principalmente em colchões, cobertores, travesseiros e onde existem aglomerados de população (FERNANDEZ-CALDAS, 1997; GUERRANT; WALKER; WELLE, 2006; YONG; JEONG, 2009).

Mais de 50% dos pacientes alérgicos e até 80% das crianças asmáticas são sensibilizados a alérgenos de ácaros (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001; PICHLER; HELBLING; PICHLER, 2001).

A imunoterapia utilizando extratos alergênicos de ácaros de poeira é eficaz para o tratamento da rinite alérgica e asma, resultando na diminuição da hiper-reatividade brônquica (PICHLER; HELBLING; PICHLER, 2001). Em um estudo realizado por Pajno et al (2001), observou-se que a imunoterapia específica a ácaros realizada na infância pode impedir o início das sensibilizações alérgicas a de outras fontes de alérgenos. Em um estudo que avaliou a presença dos ácaros nas habitações não houve diferença entre a presença dos mesmos nas habitações de pessoas atópicas e nas de pessoas saudáveis.

As formas mais eficientes encontradas para remover os ácaros são: lavagem da casa, lavagem dos objetos e a secagem para retirar a maior porcentagem de umidade possível (PARK et al., 2002; YONG; JEONG, 2009).

Em São Paulo-SP, foi verificada alta frequência nos níveis de IgE específica a *D. pteronyssinus* na maioria das crianças estudadas (95%) (ARRUDA, et al., 1991). Soares e colaboradores (2007) evidenciaram que os níveis de sensibilização aos ácaros *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis* na população de Uberlândia-MG foram respectivamente, 61.7%, 59.9% e 54.7%, confirmando sua importância como fonte de alérgenos em pacientes desta região.

Testes cutâneos ou a mensuração de anticorpos IgE específicos no soro são usados para indicarem sensibilização, mas devem ser combinados com a história do sujeito, para diagnosticar a alergia clínica (RING et.al., 1989; FUIANO; FUSILLI; CRISTOFORO, 2009).

1.3 Fisiopatologia da resposta imune alérgica

As manifestações clínicas e patológicas da hipersensibilidade imediata (reação imediata) consistem na reação vascular e da musculatura lisa, que se desenvolve rapidamente após a re-exposição ao alérgeno, ou como reação tardia representada principalmente por um processo inflamatório. As reações de hipersensibilidade imediata são desencadeadas através da exposição ao alérgeno que estimula às respostas imunes com padrão Th2, com consequente produção de IgE, seguido da ligação cruzadas aos receptores Fcε nos mastócitos ocasionado pelo alérgeno, que leva a ativação de mastócitos e liberação de mediadores pré-formados, como histamina e derivados de lipídeos, como os leucotrienos e prostaglandinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A resposta de fase tardia ocorre após 4 a 8 horas e os principais mediadores desta resposta são os leucotrienos, citocinas, sobretudo as interleucinas do tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13) e as moléculas de adesão, tais como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (GALLI; LANTZ, 1999; JANSON et al., 2005).

As respostas imunológicas à sensibilização alérgica ocorrem poucos minutos após o contato com o alérgeno, com os sintomas iniciados através de mediadores pré-formados e os recém sintetizados, sendo que a liberação da histamina, prostaglandinas e fatores quimiotáticos são responsáveis pelo desencadeamento dos sintomas característicos da rinite alérgica (WHITE; KALINER, 1992; TOGIAS, 2000).

Segundo Marrone (1998), o processamento do alérgeno pela célula apresentadora de antígeno (APC) resulta na formação de peptídeos que são apresentados à célula T CD4⁺ em associação com moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O desencadeamento da resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigênico e de várias etapas da resposta imune do hospedeiro. O processamento do alérgeno pela APC resulta na formação de peptídeos que são apresentados à célula T CD4⁺ em associação com moléculas de classe II do MHC.

As interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 são secretadas por células Th2 ativadas, que auxiliam as células B a produzirem anticorpos IgE e IgG4, bem como produção e degeneração eosinófilos, basófilos e mastócitos. A presença de IFN- γ e TNF- β produzidas por células do perfil Th1 inibe a síntese de IgE pelas células B, enquanto IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 estimulam sua síntese (WORM; HENZ, 1997). Subpopulações de células T CD4⁺CD25⁺ denominadas de células T reguladoras (Treg) produtoras de TGF- β e IL-10 têm sido reconhecidas com propriedades imunomoduladoras do perfil Th1 bem como estímulo para a produção de anticorpos da classe IgA (WEINER, 1997). Estudos têm mostrado que o mecanismo de supressão das respostas em diferentes condições patológicas (autoimunidade, respostas alérgicas e infecciosas, entre outras) é dependente da produção e secreção de mediadores como TGF- β e/ou IL-10 (PICCIRILLO et al., 2002).

As células Th17 desempenham importantes funções na indução da inflamação tecidual pela indução de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, particularmente envolvendo o recrutamento e ativação de neutrófilos (OBOKI et al., 2008). Foi demonstrado que em pacientes asmáticos, a expressão de RNAm codificando para IL-17 foi aumentada em pulmões, escarro, lavado broncoalveolar e soro, e a gravidade da hiperssensibilidade das vias aéreas em pacientes correlaciona com os níveis de expressão de RNAm para IL-17, sugerindo que esta citocina possui um papel importante na inflamação alérgica (WANG; LIU, 2008; OBOKI et al., 2008).

1.4 *Blomia tropicalis*

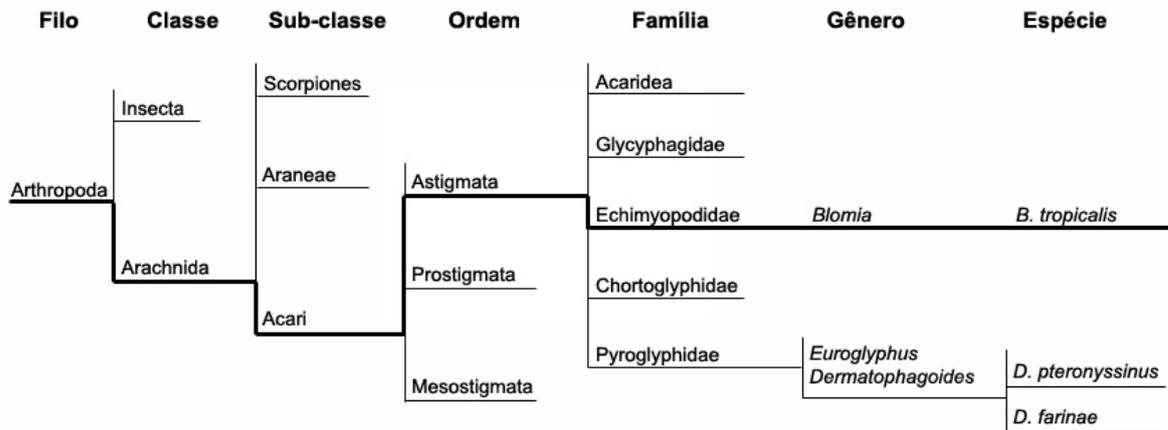
Blomia tropicalis foi pela primeira vez descrito por Van Bronswijk, de Cock e Oshima (1973) como pequeno ácaro, com 230 a 465µm de comprimento, de forma globular e se distingue facilmente de outros ácaros da poeira domiciliar por apresentar um aspecto com longas antenas que saem de seu corpo, semelhante ao porco espinho.



Blomia tropicalis, ácaro da poeira domiciliar (www.asma-bronquica.com.br).

Este ácaro pode ser encontrado principalmente em regiões tropicais e sub-tropicais, exercendo importante papel clínico nestas regiões. Sua classificação taxonômica é: Reino Metazoa; Filo: Artopida; Classe: Arachnida; Ordem: Astigmata; Família: Echimyopodidae; Gênero: *Blomia*; Espécie: *Blomia tropicalis* (COLLOFF, 1998).

Previamente era encontrado em fazendas, sendo considerado ácaro de armazenamento, e posteriormente identificado em poeira domiciliar de áreas tropicais e sub-tropicais, onde a temperatura média é cerca de 28°C e a umidade relativa média é de aproximadamente 82% (ARRUDA et al., 1991; YI et al., 2006).



Posição taxonômica dos principais ácaros da poeira domiciliar. *Adaptado de: Chua; Cheong; Kuo (2007).*

A maioria dos estudos publicados sobre a sensibilização *Blomia tropicalis* foram originados nas Américas e demonstrados em países como Colômbia e Brasil, onde a sensibilização a este ácaro é aproximadamente 60-80% nos indivíduos com asma e rinite. Outros países como Cuba e Estados Unidos verificaram 85% e 38% de indivíduos com asma e ou rinite sensibilizados a esse ácaro através do teste cutâneo de puntura (TCP), demonstrando que a asma e a rinite alérgica estão fortemente associadas com a sensibilização ao ácaro *Blomia tropicalis* (PUERTA, et al., 1991; PUERTA, et al., 1993; ARRUDA et al., 1997; STANALAND, et al., 1994). Além disso, foram demonstrados que 90-96% da população atópica de Cingapura no sudeste asiático eram sensibilizados a ácaros sendo incluído *Blomia tropicalis* (KUO et al., 1999). Nessas áreas o ácaro *Blomia tropicalis* tem sido demonstrado um componente importante aos alérgenos de ácaros de poeira, clinicamente induzindo a respostas de IgE em pacientes com doenças alérgicas, como asma e rinite (PUERTA et al., 1991; ARRUDA et al., 1997; FERNADES-CALDA et al., 1993; KUO, 2003).

Vários autores têm demonstrado que *Blomia tropicalis* possui reatividade cruzada com outros ácaros, dentre eles podemos destacar: *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *D. siboney*, *Euroglyphus mayne*, *L. destructor*, *Suidasia medanensis* (ARRUDA et al., 1997; MORGAN; ARLIAN; FERNANDEZ-CALDAS, 1996; CHEW et al., 1999; YI et al., 2002; GARCIA, et al., 2003; PUERTA, et al., 2005).

Estudo realizado com populações não expostas, que vivem em clima temperado onde *Blomia tropicalis* não é encontrado em poeira doméstica, demonstrou que 50% dos pacientes atópicos sensibilizados a *Dermatophagoides ssp* tiveram reatividade a IgE para *B. tropicalis*,

porém de 10 a 100 vezes menor que em relação a *D. pteronyssinus*, sugerindo a hipótese de reatividade cruzada entre os alérgenos. Outro estudo demonstrou que 63% dos pacientes asmáticos sensibilizados a *D. pteronyssinus*, também foram sensibilizados a *Blomia tropicalis* (SIMPSON; ARRUDA; CHAPMAN, 1997; ARRUDA et al., 1997).

A reatividade cruzada aos ácaros *Dermatophagoides ssp* e *B. tropicalis* foi avaliada nas regiões tropicais onde foi demonstrado moderada reatividade cruzada entre os mesmos (ARRUDA et al.; 1997). A resposta de IgE a *B. tropicalis* foi inibida de 47 a 58% pelo ácaro *D. siboney* (FERRADIZ; CASAS; DREBORG, 1996, YI, 2006).

A importância clínica dos alérgenos de *B. tropicalis* foi demonstrada em regiões tropicais e sub-tropicais e a frequência da dupla sensibilização entre os ácaros *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*, sendo considerada elevada (SOARES et al, 2007; ALMEIDA et al, 2006, ARRUDA et al, 1997).

1.5 Alérgenos de *Blomia tropicalis*

Os avanços da biologia molecular ao longo destas últimas décadas proporcionaram, através de técnicas moleculares, o desenvolvimento de alérgenos puros e quimicamente bem definidos, sendo utilizados como importantes ferramentas no diagnóstico e na imunoterapia de doenças alérgicas respiratórias (VALENTA et al., 1999; LARCHÉ, 2006).

Com a ajuda da tecnologia do DNA recombinante, muitos alérgenos importantes de vários ácaros já foram clonados e caracterizados a nível molecular. A combinação de técnicas moleculares e imunológicas tem desempenhado um importante papel para a compreensão imunológica dos ácaros de poeira e seu real papel nas doenças alérgicas (CHUA et al., 2007).

Aproximadamente 20 alérgenos de *B. tropicalis* já foram identificados e descritos na literatura. A Blo t 1 é proteína de 221 resíduos, codificada por um DNA que apresenta 663 pb e peso molecular aproximado de 25 kDa, sendo caracterizada funcionalmente como cisteína protease. Seu alérgeno principal é um homólogo de Der p 1, apresentando 35% de identidade de sua seqüência de aminoácidos com outros ácaros de poeira do grupo 1 (MORA; FLORES; MONTEALEGRE; DIAZ, 2003). A reatividade de Blo t 1 foi relatada em 60 a 92% pacientes asmáticos, mas a titulação de IgE foi baixa, comparada com os alérgenos do Grupo 1 de outros ácaros (FONSECA; DIAZ, 2003; MORA; FLORES; MONTEALEGRE; DIAZ, 2003). Sua forma recombinante foi expressa em sistema eucarioto *Pichia pastoris* apresentando até 90% de reatividade IgE em crianças asmáticas (CHEONG et al., 2003).

Grupo 2 de alérgeno *Blomia tropicalis* ainda não foi totalmente caracterizado, sua função molecular é desconhecida e possui 39% de homologia com Der p 2 (CHUA et al., 2007). O

alérgeno grupo 3 de *Blomia tropicalis* foi clonado com seu DNA apresentando 798 pb, codificando 231 aminoácidos, sendo caracterizada funcionalmente como tripsina cisteína. Seu peso molecular é 27.5 kDa e apresenta uma reatividade a IgE de aproximadamente 50-57% (YANG, 2003; FLORES, 2003).

O alérgeno Blo t 4 do Grupo 4 possui peso molecular de 56 kDa e apresenta 65% de homologia com o alérgeno Der p 4. Sua função protéica é alfa amilase apresentando menos de 15% de reatividade aos anticorpos IgE em pacientes sensibilizados a *Blomia tropicalis* (MILLS et al., 1999).

Blo t 5 é o principal alérgeno de *Blomia tropicalis*. Este foi o primeiro alérgeno a ser clonado e expresso em sistema procarioto apresentando DNA 432 pb e codificando 134 aminoácidos. Além disso, possui aproximadamente 14 kDa e apresenta de 70 a 90% de reatividade ao anticorpo IgE em pacientes atópicos. A homologia ao alérgeno Der p 5 é de 40 a 50% (ARRUDA et al., 1995).

O alérgeno Blo t 6 apresenta aproximadamente 10 a 20 % de reatividade a IgE em soros de pacientes asmáticos. Seu DNA é constituído de 1045 pb e 270 aminoácidos com peso molecular de 25 kDa, e sua homologia com Der p 6 é de 58% (THOMAS et al., 2002; THOMAS; SMITH; HALES, 2004).

O alérgeno Blo t 10 foi expresso em sistema procarioto e 20 a 29% de IgE presente nos soros de pacientes atópicos tiveram reatividade com IgE. Codificado por uma proteína de 284 aminoácidos a partir de um DNA de 852 pb, possui mais de 90% de homologia com outros ácaros do grupo 10 e seu grupo funcional é uma tropomiosina (YI et al., 2002).

O Blo t 11 é considerado o alérgeno com maior peso molecular de *Blomia tropicalis*, aproximadamente 102 kDa. Apresenta em seu DNA 2625 pb que codifica uma proteína de 875 aminoácidos, sua função molecular é a paramiosina e seu recombinante apresenta uma reatividade com o IgE de 18 a 52% (RAMOS, et al., 2003 a; RAMOS, et al., 2003 b).

O Blo t 12 é um alérgeno com DNA apresentando 582 pb e o peso molecular em torno de 14,2 kDa, sendo expresso em sistema eucarioto e procarioto com variações na reatividade de 20 a 50% (LIM et al., 2002; PUERTA et al., 1996).

O Grupo 13 *Blomia tropicalis* possui peso molecular de aproximadamente 14 kDa sendo expresso por sistema procarioto, apresentando baixa reatividade a IgE (11%) e 80% de homologia com Der p 13 (CARABALLO et al., 1997; CHUA et al., 2007).

O alérgeno Blo t 19 é codificado por 507 pb, com peso molecular de 7.2 kDa e baixa a moderada reatividade a IgE de 3 a 20% (THOMAS et al., 2002).

1.6 Alérgenos Recombinantes

Uma ferramenta importante utilizada no estudo de alérgenos a ácaros são proteínas recombinantes. Elas podem ser usadas para melhoria da eficácia clínica do diagnóstico e tratamento de alergias respiratórias (GAO et al., 2007, GOH et al., 2001).

