



**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES ALERGÊNICAS DE
BAIXO PESO MOLECULAR DO ÁCARO *Aleuroglyphus ovatus*.**

TEREZINHA CÉLIA DE ALMEIDA E SILVA ZOLLNER

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Doutor em Ciências na
área de Bioquímica.**

Orientador: Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho

Campinas

1998



9822411

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
*Terezinha Célia de Almeida
e Silva Zollner*
e aprovada pela Comissão Julgadora
28/09/98

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Es.
TOMBO BC/	35581
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/10/98
N.º CPD	

CM-00117709-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Zollner, Terezinha Célia de Almeida e Silva

ZOL75i Identificação e caracterização de frações alergênicas de
baixo peso molecular do ácaro *Aleuroglyphus ovatus*/Terezinha
Célia de Almeida e Silva Zollner. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
117f.:ilus

Orientador: Benedito Oliveira Filho

Co-orientador: Ricardo de Lima Zollner

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto
de Biologia.

1. Ácaros. 2. Alergia. 3. Proteases. I. Oliveira, Filho, Benedito
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 28 de setembro de 1998

Banca Examinadora

Titulares:

Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho
(Orientador)

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Prof. Dr. Willy Sarti

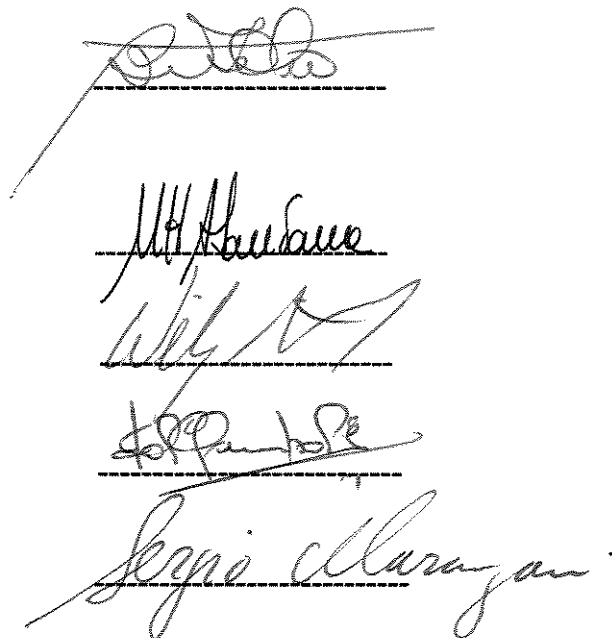
Prof. Dr. Walderez Gambale

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Suplentes:

Profa. Dra. Nilce Correa Meireles

Prof. Dr. José Camillo Novello



The image shows handwritten signatures of the examiners on the right side of the page. The signatures are written on horizontal lines. The first signature is for Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho. The second signature is for Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana. The third signature is for Prof. Dr. Willy Sarti. The fourth signature is for Prof. Dr. Walderez Gambale. The fifth signature is for Prof. Dr. Sérgio Marangoni. The sixth and seventh lines are empty, corresponding to the suplentes.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP) - Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia e Laboratório de Imunologia Clínica (LICA), Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas com apoio financeiro da CAPES.

Ao Ricardo, Ana Rachel e Rick, com amor.

**Aos meus pais Carlos e Maria Rosa, minha
irmã Ana Luíza e Dna. Meiga com carinho.**

Agradecimentos

Prof.Dr. Benedito de Oliveira Filho - Laboratório de Química de Proteínas
Departamento de Bioquímica - IB/UNICAMP

Prof.Dr. Ricardo de Lima Zollner - Departamento de Clínica Médica, Disciplina e
Laboratório de Imunologia Clínica, FCM/UNICAMP

Prof.Dr. Sérgio Marangoni - Laboratório de Química de Proteínas
Departamento de Bioquímica - IB/UNICAMP

Conceição Aparecida Vilella, Bióloga do Laboratório de Imunologia Clínica
Disciplina de Imunologia Clínica, Departamento de Clínica Médica, FCM/UNICAMP

Evandro de Lima Rego - Pós Graduando do Departamento de Genética IB/UNICAMP

Marcos Toyama - Pós Graduando do Departamento de Bioquímica - IB/UNICAMP

Paulo Baldassi - Técnico do Laboratório de Química de Proteínas,
Departamento de Bioquímica IB/UNICAMP

Dr. Tim Cawston - Head of Research of Laboratories of Rheumatology, Rheumatology
Research Unit, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK.

Mrs. Valery Curry, technician of Rheumatology Research Unit, Addenbrooke's Hospital,
Cambridge, UK.

Mr. David Seilly, technician of Molecular Immunopathology Unit, Medical research Unit,
Cambridge, UK.

ABREVIATURAS

Ao = Aleuroglyphus ovatus

As= Acarus siro

Bt= Blomia tropicalis

Ca= Chortoglyphus arcuatus

Df= Dermatophagoide farinae

Dm=Dermatophagoide microcera

Dp= Dermatophagoide pteronyssinus

Ds= Dermatophagoide siboney

Em= Euroglyphus maynei

Gd= Glyciphagus domesticus

Ld= Lepidoglyphus destructor

Tp= Tyrophagus putrescentiae

E.T.= Extrato total

HPLC= Cromatografia Líquida de Alta Performance

IgE= Imunoglobulina do isótipo E

kDa= kilo Dalton

Mo= Monoclonal

pI= Ponto isoelétrico

P.M.= Peso Molecular

SDS-PAGE= Eletroforese em Gel de Policrilamida-SDS

RAST= Radioallergosorbent Test

BapNA= N-benzoyl-arginine-*p*-nitroanalide (Sigma)

COCA= Solução Fisiológica e Bicarbonatada de Sódio

EDTA= Ácido Etileno-Diamino-Tetracético-di-Sódico (Sigma)

PBS= Tampão Fosfato de Sódio e Potássio

PMSF= Phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride (Sigma)

T.F.A.= Tri-fluoro-acético (Sigma)

TRIS= Tris[Hidro-metil] Amino acético (Merck)

Os reagentes utilizados e não citados eram produtos pró-análise (PA).

ÍNDICE

I-	Introdução	
•	Classificação, Nomenclatura e Propriedades Biológicas dos Alergenos.....	02
•	Bioquímica dos Alergenos.....	08
•	Ácaros.....	10
•	Antigenicidade dos ácaros do pó doméstico.....	11
•	Reatividade cruzada entre ácaros.....	15
•	Importância imunoclínica dos ácaros de estocagem.....	18
•	<i>Aleuroglyphus ovatus</i>	19
•	Estrutura primária de proteínas obtidas de frações acarinas e sua importância no diagnóstico e terapêutica.....	20
II-	Objetivos.....	22
III-	Material e Métodos	
•	Extrato de ácaros.....	24
•	Extração de componentes solúveis.....	24
•	Diálise.....	25
•	Dosagem do conteúdo protéico.....	25
•	Avaliação da utilização de inibidores de proteases.....	26
•	Fracionamento através de filtrações em Gel Sephadex G-75.....	27
•	Testes epicutâneos.....	27
•	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.....	28
•	Cromatografia Líquida de Alta Performance.....	28
•	Diálise das frações.....	28
•	Cromatografia.....	28
•	Eletroforese em gradiente de 5-18% de poliacrilamida-SDS sob condições reduzidas e não reduzidas.....	29

•	Transferência e " <i>Immunoblotting</i> "	29
•	Determinação do efeito de substâncias inibidoras de protease sobre as frações <u>A</u> , <u>B</u> e <u>C</u>	31
•	Eletroforese em sistema de gel tricina.....	32
IV-	Resultados	
•	Extrato obtido.....	34
	Avaliação do conteúdo protéico.....	34
	Eletroferese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	34
•	Estudo da ação de substâncias inibidoras de proteases sobre extrato de <i>Aleuroglyphus ovatus</i>	34
•	Avaliação do tempo de diálise.....	44
•	Filtração em gel de sephadex G-75.....	44
•	Reatividade cutânea.....	44
•	Eletroferese em gradiente de poliacrilamida-SDS 5 a 18% sob condições reduzidas e não reduzidas.....	49
•	Eletroferese de transferência seguida de " <i>Immunoblotting</i> ".....	49
•	Cromatografia líquida de alta performance das frações eluídas	
•	em coluna de filtração gel Sephadex G-75	49
•	Repurificação do pico 2 da fração <u>C</u> por Cromatografia líquida de alta performance.....	50
•	Determinação do efeito de substâncias inibidoras de proteases.....	50
•	Eletroforese em sistema gel de tricina.....	50
•	Análise comparativa da reatividade cutânea à diferentes extratos alergênicos de ácaros: <i>Aleuroglyphus ovatus</i> , <i>Blomia tropicalis</i> e <i>Dermatophagoide pteronyssinus</i> e associação com asma brônquica e/ou rinite alérgica.....	51
V-	Discussão.....	62
VI-	Resumo.....	78
VII-	Summary.....	81
VIII-	Referências Bibliográficas.....	83

INTRODUÇÃO

Classificação, Nomenclatura e Propriedades Biológicas dos Alergenos:

Historicamente antígeno é definido como qualquer substância capaz de induzir a resposta imune. Quando a expressão desta resposta resulta em reação de hipersensibilidade Tipo I (GEL & COOMBS) mediada por IgE, classificamos este antígeno como alérgeno. Sua origem pode ser decorrente das mais variadas fontes tais como: ácaros domésticos e de estocagem, grãos de pólen, epitélios de animais, veneno de insetos, produtos alimentares, fungos, bactérias e drogas, entre outros.

A reação de hipersensibilidade imediata induzida por alérgenos é desencadeada ao contacto destes com as vias aéreas, trato gastrointestinal, pele ou mucosas (MARSH, 1975; KING, 1976) e sua expressão clínica é conhecida genericamente por "Alergia". A indução de IgE específica pelo alérgeno e a ativação de granulócitos polimorfo-nucleares caracteriza a resposta alérgica em indivíduos atópicos, que compreende 25 a 30% da população mundial, contudo a prevalência para doenças alérgicas específicas varia entre idade, sexo e raça. A prevalência da sensibilidade para alérgenos específicos é determinada tanto por fatores genéticos como por fatores geográficos e culturais responsáveis pela exposição ao alérgeno (O'HEHIR & cols., 1991; KING & cols., 1995).), O que faz, exatamente, uma substância tornar-se um alérgeno (MARSH, 1975; AAS, 1978; STEWART & THOMPSON, 1996) e o porquê de um dado alérgeno variar em potência de um indivíduo para outro e porque alguns antígenos não demonstram as mesmas propriedades alergênicas para todos não esta totalmente esclarecido .

A partir de estudos com Radioimunoeletroforese Cruzada (CRIE), LOWENSTEIN (1978) definiu o termo "Alergeno Principal" para os antígenos que se ligam a IgE em pelo menos 50% dos soros de pacientes de referência testados e "Alergeno Secundário" àqueles que se ligam a IgE em menos de 50% destes soros, ou como proposto por MEYER & cols.(1994), que alérgenos "principais" poderiam ser classificados como aqueles componentes para os quais mais que 10% dos anticorpos IgE de mais de 50% dos pacientes reagem . Para padronização de alérgenos BALDO (1983) define alguns itens apresentados na Tabela I, página 4. A nomenclatura dos aeroalergenos segue a orientação da INTERNATIONAL UNION OF IMMUNOLOGICAL SOCIETIES (IUIS) e são designados de acordo com o nome taxonomico assumido e escritos da seguinte maneira : as 3 primeiras letras do gênero, espaço, a primeira letra da espécie , espaço, e um número arábico. Os números são fixados na ordem de sua identificação, e o mesmo número geralmente é usado para designar alérgenos homólogos de espécies relacionadas, ex: *Der p 1*, *Dermatophagoides pteronyssinus P 1*, refere-se ao primeiro alérgeno identificado dessa espécie de acaro (MARSH & cols., 1986; KING & cols., 1995).

Um alérgeno proveniente de uma simples espécie pode ser estruturalmente constituído por várias moléculas intimamente relacionadas e, quando, compartilham de algumas propriedades bioquímicas como: tamanho molecular similar; idêntica função biológica, se conhecida, como por exemplo ação enzimática, e mais de 67% da sequência de amino-ácido idênticas, são designadas de **isoalergenos**. Além disso, cada isoalergeno pode ter multiplas formas de sequências muito similares, que são designadas como variantes (MARSH & cols., 1986; KING & cols., 1995). Isoalergenos e suas variantes ,são

Tabela I: Características ideais para controle de qualidade de extratos alergenicos:

1. Identificar todos os IgEs ligados aos componentes no extrato
2. Isolar, purificar e caracterizar fisicoquimicamente seus componentes
3. Analisar de forma abrangente suas propriedades biológicas através de testes de punctura, de provocação, de liberação histaminérgica de leucócitos sensibilizados
4. Quantificar os diferentes alérgenos no extrato
5. Identificar os componentes inertes e de indução de resposta inespecífica presentes no extrato: irritantes, tóxicos, etc...

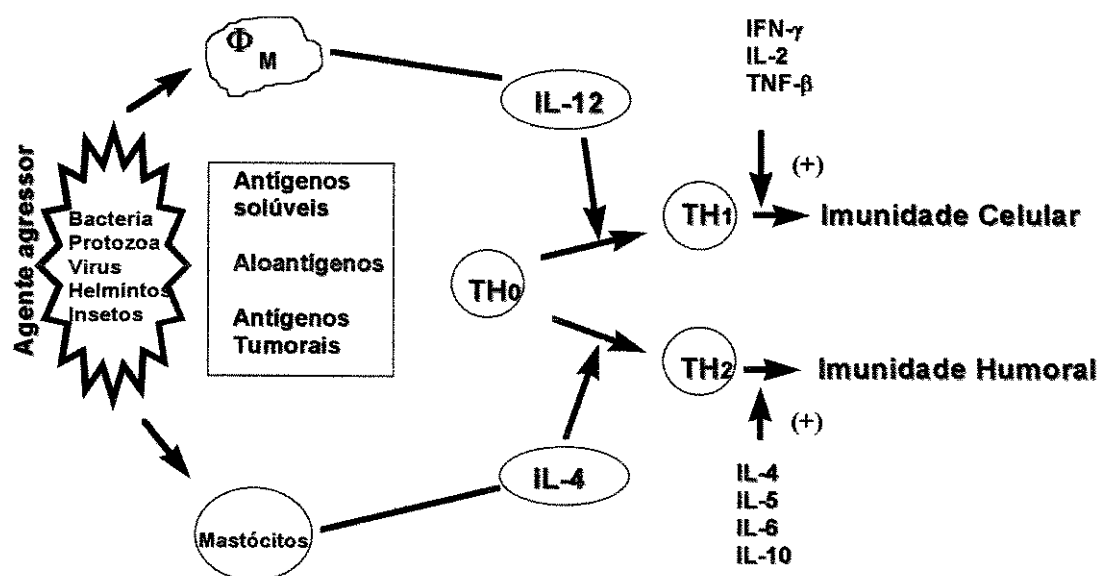
Adaptada e modificada de BALDO,BA (1983). Allergy, 38:535-46.

designadas por sufixos seguido de 4 números arábicos. Os primeiros dois números de 01-99 refere-se a um isoalergeno em particular e os dois números subsequentes de 01-99 referem-se a uma variante particular designada pelos dois numerais anteriores. Em casos onde há várias variantes, o sistema de um sufixo de quatro numerais poderá ainda ser aplicado. Ex.:Bet v 1 representa algum alérgeno Bet v 1 e Bet v 1.0101 representa a variante número 1 do isoalergeno Bet v 1 (MARSH & cols., 1986; KING & cols., 1995).