A biologia molecular permitiu a produção, identificação e a caracterização de várias proteínas recombinantes em larga escala, as quais apresentam fundamental importância no diagnóstico sensível e específico, além de um estudo mais detalhado dos fatores que influenciam a alergenicidade e imunogenicidade de determinado alérgeno. Uma seleção cuidadosa para a clonagem pode resultar em alérgenos recombinantes com atividade alergênica comparada àquela apresentada pelos naturais (SCHEINER; KRAFT, 1995; VALENTA et al., 1999).

Estudos comparativos entre proteínas recombinantes inteiras e fragmentos (peptídeos) têm demonstrado diferenças de reatividade para IgE, podendo ser encontradas porções tanto hiperalergênicas quanto hipoalergênicas da molécula (NIEDERBERG et al, 2004; NAIK et al, 2008).

Niederberger et al. (2004) produziram peptídeos derivados de Bet v 1, o principal alérgeno de pólen de Bétula, cuja reatividade para IgE foi 100 vezes menor que da proteína inteira, para utilização em diferentes protocolos de vacinação. Por outro lado, vários pesquisadores têm focado sua atenção na identificação de epítomos de alérgenos que se liguem mais fortemente a IgE, com o objetivo de melhorar o diagnóstico de doenças alérgicas (Yi et al., 2002; RAMOS et al., 2003a; RAMOS et al., 2003b).

Atualmente, sistemas de expressão, em bactérias, leveduras e sistemas virais, de maneira bastante padronizada tem resultado em grandes quantidades de proteínas de alérgenos recombinantes que podem ser facilmente purificáveis (GELLISSEN, 2000).

A maioria dos protocolos utiliza atualmente o sistema de expressão em *E. coli*, procarionto pouco exigente e de crescimento acelerado, com ciclos completos a cada 20 minutos. No entanto, alguns casos de proteínas expressas não reativas neste sistema foram evidenciados, possivelmente devido às diferenças nos mecanismos de expressão e/ou nas modificações pós-traducionais, exclusivas de sistemas eucariotos (LASCOMBE et al., 2000; SMITH et al., 2001).

A vantagem de se utilizar alérgenos recombinantes para propósitos de diagnóstico é que eles podem ser sistematicamente produzidos com alto grau de pureza, a concentração protéica pode ser pré-determinada e pode se produzir misturas padronizadas de alérgenos de diferentes fontes (CHAPMAN et al., 2000).

Assim, a produção de alérgenos recombinantes é uma maneira eficiente de se obter altos rendimentos para estudos imunológicos e bioquímicos, bem como diagnóstico e tratamento de doenças mediadas por IgE (LIM et al., 2004).

1.7 Alérgeno Blo t 5

O alérgeno Blo t 5 é considerado clinicamente um dos principais alérgenos de *Blomia tropicalis* possuindo em seu DNA 432 pb que codifica uma proteína de 134 aminoácidos, com aproximadamente 14 kDa (ARRUDA et al., 1995).

Blo t 5 se encontra principalmente na parede do intestino médio e posterior e nas fezes do ácaro *B. tropicalis* (GAO et al., 2007), sendo reconhecidas várias formas nativas Blo t 5 (Yi et al., 2002, Yi et al., 2006).

A proteína Blo t 5 foi o primeiro alérgeno de *Blomia tropicalis* a ser expresso de forma recombinante em sistema procarioto utilizando proteínas de fusão GST (ARRUDA et al., 1997). Atualmente, ela já foi expressa em vários tipos de sistema. Goh et al. (2001) realizaram a expressão utilizando clones *Pichia pastoris*, resultando em uma proteína que apresentou 14 kDa, sendo demonstrada reatividade ao anticorpo IgE em soros de indivíduos atópicos. LIM, et al., (2004) expressaram Blo t 5 em óvulos de hamster encontrando uma correlação entre a reatividade a Blo t 5 recombinante expressa e a forma nativa em testes cutâneos.

Em países asiáticos, a sensibilização a Blo t 5 é uma das mais prevalentes entre os indivíduos atópicos, podendo exceder a 70%, o que pode ser justificado pelo excesso de exposição, devido a abundância desse alérgeno no ambiente, podendo ser encontrado em 32 a 40% das residências (LIM et al., 2002; CHEW et al., 1999; YI, 2006).

Estudos realizados com pacientes asmáticos de regiões subtropicais e tropicais demonstraram que 70% apresentaram reatividade ao anticorpo IgE a Blo t 5 por imunoenaios (ARRUDA et al., 1997). A maioria dos indivíduos sensibilizados a este alérgeno apresentaram altos títulos de IgE específica, demonstrando elevado potencial alergênico (YI, et al 2002; YI et al., 2004).

Apesar de existir uma homologia de 42% entre o grupo 5 de *B. tropicalis* e *D. pteronyssionus*, alguns estudos demonstraram a existência de moderada a baixa reatividade entre eles (CHEW et al., 1999). Outro estudo foi capaz de demonstrar que os alérgenos de Blo t 5 e Der p 5 apresentaram inibição de aproximadamente 75% IgE do outro alérgeno, sugerindo uma importante reatividade cruzada entre ambos (CARABALLO et al., 1997).

Devido à grande importância de Blo t 5, vários de seus epítomos estão sendo estudados e já foi determinado que peptídeos com resíduos 35-50 conseguiram inibir mais de 50% da

reatividade vinculada a Blo t 5. Peptídeos que abrangem os resíduos 45-50 inibiram 37% de ligação a IgE a Blo t 5 e peptídios 46-61 inibiram 16% dessas ligações (CARABALLO et al., 1997; YI et al., 2006). Vários autores relatam que Blo t 5 pode ser usado para o desenvolvimento de reagentes diagnósticos à alergia aos ácaros, e que estudos devem ser continuados a fim de desenvolver um forma de Blo t 5 hipoalergênica com possíveis utilizações na imunoterapia (YI, 2002; YI, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo principal foi utilizar a metodologia de produção de proteínas recombinantes, relacionada com alérgenos de *Blomia tropicalis* e comparar sua reatividade a IgE de soros de pacientes atópicos aos alérgenos de extrato total deste ácaro e com o alérgeno Blo t 5 recombinante e nativa.

2.2 Específicos

- Clonar, expressar e purificar proteínas recombinantes Blo t 5 de *B. tropicalis*;

- Comparar a resposta de anticorpo IgE em soros de pacientes a alérgenos de *B. tropicalis* e Blo t 5 nativa e recombinante de pacientes atópicos;

- Verificar a utilidade do alérgeno Blo t 5 para avaliação da sensibilização a *Blomia tropicalis* em pacientes com asma e rinite alérgica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos (Anexo 1). Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), estando cientes de todos os procedimentos adotados e responderam a um questionário clínico elaborado segundo *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC, 1998) (Anexo 3).

3.2 Seleção dos pacientes

Um total de 121 indivíduos adultos foram recrutados para o estudo. Noventa e um indivíduos (32 homens e 59 mulheres, com idade entre 18 a 65 anos) tinham rinite alérgica (RA) com ou sem asma leve a moderada e foram selecionados no Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia com base na história clínica de sintomas alérgicos após exposição aos ácaros da poeira doméstica e teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a alérgenos de ácaros. A presença de manifestações de espirros, rinorréia e/ou obstrução nasal intermitente, relacionadas à exposição a alérgenos inaláveis e na história pessoal e/ou familiar de doenças atópicas foi determinante para o diagnóstico de rinite alérgica enquanto que a presença de dispnéia e sibilância foi determinante para o diagnóstico clínico de asma (ISAAC, 1998).

Como grupo controle, 30 indivíduos saudáveis (6 homens e 24 mulheres, com idade de 18 a 47 anos) também foram selecionados entre os alunos dos cursos de graduação e pós graduação da UFU, com base na ausência de história clínica de alergia e TCP negativo a um painel de aeroalérgenos padronizados (não-atópicos, NA).

Os critérios de exclusão utilizados foram: uso de anti-histamínicos ou corticosteróides, por via oral ou tópica, na semana anterior ao teste; uso de corticosteróides sistêmicos por período de tempo prolongado; pacientes com prévia imunoterapia específica com alérgenos; pacientes com asma grave, doenças cardiovasculares ou auto-imunes, fazendo uso de drogas quimioterápicas ou imunossupressoras; presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo.

3.3 Teste cutâneo de puntura (TCP) e coleta de sangue

Todos os indivíduos participantes do estudo foram submetidos ao teste cutâneo de puntura (TCP) de acordo com Ownby (1988) para avaliar a hipersensibilidade imediata. O teste foi realizado na região do antebraço dos indivíduos, sendo primeiramente realizada a anti-sepsia local com álcool etílico 70% e depositado aproximadamente 10 µL dos seguintes extratos alergênicos glicerinados: extratos de ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*), preparados como descrito anteriormente (PEREIRA et al., 2005); extratos comerciais de barata (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*), de fungo (*Alternaria alternata*) e de epitélio de animais domésticos (*Felis domesticus* e *Canis familiaris*) (FDA Allergenic, Rio de Janeiro, São Paulo, Brasil). Como controle positivo foi utilizada solução de histamina a 10 mg/mL e, como controle negativo, diluente da preparação alergênica tamponado com glicerol (FDA Allergenic, Rio de Janeiro, Brasil). A mensuração da pápula foi realizada após 15 minutos, considerando como TCP positivo as pápulas com diâmetro médio maior que 3 mm que aquelas do controle negativo (McKAY et al., 2006).

Paralelamente ao TCP, foram coletadas amostras de sangue (10 mL) sem anti-coagulante de cada indivíduo utilizando tubos *Vacutainer* (Becton, Dickinson and Company, Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, EUA) e agulhas 21G1 para punção venosa na região do antebraço. As amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos a 700 x g e os soros obtidos foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.4 Preparação dos extratos alergênicos de ácaros

A extração dos alérgenos de ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis*) foi realizada de acordo com o protocolo anteriormente descrito (PEREIRA et al., 2005). Em resumo, 200 g de material seco de cultivo de ácaros (gentilmente cedido pelo Prof. Federico Montealegre, Immunochemistry Laboratory, Medical School of Ponce – Porto Rico, EUA) foram peneirados, adicionados em solução salina tamponada com borato 5 mM (pH 8,0) contendo inibidores de proteases (50 µg/mL de leupeptina, 10 µg/mL de aprotinina, 1,6 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF], 1 mM de benzamidina), macerados em nitrogênio líquido para ruptura dos ácaros e incubados durante 18 horas a 4°C sob agitação para extração dos alérgenos. Após centrifugação a 20.000 x g durante 45 minutos a 4°C, o sobrenadante foi dialisado em solução salina tamponada com fosfatos 0.01 M pH 7.2 (PBS) por 24 horas a 4°C, consistindo no extrato total de ácaros, o qual foi distribuído em alíquotas e armazenado a -20°C.

O conteúdo protéico dos extratos totais de ácaros foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando soroalbumina bovina como padrão protéico para a curva de calibração.

Para o TCP, os extratos alergênicos de ácaros foram preparados a partir dos extratos totais, em concentração protéica final de 2 mg/mL em PBS contendo 0.4% de fenol e 50% de glicerina (Bayer Corporation, Spokane, EUA). Os extratos foram armazenados em frascos de vidro do tipo âmbar com conta-gotas a 4°C até a realização dos testes cutâneos.

3.5 Pesquisa de seqüências do gene dos antígeno Blo t 5 de *B. tropicalis*

Seqüências do gene e de aminoácidos que codificam a proteína Blo t 5 de *B. tropicalis* foram obtidas do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) tendo número de acesso *DQ788684* e *U59102* respectivamente e www.allergen.org (list of allergens: Animalia Arthropoda > Astigmata > Blomia tropicalis

Por meio das seqüências encontradas, foram planejados e sintetizados os três oligonucleotídeos (*primers*) iniciadores utilizados para a amplificação do cDNA do gene Blo t 5, sendo *primers* F (5'-CAATTACATATGAAGTTCGCCATCGTTCTT-3'); R0 (5'-GAACATTTATTGACATTTAAT-3') e R (5'-CATGGGATCCTTATTGGGTTTGAATATCCTT-3'). Os *primers* F e R foram sintetizados contendo os sítios para as enzimas de restrição *Nde I* (New England Biolabs, Inc Ipswich, MA, EUA) (CATATG) e *Bam HI* (New England Biolabs, Inc) (GGATCC).

3.6 Extração de RNA total de *B. tropicalis*

Para a realização da extração de RNA de *B. tropicalis* foram utilizados um total 600 ácaros contados individualmente, com auxílio de lupa, depositados em microtubo de 1,5 mL, para extração de RNA total utilizando o kit “Ultraclean Tissue RNA Isolation” (Mobio Laboratories, Cralsbad, CA, EUA) conforme instruções do fabricante. Para verificar a integridade da amostra RNA total obtida, realizou-se eletroforese em gel de RNA [Agarose 1%; 0,1 M (3-N-Morphalino), propanisulfonic Acid, 40 mM Sodium acetate, 5 mM EDTA pH 8], para verificar a presença das bandas 28S, 18S e 5S, corrido por uma hora a 120Volts.

3.7 Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Transcriptase reversa foi realizada utilizando kit “One Step RNA PCR” (TaKaRa Biotech Co. Led. Japão) conforme instruções do fabricante, descrito resumidamente. Primeiramente, foi realizada uma amplificação de RNA total do ácaro *B. tropicalis* por reação

em cadeia da polimerase PCR com transcriptase reversa, utilizando “One Step RNA PCR Kit” (TaKaRa Biotech Co. Led. Japão) e termociclador (Base for gene Pro Thermal Cycle, China). Para um volume final 50 μ L: 20 pmol dos “*primers*” F e R0, 2 μ g de RNA total, 2,5 mM de dNTP, 40 unidades de inibidores de RNase, 5 unidades de M-MLV Reverse Transcriptase XL, 5 unidades de Taq-polimerase. A seguir a reação foi incubada 50°C por 30 minutos e após 94°C por 2 minutos para amplificação do gene Blo t 5, sendo posteriormente submetida a 30 ciclos de amplificação 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e uma incubação final de 72°C por 5 minutos. O produto desta PCR foi analisado por eletroforese em gel 1% de agarose (Ultra Pura Invitrogen), utilizando como corante Blue Green Loading (LGC Biotecnologia LTDA, Cotia, São Paulo, Brasil) corrido por 1 hora a 120 Volts.

Uma segunda reação utilizando a técnica de Nested PCR foi realizada para obter o cDNA que codifica Blo t 5, o produto acima foi tratado como molde para a reação, sendo utilizado os *primers* F e R nas seguintes condições: um volume final de 50 μ L contendo 20 pmol de *primers* F e R, 5 μ L do produto de PCR, 2,5 mM de dNTP (Invitrogen), 5 unidades de Taq-polimerase (Platinum® Taq DNA Polimerase Invitrogen). As condições de amplificação foram 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto finalizando com uma incubação de 72°C por 5 minutos. O produto final foi analisado por eletroforese em 1% gel de agarose com previamente descrito.

3.8 Clonagem e transformação de bactérias competentes

3.8.1 Ligação cDNA Blo t 5 ao vetor pTZ57R/T

Para realizar a ligação do produto amplificado Blo t 5 por PCR ao vetor pTZ57R/T seguiu-se as recomendações do fabricante (Fermentas Life Sciences, St. John's, Canadá). Resumidamente, a reação de ligação foi realizada utilizando o vetor pTZ57R/T, amostra do cDNA de Blo t 5 (7 μ L), 10X tampão de ligase (1,5 μ L), T4 DNA ligase (1 μ L), para um volume final de reação de 15 μ L, sendo incubado por 24 horas a 4°C. O vetor pTZ57R/T clonado com Blo t 5 passou a receber a identificação de pTZ57R/T-Blo t 5.

3.8.2 Transformação de *E.coli* DH5- α

A transformação de *E. coli* DH5- α previamente competentes com o vetor pTZ57R/T-Blo t 5 foi realizada inicialmente através do descongelamento de DH5- α em banho de gelo

adicionando solução de transformação “Transformaid T-solution” (Fermentas), em seguida foi incubado o vetor pTZ57R/T-Blo t 5 com suspensão bacteriana por 5 minutos em banho de gelo e em seguida submetida a choque térmico 42°C por 30 segundos e logo após em banho de gelo por 10 minutos. A suspensão bacteriana (50 µL) foi inoculada em 100 µL de meio de cultura “Transformid C-medium” (Fermentas), por uma hora a 200 rpm 37°C. As bactérias foram plaqueadas em placas de petri contendo meio de cultura “agar” (10g de NaCl, 10g de bactroptona e 5 g de extrato de levedura, 20 g de agar por litro pH 7.5) e acrescido de 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich; Saint Louis, Missouri, EUA) e suplementadas com 50 µg/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-Dgalactosideo (X-gal) (Sigma).