Rinite alérgica e asma brônquica são as manifestações clínicas de atopia mais comuns após exposição a esses alérgenos ambientais. São consideradas como expressão dos mecanismos envolvidos na reação de hipersensibilidade imediata causada pela liberação de mediadores dos mastócitos após a interação divalente do alérgeno com a IgE específica na superfície destas células. O envolvimento das citocinas produzidas pelas células T específicas, determinam as classes de imunoglobulinas produzidas (LUNDGREN & cols., 1989; GASGAN & cols., 1991; JOHANSSON & cols., 1995; JOOST VAN NEERVEN & cols., 1996). Quando as vias aéreas ou a pele de pessoas atópicas são sensibilizadas pela exposição a um alérgeno há o início de uma reação alérgica com a molécula polivalente do alérgeno reagindo com os anticorpos e ocupando seus receptores específicos. Como consequência a este estímulo, ocorre uma resposta bifásica, isto é, uma primeira fase chamada “fase imediata”, ocorrendo 15 a 30 minutos após a exposição ao alérgeno, onde há liberação dos mediadores primários, como histamina, leucotrienos e fatores quimiotáticos. A fase secundária, conhecida como “fase tardia”, é caracteristicamente inflamatória e ocorre 4 - 6 horas após a exposição ao alérgeno e normalmente termina dentro de 24 a 48 horas. Durante esta resposta as células infiltrantes são eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e basófilos com subsequente liberação de mediadores secundários, incluindo prostaglandinas, leucotrienos B4 e C4 e fator ativador de plaquetas (CROMWELL, 1988; KAY, 1988; O’HEHIR &

cols., 1991). Em pacientes atópicos, esses sintomas estão associados com altos níveis de IgE alérgeno específica no soro, e eosinofilia, e são induzidas por dois tipos de citocinas produzidas por células T CD4 alérgeno específica. A inativação específica dessas células ou a indução de citocina tipo T helper 1 (Th1) pode diretamente interferir com o processo da doença (JOOST VAN NEERVEN & cols., 1996) (vide esquema 1 de modulação celular de citocinas, página 7). O sistema complemento apresenta um importante papel na defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos e no processo inflamatório. Ativação do complemento resulta na formação de anafilatoxinas C3a, C4a e C5a (MULLER-EBERHARD, 1988). Essas anafilatoxinas são peptídeos biologicamente ativos definidos funcionalmente por suas ações nos pequenos vasos sanguíneos, músculo liso, mastócito e leucócitos sanguíneos periféricos, podendo contribuir para a reação inflamatória observada numa variedade de doenças alérgicas (MARUO & cols., 1997). Esses autores incubaram uma protease de 30kDa do ácaro *Dermatophagoides farinae* (alérgeno Df- protease) com C3 e C5 de soro humano e a atividade das anafilatóxinas foi medida pelo aumento da permeabilidade vascular e liberação de histamina a partir de mastócitos causadas por C3a e por estimativa de quimotaxia de células polimorfonucleares causada por C5a, ao mesmo tempo determinaram se protease isolada de poeira doméstica poderiam liberar C5a a partir de C5. Pelos resultados obtidos, que Df- protease mostrou forte ativação de C3 e C5, produzindo C3a e C5a por clivagem proteolítica do complemento e que protease de poeira doméstica causou liberação de C5a por C5, concluíram que Df- protease ativa o sistema complemento produzindo anafilatoxinas.

Esquema 1: Estimulação Antigênica e citocinas



Adaptado de Zollner & Ortenzi, Sistema Imunológico e Anestesia. in: "Atualização em Anestesiologia", ed: Vianna P T G & Ferez D. pp 108-127. Ambito editores, SP.1997.

Anteriormente, TAKAHASHI & cols.(1990); MARUO & cols.(1991;1993) já haviam demonstrado que essa mesma *Df*-protease ativaria a cascata de cininas bloqueando a atividade inibitória das cisteínas-proteases de cininogenio e ativação do complemento, contribuindo, desta forma, para a patogeneses da doença alérgica causada por poeira doméstica.

BIOQUÍMICA DOS ALÉRGENOS

Muitos dos alérgenos pertencem ao grupo das proteínas solúveis ou glicoproteínas, com peso molecular (P.M.) de 10 a 50 kilo Daltons (kDa), com funções biológicas diversas, são reconhecidos pelos indivíduos atópicos em doses extremamente baixas como 1 - 10µg/ano (CHAPMAN & cols., 1995).

Já se conhece a estrutura primária completa de mais de 100 alérgenos, contudo uma ampla variedade de alérgenos permanece para ser sequenciada. Tem-se demonstrado que muitos alérgenos apresentam uma gama de propriedades bioquímicas, sendo que essas propriedades contribuiriam para a imunogenicidade (STEWART & cols., 1996; CHAPMAN & cols., 1997).

Os estudos até agora indicam que a maioria dos alérgenos podem ser divididos em diversos agrupamentos, baseados, tanto na atividade biológica demonstrada quanto na sua significativa homologia com proteínas de função conhecida . Isso inclui:

- a) Enzimas hidrolíticas e não hidrolíticas
- b) Inibidores enzimáticos
- c) Proteínas envolvidas em transporte
- d) Proteínas regulatórias (STEWART & cols., 1996).

KING (1980) descreveu que os alérgenos purificados tem três propriedades físico-químicas em comum:

- 1) Os alérgenos “principais” são usualmente de P.M. variando entre 20 a 40 kDa, enquanto que os alérgenos “secundários” são mais variáveis com P.M. em torno de 3 a 70 kDa.
- 2) Os alérgenos “principais” são as proteínas de maior concentração presente no extrato.
- 3) A atividade do alérgeno é marcadamente reduzida na desnaturação indicando que muitos, senão todos, os antígenos determinantes que reagem com IgE específica são dependentes da conformação nativa da molécula.

Os mecanismos pelos quais as propriedades biológicas do alérgeno possam influenciar o sistema imune são diversos, variando de acordo com a gama de enzimas que tornou-se alergena. Eles podem atuar alterando a permeabilidade epitelial ou celular, podendo afetar tanto a migração celular quanto as interações moleculares de superfície de membrana importantes no transporte ou processamento de informações celulares. Por exemplo, mudanças alostéricas ou “cross-linking” produzidas por interação hidrofóbica entre ou dentre receptores modificados poderão estimular fatores de transdução (THOMAS, 1993) nem sempre desejáveis. A interação de enzimas com substratos ou ligantes tais como inibidores de proteases podem também influenciar a apresentação do antígeno como foi mostrado por OSADA & cols. (1987) administrando antígeno ligado a inibidor de protease α -2-macroglobulina e observaram o aumento proliferativo das células T para o antígeno. FINKELMAN & URBAN (1992) ao imunizarem camundongos com papaína ativada notaram aumento 10 a 30 vezes de IL-4 e outras linfocinas TH2 do que quando administraram papaína não ativada.

Estudos usando células mononucleares do sangue periférico, linhagem de células T, clones, produção de citocinas, tanto de doadores alérgicos como não

alérgicos, bem como de pacientes alérgicos mas com diferentes sintomas, mostraram que linhagem de células T e clones isolados de doadores alérgicos são usualmente do TH2 fenótipo e produzem IL-2, IL-4 e IL-5 (WIERENGA & cols., 1990; PARRONCHI & cols., 1991; VAN NEERVEN & cols., 1996). A frequência e a magnitude das respostas das células T é baixa em doadores não alérgicos e os clones de células T isolados desses indivíduos são geralmente TH1, produzindo IL-2 e interferon-gama mas pouco IL-4 e IL-5 (JOOST VAN NEERVEN & cols., 1996).

ÁCAROS

Dentre as fontes de alérgenos que provocam reação de hipersensibilidade imediata, no homem, umas das mais importantes em termos de distribuição e frequência de envolvimento em alergia são os ÁCAROS. A participação dos ácaros da poeira domiciliar como fatores de risco para o desencadeamento de “crises alérgicas” em pacientes asmáticos, foi preliminarmente sugerida por KERN (1921); COOKE (1922) e DEKKER (1928), e posteriormente comprovada com a identificação do ácaro *Dermatophagoides* em amostras de poeiras dos domicílios dos pacientes asmáticos (VOORHORST & cols., 1964, 1967; MIYAMOTO & cols., 1968). Estes doentes apresentaram reatividade, a testes epicutâneos, ao extrato bruto desse ácaro sugerindo a presença de anticorpos específicos intermediando esta reação. Apesar de alguma controvérsia provocada pelos trabalhos de KAWAI & cols. (1972) e MARSH (1975), na época colocando incertezas com respeito à sensibilidade a pó e ácaros, atualmente é consenso na literatura médica especializada, a participação dos ácaros e outros componentes do pó domiciliar, como fatores etiológicos e desencadeadores de crises alérgicas em indivíduos susceptíveis.

Nesta última década, estudos sorológicos e epidemiológicos de população atópica têm demonstrado a presença de anticorpos da classe IgE com reatividade aos ácaros da poeira doméstica classificando-os como

principais fatores de risco no desencadeamento da Asma (PLATTS-MILLS & CHAPMAN, 1987; POLLART & cols., 1989). No Brasil, JORGE NETO & cols. (1980), verificaram a presença de ácaros em coleta de amostras de poeira domiciliar na cidade de São Paulo. PLATTS-MILLS (1989) revendo o envolvimento dos ácaros na atopia, responsabilizou a família *Pyroglyphidae* como um dos principais agentes envolvidos na imunopatogenia da Asma Brônquica, porque os chamados alérgenos do grupo 1 (os chamados *Der 1*) se apresentam em mais de 2 µg/g de poeira doméstica, o equivalente a 100 ou 500 ácaros /grama de poeira demonstrando que a prevalência destes microorganismos no ambiente deva ser encarada como problema mundial de saúde pública. Os ácaros podem ser genericamente divididos em duas classes: ácaros domiciliares e ácaros de estocagem (Tabela II, página 12) .

ANTIGENICIDADE DOS ÁCAROS DO PÓ DOMÉSTICO.

A investigação do papel dos aeroalergenicos como causadores de doenças alérgicas têm sido facilitada nesta última década com os avanços das técnicas imunoquímicas, tanto do ponto de vista de identificação, quanto da purificação dos principais alérgenos ambientais (VOORHOST & cols., 1967; MIYAMOTO & cols., 1969; CHAPMAN & PLATTS-MILLS, 1980; HAIDA & cols., 1985; LIND & cols., 1987; INO & cols., 1989; YAMASHIDA & cols., 1989; ANDO & cols., 1991; EDWARDS & cols., 1992; KENT & cols., 1992; STEWART & cols., 1992; AKI & cols., 1994 a e b; SMITH & cols. , 1994; STEWART & cols., 1994; AKI & cols., 1995; SHEN & cols., 1995). Os métodos de extração e fracionamento dos ácaros da poeira domiciliar desenvolvidos por MIYAMOTO & cols. (1969) auxiliaram de maneira definitiva os estudos imunoclínicos destes aeroalergenicos.

Uma interpretação molecular tem sido cada vez mais favorecida pelo progresso dos trabalhos realizados com o emprego de anticorpos monoclonais, e, com o sucesso obtido da determinação da estrutura primária (que conduz a comparações filogenéticas) e, sobretudo, com o avanço da nomenclatura

Tabela II: Taxonomia de ácaros

Família	Gênero	Espécie
Pyroglyphidae	Dermatophagoidae	<i>D. pteronyssinus</i>
		<i>D. farinae</i>
		<i>D. microcera</i>
	Pyroglyphinae	<i>E. maynei</i>
Glycyphagidae	Blomia	<i>B. kulaginae</i>
		<i>B. tropicalis</i>
	Gohieria	<i>G. fusca</i>
	Glycyphagus	<i>G. domesticus</i>
	Lepidoglyphus	<i>L. destructor</i>
Chortoglyphidae	Chortoglyphus	<i>C. arcuatus</i>
Acaridae	Acarus	<i>A. siro</i>
		<i>A. farris</i>
	Tyrophagus	<i>T. putrescentiae</i>
		<i>T. longior</i>
	Aleuroglyphus	<i>A. ovatus</i>

Adaptada de EBNER, C e cols., (1994). Clinical Exp. Allergy, 24 :347-352.

sistemática dos alérgenos (MARSH, 1988; HÄRFÄST & cols., 1992; SHEN & cols., 1995; SMITH & THOMAS, 1996; THOMAS & cols., 1997).

Como resultado das investigações das homologias sequenciais, as funções biológicas de vários alérgenos de ácaros tem sido estabelecida. Foi verificado que os alérgenos possuem atividade enzimática, tais como cisteína e serina proteases (*Der p 1*, *Der p 3*, *Der p 9*), amilase (*Der p 4*) e glutathione transferase (*Der p 8*), bem como alérgenos de funções não conhecidas (*Der p 5* e *Der p 7*) (CHAPMAN & PLATTSMILLS, 1980; HAIDA & cols., 1985; CHUA & cols., 1988 a e b; TOVEY & cols., 1989; YAMASHIDA & cols., 1989; LIN & cols., 1994; O'NEILL & cols., 1994; KING & cols., 1996). THOMAS & CHUA (1995) observaram que o grupo 2 de alérgenos tem homologia com a proteína epidendímal humana, e sugeriram que esses alérgenos seriam produzidos por ácaros machos como parte de seu processo reprodutivo (tabela III, página 14).

As proteases são excretadas em altas concentrações nas fezes dos ácaros e atividade de protease tem sido demonstrada em extratos de poeira domiciliar e extratos de ácaros (TOVEY & cols., 1981; SCHOU & LIND, 1991; ROBINSON & cols., 1997). É estimado, que a concentração de ácaros na poeira doméstica seja de 50ug/m³ de poeira, e de 5 a 10 ng de protease/m³ (PRICE & cols., 1990).

Testes in vitro, utilizando painel de soro de pacientes alérgicos a ácaros do pó domiciliar, de uma maneira geral, demonstrou maior reatividade antigênicos dos grupos 1 e 2, quando comparada com a resposta aos outros grupos de alérgenos (SCHOU & LIND, 1991). SHEN & cols. (1993) e CHAPMAN & cols. (1997), no entanto, demonstraram que essa resposta pode variar de acordo com o ensaio para detecção do anticorpo IgE bem como a população de

Tabela III: Alergenos purificados de *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*

Alergeno	Prevalência de IgE específica (%)	MW (kDa)	Função biológica
Grupo 1	80 - 90	25	Cisteína protease
Grupo 2	> 90	14	Proteína epidendimal
Grupo 3	~ 60	28 - 30	Serina protease (tripsina)
Grupo 4	40	60	Amilase
Grupo 5	40	14	Não conhecida
Grupo 6	40	25	Quimotripsina
Grupo 7	50	22	Não conhecida
Grupo 8	40	26	Glutathione-S transferase
Grupo 9	> 60	30	Colagenolítica serina protease
Grupo 10	> 80	36	Tropomiosina

Adaptada de CHAPMAN, MD e cols. (1997). *Allergy*, 52:374-79

pacientes selecionada. Esses autores descreveram estudos em que pacientes demonstravam altos níveis de IgE para outros alérgenos como *Der p 7* ou *Der p 10*.

Segundo PLATTIS-MILLS & cols. (1997) os termos alérgenos "principal" e "secundário" foram bem definidos no passado com base na prevalência de anticorpo IgE num selecionado grupo de pacientes alérgicos para ácaros. Entretanto a sensibilização aos sistemas de detecção de IgE tem aumentado, e muitos dos outros alérgenos de ácaros tem sido mostrados que reagem com anticorpo IgE em mais de 50% dos soros. Por exemplo, uma alta prevalência de anticorpo IgE para *Der p 3* tem sido mostrada em alguns estudos (KING & cols., 1996). Um outro critério que poderia ser usado para avaliar importância alergênica, incluindo estimativa da percentagem de anticorpo IgE alérgeno específico (em termos de anticorpo IgE por extrato de ácaro) seria a extensão para o qual alérgenos individuais contribuem para atividade alergênica do extrato de ácaros. Com base em estudos de absorção somente alérgenos dos grupos 1 e 2 poderiam ser considerados alérgenos principais. Enquanto não há critério absoluto para que um alérgeno possa ser entendido como importante ou "principal", a questão relevante seria identificar quais alérgenos poderiam estar presentes em um extrato alergênico ou na mistura de proteínas recombinantes usadas para diagnóstico ou imuno-terapia (PLATTIS-MILLS & cols., 1997).

REATIVIDADE CRUZADA ENTRE ÁCAROS

CHAPMAN & cols. (1984); LIND & cols. (1987 e 1988), mostraram que IgE de pacientes sensíveis aos ácaros domiciliares, reagem com determinantes antigênicos do Grupo 1 das três principais espécies do família *Pyroglyphidae*, ou seja, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *farinae* e *microcera*, sugerindo a possibilidade de reação cruzada entre alérgenos de ácaros pertencentes ao mesmo gênero e principalmente do mesmo grupo antigênico. Contudo, esta

reatividade cruzada imune é vista mais freqüentemente entre *Der f 1* e *Der p 1*, que entre estes e *Der m1* (SCHOU & LIND, 1991).

VAN HAGE-HAMSTEN & cols. (1987), estudando a reatividade imunológica cruzada entre *Dermatophagoides pteronyssinus* e ácaros classificados como de estocagem, empregando a técnica de inibição de Radioallergosorbent (RAST) com soro de indivíduos a eles sensíveis, não observaram reatividade cruzada significativa entre o *Dermatophagoides pteronyssinus* e ácaros *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Glyciphagus domesticus* e *Acarus siro*. Por outro lado, GRIFFIN & cols. (1989) e mais recentemente HARFAST & cols. (1992) mostraram reatividade cruzada fraca entre estes mesmos ácaros. Esses estudos foram confirmados por FERRÁNDIZ & cols. (1995), ao estudarem a reatividade cruzada entre *Dermatophagoide siboney* e *Blomia tropicalis* que por sua vez, estavam de acordo com os resultados obtidos anteriormente por PUERTA e cols. em 1991, quando esses autores estudaram reatividade cruzada entre *B. tropicalis* e *Dermatophagoides farinae*.

ARLIAN & cols. (1993) mostraram que além da reatividade entre *B. tropicalis* e espécies *Dermatophagoides* ser baixa, muitos dos alérgenos encontrados para essas espécies são espécie-específico, fato confirmado por STANALAND & cols. (1994) ao estudarem essas espécies de ácaros em pacientes atópicos em Tampa, Flórida.

MORGAN & cols. (1996) ao estudarem reatividade cruzada entre *Euroglyphus maynei* e *Blomia tropicalis* observaram que apesar de cada extrato ter mostrado mais de 20 bandas eletroforéticas em SDS-PAGE/immunoblotting, 5 delas se assemelhavam, entre elas uma banda de 14 kDa que era reconhecido pelo soro de mais de 50% dos pacientes. Em continuidade às estas observações para a determinação de possíveis reatividade cruzada, esses autores usando um anticorpo monoclonal (Mo) para

Der p 2, verificaram a ligação deste anticorpo a uma banda de 14kDa em *Euroglyphus maynei*, identificado como alérgeno *Eur m 2*, mas não foi observada nenhuma ligação com as outras proteínas de *Euroglyphus maynei*. No entanto, nenhuma reatividade foi observada ao fazerem o mesmo estudo utilizando o *Mo-Der p 2* contra o extrato obtido do ácaro *Blomia tropicalis*, tanto com a banda de 14 kDa, como com outras proteínas. Por outro lado, empregando a técnica de Radioimunoeletroferese cruzada (CRIE), observaram que os alérgenos desses ácaros (*Euroglyphus maynei* e *Blomia tropicalis*) apresentavam reatividade cruzada entre si além de demonstrarem a presença de alérgenos espécie-específico.

A explicação, encontrada por esses autores, para essas observações seria que proteínas de diferentes pesos moleculares poderiam ter o mesmo epítipo. Igualmente, como ilustrado por eles com a utilização de anticorpo monoclonal, uma proteína de mesmo peso molecular poderia possuir diferentes epítopos alergênicos. Além disso, proteínas poderiam exibir ampla equivalência na sequência de amino-ácidos com homologia no epítipo e no entanto não apresentar o mesmo comportamento eletroforético devido a diferenças de tamanho, glicosilação, etc. Adicionalmente múltiplas proteínas de tamanho similar, mas diferente ponto isoelétrico (pI) poderiam migrar com a mesma Mobilidade Eletroforética Relativa (Rf). Desta forma, muitos alérgenos individuais comportar-se-iam como se fossem proteínas simples.

VAN DER HEIDE & cols. (1998) encontraram alta reatividade cruzada entre os ácaros *Acarus siro* e *Tyrophagus putrescentiae*, pertencentes a mesma família, e menor reatividade cruzada entre esses ácaros e o *Lepidoglyphus destructor*, pertencentes a outra família. Segundo esses autores, o estudo de reatividade cruzada entre extratos de ácaros de diferentes espécies é complexo porque os resultados ficariam na dependência dos métodos de extração e obtenção das frações alergênicas e dos soros usados para essas avaliações (origem do paciente, utilização de anticorpo monoclonal, entre outros). Isso

poderia explicar, porque alguns estudos não mostram reatividade cruzada entre *Der* e ácaros de estocagem, enquanto outros revelam uma extraordinária identidade alergênica entre esses ácaros.

VAN HAGE-HAMSTEN & cols. (1990), ao estudarem a reatividade de soros de população brasileira e sueca aos extratos dos ácaros *Lepidoglyphus destructor* e *Blomia kulaginae*, puderam verificar que o extrato do *Lepidoglyphus* foi capaz de inibir a reatividade de soros suecos RAST(+) à *Blomia*, mas não a reatividade dos soros brasileiros. Por outro lado, extrato de *Blomia kulaginae* foi capaz de inibir apenas a reatividade de soros RAST(+) provenientes do Brasil, e não da Suécia. Assim, a resposta alergênica cruzada entre ácaros poderia estar na dependência da(s) população(ões) testada(s).

A relação filogenética entre “ácaros domésticos” é muito mais estreita entre si, do que entre estes e os ácaros classificados como de “estocagem”. Assim, do ponto de vista taxonômico, é limitada a perspectiva de reatividade imunológica cruzada entre duas famílias de ácaros. Contudo, espera-se que trabalhos posteriores compreendendo a reatividade imunológica entre famílias e gêneros diferentes possam esclarecer melhor este tipo de relação taxonômica-funcional.

IMPORTÂNCIA IMUNOCLÍNICA DOS ÁCAROS DE ESTOCAGEM

Os estudos dos fatores ambientais responsáveis pelo desencadeamento das doenças alérgicas, enfocaram os ácaros classificados como domiciliares, e principalmente aqueles do grupo *Pyroglyphidae*, como os principais elementos envolvidos. somente nestas duas últimas décadas foi verificada a participação de outros gêneros e famílias de ácaros, na etiologia das alergias respiratórias (VAN BRONSWIGK & cols., 1973; VAN HAGE-HAMSTEN & cols., 1985; 1993; INGRAN & cols., 1979; WRAITH & cols., 1979; JORGE-NETO & cols., 1980; TERHO & cols., 1985; AMBRÓZIO & cols., 1988, 1989; ARRUDA & cols.,

1991; PINHO & cols., 1992; ZOLLNER & cols., 1992 a,b, 1994; FERNANDES & cols., 1993; JOHANSSON & cols., 1993; PUERTA & cols., 1993, entre outros.). Contudo, apesar da classificação ambiental em ácaros domiciliares e de estocagem, têm-se observado variação neste padrão comportamental. As condições inadequadas de acondicionamento de cereais, da silagem e pós-beneficiamento, do transporte e armazenamento em mercado e residências, invasão vêm proporcionando a "invasão" e instalação de populações de ácaros, que até então eram característicos de estocagem. No Brasil, JORGE-NETO & cols. (1980) já demonstravam a alta prevalência de *Blomia tropicalis*, ácaro de estocagem e *Dermatophagoides pteronyssinus*, este, característico na poeira domiciliar na cidade de São Paulo. Estes resultados têm sido verificados em diversas localidades, como a Venezuela, Flórida, Hong-Kong entre outras (VAN BRONSWIGK & cols., 1973; GABRIEL & cols., 1982; HURTADO & cols., 1987; FERNANDES-CALDAS & cols., 1990), justificando a relevância deste grupo de ácaros nas avaliações clínico-laboratoriais e, na análise epidemiológica dos fatores etiológicos das doenças alérgicas (AMBRÓZIO & cols., 1988; 1989; BAGGIO & CORDARO, 1991; PINHO & cols., 1992; ZOLLNER, 1992)

ALEUROGLYPHUS OVATUS

Ácaro considerado de estocagem e que vem adquirindo importância quanto a reatividade em pacientes atópicos (SILTON & cols., 1991). Em nosso meio BAGGIO & CORDARO (1991), verificaram a presença destes ácaro no pó em domicílios de diversas cidades brasileiras. Em estudos na região de Campinas, foi verificada sensibilização populacional elevada, cerca de 90% de pacientes atópicos eram reativos a testes epi-cutâneos ao extrato bruto de *Aleuroglyphus ovatus* (ZOLLNER & cols., 1992), mostrando sua importância epidemiológica em doenças atópicas. Estas evidências clínicas, subsidiam o interesse em sua caracterização e o conhecimento da estrutura antigênica de seus alérgenos.

EDWARDS & cols. (1992) fracionando o extrato bruto de *Aleuroglyphus ovatus* por meio de centrifugação fracionada e posterior testes biológicos, puderam verificar a atividade proteásica de suas frações, da mesma forma que alérgenos derivados de ácaros domiciliares.

ESTRUTURA PRIMÁRIA DE PROTEÍNAS OBTIDAS DE FRAÇÕES ACARINAS E SUA IMPORTÂNCIA NO DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA.

Diversos alérgenos de diferentes origens e responsáveis pelo desencadeamento de reações alérgicas (IgE-mediadas) no homem foram isolados. Progressos relevantes envolvendo a dosagem e conhecimento da estrutura antigênica de alérgenos foram realizados. A determinação da estrutura primária de antígenos oriundos de gramíneas, pólenes e toxinas de insetos, tem determinado avanços consideráveis na interpretação molecular da alergia clínica (YAMASHIDA & cols., 1989; CARDOT & cols., 1992; SCHEINER, 1992; VAN-HAMSTEN & cols., 1993). Tais análises permitem a utilização destes componentes em estudos imunológicos objetivando a determinação de estruturas moleculares envolvidas com o reconhecimento anticórpico e de células T, e, conseqüentemente a imunoregulação; sua função biológica e principalmente propiciar o desenvolvimento de produtos padronizados para elaboração de kits diagnóstico e tratamento das doenças alérgicas.

A determinação da estrutura primária de frações obtidas a partir de extratos “espécie específica” de ácaros, comprometidos com o desencadeamento de reações alérgicas conduz, através do método de CHOU & FASMAN (1978), a previsão de sua estrutura secundária, podendo-se conhecer as regiões moleculares com conformação em alfa hélix, e em folhas pregueadas (“pleated sheet”), podendo-se inferir, desta maneira, as regiões que poderiam se comportar como determinantes antigênicos. Estes conhecimentos convergem para o emprego de alérgenos recombinantes empregados em alergodiagnose,

tanto em testes cutâneos, quanto em reações sorológicas, melhorando a qualidade do diagnóstico e tratamento das doenças alérgicas.

MARSH & cols. (1988) publicaram artigo apresentando orientação de nomenclatura recomendada oficialmente pela "IUIS", baseada em proposta do "Sub-Committee for Allergen Nomenclature". Assim, os elementos de padronização relevam, entre outros, critérios químicos de pureza como: seqüenciamento NH₂ e COOH terminal e composição de amino-ácidos, o que evidencia a importância do conhecimento estrutural dos alérgenos.

OBJETIVOS

- Aprimorar a metodologia de fracionamento e obtenção de antígenos a partir de extratos de ácaros, no presente trabalho, do ácaro de estocagem *Aleuroglyphus ovatus*.
- Caracterizar imunoquimicamente procurando analisar as propriedades proteásicas das frações protéicas e alergênicas, obtidas do extrato de *Aleuroglyphus ovatus*.
- Verificação da reatividade sorológica a antígenos de baixo peso molecular .

MATERIAL E MÉTODOS

1. Extrato de Ácaros

Os extratos puros do ácaro *Aleuroglyphus ovatus* (Ao) eram obtidos segundo método de MIYAMOTO (1969) modificado e aperfeiçoado pelo Laboratório de Acarologia Médica, do ICB-USP sob a coordenação do Prof. Domingos Baggio. Resumidamente: Culturas puras de cada espécie de ácaro a estudar, eram cultivada separadamente em estufas BOD individuais, com temperatura ajustada a 28 - 29°C e 65 - 70% de umidade relativa do ambiente, em substratos espécie específicas a base de ração de ave em pó. Após 45 a 65 dias de cultivo, os substratos eram isolados dos ácaros ainda vivos, utilizando-se funil de Berlese-Tulgren modificado, e lâmpada elétrica leitosa de 40W na distância de 30 cm. Após 24 h de extração contínua, os frascos de vidro receptores de ácaros vivos, livres de impurezas, eram retirados do sistema para recipientes fechados com tampa hermética e colocados em freezer a -30°C durante 48 horas, e a seguir estocados a -70°C até utilização.

2. Extração de Componentes Solúveis

Para verificarmos qual a melhor solução extratora e o tempo ideal de extração, submetemos as partículas do Ao às seguintes condições:

- a. Solução A : Tampão Fosfato de Na e K, pH 7.4 (PBS)
- b. Solução B: Solução fisiológica e bicarbonatada de Na, pH 7,2 (COCA)
- c. Solução C: Carbonato Ácido de Amônia 0.125M

Preparações de extração padrão continham 500mg de partículas de Ao, em 10 ml de solução extratora A, B ou C, acrescidas ou não, de inibidores de proteases Phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride (Sigma-USA) em concentração final de 1mM e Epsom-amino-capróico (Sigma-USA) em concentração final de 0,5mM . Variando-se o tempo de incubação a 4°C em 24, 48, 72 e 168 horas em frasco âmbar. Após o período de extração eram submetidos a ultrasonicação em ciclos de 15 minutos, 1000 Hz, deixados em repouso a 4°C, 24 horas e então centrifugados a 48.000 x g sob refrigeração por 30 minutos. A seguir eram separados sobrenadante e precipitado e estocados à -20°C até utilização.

3. Diálise

As amostras eram diálisadas contra água destilada, mantidas em camara fria a 5°C, em duas fases de 24 horas e 48 horas, em membranas de diálise com porosidade seletiva de 10 a 12 kDa.

4. Dosagem do conteúdo protéico

A determinação da concentração protéica das várias frações seguia o método de HARTREE (1972) e era utilizada a albumina bovina sérica como proteína de referência, cromatograficamente pura, cuja concentração era determinada espectrofotometricamente.