As colônias crescidas em placa de Petri foram selecionadas aleatoriamente sendo coletadas em capela de fluxo e posteriormente inoculadas em 15 mL meio cultura “caldo” (10g de NaCl, 10g de bactroptona e 5 g de extrato de levedura por litro pH 7.5) acrescido de 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e colocadas sobre agitação em shaker a 200 rpm a 37°C 18 horas. Cada amostra foi aliqotada em microtubos de 1,5 mL, diluídos 1:2 com glicerina estéril e estocados a -80°C.

Alternativamente o mesmo procedimento foi utilizado para transformar DH5-α com o vetor pET14b (pET14b plasmid DNA, NOVAGEN, Charmany. EUA) nos procedimentos a seguir.

3.9 Extração do plasmídeo pTZ57R/T- Blo t 5 de *E. coli* DH5-α

Para efetuar a extração do inserto Blo t 5 (pTZ57R/T-Blo t 5) em *E. coli* DH5-α utilizou-se o protocolo “QIAGEN QIA min prep” (Qiagen, Germantown, Maryland, USA) conforme instruções do fabricante. Foram coletadas colônias *E. coli* DH5- α transformadas com vetor pTZ57R/T-Blo t 5 (*E. coli* DH5-α pTZ57R/T-Blo t 5 das placas de Petri contendo meio de cultura agar e incubadas em meio de cultura “caldo” em agitação de 200 rpm a 37°C 18 horas. As culturas crescidas com *E. coli* DH5-pTZ57R/T-Blo t 5 foram centrifugados a 1.700 x g por 3 minutos, sendo descartados os sobrenadantes, aos sedimentos foram processados conforme o kit QIAGEN. Resumidamente, foram adicionados em cada reação 250 µL dos tampões P1 e P2 realizando inversão 4-6 vezes em cada tubo, posteriormente centrifugando por 10 minutos a 25°C por 10.000 x g, o sobrenadante foi aplicando em micro-coluna de filtro, sendo centrifugada a 10.000 x g a 25°C por 1 minuto. Para lavagem dos plasmídeos na micro-coluna utilizou-se 750 µL do tampão PE, centrifugando por 1 minuto a 25°C a 10.000 x g, a secagem da micro-coluna de filtro foi realizada após nova centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto a 25°C e posteriormente transferido para microtubo estéril.

Para eluição final foi utilizado tampão EB (10 mM Tris-CL, pH8) para vetor pTZ57R/T-Blo t 5, centrifugando novamente a 1 minuto 10.000 x g. A confirmação da presença do gene para Blo t 5 foi realizada através de uma nova PCR utilizando-se dois *primer* F e R. conforme descrito item 3.7 Os produtos finais da extração plasmidiais e da reação de PCR foram analisados por eletroforese em 1% gel de agarose (Invitrogen) utilizando como corante *Blue Green Loading* (LGC Biotecnologia LTDA) e corridos por uma hora a 120 Volts. Para o plasmídeo pET14b realizou-se os mesmos procedimentos de extração, exceto a utilização do tampão EB sendo substituído pelo tampão TE (10 mM Tris Cl; 1 mM EDTA, pH 8) durante a eluição.

3.10 Digestão dos vetores

3.10.1 Padronização da digestão do vetor pTZ57R/T-Blo t 5

Para realizar a padronização da digestão plasmidial, do vetor pTZ57R/T-Blo t 5 foram realizadas cinco reações se diferenciando na concentração das enzimas adicionadas, como se segue:

Reação	Plasmídeo pTZ57R/T-Blo t 5	Enzima <i>Ned I</i>	Enzima <i>Bam HI</i>
Reação 1	8 µl	5 µl	-
Reação 2	8 µl	10µl	-
Reação 3	4µl	10µl	-
Reação 4	8 µl	5 µl	5 µl
Reação 5	8 µl	10µl	10µl

Todas as reações foram incubadas separadamente com Tampão 4 (10 vezes concentrado) (Biloabs), soro albumina bovina (BSA) 10 vezes concentrado (Biloabs), enzima *Nde I* (Biloabs) 2,5 U/µl, H₂O ultrapura (GIBCO) a 37°C por 1 hora. As reações (iii) e (iiii) foram posteriormente acrescidas da enzima *Bam HI* (Biloabs) na concentração de 2,5 U/ µl e incubada novamente por 1 hora a 37°C. Os produtos da digestão foram aplicados a gel 1% de

agarose Low Melting (Invitrogen) e utilizando como corante *Blue Green Loading* (LGC Biotecnologia LTDA) corrido por uma hora a 120 Volts.

3.10.2 Digestão dos vetores pTZ57R/T-Blo t 5 e pET14b

Para realizar a digestão plasmidiais, dos vetores pTZ57R/T-Blo t 5 e pET14b foram incubados separadamente com Tampão 4 (10 vezes concentrado) (Biloabs), soro albumina bovina (BSA) 10 vezes concentrado (Biloabs), enzima *Nde I* (Biloabs) 2,5 U/ μ l, H₂O ultrapura (GIBCO) a 37°C por 1 hora. Posteriormente a reação foi acrescida da enzima *Bam HI* (Biloabs) na concentração de 2,5 U/ μ l e incubada novamente por 1 hora a 37°C. O produto da digestão foi aplicado a gel 1% de agarose *Low Melting* (Invitrogen) e utilizando como corante *Blue Green Loading* (LGC Biotecnologia LTDA) corrido por uma hora a 120 Volts.

3.11. Purificação e reação de ligação do inserto Blo t 5 ao vetor pET14b

A purificação do inserto Blo t 5 e do vetor pET14b foi realizada através da extração dos mesmo em bandas do gel de agarose Low Melting 1%, utilizando transluminador para a visualização das mesmas. Utilizou-se o protocolo kit de extração *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN) seguindo as orientações do fabricante. Primeiramente as bandas de géis extraídas foram pesadas e adicionados 3 vezes o volume (100 μ g = 100 μ L) de *Buffer QG*, sendo incubados a 50°C por 10 minutos e adicionado o mesmo volume dos géis com isopropanol e posteriormente os volumes finais foram transferidos para as micro-colunas de filtros em um valor máximo de 800 μ L, centrifugando-os por 1 minuto a 10.000 x g 25°C, adicionou-se 500 μ L *Buffer QG* realizando nova centrifugação 10.000 x g por 1 minuto a 25°C, o volume excluído da micro-coluna foi desprezado. Para realizar a secagem da micro-coluna realizou-se nova centrifugação a 10.000 x g 1 minuto a 25°C. Os ácidos nucléicos retidos foram removidos da micro-coluna de filtros e eluídos em microtubos limpos com Tampão EB por centrifugação a 10.000 x g 1 minuto 25°C.

A reação de ligação após a purificação do inserto Blo t 5 ao vetor pET14b foi realizada inicialmente coma a incubação do inserto Blo t 5 (7 μ L) e o vetor pET14b (4 μ L) com tampão 10 vezes ligase (Biloabs) (1.5 μ L), T4DNA ligase (Biloabs) (1 μ L) para um volume final de 15 μ L a 4°C por 18 horas.

3.12 Produção de células competentes (Rosetta DE3)

Para realizar a competência das células utilizou-se inicialmente um pré-inóculo em meio) cultura “caldo” a 37°C crescido previamente por 20 horas (colônia Rosetta DE3 Novagen). Inoculou-se 500 µL do pré-inóculo em 50 mL de meio “caldo” deixando sobre agitação de 200 rpm a 37°C até atingir densidade óptica (D.O) de 0,1 a 0,3 (mais ou menos 3 horas). As células foram posteriormente centrifugadas a 3.000 x g 4°C por 15 minutos, e o sedimento ressuspensão em 10 mL da solução 50 mM CaCl₂ a 4°C com suave agitação. Centrifugou-se novamente a 3.000 x g a 4°C por 15 minutos, descartando o sobrenadante e o sedimento ressuspensão novamente em 1 mL da solução CaCl₂ 50 mM a 4°C. As células foram mantidas 1 hora em banho de gelo, sendo a partir de então consideradas competentes (AZEVEDO, 2003).

3.13 Reação de Transformação do vetor pET14b-Blo t 5 em *E. coli* Rosetta (DE3)

Para realizar as transformações das células previamente competentes, inicialmente realizou a incubação de 1 mL das células competentes com 2,5 µL do vetor pET14b-Blo t 5 em gelo por 5 minutos. Posteriormente realizou-se o choque térmico incubando a reação 42°C por 30 segundos e em seguida banho de gelo por 10 minutos. Posteriormente as bactérias foram adicionadas em meio cultura “caldo” e a reação incubada por 1 hora a 37°C sobre agitação de 200 rpm e a seguir plaqueadas em placas de Petri contendo meio cultura “agar” com 50 µg/mL de ampicilina (Sigma), sendo crescidas por 18 horas 37°C.

3.14 Expressão de Blo t 5 em *E. coli* Rosetta (DE3)

A expressão da proteína Blo t 5 recombinante foi dividida em duas etapas: Fase Teste, em menor escala, com o objetivo de verificar se a expressão foi alcançada; e Fase de produção, em maior escala, visando a produção de proteínas recombinantes para posterior purificação, em quantidade suficiente para os ensaios biológicos subsequentes.

3.14.1 Teste de Expressão de Blo t 5 em *E.coli* Rosetta (DE3)

Para realizar o teste de expressão de Blo t 5 em *E. coli* Rosetta (DE3), primeiramente foram selecionadas 6 colônias e inoculadas em 5 mL de meio de cultura cultura “caldo” com ampicilina 50 µg/mL e incubou por 16 horas a 37°C sob agitação 200 rpm.

Os inóculos foram diluídos 1/100 em 5 mL de meio cultura “caldo” acrescidos 50 µg/mL ampicilina (Sigma) e incubado a 37°C sob agitação 250 rpm até atingir $A_{600nm} = 0.6$. Foram retirados alíquotas de 400 µL dos inóculos sem indução IPTG (tempo 0),

centrifugando-os a 9.000 x g por 1 minuto a 4°C, sendo o sobrenadante desprezado e o *pellet* ressuspensão em 40 µL de tampão da mostra.

Para iniciar os ensaio de expressões adicionou-se 1 mM de isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) nos inóculos, sendo estes incubado a 37°C sob agitação 250 rpm a 3 horas. Em cada hora de indução, foram retiradas alíquotas de 400 µL e centrifugados como previamente descrito, sendo ressuspensão em 60 µL de tampão de amostra (Tris-HCL 0,1M pH 6, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2% , Glicerol a 20%). Para verificar a expressão da Blo t 5 o conteúdo protéico das amostras foram analisados em gel SDS-PAGE como descrito por Laemmil 1970.

3.14.2 Produção de Blo t 5 em *E. coli* Rosetta (DE3) em larga escala

Para a indução de Blo t 5 foi utilizada colônias *E. coli* Rosetta (DE3) transformadas com vetor pET14b-Blo t 5 pré-selecionada no teste de expressão, sendo esta inoculada em 100 mL meio cultura “caldo” com 50µg/mL de ampicilina (Sigma) a 37°C overnight. As células foram re-inoculadas em 900 mL meio cultura caldo totalizando um volume final de 1L e incubadas a 37°C a 250 rpm até atingir uma D.O. de 0.6 (por mais ou menos 1hora) sendo adicionado 1 mM (IPTG) (Sigma) e incubado sobre agitação 250 rpm em *shaker* por 3 horas a 37°C. O conteúdo do cultivo de 1 L foi centrifugado a 900 g por 40 minutos e o sedimento resultante foi pesado e estocado a – 80°C até a extração protéica.

Como controle negativo, foram cultivadas células nas mesmas condições, mas sem adição de IPTG. Para avaliar a eficiência da indução protéica de Blo t 5 foram retiradas alíquotas de 100 µL de suspensão de células sem indução e com indução de IPTG. Ambas alíquotas foram centrifugadas a 1.700 x g por 3 minutos. Posteriormente o perfil das bandas de indução foram avaliadas em gel gradiente SDS PAGE de 5-22%.

3.15 SDS-PAGE 15%

Os géis de separação foram preparados com uma solução Tris-HCL 125 mg/mol (pH 8.8), dodecil sulfato de sódio (SDS, Bio-Rad) 0.1%, N,N'-Metileno-bis-acrilamida (Bio-Rad) 5%, N,N,N,N-tetrametiletenodiamina (TEMED, Bio-Rad) 0.125% e persulfato de amônia (Bio-Rad) 0,125%, diluídos em água deionizada. O gel de empilhamento foi preparado a 5%, com os mesmos compostos, porém, utilizando Tris-HCl 0.375 mg/mol (pH 6.8) como solução tamponante. O tempo de polimerização foi de aproximadamente 40 minutos para o gel de separação e 20 minutos para o gel de empilhamento.

As amostras foram previamente diluídas em tampão de amostra, contendo Tris-HCL 0.1 M, (pH 6.8), SDS 4%, azul de bromofenol 0.2% e glicerol 20%, e submetidos a aquecimento a 95°C em banho seco (Termobath ALB64- Finemould Precision Ind., Co., Suel, Coréia do Sul), por 5 minutos, para desnaturação protéica antes da aplicação no gel, em condições desnaturantes e não redutoras (LAEMMLI, 1970), utilizando sistema para mini-gel “Mighty “Small Multiple Caster” (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA).

A eletroforese foi realizada sob condições de corrente de 20 mA a aproximadamente 50 minutos. Após a corrida os géis foram corados com “Coomassie Blue brilliant blue R250”, (Sigma).

3.16 SDS-PAGE 5-22%

O sistema de tampão descontínuo descrito por Laemmili & Favre (1973) foi utilizado, com géis gradiente de acrilamida de 5 a 22% e no empilhamento de 3%. Os géis de separação foram preparados com glicerol 0.7%, tampão de separação 360 mM pH 8.8 (Tris-base 45.38%, 6 N HCl 10%), SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida (30:0.8) nas devidas concentrações, TEMED 0.003% e PSA 0.0128%. O gel de empilhamento foi preparado com tampão de empilhamento 124 mM pH 6.8 (Tris-base 15.32% e HCl 12 N 10%), SDS 0.12%, acrilamida/bisacrilamida (30:1.6) a 3%, TEMED 0.006% e PSA 0.150%.

A eletroforese foi realizada com tampão eletrodo (100 mM Tris, 7.8 mM EDTA, 770 mM glicina, SDS 3% pH 8.3) e corrente constante de 45mA. Após a corrida, o gel foi corado Coomassie Brilliant Blue R 125 e descorado em solução descorante (metanol 5% e ácido acético 9%), para visualização das bandas polipeptídicas, sendo avaliado a intensidade destas, utilizando o programa computacional KODAK 1D Image Analysis (Eastman Kodak Co., Rochester, EUA), sendo avaliadas em pixel/mm².

3.17 Extração e purificação da proteína recombinante Blo t 5

Para a purificação da proteína recombinante foi utilizado o sedimento obtido como descrito no item 3.14.2, este foi ressuspenso em tampão fosfato a 10 mM imidazol (50 mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10 mM imidazol) na razão de 3 mL por grama de peso do sedimento e incubada por 30 minutos a 37°C sobre agitação pendular moderada. Posteriormente foram realizados congelamento-descongelamento por seis vezes (nitrogênio líquido – banho a 40°C) intercalando com agitação tipo *vorte*. Ao final centrifugou-se a 10.000 x g por 30 minutos.

Uma alíquota de 50 μ L foi retirada e estocada a -20°C , sendo posteriormente analisadas em gel SDS-PAGE 15%.

O sobrenadante foi eluído na coluna de cromatografia de níquel Ni-NTA (Qiagen) com afinidade a histidina e os filtrados coletados em um volume final 50 mL.

Para a lavagem da coluna utilizou-se o tampão imidazol a 20 mM (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol), sendo este tampão coletado como citado anteriormente. Para a eluição da proteína Blo t 5 foram utilizados tampões de imidazol em diferentes concentrações [pH8.0; 50, 100 e 200 mM, (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, [] mM imidazol)], respectivamente. As frações foram coletadas separadamente (1 mL/microtubo) completando um volume final de 50 mL. As frações eluídas na coluna Ni-NTA foram analisadas em SDS-PAGE como descrito no item 3.15.