Solução A - Tartarato de sódio e potássio	2g
Carbonato de sódio	100g
NaOH	500ml
Água destilada q.s.p.	1000ml
Solução B - Tartarato de sódio e potássio	2g
Sulfato cuprico	1g
NaOH	10ml
Água destilada q.s.p.	100ml

Solução C - Folin-Ciocalteu	1 volume
Água destilada	15 volumes
(preparar no momento da dosagem)	

Amostras de soluções de albumina padrão em concentrações que variavam de 20 a 100 μg , em intervalos de 10 μg , eram diluídas para 1ml de água destilada e transferidas quantitativamente para tubos de vidro (12 cm x 13 mm) e tratadas com 0,9 ml da solução **A**. O controle de reagentes era preparado da mesma forma sem a presença de proteína. Os tubos eram colocados em banho a 50°C por 10 minutos e resfriados à temperatura ambiente e tratados, a seguir, com 0,1 ml da solução **B**. As soluções eram deixadas em temperatura ambiente pelo menos 10 minutos, então 3,0 ml de solução **C** era aplicada vigorosamente de maneira que a turbulência do jato líquido forçava uma mistura rápida.

Os tubos eram novamente aquecidos a 50°C por 10 minutos e resfriados à temperatura ambiente. As amostras eram lidas no espectrofotômetro (Beckman) em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico em comprimento onda de 650 nm. Desta forma construía-se uma curva de referência. Para as determinações experimentais procedia-se da mesma forma.

5. Avaliação da Utilização de Inibidores de Proteases.

Com intuito de verificarmos se as soluções inibidoras de proteases teriam alguma influência na preservação de antígenos durante o procedimento extrator, submetemos o extrato bruto de *Aleuroglyphus ovatus* às condições anteriores, acrescida ou não, de solução inibidora de protease.

Soluções Inibidoras de Protease:

- Phenyl-methyl Sulphonyl Fluoride (Sigma,USA), na concentração final de 1mM.
- Epson Amino-capróico (Sigma, USA), na concentração final de 0,5mM

6. Fracionamento através de Filtração em gel Sephadex G-75

A partir dos extratos puros do ácaro Ao realizou-se o fracionamento através da filtração em gel de Sephadex G-75 (Pharmacia-Sweden) em coluna cromatográfica calibrada com proteínas de peso molecular conhecido. A concentração protéica era ajustada para 5mg/ml para o Ao, e submetidos á coluna cromatográfica de 114 ml. As frações eluídas eram monitorizadas por registro gráfico pela passagem em absorciômetro em 280 nm (Pharmacia-Sweden), e recolhida em coletor de frações automático (INCIBRAS-Br), sob temperatura ambiente e imediatamente colocadas em congelamento à -80°C. As leituras espectrofotométricas (Beckman) eram realizadas em 280 nm sob temperatura ambiente, e de acordo com o perfil de eluição, as frações eram agrupadas em "pools" e concentradas por ultrafiltração em membrana YM-3 (AMICON) e estocadas à -20°C, até o uso.

7. Testes Epicutâneos

As frações obtidas pela filtração em gel, eram padronizadas em concentração de 200 ug/ml de proteína, e testadas através de testes epicutâneos em pacientes atópicos adultos acompanhados no Ambulatório da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia, Hospital das Clínicas, FCM, UNICAMP. O método empregado era o de prick-Test, descrito por PEPYS (1975). Como controle positivo era empregado a Histamina (10mg/ml) e Solução Fisiológica 0,9% como controle negativo, as leituras eram realizadas em 20

minutos do início do teste e o resultado medido através da média entre o maior diâmetro da pápula e o diâmetro ortogonal do ponto médio, e considerados positivos quando a reação local ao teste era maior ou igual a 3 mm (obtido em estudo populacional com a histamina).

8. Eletroforese em gel de Poliacrilamida SDS.

A análise da complexidade do extrato bruto de ácaros e suas respectivas frações cromatográficas era realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Este procedimento seguia essencialmente a técnica de LAEMMLI (1970), com algumas adaptações desenvolvidas no Laboratório de Imunologia Clínica (LICA) da Disciplina de Imunologia Clínica do Departamento de Clínica Médica, FCM/UNICAMP. A concentração dos géis de empilhamento e separação eram, 5 e 12% respectivamente, espessura de 0.75 mm, em tampão Tris-Glicina.

9. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

a. Diálise das Frações:

O Extrato de *Aleuroglyphus ovatus* era dialisado contra 4 litros de Ácido Tri-Fluoro-Acético (MERCK-USA) 0.1% em membrana de diálise com porosidade seletiva de 10 a 12 kDa, em duas fases 24 e 48 horas, 5°C.

b. Cromatografia.

Utilizamos para eventual purificação dos peptídeos equipamento Waters HPLC modelo PDA-991, equipado com duas bombas Waters modelo 510. Foi usado injetor automático de amostra Waters modelo UGK e coluna RC-18 da WATERS, nas dimensões 3,9 x 300 mm. A purificação era feita sob gradiente linear de 0 a 100% de solução de Acetonitrilo (MERCK-USA) 66% em TFA

0.1% pH 2.5 utilizando-se fluxo de 1.0 ml/minuto. Quando necessário, os peptídeos eram repurificados na mesma coluna utilizando-se intervalo de gradiente descontínuo, referente ao gradiente na qual foi eluído. A monitorização da eluição peptídica era feita em 220 nm, durante 60 minutos.

10. Eletroforese em Gradiente de 5-18% de Policrilamida-SDS sob condições reduzidas e não reduzidas:

Eletroforese em gradiente de 5-18% de policrilamida-SDS. O preparo do gradiente era realizado a partir de dois reservatórios comunicantes entre si por tubo flexível. As soluções para a formação do gradiente eram denominadas **A** e **B**, e preparadas como a seguir:

As soluções eram deaerada por 30", quando então adicionava-se 48µl de TEMED, respectivamente às soluções **A** e **B** e transferidas para os reservatórios comunicantes. Quando os níveis de solução entre os frascos estavam balanceados, abria-se completamente a conexão entre A e B transferindo-se o conteúdo sob agitação para as placas de vidro onde o gel se polimerizava. As amostras eram aplicadas sob condições redutoras utilizando-se β-2-mercaptoetanol a 10% e não redutoras. Os padrões de peso moleculares utilizados eram "Rainbow molecular weight markers" (Amersham LIFE SCIENCE, UK) (200 a 12.3 kDa). Eram aplicados 25 mA ao gel durante aproximadamente 45 minutos, ou até que a frente de corante (bromophenol-blue) atingisse 1 cm da extremidade do gel.

11. Eletroforese de Transferência e "Immunoblotting":

Material proveniente do extrato bruto e frações dos procedimentos de filtração em gel sephadex-G75 eram submetidos a eletroforese em gel de poliácridamida com SDS (SDS-PAGE) em gel gradiente entre 5.0 a 18%, conforme descrição anterior (item 9). Após a corrida as frações eletroforéticas no

gel eram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com soro diluído 1:3, em solução NANET (descrição abaixo), de pacientes com teste de reação cutânea (prick-test) positivo para o extrato solúvel bruto do ácaro *Aleuroglyphus ovatus*. Após o período de incubação e lavagem as tiras eram incubadas durante 24 horas com conjugado anti-IgE humano (Sigma) marcado com Iodo¹²⁵, lavadas eram acondicionadas em “cassete” para exposição à filme de autoradiografia (Kodak) e reveladas após 48 horas. Para os procedimentos de lavagem e incubação das tiras de nitrocelulose, eram utilizadas solução de NANET.

	Solução	
	(A)	(B)
	5%	18%
	(Volume)	
Acrilamida 50%/ Bis 1,33%	2,1 ml	13,2 ml
Água	15,4 ml	4,3 ml
0, 75M Tris/HCl, pH 8,8	18,0 ml	18,0 ml
SDS 10%	360 µl	360 µl
Sucrose	----	2,4 g
Persulfato de amônia 10%	180 µl	180 µl

Nanet/Gel/Azida.

Trisma base	150g
Sodium chloride	219.2g
0.2M EDTA pH 7.2	625ml
7% w/v Gelatin	900ml
Nonidet P40	12.5ml
1.0M Sodium Azide	250ml

Preparava-se 7% p/v de gelatina em água quente imediatamente antes do uso. Aquecia-se Nonidet P40 em banho de água quente para reduzir a viscosidade. Misturava-se os reagentes acima mencionados em aproximadamente 20 litros de água destilada mantendo sob agitação até dissolverem totalmente. Ajustava-se o pH da solução para 7.4 com 5M HCl. Completava-se para 25 litros com água destilada.

10x Tampão PAGE e Transferência

Glycine.....	288g
Trisma Base (Tris).....	60g

Preparava-se a solução stock 10 x concentrado completando com 2 litros de água destilada. Para a transferência adicionava-se 800ml de methanol para 200 ml de tampão completando o volume para 4000 ml com água destilada.

12. Determinação do efeito de substâncias inibidoras de proteases sobre as frações A, B e C:

As frações provenientes da filtração em gel G-75, frações A, B e C eram analisadas na presença de um substrato inespecífico *N*-benzoyl-arginine-*p*-nitroanilide (SIGMA-USA) na concentração de 1mM e diferentes agentes inibidores de proteases, como Phenylmethylsulphonyl fluoride (SIGMA-USA), inibidor de serina protease, na concentração de 100 mM, Ácido Iodoacético (SIGMA-USA), inibidor de cisteína protease, na concentração de 100 mM e Ácido Etileno-diamino-tetracético di-sódico (SIGMA-USA), inibidor de metaloproteínas, na concentração de 100 mM.

Para os ensaios, as frações A, B e C, em volumes de 50 µl, eram incubadas durante 10 minutos a 37°C, com os diferentes inibidores, preparados de acordo com métodos standart, no volume de 20µl, em tampão TRIS - HCL 0,1M pH 8,0, sendo de 1ml o volume da pré-incubação. Decorridos o tempo descrito,

adicionava-se 1ml de BapNA e a incubação prosseguia a 37°C por mais 30 minutos. A reação era interrompida por acidificação pela adição de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima era acompanhada fotométricamente a 405 nm em espectofotometro (INCIBRAS - UV 1201). O cálculo da atividade inibitória era feito pela determinação da atividade residual da enzima no ensaio.

13. Eletroforese em sistema de gel de Tricina (Eletroforese para peptídeos)

Eletroforese em gel de sistema era realizado segundo o método de SCHAGGER & VON JAGOW (1987) com algumas adaptações introduzidas pelo Laboratório de Imunologia Clínica - LICA, FCM/UNICAMP. Este procedimento está fundamentado na construção de placa vertical de vidro contendo 3 géis de poliacrilamida: O do topo de empilhamento, um intermediário de espaçamento e finalmente o de separação, no qual se efetuará a definição dos diversos peptideos de baixo peso molecular. Este sistema permite a análise de proteínas de baixo peso molecular até 500 Daltons.

RESULTADOS

1. Extrato Obtido

As características dos diferentes métodos de extração obtidos pelas soluções extratoras: Tampão Fosfato de Na e K, pH 7,2 (PBS), Solução fisiológica bicarbonatada de Na (COCA) e Carbonato ácido de amônio, estão descritas a seguir, enfocando o conteúdo protéico e o comportamento eletroforético dos extratos.

1a- Avaliação do conteúdo protéico:

Quando comparados, os extratos de *Ao* obtidos em solução de Carbonato apresentaram conteúdo maior quando comparados com aquelas com PBS e Solução de COCA. Os tempos de extração não mostraram resultados relevantes como demonstrado na tabela IV ,página 36.

1b- Eletroforese em gel poliacrilamida SDS-PAGE:

Foi feito controle em PAGE/SDS dos diferentes extratos. Observamos que as soluções extratoras não apresentaram diferenças significantes entre si (Figura.1, página 37).

2- Estudo da ação de substâncias inibidoras de proteases sobre o extrato de *Ao*.

Na presença de PBS os extratos obtidos quando analisados em HPLC mostraram que a atividade é preservada pelos inibidores de protease, como pode se notar pela figuras 2Aa e 2Ab (página 38 e 39). O mesmo se observa ao analisarmos o extrato na solução de carbonato na presença ou ausência de

inibidores de protease. As soluções inibidoras de proteases protegem os extratos da autodigestão, como podemos ver pela figuras 2Ca e 2Cb, páginas 42 e 43, onde é mostrado o perfil cromatografico do extrato na presença de inibidores e na sua ausência. Na presença de inibidores observa-se dois picos de resposta evidentes, que não estão presentes na sua ausência. O mesmo não acontece quando analisamos os extratos obtidos a partir de COCA. A figuras 2Ba e 2Bb, páginas 40 e 41, mostra que não houve alteração no perfil cromatografico, ou seja, as respostas são semelhantes.

TABELA IV: Rendimento da Extração Protéica do Ao submetido a diferentes soluções extratoras, variando-se os tempos de incubação.

Tempo de extração	24h	48h	72h	168h
Concentração protéica	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
<u>Solução extratora</u>				
PBS	2.6	2.5	2.8	2.7
COCA	2.6	3.2	3.5	3.2
Carbonato ácido de Amônia	3.9	3.8	3.5	3.9

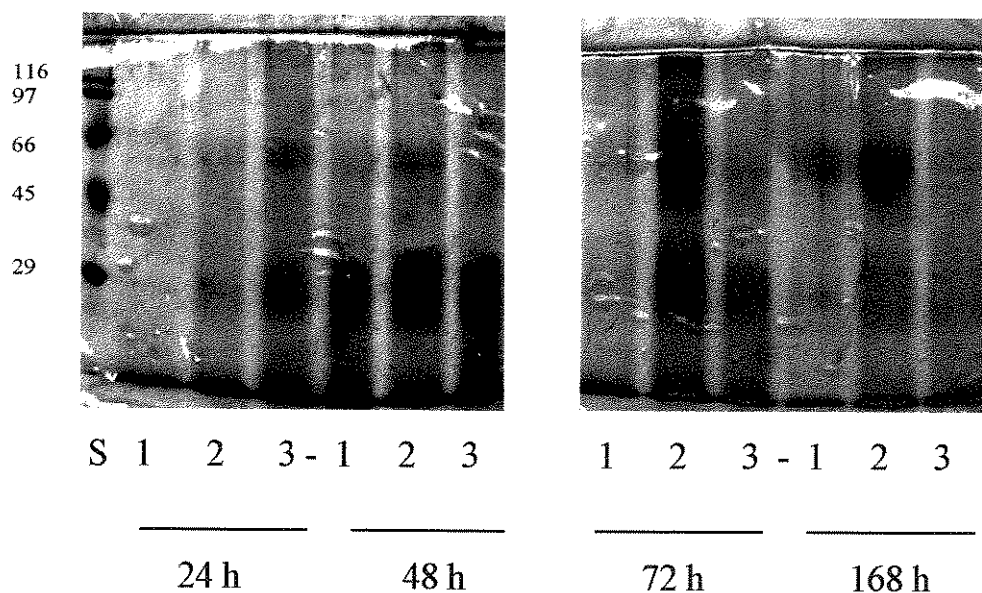


Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS a 12%, dos extratos totais de Ao, extraídos com PBS (1), Solução fisiológica bicarbonatada de sódio, pH 7,2 (2) e solução de carbonato ácido de amônia 0,125 M (3) com inibidores de protease, durante 24, 48, 72 e 168 horas. (S) padrão de pesos moleculares em kDa.