A proteína recombinante Blo t 5 foi dialisada em membrana de diálise 3.5 kDa Spectrapor (Spectrum Laboratories, Inc, Broadwick, Califórnia, EUA), em PBS por 24 horas sendo realizado 5 tocas em intervalos a cada 3 horas e um troca após 18 horas.

Para concentrar a amostra utilizou-se o sistema Amicon Ultra 15 (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA), adicionando um volume de 15 mL na unidade de filtrado Amicon Ultra Pura, centrifugado a $1.700 \times g$ a 25°C por 15 minutos.

A determinação da concentração da proteína recombinante rBlo t 5 foi realizada através de espectrofotômetro (SHIMADZU UV-Visible, Spectrophotometer Bio Spec-mini, Kyoto, Japan). A amostra foi diluída 10 vezes em água deionizada e a leitura realizada a uma densidade óptica de 280 nm.

3.18 Dot-blot e Slot-blot para rBlo t 5

Para verificar a reatividade específica da proteína recombinante Blo t 5 previamente produzida e purificada, foram realizadas as técnicas de Dot-blot e Slot-blot. Inicialmente, foi realizada a sensibilização das fitas de nitrocelulose como se segue: (i) Blo t 5 recombinante padrão (Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA, EUA) na concentração de 6,25 ng/dot ou slot; (ii) extrato de Bt-total (10 μg /dot ou slot); (iii) soro albumina bovina (BSA, Sigma) (5 μg /dot ou slot); rBlo t 5 (3,75 μg /dot ou slot).

Para o Dot-blot as fitas foram sensibilizadas por meio de pipetagem manual (2.5 μL /dot), enquanto que para o Slot-blot as fitas de nitrocelulose foram sensibilizadas (20 μL /slot) utilizando equipamento a vácuo (Bio-dot@SF, Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Após a secagem das membranas por uma hora à temperatura ambiente, as fitas foram bloqueadas com 800 μL de PBS acrescido de Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan

monolaurate, Sigma) a 0.05% (PBS-T) e 5% de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé, São Paulo, Brasil) (PBS-T-L) por 2 horas à temperatura ambiente, seguido de três lavagens com PBS-T. As fitas foram incubadas com 500 µL de anticorpo monoclonal de camundongo anti-Blot 5 (4D9) biotinizado (Indoor Biotechnologies) diluído 1:250 em PBS-T-L por 18 horas à temperatura ambiente, sendo então lavadas PBS-T por 3 vezes.

Em seguida, foi realizada a incubação com o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluído 1:500 em PBS-T-L por duas horas à temperatura ambiente. Para a revelação do Dot-blot foi utilizado sistema de quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Inglaterra) e para revelação do Slot-blot foi utilizado 10 mg hidrocloreto 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) diluído em 15 mL de solução salina tamponada com Tris 20 mM (pH 7.4) e 12 µL de peróxido de hidrogênio. Agitação pendular lenta e constante foi utilizada durante toda a reação que foi interrompida com água destilada após a visualização das bandas.

3.19 Mensuração de IgE específica ao extrato total de *Blomia tropicalis* e rBlo t 5

Foram utilizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA indireto) para detecção de anticorpos IgE aos alérgenos do extrato total de *B. tropicalis* (Bt-total) e rBlo t 5 em amostras de soros de pacientes atópicos e indivíduos não-atópicos, conforme descrito por Almeida et al. (2006), com modificações.

Placas de microtitulação de alta afinidade, com 96 poços Corning Incorporated Costar® (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com o extrato Bt-total (20 µg/mL) ou rBlo t 5 (5 µg/mL) (50 µL/poço) em tampão carbonato-bicarbonato 0.06 M (pH 9.6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS-T com três repetições e bloqueadas (150 µL/poço) com PBS-T contendo BSA 1% (PBS-T-BSA) por 1 hora à temperatura ambiente.

Os soros foram diluídos 1:2 em PBS-T-BSA, adicionados em duplicata (50 µL/poço) e incubados por 2 horas a 37°C. Soros controles negativos de indivíduos não-atópicos foram incluídos em cada placa.

As placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário biotinizado anti-IgE humana (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EUA) diluído 1:500 em PBS-T-BSA (50 µL/poço) por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma), diluído 1:500 em PBS-T-BSA (50 µL/poço) e incubado a 37°C durante 30 minutos à temperatura ambiente.

O ensaio foi desenvolvido com 10 mM 2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid (ABTS; Sigma, EUA) diluído em tampão citrato-fosfato 70 mM (pH 4,2) contendo 0,03% de H₂O₂. A densidade óptica (D.O.) foi determinada em leitor de placas a 405 nm. Os níveis de anticorpos IgE foram expressos em Índice ELISA (IE), sendo utilizado a seguinte fórmula:

$$IE = DO \text{ amostra} / \text{cut off}$$

O *cut off* foi estabelecido como a média aritmética dos valores de DO dos soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Para excluir valores de reatividade limítrofes próximos ao ponto de corte (EI = 1,0), foram considerados como positivos os valores de IE > 1,2.

3.20 Mensuração de IgE específica a Blo t 5 nativa

Foram utilizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA reverso) para detecção de anticorpos IgE específicos a Blo t 5 nativa em amostras de soros de pacientes atópicos e indivíduos não-atópicos, conforme descrito por Silva et al. (2001), com modificações.

Placas de microtitulação de alta afinidade, com 96 poços (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-Blo t 5 (clone 4G9, Indoor Biotechnologies) na concentração protéica de 5 µg/poço/50 µL e diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0.06 M (pH 9.6) por 18 horas a 4°C.

As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-BSA como descrito para ELISA indireto. Em seguida, as placas foram incubadas com o extrato Bt-total (20 µg/mL) por 1 hora à temperatura ambiente. Após seis lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com amostras de soro (50 µL/poço) diluídas 1:2 em PBS-T-BSA, em duplicata, por 2 horas a 37°C. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-IgE humana (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.) diluído 1:2000 em PBS-T-BSA (50 µL/poço) por 1 hora à temperatura ambiente e, em seguida, com estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluído 1:500 em PBS-T-BSA (50 µL/poço) por 30 minutos à temperatura ambiente.

O ensaio foi desenvolvido com ABTS e H₂O₂ e resultados expressos em Índice ELISA (IE) como descrito para ELISA indireto.

3.21 Análise estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 4,0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). As diferenças entre as características

clínicas obtidas de diferentes grupos foram analisadas pelo teste de probabilidade exata de Fisher. Como os dados não seguiram uma distribuição normal, testes não-paramétricos foram utilizados.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar o tamanho da pápula obtido no TCP entre os grupos de pacientes atópicos e o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn foram utilizados para comparar os níveis de IgE a alérgenos de *B. tropicalis* entre os grupos.

As diferenças entre os níveis de IgE específica ao extrato Bt-total, nBlo t 5 e rBlo t 5 dentro do mesmo grupo foram analisadas pelo teste de Friedman e o teste de comparação múltipla de Dunn.

As diferenças entre porcentagens de positividade para IgE específica ao extrato Bt-total, rBlo t 5 e nBlo t 5 de acordo com diferentes graus de reatividade nos diferentes grupos foram analisadas pelo teste exato de Fisher.

As correlações entre níveis de IgE específica ao extrato Bt-total, nBlo t 5 e rBlo t 5 dentro do mesmo grupo foram analisadas pelo teste de correlação de Spearman. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.22 Biossegurança

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

4. RESULTADOS

4.1 Dados clínicos, demográficos e teste cutâneo dos pacientes

As características clínicas e demográficas dos sujeitos do estudo estão demonstradas na Tabela 1. Os indivíduos foram distribuídos em três grupos de acordo com testes cutâneos de puntura (TCP) para o extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt) da seguinte forma: (i) grupo BT+ consistiu de 75 pacientes atópicos com testes cutâneos positivos para o extrato total Bt; (ii) grupo BT- consistiu de 16 pacientes atópicos com TCP negativo ao extrato total Bt, mas TCP positivo ao extrato Dp e/ou extrato Df; (iii) grupo NA consistiu de 30 indivíduos não-atópicos com TCP negativo para todos os aeroalérgenos testados. Os três grupos não mostraram diferenças significativas quanto à idade e sexo, embora houvesse predominância de mulheres em todos os grupos. Rinite foi o diagnóstico clínico mais freqüente observado na maioria dos pacientes atópicos (88 a 94%), não havendo diferença significativa entre os grupos BT+ e BT- ($P > 0,05$).

Ao analisar os resultados do TCP aos alérgenos de ácaros em ambos os grupos atópicos, observou-se que o grupo BT+ mostrou alta sensibilização concomitante aos extratos de Dp (97,3%) e Df (98,7%), enquanto o grupo BT- também foi altamente sensibilizado para extrato de Dp (100%) e Df (81,5%).

Além disso, os tamanhos das pápulas obtidos para os três alérgenos foram significativamente maiores no grupo BT+ que grupo BT-, mas o tamanho da pápula ao extrato Bt-total foi significativamente menor do que aos extratos Dp e Df em ambos os grupos de pacientes atópicos ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre as pápulas obtidas para os alérgenos Dp e Df em ambos grupos BT+ e BT-.

4.2 Sequência Gênica e dedução de aminoácidos de Blo t 5

A obtenção da sequência de gene e aminoácidos de Blo t 5 foram obtidas no *Genebank* NCBI com o número de acesso *U59102* para a sequência da proteína, e *DQ78868* para a sequência do gene (Figura 1). A sequência do gene Blo t 5 apresenta 459 pb, e codifica um produto esperado de 134 aa com peso molecular aproximado de 14 kDa.

4.3 Obtenção de RNA total de *B. tropicalis* e gene de Blo t 5

O RNAm total de *Blomia tropicalis* (RNA_{total Bt}) extraído a partir do ácaro, foram visualizados em gel de RNA [1%; Agarose 0,1 M (3-N-Morphalino), ácido propanosulfônico, 40 mM Acetato de sódio, 5mM EDTA pH 8]. As bandas 18S e 5S foram visualizadas

comprovando a integridade do RNA_{total} (figura 2 A). O cDNA foi obtida utilizando a técnica transcriptase reversa a partir do RNA_{total} Bt₅, e posteriormente o gene de Blo t 5 foi amplificado por Nested-PCR. A amplificação inicial serviu de molde para as reações de PCR subsequentes resultando na amplificação do gene de Blo t 5. A Figura 2B, demonstra a análise eletroforética do produto amplificado de 412 pares de bases (PB) correspondente, visualizado em gel de 1% agarose .

4.4 Transformação das cepas de *E.coli* DH5a e Rosetta DE3

O gene de Blo t 5 amplificado por PCR (figura 2B) foi utilizado para realização da reação de ligação ao vetor pTZ57R/T (Figura 3). Posteriormente foi realizada a transformação com *E.coli* DH5- α com o intuito de amplificação em larga escala do plasmídeo pTZ57R/T-Blo t 5.

Das colônias *E.coli* DH5- α transformadas, cinco foram previamente selecionadas. O DNA plasmidial de cada bactéria transformada foi extraído e utilizado para realização de uma PCR no intuito de verificar se ocorreu a ligação do DNA de Blo t 5 ao plasmídeo pTZ57R/T (Figura 3), sendo confirmado o sucesso da reação de ligação em todas as cinco colônias.

A digestão plasmidial com as enzimas de restrição, foram padronizadas utilizando diferentes concentrações (Figura 4), sendo obtido um melhor rendimento na reação DI2, sendo visualizado uma coloração mais forte a banda. A presença da banda na região de 412 pb confirma a amplificação por PCR do gene Blo t 5 presente no plasmídeo pTZ57R/T.

Após a digestão plasmidial do vetor pTZ57R/T-Blo t 5, realizou a extração e purificação do gene Blo t 5, com a finalidade de recloná-lo ao plasmídeo pET14b, e transforma-lo com a *E.coli* Rosetta DE3. A colônia transformadas foram crescidas e seu produto plasmidial extraído, sendo confirmada a ligação do inserto Blo t 5 com a visualização da banda 412 pb em gel de agarose 1% (Figura 5).

4.5 Expressão e purificação Blo t 5 recombinante

A cinética de expressão da proteína Blo t 5 em *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET14b-Blo t 5, foi realizada com teste de expressão protéica em diferentes tempos, variando de zero a três horas (Figura 6A), sendo observado que após adicionar o promotor IPTG (1mM) houve um aumento gradativo da expressão de proteína com 14 kDa (Blo t 5). Neste ensaio foi obtido um maior rendimento no tempo de três horas (Figura 6A).

A expressão de Blo t 5 em larga escala foi realizada com a colônia pré-selecionada no ensaio cinético, em um volume total de 1L e com tempo de expressão de três horas (Figura

6B). A fração da amostra de Blo t 5 induzida foi analisada em gel SDS-PAGE e as diferenças das bandas mensuradas em (pixel/ mm²), sendo encontrado a expressão 1,71 vezes maior na fração induzida comparada à aquela sem indução protéica com IPTG.

A fração de Blo t 5 foi eluída na coluna de níquel com 200 mM de tampão imidazol (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH8,0), e analisada em gel SDS-PAGE. Nesta análise foram observadas dois componentes protéicos de 14 kDa e 28 kDa. A presença da banda de 28 kDa sugeriu a formação de dímeros da proteína Blo t 5 (dados não mostrados).

4.6 Imunodeteção de Blo t 5 recombinante

A especificidade do alérgeno rBlo t 5 foi confirmada pela reatividade com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-Blot 5 biotilado (4D9 Indoor Biotechnologies) em análises de Dot-blot e Slot-blot (Figura 7). Foi observada fraca reação de rBlo t 5 em comparação com forte marcação do padrão rBlo t 5. Não foi observada reatividade para o extrato total Bt, bem como à proteína irrelevante (BSA) de controle em ambos os testes.

4.7 Níveis séricos de IgE e positividade ao extrato total de *B. tropicalis*, rBlo t 5 e nBlo t 5

Níveis de IgE ao extrato total Bt, rBlo t 5 e nBlo t 5 em soros de pacientes atópicos (grupo BT+ e BT-) e indivíduos NA foram mensurados por ELISA e estão ilustrados na Figura 8. Anticorpos IgE que reagiram ao extrato total Bt (Figura 8A) foram significativamente maiores nos pacientes dos grupos BT+ ($P < 0,001$) e BT- ($P < 0,05$) em relação ao grupo NA. Além disso, 58,6% dos pacientes do grupo BT+ apresentaram anticorpos IgE que reagiram ao extrato total Bt, comparado a 25% de pacientes do grupo BT- ($P < 0,05$) e 6,6% para os indivíduos do grupo NA ($P < 0,05$).

A reatividade de IgE para rBlo t 5 (Figura 8B) foi relativamente baixa em comparação com o grupo BT+ (34,6%) e BT- (31,2%), mas significativamente maior do que em indivíduos NA (6,6%) ($P < 0,05$). Níveis de IgE presente no soro que reagiram ao alérgeno rBlo t 5 também foram semelhantes entre os indivíduos dos grupos BT+ e BT- e significativamente maiores quando comparados ao grupo NA ($P < 0,05$).

A reatividade do soro ao alérgeno nBlo t 5 para o anticorpo IgE (Figura 8C) mostrou que 32% dos pacientes do grupo BT+ foram positivos em comparação a 12% do grupo BT- e 10% dos indivíduos do grupo NA. Os níveis séricos de IgE que reagiram ao alérgeno nBlo t 5 também foram semelhantes entre indivíduos dos grupos BT+ e BT- e significativamente maiores quando comparado ao grupo NA ($P < 0,05$).

Ao comparar a reatividade das amostras de soro para os três alérgenos *B. tropicalis* analisados dentro do grupo BT+, observou-se que anticorpos IgE reativos com o extrato total Bt (58,6%) foi significativamente maior do que para rBlo t 5 (34,6%) e nBlo t 5 (32%) ($P < 0,01$) (Figura 8A-C). Por outro lado, alguns pacientes do grupo BT- (12% a 31%) foram observadas reatividade a IgE para os três alérgenos (Bt-total, rBlo t 5 ou nBlo t 5), mas sem diferenças significativas entre os mesmos. Em indivíduos NA, reatividade aos três alérgenos aos anticorpos IgE analisados foi relativamente baixa e semelhante entre eles (6,6% a 10%) (Figura 8A-C).

4.8 Análise estratificada dos níveis séricos de IgE e positividade ao extrato total de *B. tropicalis*, rBlo t 5 e nBlo t 5

Os pacientes atópicos do grupo BT+ foram também analisados com base na estratificação dos níveis séricos de IgE e positividade aos três alérgenos de *B. tropicalis* investigados (Figura 9).

As porcentagens de pacientes do grupo BT+ que apresentaram níveis séricos de IgE ao extrato total de Bt com IE entre 1,2 e 2,4 (41,4%) foram significativamente maiores do que aqueles com IE de 2,4 a 4,8 (10,6%) e IE > 4,8 (4%) ($P < 0,05$), não sendo encontrada diferença significativa entre aqueles apresentando IE 0-1,2 (41,3%) e 1,2-2,4 (41,4%) ($P > 0,5$) (Figura 9).

Não houve pacientes do grupo BT+ apresentando IE > 4,8 ao alérgeno rBlo t 5, sendo que a maior porcentagem de indivíduos deste grupo apresentou IE entre 0 a 1,2 (65,4%), com diferenças significativas quando comparado aos demais níveis ($P < 0,001$). A porcentagem de indivíduos com IE considerado positivo (IE > 1,2) foi de 34,6%, sendo que destes 25,3% estavam entre IE 1,2 a 2,4 e uma pequena parcela, 9,3%, apresentavam IE entre 2,4 a 4,8, com diferenças significativas entre os mesmos ($P < 0,05$) (Figura 9).

A positividade ao alérgeno nBlo t 5 reativos aos IgE foi similar ao alérgeno rBlo t 5 nos pacientes do grupo BT+, sendo que a grande maioria dos pacientes apresentaram IE negativos, ou seja, IE < 1,2 (68%), com diferenças significativas entre os demais níveis ($P < 0,001$). A maior porcentagem de indivíduos com IE positivos foi encontrada na faixa de IE 1,2 a 2,4 (25,4%) que foi significativamente maior ($P < 0,01$) que os IE entre 2,4 e 4,8 (6,6%), não sendo também encontrados indivíduos apresentando IE superior a 4,8 (Figura 9).

4.9 Correlação entre níveis de IgE ao extrato total *B. tropicalis*, rBlo t 5 e nBlo t 5

A correlação entre níveis de IgE aos três alérgenos analisados foi avaliada em cada grupo, mas apenas o grupo BT+ apresentou correlação positiva significativa para IgE ao extrato total Bt vs rBlo t 5 ($r = 0,4073$, $P = 0,0003$) (Figura 10A) e IgE anti-rBlo t 5 vs nBlo t 5 ($r = 0,4680$, $P = 0,0001$) (Figura 10C). Além disso, observou-se que 59% dos pacientes foram anti-IgE reagentes ao extrato total de Bt (Figura 10A e 10B), enquanto 29% foram duplo positivos para IgE ao extrato total Bt e rBlo t 5 (Figura 10A), e 24% dos pacientes tiveram dupla positividade de IgE ao extrato total Bt e nBlo t 5 (Figura 10B). Das amostras de soro positivas para rBlo t 5 ao anticorpo IgE (35%) e nBlo t 5 (32%), 22% foram duplo positivos para IgE e 55% foram duplo negativos para ambos os alérgenos (Figura 10C).

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos indivíduos do estudo.

Características	Grupos		
	BT+	BT-	NA
Nº de indivíduos (N)	75	16	30
Idade (anos)			
mediana (amplitude)	23 (18-65)	20,5 (19-49)	22 (18-47)
Sexo (M/F)	28/47	4/12	6/24
Clínica (N)			
Rinite	61	15	0
rinite e/ou asma	9	1	0
TCP (pápula, mm; positividade, %) ^a			
<i>B. tropicalis</i> (Bt)	6 (3-19) ^{*#} 100%	0 (0-2) [#] 0%	0 (0) 0%
<i>D.pteronyssinus</i> (Dp)	8 (0-17) [*] 97,3%	5,7 (3-12) 100%	0 (0-1,5) 0%
<i>D.farinae</i> (Df)	8 (0-16) [*] 98,7%	5 (0-12) 83,3%	0 (0-1) 0%

BT+: pacientes com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo para o extrato total de *B. tropicalis*; BT-: pacientes com TCP negativo para o extrato total de *B. tropicalis*; NA: indivíduos não-atópicos.

^aDados do tamanho das pápulas expressos em mediana e amplitude (mm). *Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos BT+ e BT- foram determinadas pelo teste Mann-Whitney (*P <0,01). [#]Diferença estatisticamente significativa em relação aos alérgenos Dp e Df determinadas pelo teste Kruskal-Wallis ([#]P <0,05).

A

```

atgaagttcgccatcggtcttattgcctgcttgccgcttcggtttg
gctcaagagcacaagccaaagaaggatgatttccgaaacg
aattcgatcacttggtgatcgaacaggtaaacagtttttttgaa
aggtaataaaaaagtaatcaaagaaacttttaggcaaacc
atgctatcgaaaagggagaacatcaattgctttacttgcaaca
ccaactcgacgaattgaatgaaaacaagagcaaggaattg
caagagaaaattattcgagaacttgatggtggttgccatgat
cgaaggagcccaaggagcttggaacgtgaattgaagcga
actgatcttaacatttggaacgattcaactacgaagaggctc
aaactctcagcaagatcttgcttaaggattgaaggaaaccg

```

B

```

MKFAIVLIACFAASVLAQEHKPKKDDFRNEFDHLLIEQ
ANHAIEKGEHQLLYLQHQLDLENENKSKELQEKIIREL
DVVCAMIEGAQGALERELKRTDLNILERFNYYEEAQTL
SKILLKDLKETEQKVKDIQTQ

```

Figura 1. (A) Sequência de genes dos antígenos Blo t 5 de *B. tropicalis* obtidas no *Genebank* NCBI com o número de acesso *DQ788684*. (B) Sequência dos aminoácidos que constituem a proteína Blo t 5 de *B. tropicalis* obtidas NCBI com o número de acesso *U59102*.

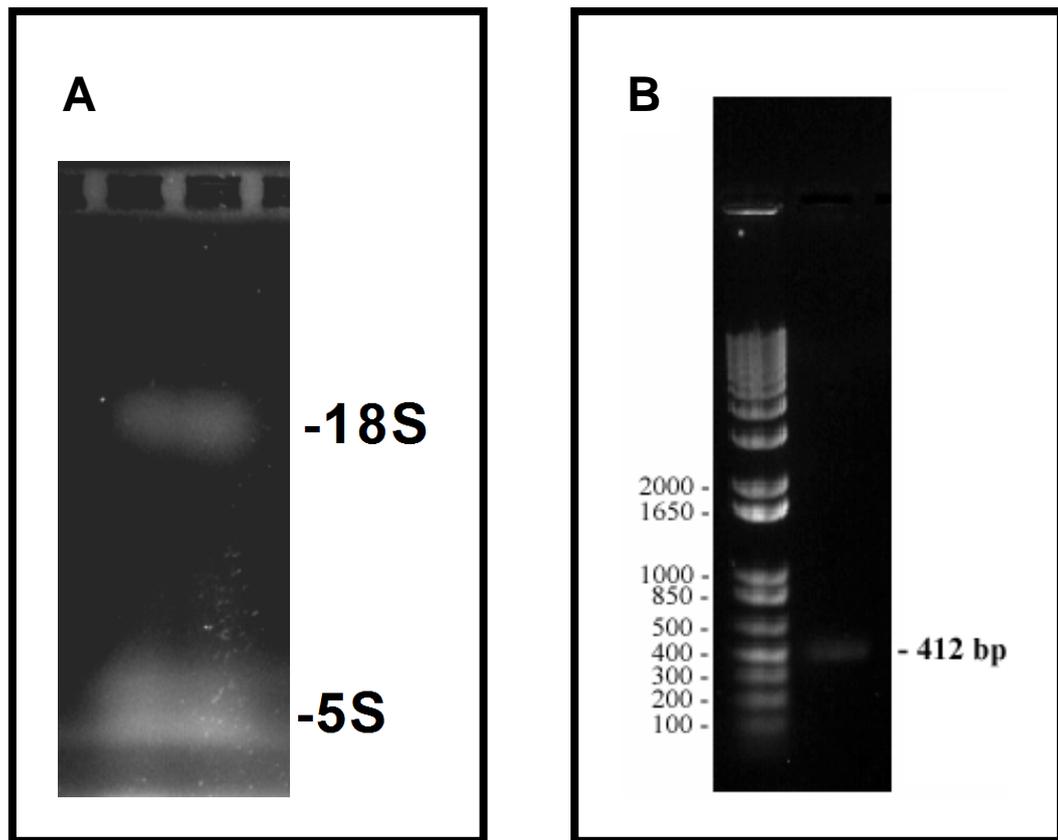


Figura 2. Obtenção de RNA total de *B. tropicalis* e gene de Blo t 5. (A) RNA total de *Blomia tropicalis* em gel de agarose para RNA apresentando as bandas 18S e 5S. (B) Amplificado do gene Blo t 5 na porção de 412 pb por PCR em gel de agarose 1%.

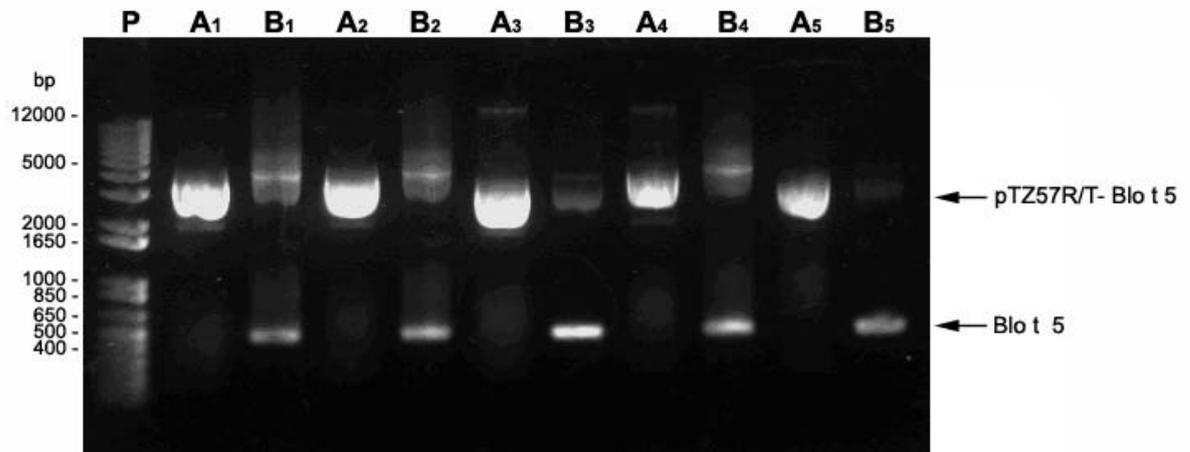


Figura 3. Confirmação da transformação de *E. coli* DH5- α com o plasmídeo (pTZ57R/T-Blo t 5). A seqüência de Blo t 5 foi amplificada por PCR a partir do vetor pTZ57R/T. **P:** padrão de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); **A: (1-5)** Plasmídeo pTZ57R/T-Blo t 5 extraído de *E.coli* DH5 α transformada; **B (1-5):** Amplificado do gene Blo t 5 por PCR.

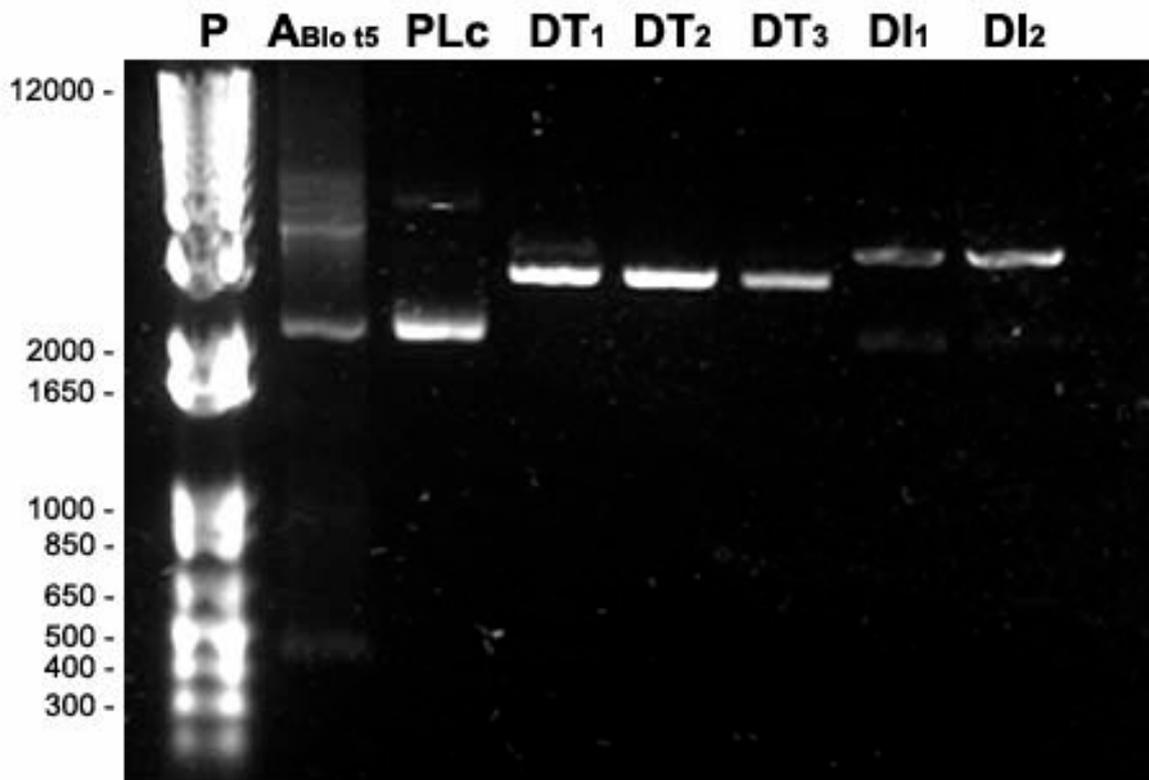


Figura 4. Padronização da reação de digestão do plasmídeo pTZ57R/T-Blo t 5 com as enzimas *Ned I* e *Bam HI* em diferentes volumes. P: padrão de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); **A_{Blo t 5}:** Amplificado do gene Blo t 5 por PCR na porção de 412 pb; **DT1:** Digestão parcial do plasmídeo pTZ57R/T-Blo t 5 utilizando 5 µl da enzima *Ned I* e 8 µl do plasmídeo pTZ57R/T-Blo t 5 para um volume final de 50 µl; **DT2:** Digestão parcial do plasmídeo pTZ57R/T-Blo t 5 utilizando 10 µl da enzima *Ned I* e 8 µl do plasmídeo pTZ57R/T-Blo t 5 para um volume final de 50 µl; **DT3:** Digestão parcial do plasmídeo pTZ57R/T-Blo t 5 utilizando 10 µl da enzima *Ned I* e 4 µl do plasmídeo pTZ 57R/T-Blo t 5 para um volume final de 50 µl; **DI1:** Plasmídeo linearizado a partir da digestão completa, utilizando 5 µl da enzima *Ned I*, 5 µl da enzima *Bam HI* e 8 µl do plasmídeo pTZ57R/T-Blo t 5 para um volume final de 50 µl, **DI2:** Plasmídeo linearizado a partir da digestão completa, utilizando 10 µl da enzima *Ned I*, 10 µl da enzima *Bam HI* e 8 µl do plasmídeo pTZ 57R/T-Blo t 5 para um volume final de 50 µl.