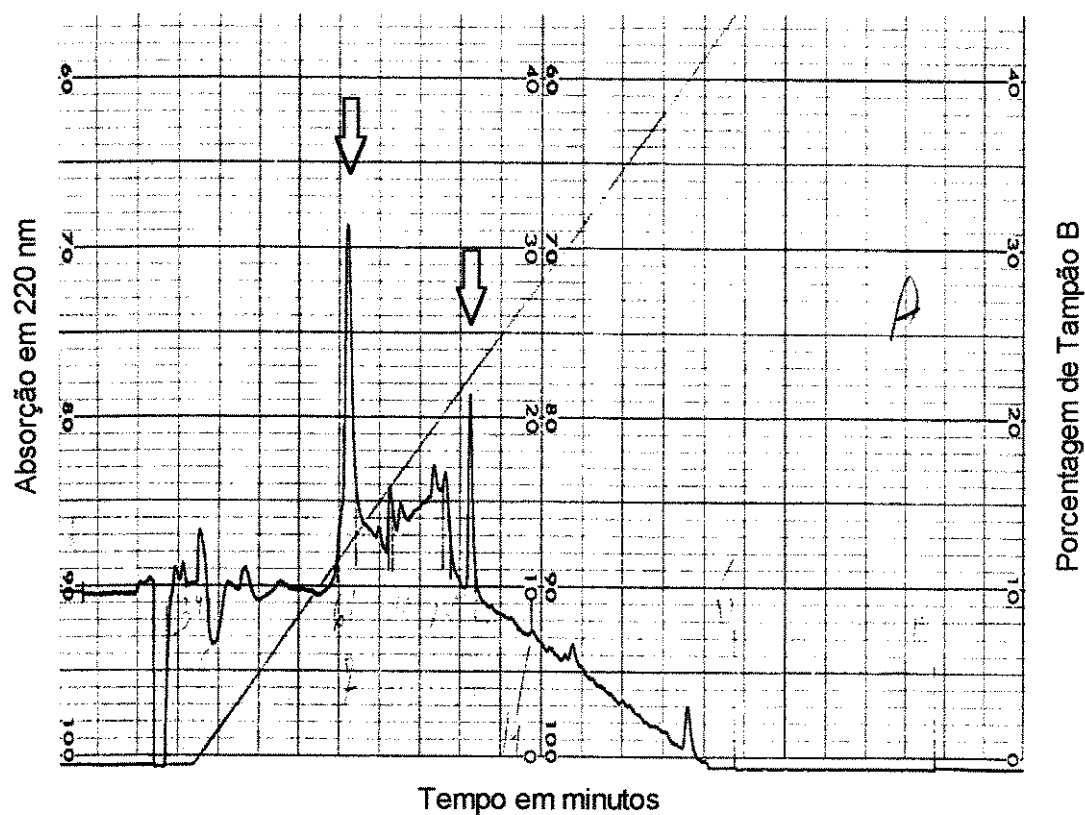


Figura 2Aa - Extrato total de Ao , extraído em solução de PBS na presença de inibidores de proteases, analisado em HPLC, coluna C-18, WATERS, fase reversa, dimensão de 3.9 X 300 mm, usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1% pH 2,5. Fluxo 1,0 ml/minuto.

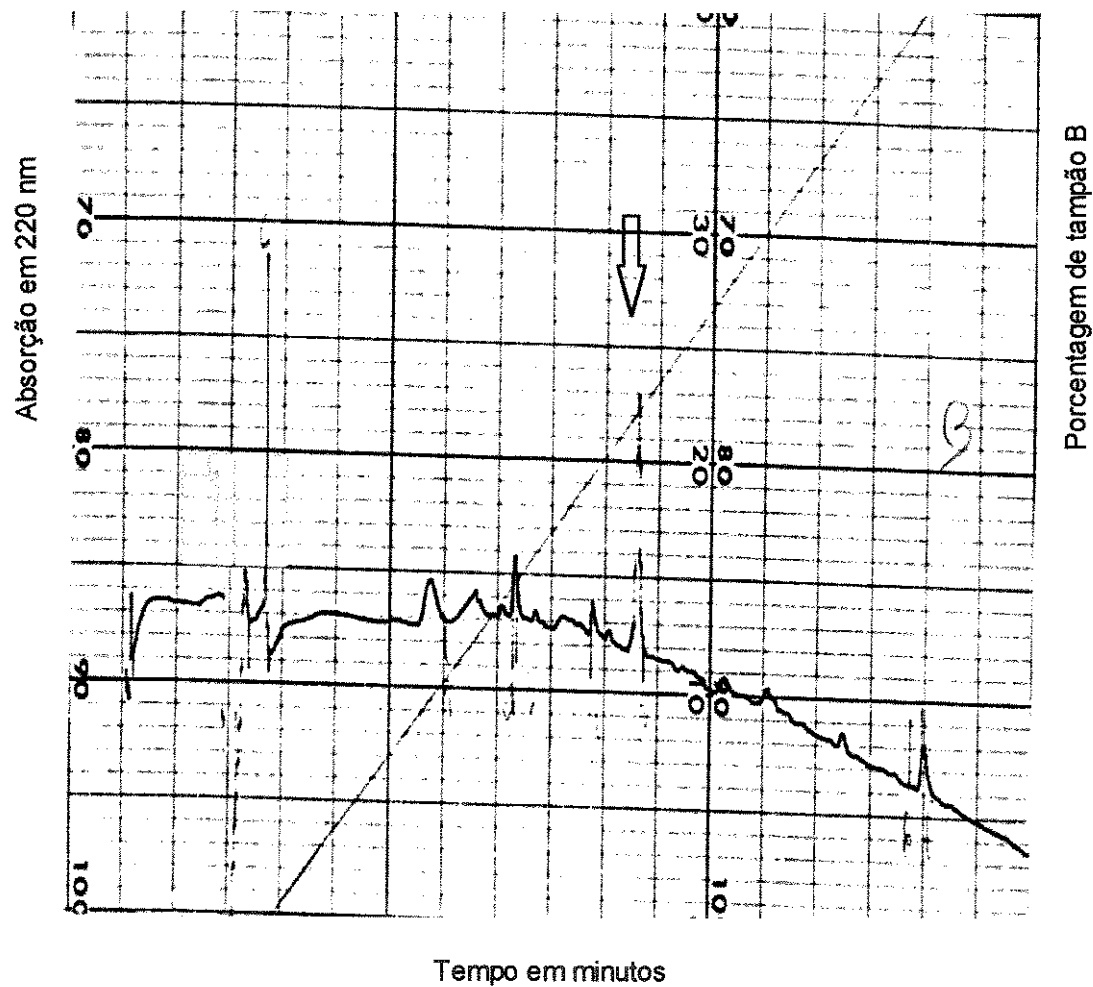


Figura 2Ab - Extrato total de Ao, extraído em solução de PBS na ausência de inibidores de proteases, analisado em HPLC, coluna C-18, WATERS, fase reversa, dimensão 3.9 X 300 mm, usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1% pH 2,5. Fluxo 1,0 ml/minuto.

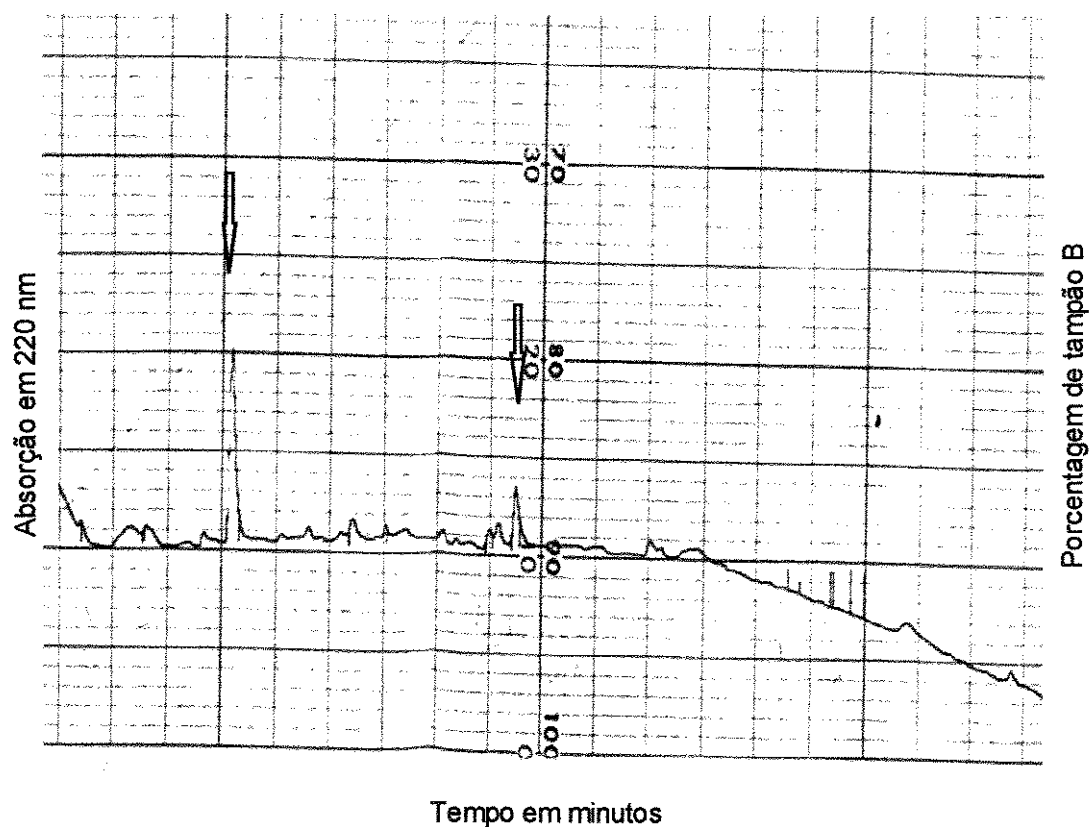


Figura 2Ba - Extrato total de Ao, extraído em solução fisiológica bicarbonatada de sódio (COCA) na presença de inibidores de proteases, analisado em HPLC, coluna c-18, fase reversa, WATERS, dimensão 3,9 X 300 mm, usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1 % pH 2,5. Fluxo 1,0 ml/minuto.

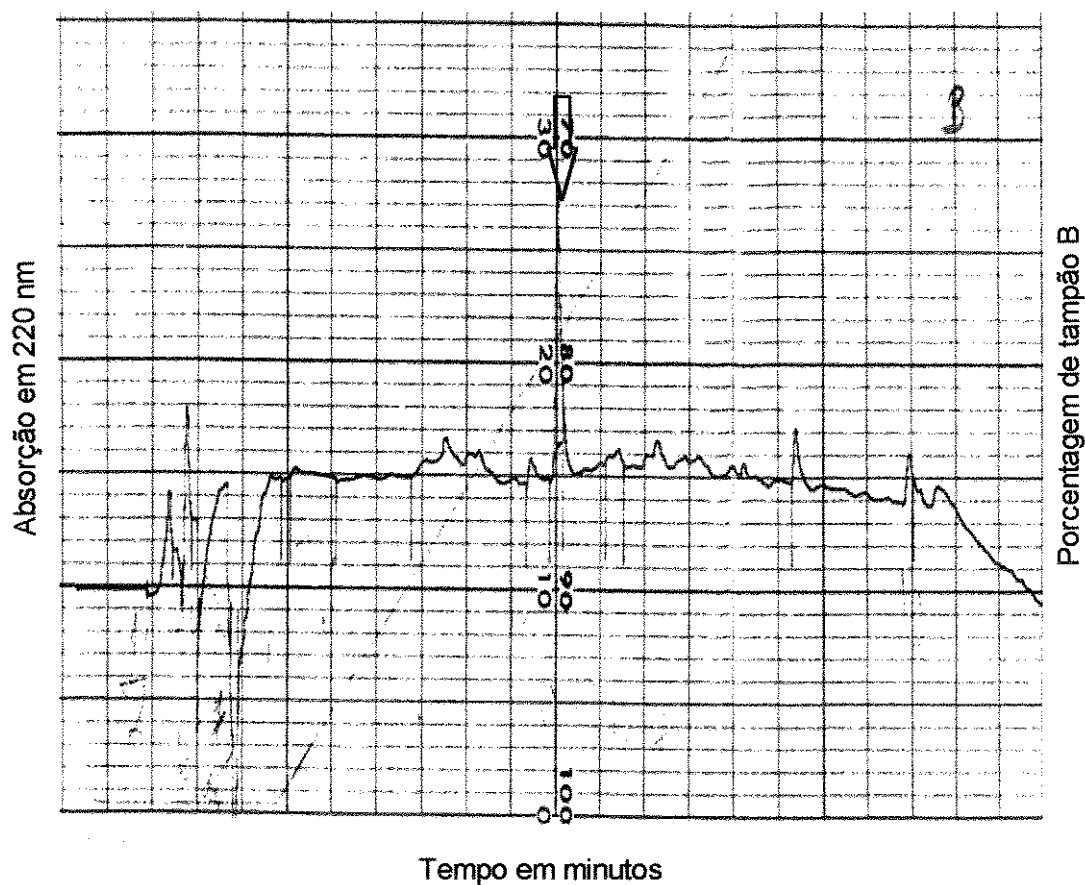


Figura 2Bb - Extrato total de Ao, extraído em solução fisiológica bicarbonatada de sódio na ausência de inibidores de proteases, analisado em HPLC, coluna C-18, WATERS, dimensão 3,9 X 300 mm, fase reversa, usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1% pH 2,5. Fluxo 1,0 ml/minuto.

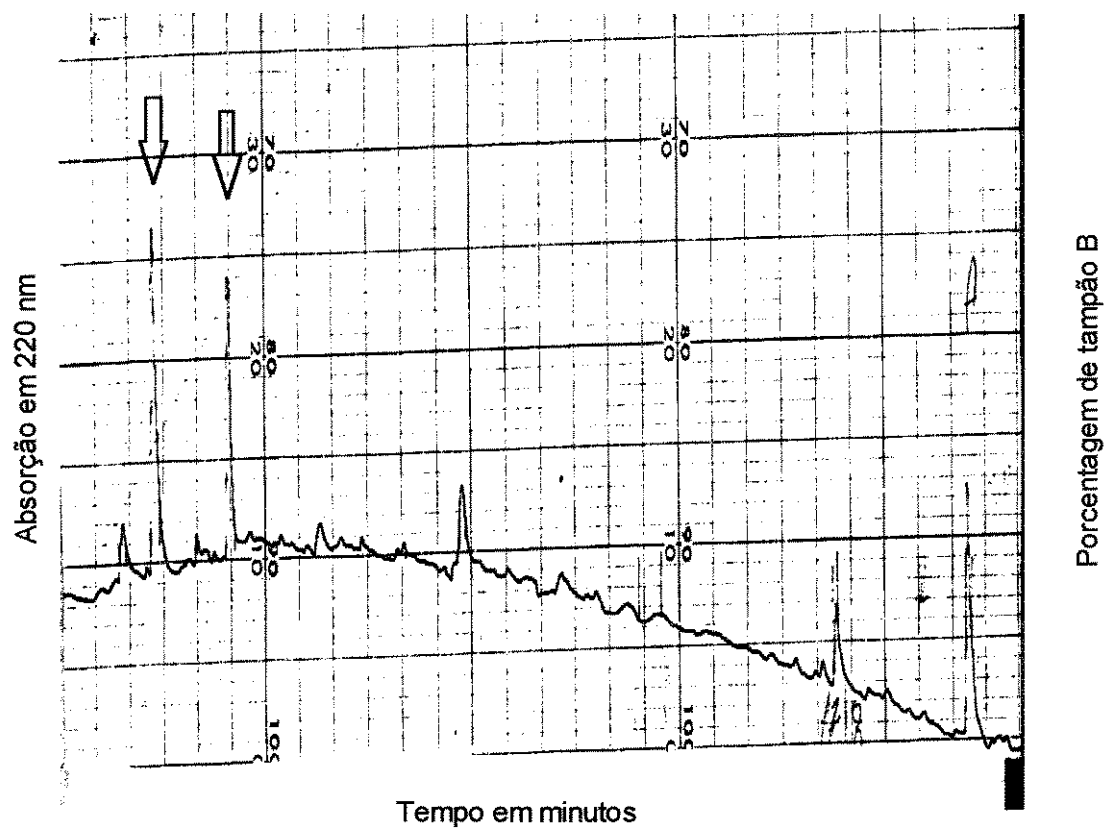


Figura 2Ca - Extrato total de Ao, extraído em solução de carbonato ácido de amônia 0,125 M, na presença de inibidores de proteases, analisado em HPLC, coluna C-18, fase reversa, WATERS, dimensão 3,9 X 300 mm usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1% pH 2,5. Fluxo de 1,0 ml/minuto.

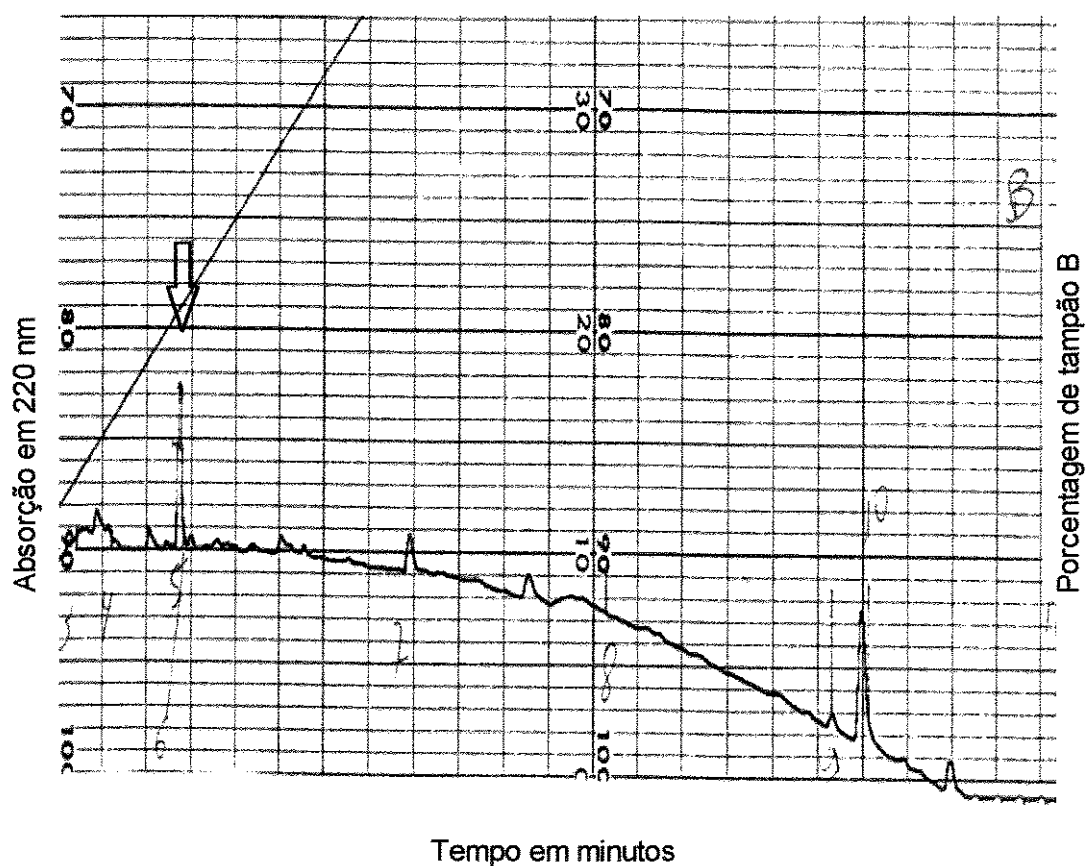


Figura 2Cb - Extrato total de *Ao*, extraído em solução de carbonato ácido de amônia, na ausência de inibidores de proteases, analisada em HPLC, coluna C-18, fase reversa, WATERS, dimensão 3,9 X 300 mm, usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1% pH 2,5. Fluxo de 1,0 ml/minuto.

3- Avaliação do tempo de diálise

Os extratos submetidos a diálise contra água destilada, durante 24hs. e 48hs., ao serem analisados em HPLC, coluna C-18 fase reversa, mostraram que no tempo de 48hs, houve perda total da atividade, como se observa pela figuras 3a e 3b, páginas 45 e 46.

4- Filtração em gel de sephadex G-75

O extrato total (ET) de Ao, na presença de inibidores de proteases, foi submetido a filtração em gel Sephadex G-75, e as frações monitoradas através de registro gráfico em absorciômetro, sob temperatura ambiente, mostrou perfil cromatográfico indicado na figura 4, página 47. Três frações identificadas como "pools" A, B e C foram consideradas.

5- Reatividade cutânea

Os resultados de reatividade cutânea, testada em 30 pacientes atópicos pelo método de PRICK-TEST, às frações A, B e C provenientes de filtração em gel de Sephadex do extrato total podem ser visualizadas na Tab. V, página 48. Podemos observar que a fração A, apesar de apresentar um diâmetro de pápula maior não mostrou a maior reatividade; esta ficou evidenciada nos pacientes testados com a fração C.

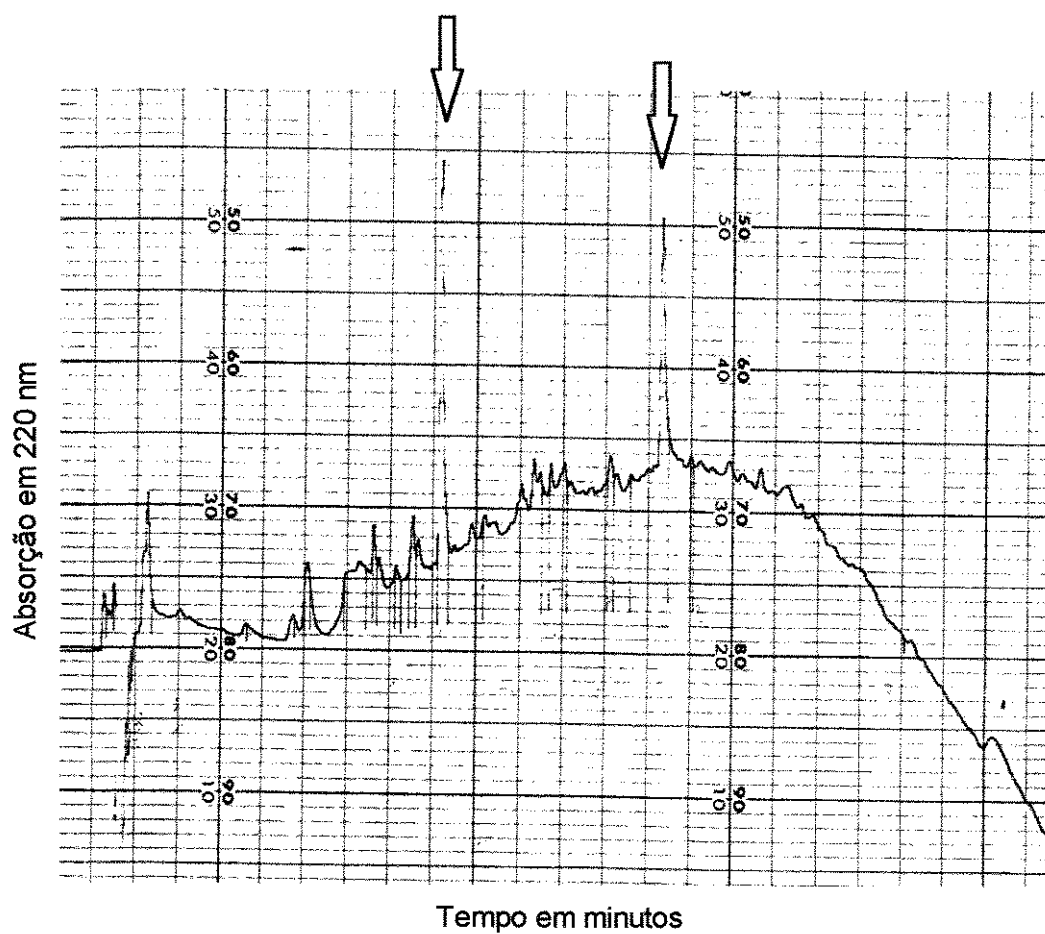


Figura 3A - Extrato total de *Ao*, dialisado durante 24 horas, analisado em HPLC, coluna C-18, fase reversa, WATERS, dimensão 3,9 X 300mm, usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1%, pH 2,5, utilizando-se fluxo de 1,0 ml/minuto.

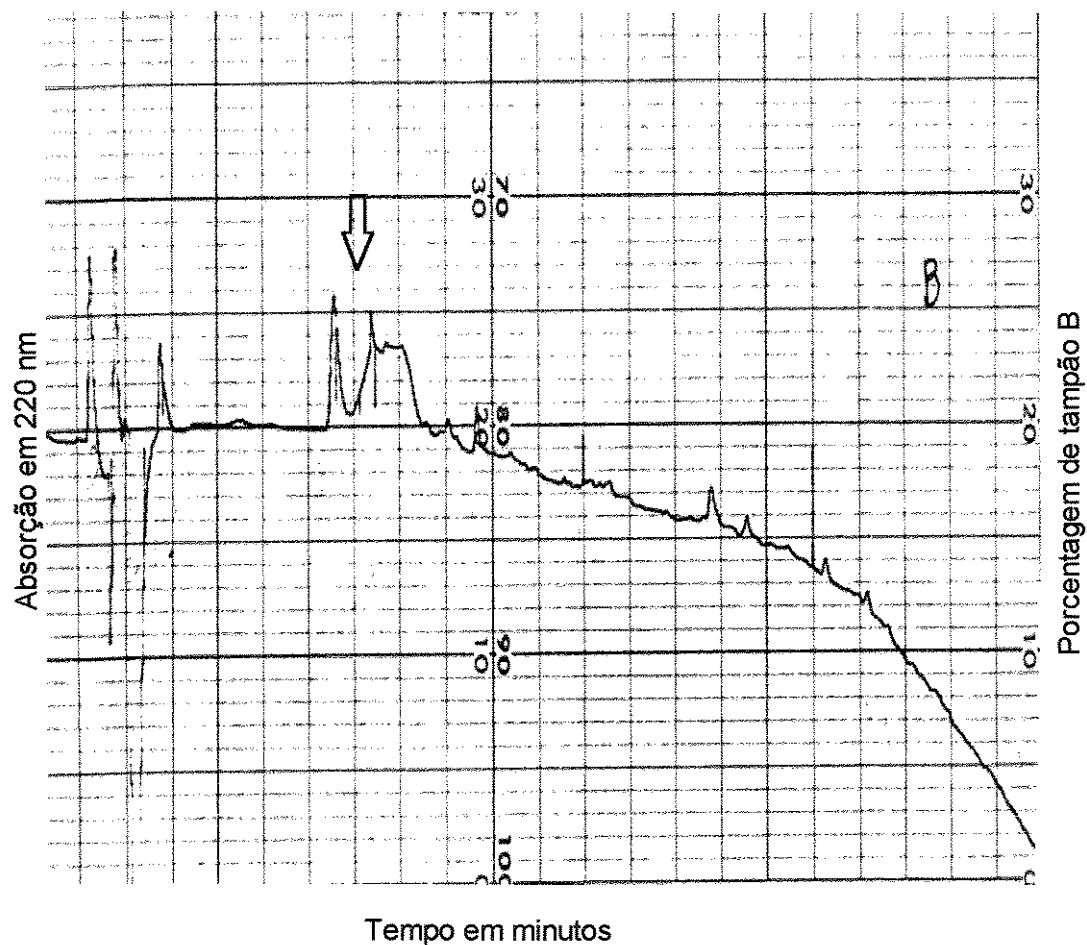


Figura 3B - Extrato total de Ao, dialisado durante 48 horas, analisado em HPLC, coluna C-18, fase reversa, WATERS, dimensão 3,9 X300 mm usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1% pH 2,5, utilizando-se fluxo de 1,0 ml/minuto.

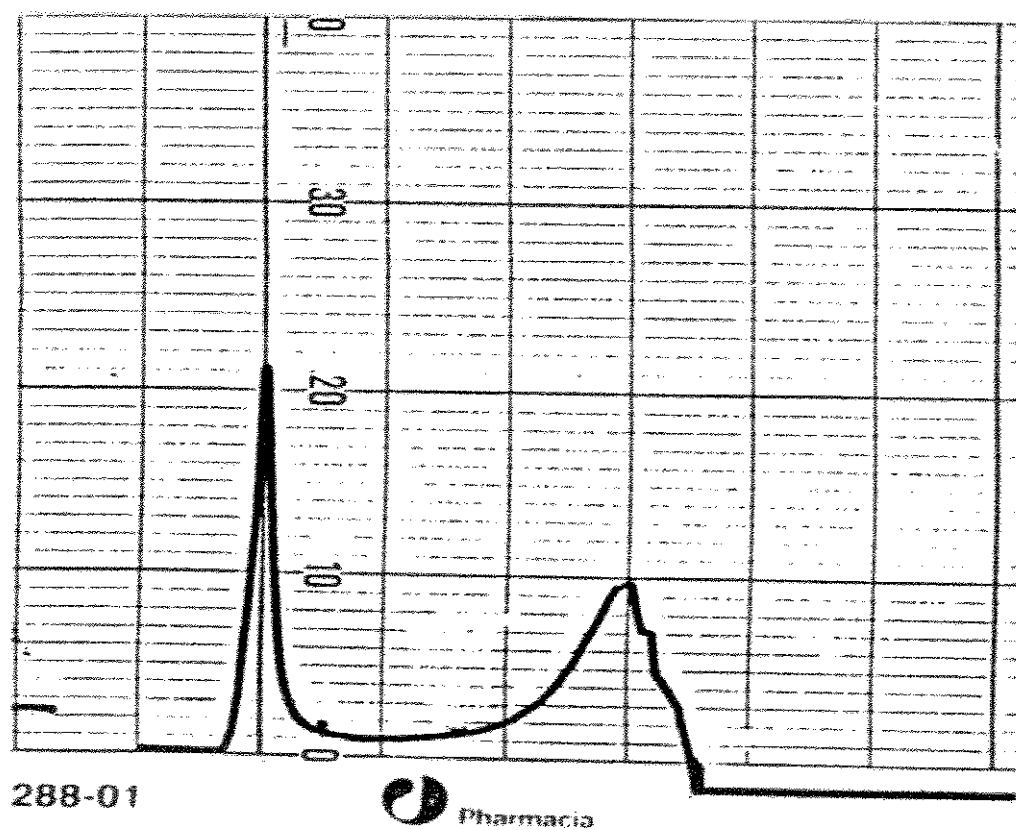


Figura 4 - Filtração em gel de Sephadex, G-75, de extrato total de Ao, na presença de inibidores de proteases. Foram aplicados 2,0ml da preparação (5,0 mg de proteína) em coluna cromatográfica (114 ml) com fluxo de eluição de 18 ml/hora. Foram coletadas frações de 2,5 ml. Volume morto de 36 ml.

Tabela V - Avaliação da anafilaxia local cutânea às frações provenientes da filtração em G-75. Pacientes atópicos, provenientes do ambulatório de Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP e estudados em rotina ambulatorial à testes epicutâneos aos alérgenos do Ao.