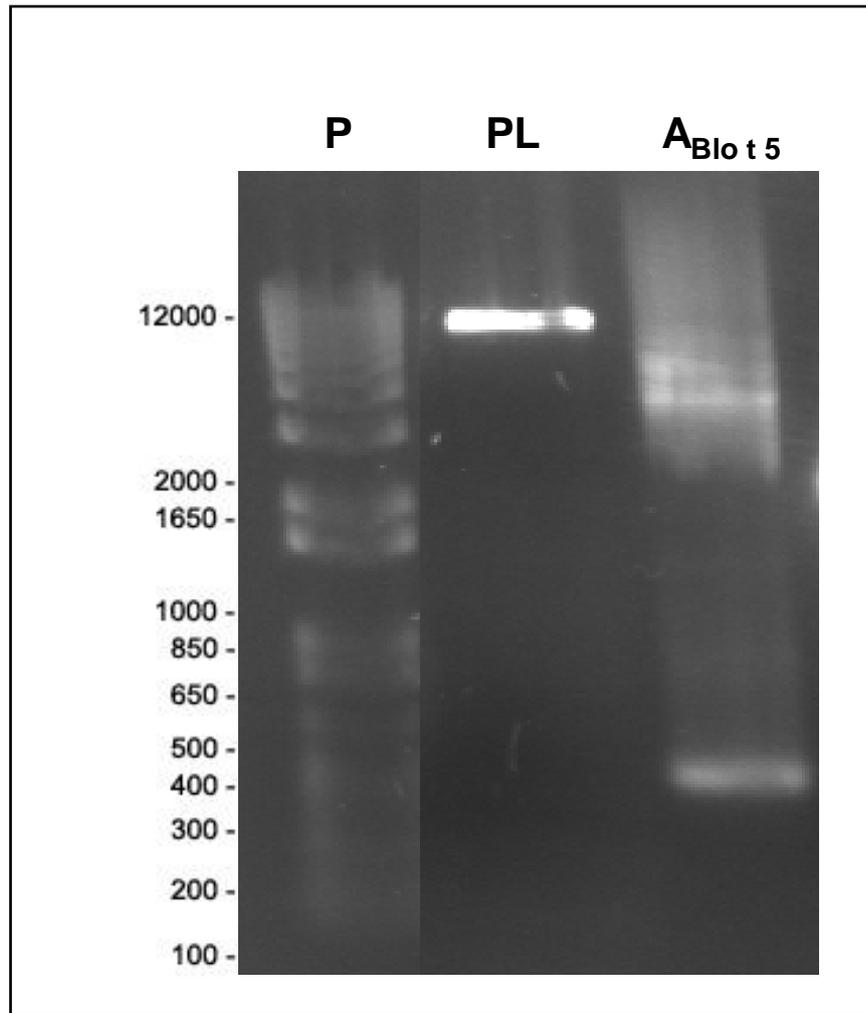


Figura 5. Plasmídio pET14b clonado com o gene Blo t 5. P: padrão de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen); **PL:** Plasmídeo pET14b-Blot 5; **A_{Blo t 5}:** Amplificado do gene Blo t 5 por PCR na porção de 412 pb.

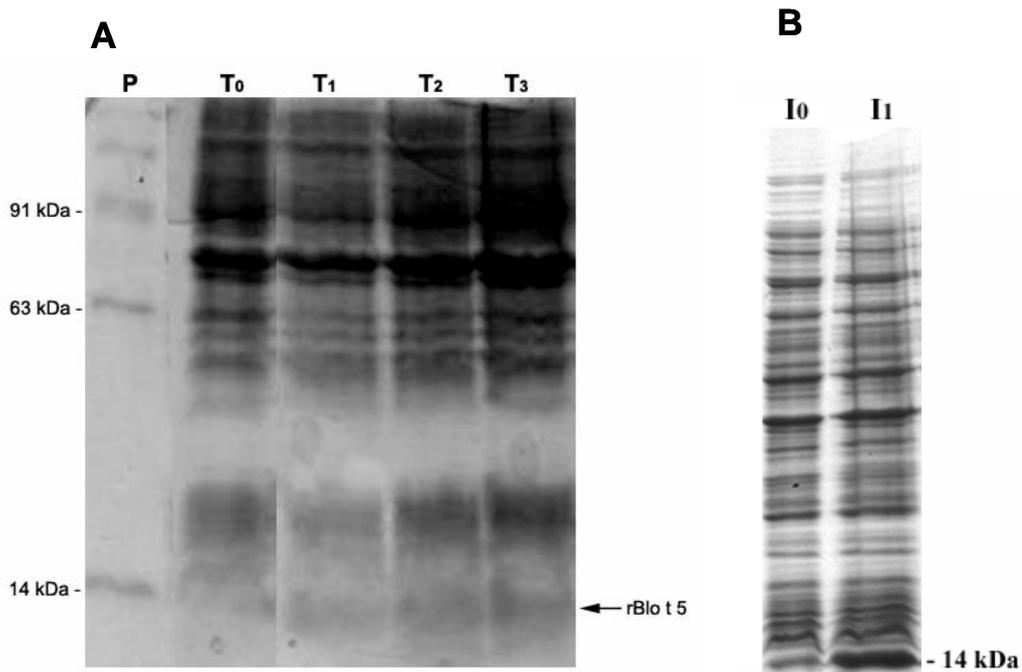


Figura 6. Expressão de Blo t 5 recombinante. (A) P= padrão de peso molecular; T₀= Inóculo *E.coli* Rosetta (D3)- pET14B-Blo t 5 ; T₁ : Inóculo *E.coli* Rosetta (D3)-pET14B-Blo t 5 com adição de IPTG 1 mM induzido, tempo de expressão 1 hora; T₂: Inóculo *E.coli* Rosetta (D3)-pET14B-Blo t 5 com adição de IPTG 1 mM, tempo de expressão 2 horas; T₃: Inóculo *E.coli* Rosetta (D3)-pET14B-Blo t 5 com adição de IPTG 1 mM, tempo de expressão 3 horas. (B) I₀: Inóculo *E.coli* Rosetta (D3)-pET14B-Blo t 5 ; I₁: Inóculo *E.coli* Rosetta (D3)-pET14B-Blo t 5 com adição de IPTG 1 mM induzido, tempo de expressão 3 horas.

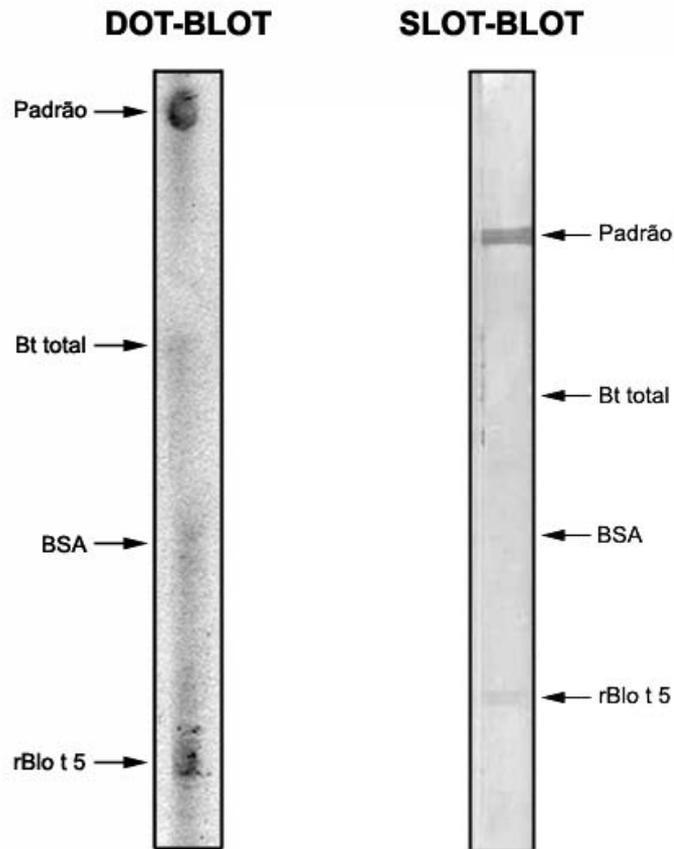


Figura 7. Imunodeteccção do alérgeno Blo t 5 recombinante (rBlo t 5) de *Blomia tropicalis* (Bt) em ensaios Dot-blot e Slot-blot. Membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com rBlo t 5 (3,75 µg) e controles (padrão rBlo t 5, 6,25 ng; extrato Bt total, 10 µg; e soro albumina bovina [BSA, 5 µg]) e reveladas com estreptavidina-peroxidase e quimioluminescência (ECL) para Dot-blot ou 3,3 'diaminobenzidina (DAB) para Slot-blot.

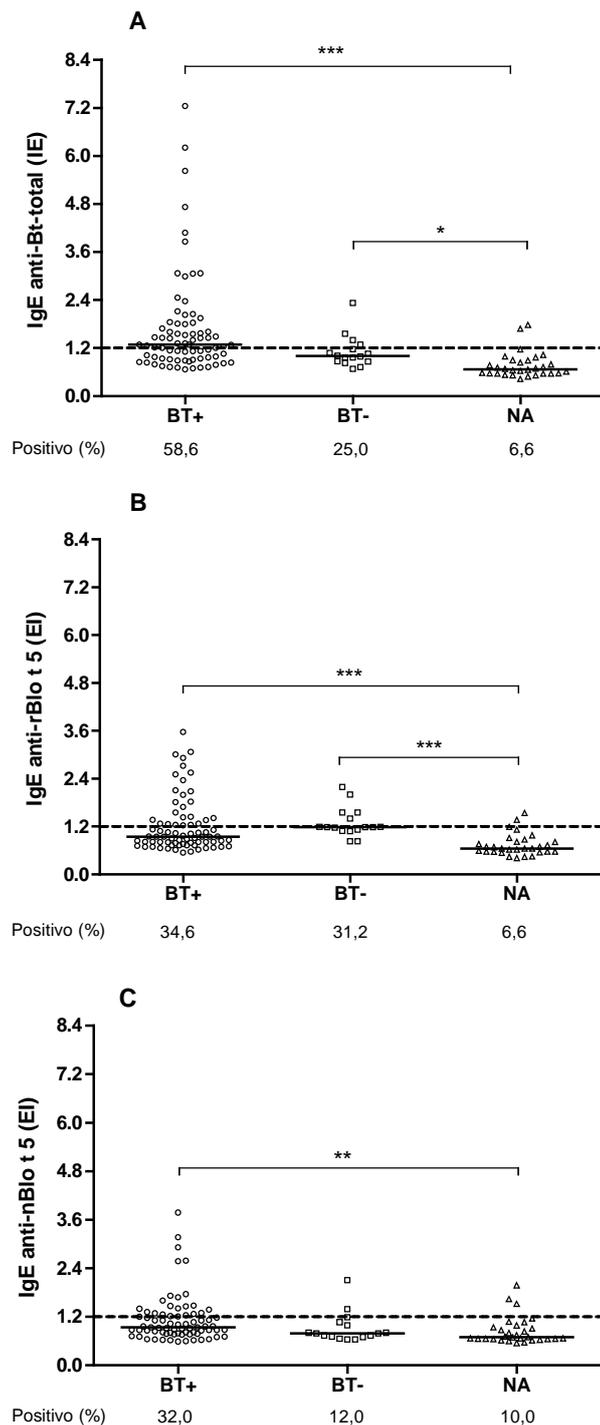


Figura 8. Níveis de IgE ao extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt-total, **A**), Blo t 5 recombinante (rBlo t 5, **B**) e Blo t 5 nativo (nBlo t 5, **C**), determinados por ELISA e expressos em índice ELISA (IE) em soros de pacientes atópicos com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo para extrato Bt (BT+, n = 75) e TCP negativo para extrato Bt (BT-, n = 16) e de indivíduos não-atópicos (NA, n = 30). As linhas tracejadas indicam o limite de positividade [Índice ELISA (IE) > 1,2] e as porcentagens de amostras positivas também são indicadas. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

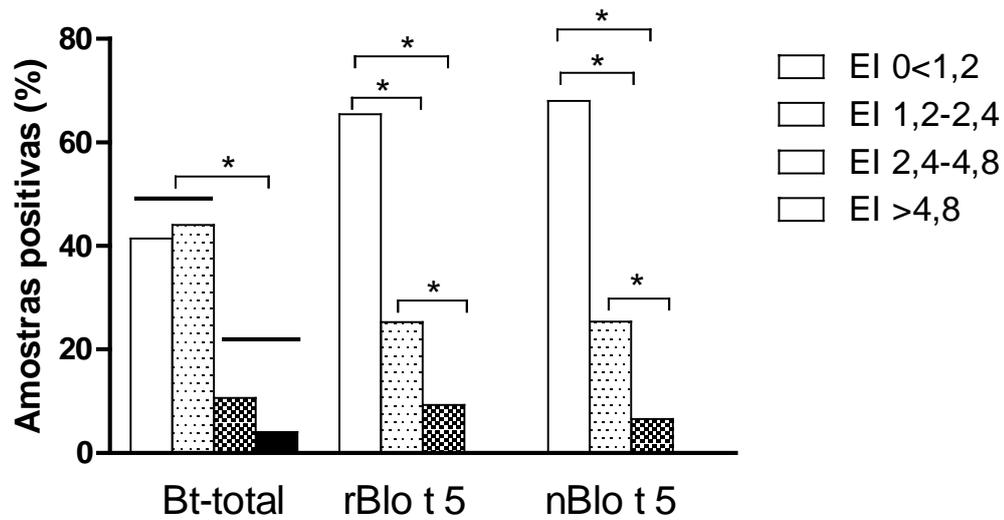


Figura 9. Porcentagem de amostras positivas para IgE ao extrato total de *Blomia tropicalis* (Bt-total), Blo t 5 recombinante (rBlo t 5) e Blo t 5 nativo (nBlo t 5), de acordo com diferentes graus de reatividade determinada por índice ELISA (IE) em soros de pacientes atópicos com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo para extrato Bt (BT+, n = 75). O limite de positividade foi estabelecido em IE > 1,2. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas pelo teste exato de Fisher (*P <0,05).

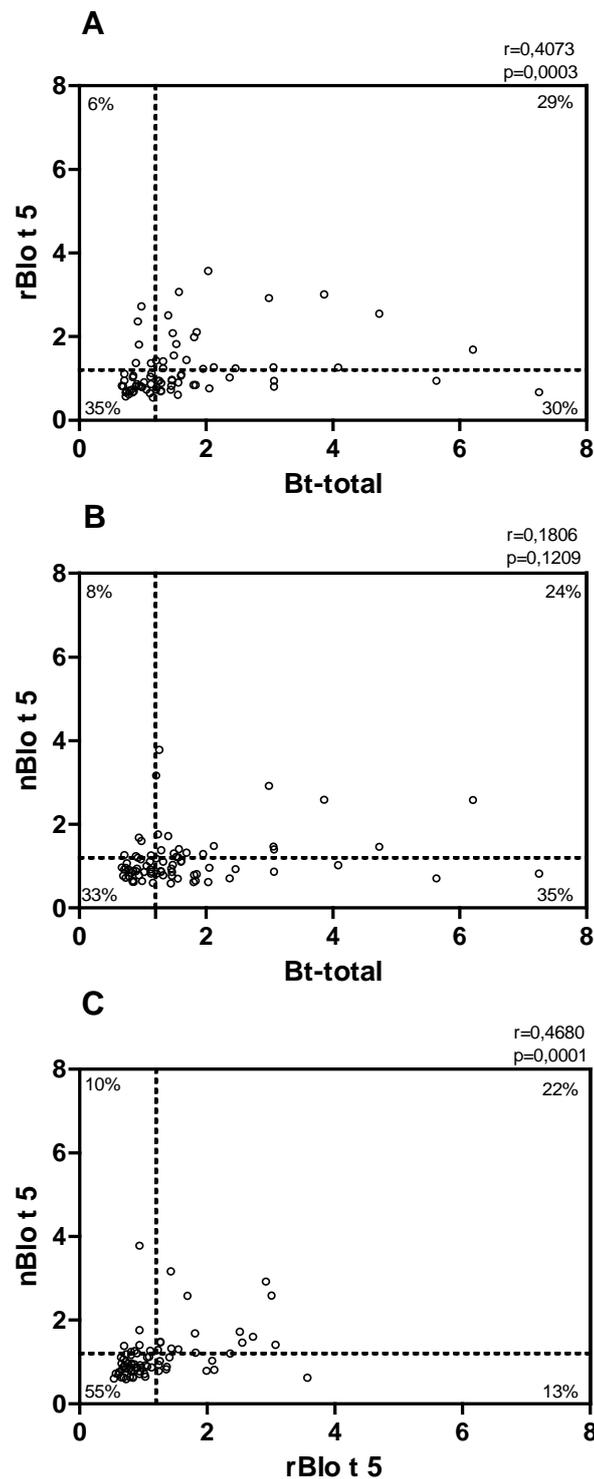


Figura 10. Correlação entre níveis de IgE a alérgenos de *Blomia tropicalis* (Bt) nos soros de pacientes atópicos com teste cutâneo de puntura (TCP) positivo ao extrato total de Bt (grupo BT+, n = 75). (A), Bt-total versus rBlo t 5; (B), Bt-total versus nBlo t 5; (C), rBlo t 5 versus nBlo t 5. As porcentagens de amostras positivas são indicadas no canto correspondente de cada quadrante. Coeficiente de correlação de Spearman (r) e significância estatística (p) também estão demonstrados.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos 25 anos as doenças alérgicas atingiram maior prevalência, tornando-se um importante problema de saúde que, aflige de 10 a 40% da população mundial, sendo os ácaros de poeira domiciliar um componente alergênico importante na patogênese das doenças alérgicas (VANDENPLAS; D'ALPAOS; VAN BRUSSEL, 2008).