	Frações		
	A	B	C
Reatividade Cutânea	42%	36.8%	47%
Média do Diâmetro da Pápula reativa (mm)	4.15	3.4	3.6

6- Eletroferese em gradiente de poliacrilamida-SDS 5 a 18% sob condições reduzidas e não reduzidas

A figura 5 , página 52, mostra a análise eletroforética das proteínas do extrato total de *Ao* bem como das frações A, B e C, obtidas da filtração em gel sephadex G-75, sob condições reduzidas e não reduzidas. Sob condições não reduzidas, as bandas do extrato total não são facilmente visualizadas, o que não acontece quando o extrato total é aplicado em condições reduzidas, onde as bandas ficam nítidas, onde se destacam aquelas de 12 a 68 Kda. O mesmo se observa com as frações A e B. No entanto a fração C que é de difícil visualização em condições não reduzidas revela-se bem e apresenta bandas de baixo peso molecular de 12 a 30 Kda.

7- Eletroferese de Transferência seguida de "*Immunoblotting*"

Na figura 6, página 53, é mostrado o controle feito através de "*immunoblotting*" a partir de eletroforese em gradiente de poliacrilamida/SDS em condições de redução. Analisada por autoradiografia revelou reatividade aos anti-corpos séricos de pacientes alérgicos a *Ao* a antígenos de peso molecular variando entre 12 e 70 KDa. Aparentemente a reatividade concentra-se em antígenos de peso molecular menor que 46 Kda.

8- Cromatografia Líquida de Alta Performance das frações eluídas em coluna de filtração Sephadex G-75

As frações provenientes da filtração Sephadex G-75 (A, B, C) analisadas em Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) sob iguais condições, mostram que os perfis de eluição das frações eluídas A e B são semelhantes

quanto ao tempo de fracionamento cromatográfico, contrastando com a fração C, de peso molecular <30 kDa (Figuras 7a, 7b, 7c - páginas 54, 55 e 56).

9- Repurificação do pico 2 da fração C em Cromatografia Líquida de Alta Performance

A repurificação do pico 2 da fração C, proveniente da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), mostra que os perfis de eluição da fração C e do seu pico 2 são semelhantes quanto ao tempo de fracionamento cromatográfico. Figura 8, página 57.

10- Eletroforese em sistema gel de tricina:

A fração C proveniente da filtração em gel de sephadex G-75, mostrou o mesmo perfil cromatográfico quando foi re-purificada em HPLC com frações menores que 30 kDa. Figura 9, página 58.

11- Determinação do efeito de substâncias inibidoras de proteases:

Pela tabela VI, página 59, observa-se que a fração A foi parcialmente inibida por PMSF (inibidor de serina protease), por ácido iodoacético (inibidor de cisteína protease) e por EDTA (inibidor de metaloproteínases). Por sua vez a fração B foi somente inibida por PMSF e a fração C foi inibida por ácido iodoacético.

12-Análise comparativa da reatividade Cutânea à 3 diferentes extratos alergênicos de ácaros: *Aleuroglyphus ovatus*; *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus* e associação com Rinite alérgica e/ou Asma Brônquica.

Do grupo de pacientes com rinite alérgica (n=82) 45 (54,8%) reagiram ao extrato dos três ácaros. A prevalência de testes positivos para extratos individuais ocorreram em 5 (6%) para *A.o*; 2 (2,4%) para *B.t* ; 3 (3,6%) para *Der p*. Testes positivos para extratos de 2 ácaros concomitantemente ocorreram em 15 (18,2%) para *A.o* + *B.t*; 5 (6%) para *A.o* + *Der p*; 5 (6%) para *B.t* + *Der p*. Tabela VII, página 60.

Dos 89 pacientes com Asma Brônquica associada ou não com Rinite Alérgica, 50 (56%) apresentaram reatividade cutânea aos três extratos alergênicos de ácaros estudados. Testes cutâneos positivos para *A.o*, *B.t* e *Der p*, ocorreram em 9 (10,1%), 2 (2,2%) e 4 (4,5%) para *A.o*, *B.t* e *Der p*, respectivamente. A reatividade cutânea para ambos ácaros *A.o* + *B.t*, ocorreu em 15 (16,8%); *A.o* + *Der p*, em 4 (4,5%) e *B.t* + *Der p* em 6 (6,7%) dos pacientes estudados. Tabela VIII, página 61.

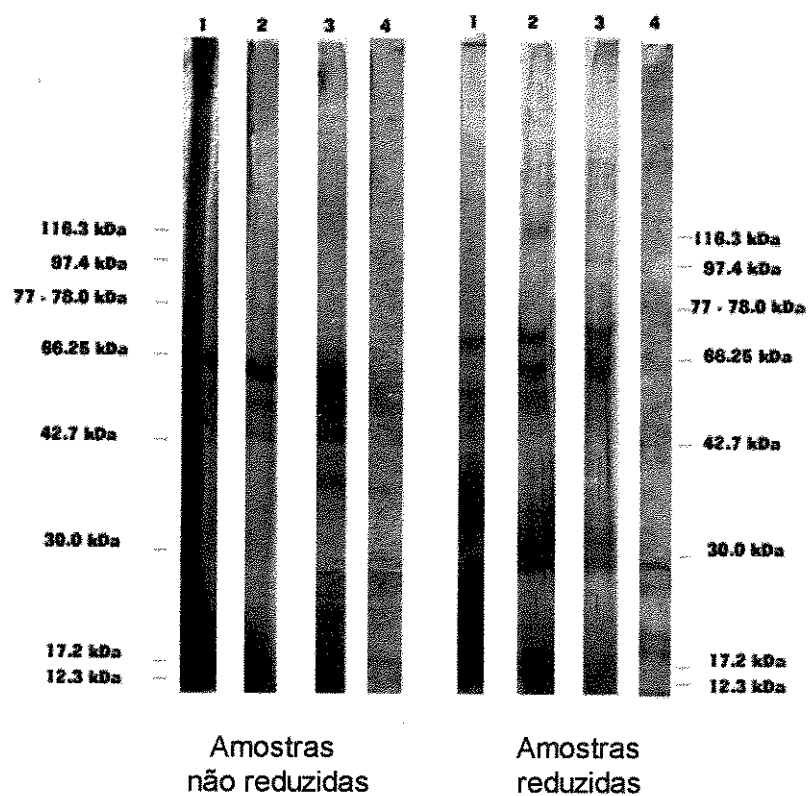


Figura 5 - Eletroforese do extrato total de Ao e frações eluídas da coluna G-75. Eletroforese em gradiente de 5 a 18% de policrilamida sob condições reduzidas e não reduzidas.

Tira 1 - Extrato total

Tira 2 - Fração A

Tira 3 - Fração B

Tira 4 - Fração C

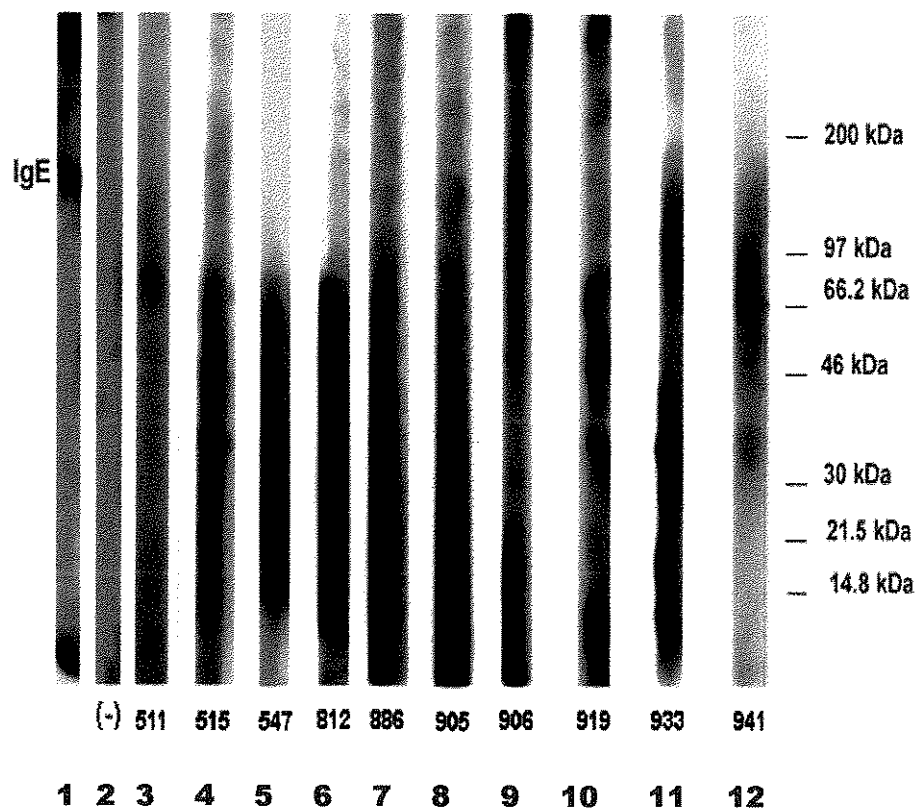


Figura 6 - Figura representativa de autoradiografia de "eletroblotting" SDS-PAGE, gradiente de 5 a 18%.

Tira 1 - controle (+) para IgE humana

Tira 2- controle (-)

Tiras 3 a 12 - soro de pacientes com resposta (+) ao teste epicutâneo (prick-test) ao extrato purificado de Ao.

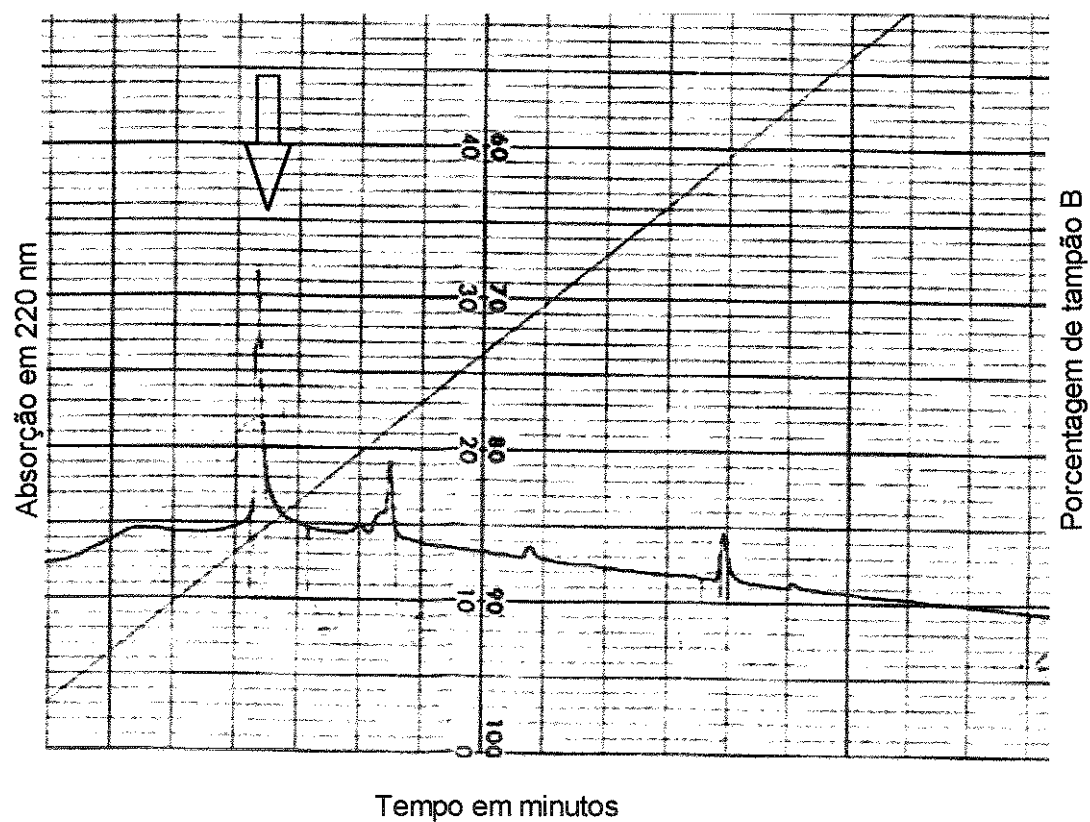


Figura 7A - Fração A proveniente da filtração em Gel de Sephadex, G-75, analisada em HPLC, coluna C-18, fase reversa, WATERS, dimensão 3,9 X 300 mm usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1% pH 2,5, utilizando-se fluxo de 1,0 ml/minuto.

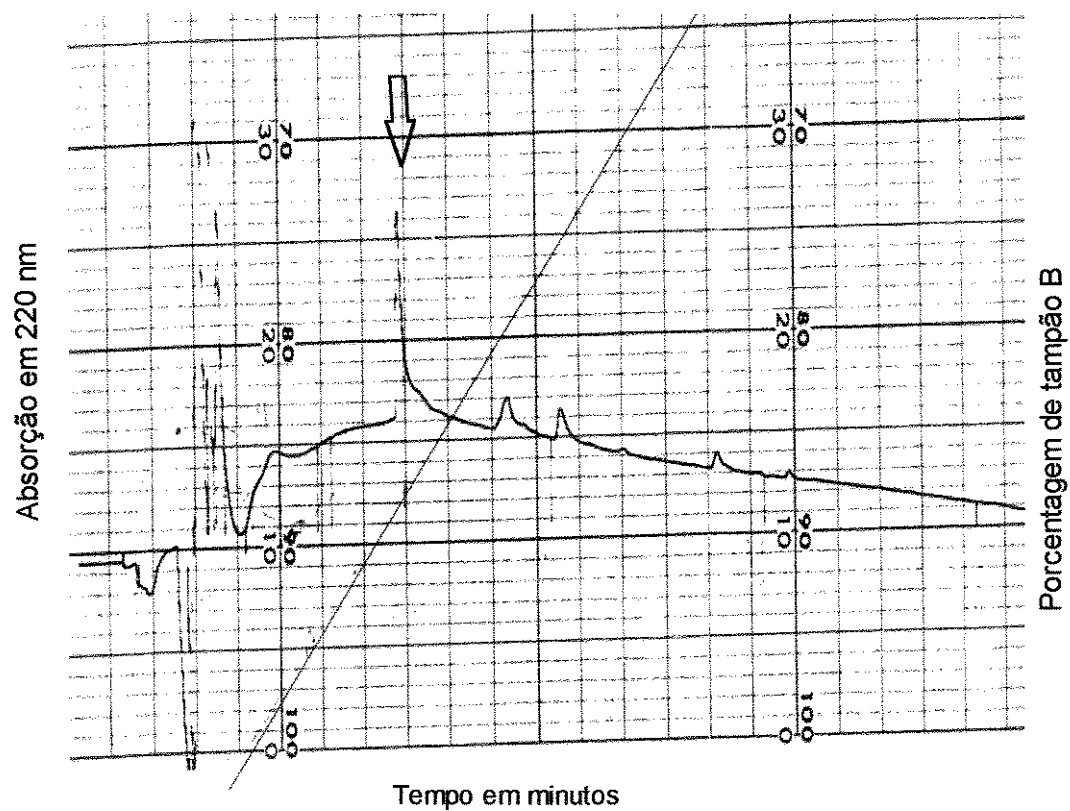


Figura 7B - Fração B proveniente da filtração em Gel de Sephadex, G-75, analisada em HPLC, coluna C-18, fase reversa, WATERS, dimensão 3,9 X 300 mm, usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1% pH 2,5, utilizando-se fluxo de 1,0 ml/minuto.