Blomia tropicalis é uma espécie de ácaro comum em países tropicais e sub-tropicais, sendo conhecidos mais de 20 alérgenos derivados destes ácaro, dentre eles podemos destacar a Blo t 5 apresentando aproximadamente 70% reatividade a IgE (ARRUDA et al., 1997; YI et al., 2006; GAO et al., 2007).

No presente estudo foi encontrado que os indivíduos atópicos reatividade aos testes cutâneos positivos ao extrato total Bt (grupo BT+), a maioria tinham sensibilização concomitante aos alérgenos de *D. pteronyssinus* (Dp) (97,3%) e *D. farinae* (Df) (98,7%) e a prevalência de rinite (88%) foi significativamente maior em comparação com asma associada com rinite (12%). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo anterior de indivíduos da mesma região, mostrando que 95% dos indivíduos atópicos foram sensibilizados para mais de um alérgeno do ácaro testados e da prevalência dos sintomas de rinite (80%) também foi maior quando comparados a pacientes com asma (43%) (SOARES et al., 2007).

Em nossos estudos anteriores realizados em outro grupo de pacientes com rinite (52%) a maioria deles estavam sensibilizados aos alérgenos de Bt e Dp, e apenas 6% estavam monossensibilizados para extrato total Bt (ALMEIDA et al., 2006; SOARES et al., 2007), confirmando que esta elevada taxa de sensibilização concomitante tem dificultado a avaliação do papel de *B. tropicalis* como principal agente de sensibilização nestes indivíduos. Quando os indivíduos com testes cutâneos negativos para o extrato total Bt (grupo BT-) foram analisadas no presente estudo, também foi encontrada uma grande sensibilização concomitante aos alérgenos Dp e Df (81,5%), reforçando que estes últimos alérgenos representam a principal fonte de sensibilização em indivíduos geneticamente predispostos desta região.

A proteína Blo t 5 é considerada um dos principais alérgenos de *Blomia tropicalis*, constituída com um cDNA que contém 432 pb e codifica 134 aminoácidos, resultando em uma proteína com aproximadamente 14 kDa (ARRUDA et al., 1995), sendo sua forma recombinante expressa tanto em sistemas procarioto quanto em sistemas eucarioto por vários

autores (ARRUDA et al., 1997; YI et al., 2002 CHUA et al., 2007; YI et al., 2006; GOH et al., 2001).

Em nosso estudo, resultados semelhantes foram encontrados com isolamento do cDNA Blo t 5 contendo 412 pb que codificou uma proteína de 134 aa (14 kDa), e expressa em sistema procarioto, com um rendimento de 1,71 vezes em pixel/mm² da fração induzida.

Após a expressão de rBlo 5 t a proteína purificada em coluna de níquel Ni-NTA, foram visualizadas bandas com pesos moleculares de 14 e 28 kDa em SDS-PAGE, sugerindo a formação de dímeros da proteína Blo t 5.

Em outro estudo no qual realizou a análise das isoformas nativas Blo t 5 por immunoblot utilizando soros de pacientes alérgicos que apresentaram reatividade IgE em soros de pacientes ao alérgeno Blo t 5 observou-se pesos moleculares marcadas com anti-Blo t 5 para a proteína de 14 kDa e 28 kDa, sugerindo a formação de dímeros também em proteínas nativas (Yi, 2004).

Para validar a proteína recombinante Blo t 5 expressa, foram realizados Dot-blot e Slot-blot utilizando anticorpo monoclonal anti-Blo t 5 de camundongo, e proteína rBlo t 5 foi evidenciada em ambos os ensaios, embora com ligeira coloração em relação ao proteína rBlo t 5 padrão; esta também expressa em sistema procarioto. Essas variações podem ser devido a pureza ou a diferenças conformacionais entre as duas proteínas recombinantes. Yi et al (2004), relatou que inadequação na conformação da proteína e a modificações pós-traducionais podem ocorrer a alérgenos recombinantes durante o processo de expressão, ocasionando em uma potencial alteração ou efeito de mascaramento a epítomos de IgE dificultando o reconhecimento de anticorpos, o que poderiam ser motivos que justifiquem a leve marcação.

No presente estudo, encontramos reatividade de IgE sérica para o extrato total Bt por ELISA em 58,6% dos pacientes atópicos com testes cutâneos positivos ao extrato total Bt (grupo BT+) e em 25% dos pacientes atópicos com TCP negativo ao extrato total Bt (grupo BT-), sugerindo uma importante reatividade cruzada de IgE *in vitro* entre os alérgenos de *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *D. farinae* como relatado por vários autores (ARRUDA et al., 1997, SIMPSOM et al., 1997; SIMPSOM et al., 2003). Neste contexto, a reatividade absorção de soros aos anticorpos IgE aos extratos Dp resultou em 36% de inibição da reatividade de IgE específica para *B. tropicalis* (SIMPSOM et al., 1997; SIMPSOM et al., 2003).

Para avaliar a reatividade de IgE ao alérgeno Blo t 5 em nossos pacientes, realizamos ELISA indireto para detecção de IgE ao rBlo t 5 e ELISA reverso para capturar o Blo t 5 nativa do extrato total Bt para a detecção de IgE nBlo t 5 em amostras de soro dos pacientes

do estudo. Constatamos que 34,6% dos pacientes sensibilizados ao extrato total de Bt, também foram IgE reativos para rBlo 5 t. Jorge (2001) realizou estudo avaliando a reatividade aos alérgenos Bt-total e rBlo t 5 em teste cutâneo e sistema UniCAP (extrato Bt) e ELISA Quimérico (rBlo t 5), constatando que dos 47 pacientes positivos no teste TCP para o extrato total Bt, 46,8% (22) foram também positivos para o alérgeno rBlo t 5 e, dos 52 pacientes avaliados 51,9% (27) foram considerados positivos para reatividade de IgE realizado através ELISA Quimérico.

O grupo não sensibilizado ao extrato total Bt, mas com testes cutâneos positivos para alérgenos Dp e/ou Df apresentaram reatividade a IgE ao extrato total de Bt (31,2%), sugerindo provável reatividade cruzada, uma vez que Blo t 5 tem cerca de 40% homologia com o alérgeno Der p 5 de *D. pteronyssinus*, e cerca de 50-70% dos doentes asmáticos sensibilizados para Dp e/ou Df tem reatividade IgE ao alérgeno Blo t 5 (ARRUDA et al., 1997; SIMPSOM, et al., 2003; CHUA et al., 2007). Em contraste, um estudo anterior, utilizando um grande painel de soros de pacientes asmáticos e uma combinação *in vitro* e *in vivo* mostraram que o alérgeno Blo t 5 apresentou baixos níveis de reatividade cruzada IgE com o seu homólogo Der p 5 (KUO et al, 2003). No Reino Unido, onde *B. tropicalis* não faz parte da ácarofauna, a presença de testes cutâneos positivos para *B. tropicalis* nesta população pode ser devido à produção de anticorpos IgE, que são dirigidos contra alérgenos de *Dermatophagoides spp*, representando assim reatividade cruzada ao invés de sensibilizações verdadeiro (SIMPSOM et al., 2003). Uma reatividade cruzada parcial foi observada entre o grupo 5 dos alérgenos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* nestes indivíduos alérgicos não naturalmente expostos a *B. tropicalis*, sugerindo que os alérgenos do grupo 5 podem ser específicos da espécie.

Por outro lado, resultados semelhantes na reatividade dos anticorpos IgE para o alérgeno nBlo t 5 (32%) em comparação com rBlo t 5 (34,6%) em pacientes do grupo BT+, indicaram uma sensibilidade semelhante entre ambos os ensaios. No entanto, uma frequência consideravelmente mais baixos de IgE positivas para nBlo t 5 em pacientes grupo BT- (12%) do que rBlo t 5 (31,2%) foi observada, indicando que o ELISA reversa para detecção de IgE ao nBlo t 5 foi mais específico do que o ELISA indireto para medir IgE ao rBlo 5.

A purificação do Blo t 5 nativo de extrato total *Blomia tropicalis* é complexo, apresenta custo elevado e baixo rendimento, a alternativa de alérgenos recombinantes seria mais eficiente, com expressão em procarioto e/ou eucarioto. GOH et al., (2001) expressaram Blo t 5 em eucarioto e encontrou reatividade IgE com os soros de pacientes asmáticos e a não reação em pacientes atópicos, comprovando que Blo t 5 recombinante pode ser usada para o

desenvolvimento de diagnósticos de alergia a ácaro. Em outro estudo utilizando um método alternativo de otimização de códon para facilitar a expressão da proteína Blo t 5 em óvulo de hamster chinês mostrou uma correlação positiva entre a forma Blo t 5 nativa e a Blo t 5 expressa em óvulo de hamster (cBlo t 5), e uma positividade semelhante aos alérgenos Blo t 5 nativa, Blo t 5 recombinante e cBlo t 5 relacionada ao teste cutâneo puntura (LIM, 2004).

Estudo utilizando imunoelektroforese heteróloga cruzada identificaram reações cruzada entre os alérgenos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* e entre os alérgenos *D. farinae* e *B. tropicalis*, embora com fraca ligação (SIMPSON et al 2003).

Ao realizarmos a estratificação dos níveis de IgE para o extrato total de Bt, encontramos que a porcentagem de pacientes com níveis 0 a 1,2 (41,3%) e 1,2 a 2,4 (44,4%) foram muito próximos, o que nos sugere um percentual de reatividade cruzada no TCP durante o processo de seleção destes pacientes. Vários estudos realizados em nossa região demonstraram que a sensibilização concomitante a mais de um ácaro é comum (SOARES et al., 2007; ALMEIDA et al., 2006). Em um estudo realizado no Reino Unido com o intuito de avaliar a reatividade cruzada no teste cutâneo entre os alérgenos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*, onde *B. tropicalis* não faz parte da ácarofauna demonstrou, que indivíduos previamente expostos a este ácaro apresentaram 60% de reatividade no teste intradérmico com o extrato de *B. tropicalis*, sugerindo forte reatividade cruzada (SIMPSON et al., 2003).

A parcela de indivíduos do grupo BT+ que apresentaram IE superior a 2,4 (14,6%) para IgE extrato total Bt apresentaram reatividades consideradas de moderada a forte, sugerindo verdadeiros positivos.

Ao estratificar os níveis de IE para IgE rBlo t 5 dos pacientes do grupo BT+ encontramos uma expressiva porcentagem dos indivíduos não reativos a Blo t 5 (65,4%), e entre os indivíduos com IE positivos, estes apresentaram índices inferior a 4,8 sugerindo a possibilidade de reação cruzada na seleção dos pacientes, uma vez que a reatividade da Blo t 5 com antígenos de IgE estão entre 50 a 70% (ARRUDA et al., 1995; YI, 2006), sendo observado também que 58,4% dos indivíduos no grupo BT+ com TCP positivos para extrato total de Bt foram positivos para IgE. Portanto, sugere-se que os indivíduos reativos a IgE Blo t 5 do grupo BT+ sejam verdadeiros positivos.

O resultado da estratificação para os alérgenos rBlo t 5 e nBlo t 5 para indivíduos de grupo BT+ foram semelhantes entre eles. Lim et al., (2004), ao expressarem Blo t 5 em óvulo de hamster encontrou respostas semelhantes entre os níveis de IgE de Blo t 5 recombinante e a forma nativa. Ao avaliarmos a reatividade de IgE para nBlo t 5 encontramos que a maior

porcentagem dos indivíduos se encontram na faixa de IE entre 1,2 a 2,4 (25,4%) apresentando reatividade moderadas a IgE.

Um trabalho anterior avaliou a correlação entre os níveis de IgE para extrato total *Blomia tropicalis* (medidos pelo sistema UniCAP) e IgE para Blo t 5, medidos por ELISA Quimérico ($r=0,33$; $p=0,02$) foi encontrada correlação significativa, embora baixa (JORGE, 2001). Em nosso estudo foram realizadas análises das correlações entre os níveis de IgE ao extrato total Bt e Blo t 5 em sua forma nativa ou recombinante em pacientes sensibilizados ao extrato total Bt, encontrando correlação positiva entre os níveis de IgE ao extrato total Bt e rBlo t 5, com 29% de pacientes IgE duplo positivos para esses alérgenos.

Surpreendentemente, não houve correlação significativa entre os níveis de IgE ao extrato total Bt e nBlo t 5, embora tenha sido observada uma taxa semelhante de IgE duplo positivo para ambos os alérgenos (24%) como visto para rBlo t 5 e extrato total Bt. No entanto, uma correlação positiva significativa foi encontrada entre a IgE rBlo t 5 e nBlo t 5, com 21% dos pacientes apresentando IgE duplo positivos e 55% dos pacientes com IgE duplo negativo, tendo assim 76% de concordância entre ambas as formas nativas e recombinantes do alérgeno Blo t 5.

Um estudo anterior, também encontrou uma alta correlação positiva entre a IgE rBlo t 5 e nBlo t 5, com apenas 4% das amostras de IgE sérica mostrando forte ligação nBlo t 5, mas não para rBlo t 5 (Yi, et al., 2004).

No presente estudo, produzimos e purificamos a proteína Blo t 5 recombinante de *B. tropicalis* em sistema procarioto (*E. coli*) de expressão. Pacientes atópicos sensibilizados a *B. tropicalis* apresentaram moderada reatividade de IgE *in vitro* para rBlo t 5 e nBlo t 5, e uma correlação positiva moderada entre os níveis de IgE ao extrato total Bt e rBlo t 5 e entre ambas as formas nativa e recombinante de Blo t 5 . A presença de reatividade a IgE rBlo t 5 em pacientes não sensibilizados, mas sensibilizados para os alérgenos Dp e/ou Df, sugere uma reatividade cruzada parcial entre os alérgenos do Grupo 5 destes ácaros. Sendo assim, concluímos que o alérgeno Blo t 5 pode não ser considerado um alérgeno sensibilizante principal de *Blomia tropicalis* na população estudada. Estudos futuros deverão ser realizados incluindo pacientes de outras regiões brasileiras, particularmente envolvendo pacientes mono sensibilizados a *Blomia tropicalis*.

6. CONCLUSÕES

- A produção da proteína recombinante Blo t 5 de *B. tropicalis* foi obtida em sistema de expressão procariotos (*E. coli*).
- Blo t 5 parece não ser um alérgeno relevante na sensibilização de pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis* residentes em nossa região;
- Correlação positiva moderada foi evidenciada anticorpos IgE presente nos soros de pacientes atópicos reativos ao extrato total Bt e alérgeno nBlo t 5 ou rBlo t 5.
- Foi observada reatividade cruzada parcial em pacientes atópicos sensibilizados aos alérgenos de Dp e/ou Df e não sensibilizados ao extrato total de Bt por meio da presença de reatividade dos anticorpos IgE a rBlo t 5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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**, v. 107, p. 406-413, 2001.

ARRUDA, L. K.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; NASPITZ, C. K.; MONTEALEGRE, F.; VAILES, L. D.; CHAPMAN, M. D. Identification of *Blomia tropicalis* allergen Blo t 5 by cDNA cloning. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 107, p. 456-457, 1995.

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

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

AZEVEDO, O.M; FELIPE, S.S.M; BRIGIDO, M.M; MARANHÃO, Q.A; DE-SOUZA, T.M. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**, 1 ed. Brasília, BR: Editora Universidade de Brasília, 2003. 129 p.

BACHERT, C.; JORISSEN, M.; BERTRAND, B.; KHALTAEV, N.; BOUQUET, J. Allergic rhinitis and its impact on asthma: a update (ARIA 2008). **B-ENT**, v. 4, n. 4, p. 253-257, 2008.

BEASLEY, R.; CRANE, J.; LAI, C. K.; PEARCE, N. Prevalence and etiology of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 2, p. 466-472, Feb. 2000.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 5, p. 147-334, 2001.

CAMARGOS, P.; IBIAPINA, C.; LASMAR, L.; CRUZ, A. A. Obtaining concomitant control of allergic rhinitis and asthma with a nasally inhaled corticosteroid. **Allergy**, v. 62, n. 3, p. 310-316, 2007.

CARABALLO, L.; PUERTA, L.; JIMÉNEZ, S.; MARTINEZ, B.; MERCADO, B.; AVJIOGLO, A.; MARSH, D. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 112, p. 341-347, 1997.

CHAPMAN, M. D.; SMITH, A. M.; VAILES, L. D.; ARRUDA, K. L.; DHANARAJ, V.; POMES, A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 409-418, 2000.

CHARLES, A.; JANEWAY, J. R.; PAUL, T.; WALPORT, M.; MARK, J. S. Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. **Artmed**, 6.ed, p. 762-767, 2006.

CHEONG, N.; SOON, S. C.; RAMOS, J. D.; KUO, I. C.; KOLORTKAR, 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**, v.58, p.912-920, 2003.

CHEW, F. T.; YI, F. C.; CHUA, K. Y.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; ARRUDA, L. K.; et al. Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clinical and Experimental Allergy**, v.29, p.982-988, 1999.

CHUA, K. Y.; CHEONG, N.; KUO, I. C.; LEE, B. W.; YI, F. C.; HUANG, C. H.; LIEW, L. N. The *Blomia tropicalis* allergens. **Protein & Peptide Letters**, v. 14, p. 325-333, 2007.

COLLOFF, M. J. Taxonomy and identification of dust mites. **Allergy**, Copenhagen, v.53, p. 7-12, Supplement 48, 1998.

CROMWELL, O. Biochemistry of allergens. In: KAY, A. B. **Allergy and allergic diseases**, ed. 1., v. 2, p. 797-810, 1997.

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

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

FERRANDIZ, R.; CASAS, R.; DREBORG, S. Sensitization to *Dermatophagoides siboney*, *Blomia tropicalis*, and other domestic mites in asthmatic patients, **Allergy**, v.51, p.501-505, 1996.

FERRARI, F. P.; ROSÁRIO-FILHO, N. A.; RIBAS, L. F. O.; CALLEFE, L. G. Prevalência de asma em escolares de Curitiba - Projeto ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood). **Jornal de Pediatria**, v. 74, p. 299-305, 1998.

FLORES, I.; MORA, C.; RIVERA, E.; DONNELLY, R.; MONTEALEGRE, F. Cloning and molecular characterization of a cDNA from *Blomia tropicalis* homologous to dust mite group 3 allergens (trypsin-like proteases). **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 130, p.12-16, 2003.

FONSECA, L.; DIAZ, A. M. IgE reactivity from serum of *Blomia tropicalis* allergic patients to the recombinant protein Blo t 1. **Health Science Journal**, v.22, p.353-337, 2003.

FUIANO, N.; FUSILLI, S.; CRISTOFORO, I. House dust mite-related allergic diseases: role of skin prick test, atopy patch test, and RAST in the diagnosis of different manifestations of allergy, **European Journal of Pediatrics**, s/n, dez, 2009.

GALLI, S. J.; LANTZ, C. S. Allergy. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 4.ed. Philadelphia, USA: Saunders , 1999.1127.p.

GAO, Y. F; WANG, D. Y.; ONG, T. C.; TAY, S. L.; YAP, K. H.; CHEW, F. T. Identification and characterization of a novel allergen from *Blomia tropicalis*: Blo t 21. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, p. 105-112, 2007.

GARCIA, R. J. C.; SANCHEZ, M. I.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; IRAOLA, C. V.; VAZQUEZ, M. C.; BONNET, M. C.; DE LA TORRE, M. F. Skin tests and conjunctival and bronchial challenges with extracts of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with allergic asthma and/or rhinoconjunctivitis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 131, p. 182-188, 2003.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 741-750, 2000.

GOH, L.T.; KUO, I.C.; LUO, S.; CHUA, K.Y. White M. Production and purification of recombinant *Blomia tropicalis* group 5 allergen from *Pichia pastoris* culture. **Biotechnology Letters**, v.23, p. 661–665, 2001.

GUERRANT, R. L.; WALKER, D. H.; WELLER, P. F.; Tropical infectious diseases. **Principles, pathogenesis, & practice**, ed.2, p. 77-81, 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**, v. 351, n. 9111, p. 1225-1232, Apr. 1998.

JANSON, C.; LUDVIKSDOTTIR, D.; GUNNBJÖRNSDOTTIR, M.; BJÖRNSSON, E. H.; HAKANSSON, L.; VENGE, P. Circulating adhesion molecules in allergic and non-allergic asthma. **Respiratory Medicine**, v. 99, n. 1, p. 45-51, Jan, 2005.

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

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

JORGE, P. P. O. **Estudos da resposta mediada por IgE aos alérgenos recombinates de ácaros *in vivo* (Der p 2, Der p 5 e Blo t 5) e *in vitro* (Der p 1, Der p 2 e Blo t 5) em pacientes alérgicos.** Ribeirão Preto, 2001. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

KUO, I. C.; CHEONG, N.; TRAKULTIVAKORN, M.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. An extensive study of human IgE cross-reactivity of Blo t 5 and Der p 5. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 603-609, 2003.

KUO, I. C.; YI, F. C.; CHEONG, N.; SHEK, L. P.; CHEW, F. T.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* – a comparative study between Singapore and Taiwan. Asian Pac. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 17, I. 3, p. 179-188, 1999.

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

LARCHÉ, M. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. **Current Opinion of Immunology**, v. 18, p. 745-750, 2006.

LASCOMBE, M. B.; GREGOIRE, C.; PONCET, P.; TAVARES, G. S.; ROSINSKI-CHUPIN, I.; RABILLON, J. Crystal structure of the allergen Equ c1: a dimeric lipocalin with restricted IgE-reactive epitopes. **Journal of Biology Chemistry**, v.275, p. 21572-21577, 2000.

LIM, L. H.; LI, H. Y.; CHEONG, N.; LEE, B. W.; CHUA, K. Y. High-level expression of a codon optimized recombinant dust mite allergen, Blo t 5, in Chinese hamster ovary cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 991-996, 2004.

LIM, D.; SHEK, P.; SHAIKH, W.; BARATAWIDJAJA, K.; TRAKULTIVAKORN, M.; CHEONG, N.; CHUA, K. Y.; LEE, B. W. Pattern of sensitization to *Blomia tropicalis* and its recombinant allergens in four tropical asian populations **The Journal of allergy and Clinical Immunology**, v.109, p.531-537, 2002.

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

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

McKAY, S. P.; MESLEMANI, D.; STACHLER, R. J.; KROUSE, J. H. Intradermal positivity after negative prick testing for inhalants. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, v. 135, n. 2, p. 232-235, 2006.

MILLS, K. L.; HART, B. J.; LYNCH, N. R.; THOMAS, W. R.; SMITH, W. Molecular characterization of the group 4 house dust mite allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and its amylase homologue from *Euroglyphus maynei*. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.120, p.100-107, 1999.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. ed. EDUFU, 2005. p. 81-111.

MORA, C.; FLORES, I.; MONTEALEGRE, F.; DIAZ, A. Cloning and expression of Blo t 1, a novel allergen from the dust mite *Blomia tropicalis*, homologous to cysteine proteases. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p.28-34, 2003.

MORGAN, M. S.; ARLIAN, L. G.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Cross-allergenicity of the house dust mites *Euroglyphus maynei* and *Blomia tropicalis*. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 77, p. 386-392, 1996.

MOSGES, R.; The increasing prevalence of allergy: a challenge for the physician. **Clinical & Experimental Allergy**, v.2, p.13-7, 2002.

NAIK, et al. Roles of Structure and Structural Dynamics in the Antibody Recognition of the Allergen Proteins: An NMR Study on *Blomia tropicalis*. **Major Allergen. Structure**, v.16, p.125–136, 2008.

NIEDERBERGER, V.; HORAK, F.; VRTALA, S.; SPITZAUER, S.; KRAUTH, M-T.; VALENT, P.; REISINGER, J.; PELZMANN, M.; HAYEK, B.; KRONQVIST, M.; GAFVELIN, G.; GRONLUND, H.; PUROHIT, A.; SUCK, R.; FIEBIG, H.; CROMWELL, O.; PAULI, G.; van HAGE-HAMSTEN, M.; VALENTA, R. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 101, p. 14677-14682, 2004.

OBOKI, K.; OHNO, T.; SAITO, H.; NAKAE, S. Th17 and allergy. **Allergology International**, v. 57, n. 2, p. 121-134, Jun. 2008.

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

PAJNO, G.B.; BARBERIO, G.; DE-LUCA, F.; MORABITO, L.; PARMIANI, S. Prevention of new sensitization in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six year follow-up study. **Clinical & Experimental Allergy**, n. 31, p.1392–399, 2001.

PARK, J.W.; KIM, C.W.; KANG, D.B.; LEE, I.Y.; CHOI, S.Y.; YONG, T.S.; SHIN, D.C.; KIM, K.E.; HONG, C.S. Low-flow, long-term air sampling under normal domestic activity to measure house dust mite and cockroach allergens. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, n.12, p. 293-298, 2002.

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

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

PICHLER, C. E.; HELBLING, A.; PICHLER, W. J. Three years of specific immunotherapy with house-dust-mite-extracts in patients with rhinitis and asthma: significant improvement of allergen-specific parameters and of nonspecific bronchial hyperreactivity. **Allergy**, Copenhagen, n.56, p 301-307, 2001.

PLATTS-MILLS, T. A. Allergen Avoidance. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v.113, p. 388-391, 2004.

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

PUERTA, L.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; LOCKEY, R.F.; CARABALLO, L.R. Mite allergy in the tropics: sensitization to six domestic mite species in Cartagena, Colombia. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 3, p. 198–204, 1993.

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

PUERTA, L.; LERENA, L.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; CARABALLO, GRACIA, L.R.; LOCKEY, R. F. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides* spp-allergic individuals. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 88, p. 943-950, 1991.

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

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

RING, J.; KUNZ, B.; BIEBER, T.; VIELUF, D.; PRZYBILLA, B. The “atopy patch test” with aeroallergens in atopic eczema. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, n. 82, p. 195-197, 1989.

SCHEINER, O.; KRAFT, D. Basic and practical aspects of recombinant allergens. **Allergy**, v. 52, p. 374-379, 1995.

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

SIMPSON, A; ARRUDA, K; CHAPMAN, M. Antigenic interrelationships among mite allergens (*Blomia* and *Dermatophagoides spp*), **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 15, p. 461-469, 1997.

SIMPSON, A; GREEN, R; CUSTOVIC, A; WOODCOCK, A; ARRUDA, L, K; CHAPMAN, M.D. Skin test reactivity to natural and recombinant *Blomia* and *Dermatophagoides spp.* allergens among mite allergic patients in the UK. **Allergy**, v.58, p. 53-56, 2003.

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

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA. Sociedade Brasileira de Pediatria e Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **I Consenso Brasileiro no Manejo da Asma**. Ed. BG Cultura, p.42-47, 1994.

SOLÉ, D.; CAMELO-NUNES, I. C.; VANA, A. T.; YAMADA, E.; WERNECK, F.; DE FREITAS, L. S.; SOLOGUREN, M. J.; BRITO, M.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; STEIN, R. T.; NASPITZ, C. K. Prevalence of rhinitis and related-symptoms in schoolchildren from different cities in Brazil. **Allergologia et immunopathologia**, v. 32, n. 1, p. 7-12, 2004.

STANALAND, B. E.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; JACINTO, C. M.; TRUDEAU, W.L.; LOCKEY, R.F. Sensitization to *Blomia tropicalis*: skin test and cross-reactivity studies. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 94, 452-459, 1994.

THOMAS, W. R.; HALES, B. J.; SMITH, W. *Blomia tropicalis*: more than just another source of mite allergens. **Clinical & Experimental Allergy**, n. 33, p.416-424, 2003.

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

THOMAS, W. R.; SMITH, W. A.; HALES, B. J.; MILLS, K. L.; O'BRIEN, R. M. Characterization and Immunobiology of House Dust Mite Allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.129, p.1-18, 2002.

TOGIAS, A. Unique mechanistic features of allergic rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 105, n. 6, p. 599-604, 2000.

VALENTA, R.; LIDHOLM, J.; NIEDERBERGER, V.; HAYEK, B.; KRAFT, D. GRONLUND, H. The recombinant allergen-based concept of component resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). **Clinical and Experimental Allergy**, v.29, p. 896-904, 1999.

VAN, HAGE-HAMSTE. M. *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis*, dust mites of subtropical and tropical areas. **Clinical and Experimental Allergy**, n. 25, p. 905–907, 1995.

VANDENPLAS, O.; D'ALPAOS, V.; VAN BRUSSEL, P. Rhinitis and its impact on work. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstownv, v. 8, n. 2, p. 145-149, 2008.

VON MUTIUS, E. The rising trends in asthma and allergic disease. **Clinical and experimental allergy**, v. 28, n. 5, p. 45-49, 1998.

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

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

WORM, M.; HENZ, B. M. Molecular regulations of human IgE synthesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 75, n. 6, p. 440-447, 1997.

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

YI, F. C.; CHEONG, N.; SHEK, P. C.; WANG, D. Y.; CHUA, K. Y.; LEE, B. W. Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, p.1203-1210, 2002.

YI, F. C.; CHUA, K. Y.; CHEONG, N.; SHEK, L. P.; LEE, B. W. Immunoglobulin E reactivity of native Blo t 5, a major allergen of *Blomia tropicalis*. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, p.1762–1767, 2004.

YI, F. C.; SHEK, L. P-C.; CHEONG, N.; KAW, Y. C.; LE, B. W. Molecular Cloning of *Blomia tropicalis* Allergens – A Major Source of Dust Mite Allergens in the Tropics and Subtropics. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, n.5, p. 261-266, 2006.

YONG, S. T.; JEONG, K. Y. Household Arthropod Allergens in Korea. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47, p.143-153, 2009.

YUNGINGER, J. W.; REED, C. E, O'CONNELL, E.; MELTON, L. J.; O'FALLONN, W. M.; SILVERSTEIN, A. A community-based study of the epidemiology of asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v. 146, p. 888-894, 1992.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: cep@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 322/08 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 133/08

Projeto Pesquisa: "Método de produção de alérgenos recombinantes de *blomia tropicalis* e de *dermatophagoides pteronyssinus* para utilização em diagnóstico (reatividade de IgE in vitro e teste cutâneo) de alergias respiratórias".

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.
 O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do relatório final: julho de 2010.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 08 de agosto de 08.

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

Orientações ao pesquisador

- 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 de o 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 aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

ANEXO 2



Universidade Federal de Uberlândia
 Instituto de Ciências Biomédicas
 Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
 Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902
 Telefone: 034-3218-2195 - TELEFAX: 034-3218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “**Método de produção de alérgenos recombinantes de *Blomia tropicalis* e de *Dermatophagoides pteronyssinus* para utilização em diagnóstico (reatividade de IgE in vitro e teste cutâneo) de alergias respiratórias**”, que tem como objetivo produzir proteínas recombinantes de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*, para aplicação no diagnóstico de alergias respiratórias.

Durante esta pesquisa, o atendimento médico, o teste alérgico e a coleta de sangue (cerca de 15mL) serão realizados na Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica, Campus Umuarama, Bloco 4C em Uberlândia-Minas Gerais e os exames de sangue serão realizados no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da UFU, MG.

Em nenhum momento você será identificado. Na publicação dos resultados desta pesquisa, sua identidade será mantido no mais rigoroso sigilo.

Você não terá ganho financeiro por participar desta pesquisa.

Os riscos são mínimos, mas se por acaso você manifestar algum tipo de crise alérgica durante os testes, você será imediatamente examinado por médicos e receberá tratamento adequado no Ambulatório de Alergia da UFU em Uberlândia, MG. Dentre os benefícios deste exame pode ser a descoberta e tratamento de alergias respiratórias.

Você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com esta pesquisa. Você é livre para se retirar da pesquisa a qualquer momento em que desejar sem necessidade prévia de explicações, e sem nenhum prejuízo.

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

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com Dr. Ernesto Taketom, pesquisador responsável por esta pesquisa.

Dr. Ernesto A. Taketomi: Avenida Pará, 1720 Bloco 4C, Campus Umuarama, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Tel.: (34) 3218-2195 / Telefax: (34) 3218-2333

Você poderá entrar em contato também com o Comitê de Ética em Pesquisa-UFU CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394531

_____, ____ de _____ de 200_.

 Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido

 Participante da Pesquisa

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

Questionário 2 (Módulo Rinite)

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

- 1) Alguma vez na vida você teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava resfriado ou gripado?
 Sim Não
- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou com resfriado?
 Sim Não
- 3) Nos últimos 12 (doze) meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?
 Sim Não
- 4) Em qual dos últimos 12 (doze) meses este problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu)
- | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <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
- Pouco
- Moderado
- Muito
- 6) Alguma vez na vida você teve rinite? Sim Não

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)