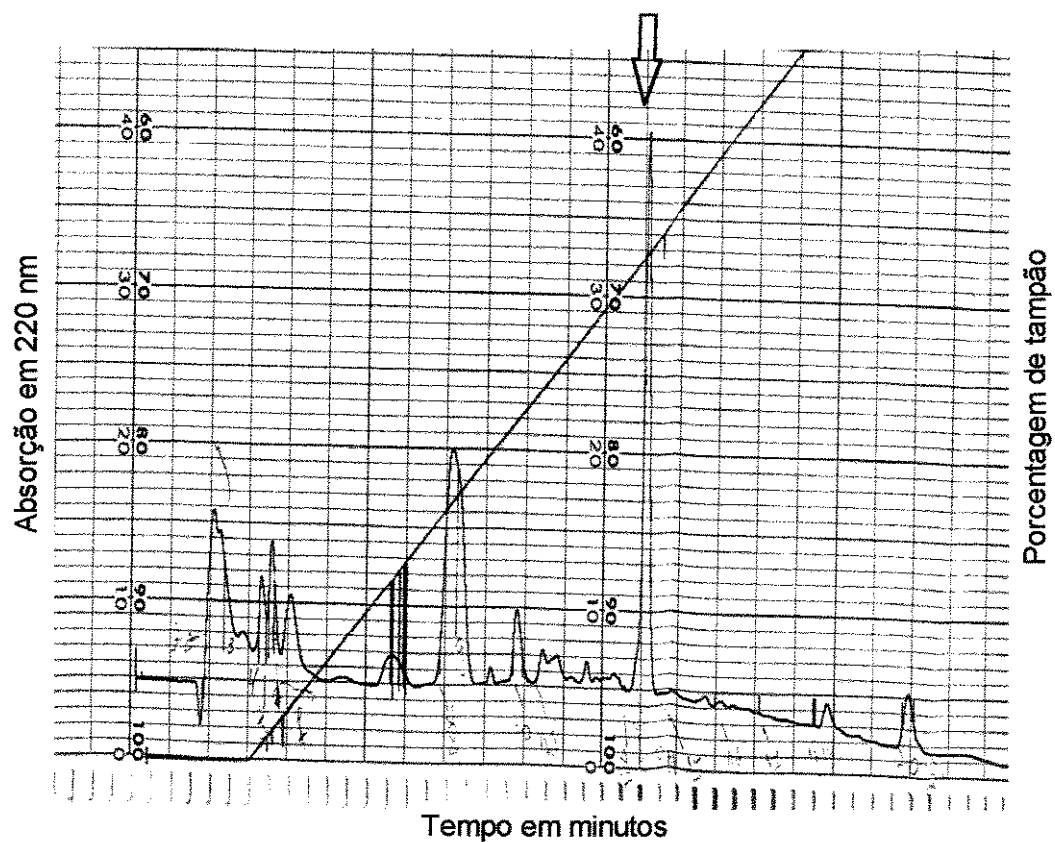


Figura 7C - Fração C proveniente da filtração em Gel de Sephadex, G-75, analisada em HPLC, coluna C-18, fase reversa, WATERS, dimensão 3,9 X 300 mm, usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1% pH 2,5, utilizando-se fluxo de 1,0 ml/minuto

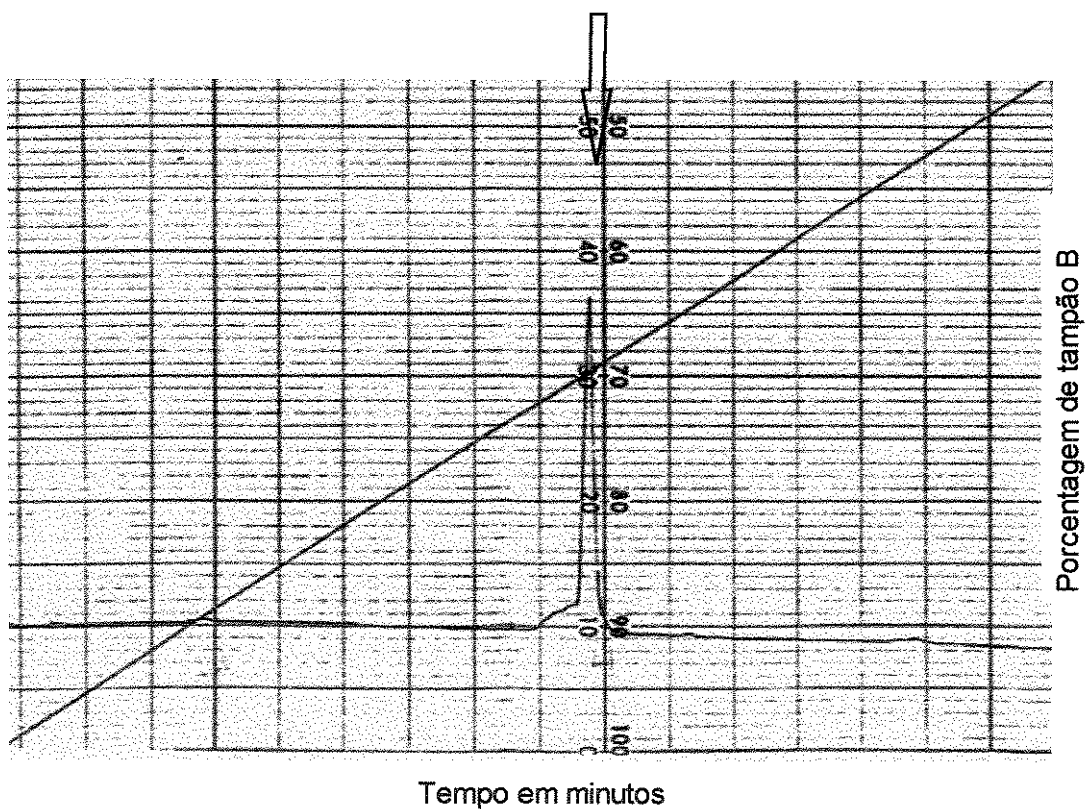


Figura 8- Repurificação do pico 2 da fração C proveniente de Cromatografia Líquida de Alta Performance, analisada em HPLC, coluna C-18, fase reversa, WATERS, dimensão 3,9 X 300 mm, usando gradiente linear de 0 a 100% de solução de acetonitrilo 66% em TFA 0,1% pH 2,5, utilizando-se fluxo de 1,0ml/minuto.

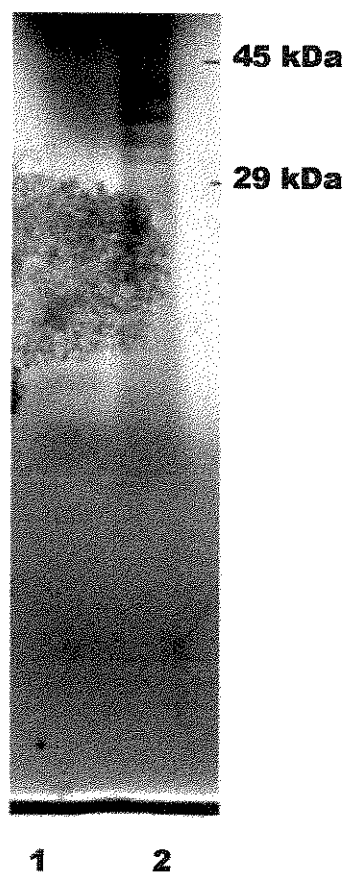


Figura 9 - Eletroforese em gel de TRICINA em condições não redutoras da fração C eluída da coluna de filtração sephadex G-75 (linha 1) e o repasse 2 da fração C re-purificada em HPLC.

Tabela VI - Efeito de inibidores de proteases na atividade das frações A, B e C provenientes da filtração em Gel de Sephadex G-75.

Agente Inibidor	Concentração (mM)	Porcentagem de Inibição		
		Fração		
		A	B	C
PMSF (serina protease)	100	34	42	-----
Ácido Iodoacético (cisteína protease)	100	30	-----	34
EDTA (Metal protease)	100	12	-----	-----

Tabela VII - Avaliação da reatividade cutânea provocada por *Aleuroglyphus ovatus* (Ao), *Blomia tropicalis* (Bt) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) em pacientes atópicos portadores de rinite alérgica, total de 82 pacientes.

Ácaro (extrato alergênico)	Número de casos com teste epicutâneo (+) (prick test)	Frequência (%)
<i>A.o</i>	5	6
<i>B.t</i>	2	2,4
<i>D.p</i>	3	3,6
<i>A.o; B.t; D.p</i>	45	54,8
<i>A.o; B.t</i>	5	6
<i>A.o; D.p</i>	15	18,2
<i>B.t; D.p</i>	5	6

Tabela VIII - Avaliação da reatividade cutânea provocada por *Aleuroglyphus ovatus* (Ao), *Blomia tropicalis* (Bt) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) em pacientes atópicos portadores de asma c/s rinite num total de 89 pacientes.

Ácaro (extrato alergênico)	Número de casos com teste epicutâneo (+) (prick test)	Frequência (%)
<i>A.o</i>	9	10,1
<i>B.t</i>	2	2,4
<i>D.p</i>	4	4,9
<i>A.o; B.t; D.p</i>	50	56
<i>A.o; B.t</i>	4	4,5
<i>A.o; D.p</i>	15	16,8
<i>B.t; D.p</i>	6	6,7

DISCUSSÃO

Ácaros de poeira doméstica são as causas mais comuns de asma e outras doenças alérgicas, sendo os ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* os mais frequentes na poeira doméstica em muitas regiões do mundo (PLATTSMILLS & CHAPMAN, 1987). Este fato tem estimulado estudos que visam caracterizar seus componentes alergênicos. Contudo, os chamados "ácaros de estocagem", isto é, aqueles encontrados em locais de armazenagem de produtos como grãos e cereais, também têm sido responsabilizados como desencadeadores de doenças alérgicas como rinite alérgica e asma brônquica.

Os primeiros estudos com ácaros de estocagem foram feitos com fazendeiros na Escócia em 1979 (CUTHBERT & cols., 1979; INGRAM & cols., 1979). Esses autores observaram relação entre sensibilidade à ácaros de estocagem e sintomas alérgicos como asma, rinite e conjutivite, relacionando esses sintomas à presença do grande número de ácaros encontrados no feno e grãos usados para alimentar o gado no inverno. Posteriormente, diferentes autores verificaram a presença destes ácaros em residências na região urbana e a importância destes organismos como agentes na sensibilização alérgica de população que não tinham exposição ocupacional (MIYAMOTO & cols., 1969; WRAITH & cols., 1979; BERARDINO & cols., 1987; BONER & cols., 1989; IVERSEN & DAHL, 1990; LUZYNSKA & cols., 1990; TRUDEAU & cols., 1990; SILTON & cols., 1991; ZOLLNER & cols., 1994).

Os chamados "ácaros de estocagem" tem sido assim chamados por sua origem a partir de locais de armazenagem de grãos e cereais, entretanto eles tem sido também encontrados em poeiras domésticas e o termo "ácaro doméstico" (onde se incluem os *Dermatophagoides* sp. e *Euroglyphus maynei*), tem sido sugerido, para esses ácaros. Além disso, tem sido observado sensibilização, para esses ácaros entre população que não trabalham em

locais de armazenagem, sugerindo que não só os ácaros da família *Piroglyphidae* estariam envolvidos como causadores de quadros alérgicos (JOHANSSON & cols., 1997). Outro fator importante, é que eles são mais de 20% das espécies de ácaros encontrados na poeira doméstica, principalmente se o ambiente for úmido (HEINIG & cols., 1991)

Dentre as diferentes espécies de ácaros de estocagem, estudos com *Aleuroglyphus ovatus* mostraram seu potencial de sensibilização populacional como demonstrado por ZOLLNER & cols. (1992) em pacientes atópicos acompanhados no Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Estes autores verificaram que 90% dos pacientes atópicos quando submetidos a testes epi-cutâneos, utilizando-se extrato purificado de Ao, apresentaram reatividade. Essa reatividade se expressa pelo aparecimento de pápula e eritema no local de punctura. Esta alta reatividade populacional tem estimulado estudos que visam a identificação e purificação dos possíveis alérgenos envolvidos com a sensibilização populacional. No entanto, essa identificação e purificação exigem controle de qualidade, como analisar de forma abrangente suas propriedades biológicas através de testes de punctura, de provocação, de liberação histaminérgica de leucócitos sensibilizados; quantificar os diferentes alérgenos no extrato, entre outros (BALDO, 1983). Assim, no intuito de identificarmos os componentes responsáveis pela resposta alérgica dos pacientes submetidos aos testes epi-cutâneos ao Ao, começamos pela avaliação e padronização dos meios utilizados para a extração antigênica.

Em um primeiro plano, fizemos o estudo comparativo entre três soluções diferentes, Carbonato ácido de amônia, COCA, PBS, pois são as mais utilizadas no processo de extração antigênica. Além do tempo de extração, procuramos analisar o rendimento e o conteúdo proteico bem como o perfil eletroforético. Os resultados de rendimento proteico obtidos com as tres soluções mostraram

que o carbonato ácido de amônia possui maior "capacidade" extratora". Contudo, quando comparados os tempos de extração entre as diferentes soluções, não pudemos observar diferenças significativas entre elas. Da mesma forma, o perfil eletroforético não mostrou diferenças qualitativas entre o material extraído pelas tres soluções extradoras estudadas. Estes resultados demonstram que essas soluções extradoras poderão ser utilizadas indistintamente, que embora o carbonato mostre maior "potencial" extrator, não verificamos prejuizo da "qualidade" dos extratos obtidos.

Outro fator analisado foi a ação de inibidores de proteases. Um dos problemas que podem ocorrer durante o processo de extração e manipulação de proteínas é a proteólise e segundo NORTH (1994), identificar o momento em que ocorre "in vitro" e como preveni-la nas preparações protéicas, são condições importantes àqueles que trabalham na elaboração de métodos mais confiáveis para obtenção de extratos alergênicos. Como grande parte dos antígenos acarinos possuem propriedades bioquímicas enzimáticas, a "auto digestão" é um parametro importante a ser considerado. No interior das células os mecanismos de proteólises são altamente controladas. Isso ocorre devido a combinação de fatores tais como, compartimentalização, presença de inibidores endógenos de proteinases e a influência que uma "variedade" de componentes celulares têm na conformação de proteínas (NORTH, 1994). Quando os tecidos são danificados durante o processo de isolamento das proteínas, esses controles são perdidos, compartimentos subcelulares são rompidos, complexos enzima-inibidor se formam e dissociam, interação entre proteínas e outras moléculas são alteradas, ou seja, no decorrer do processo de extração e isolamento de proteínas fatores que normalmente protegeriam partes da estrutura protéica do ataque proteolítico. As proteínas são certamente mais resistentes em sua forma nativa e alguma perturbação durante o processo de extração, aumenta a probabilidade de disfunção protéica (BEYNON, 1995). Componentes da solução de extração, por seu turno, podem afetar a

conformação da proteína e assim aumentar a vulnerabilidade para proteólise (GOLDBERG & DICE, 1974).

A inclusão de inibidores em solução extratora durante e após o rompimento dos tecidos é a metodologia mais eficiente para se evitar a proteólise. Pelo uso de inibidores apropriados, proteinases podem ser inativadas completamente em preparação (BEYNON, 1995). Esse fato foi observado em nossos ensaios, ao analisarmos em HPLC, os extratos obtidos a partir de PBS, Carbonato e COCA. Somente com a utilização de inibidores de proteases nos procedimentos de extração tanto com PBS quanto com Carbonato ácido de amônia é que pudemos visualizar o perfil protéico cromatográfico. Entretanto, nos procedimentos com COCA, a presença de inibidores não alterou o perfil de eluição cromatográfica sugerindo que esta solução altere de alguma maneira o mecanismo de ação proteolítico retardando esta ação. Estudos posteriores poderão esclarecer essas observações.

A padronização da extração dos antígenos, indicou os melhores tempos de diálise. Assim, utilizando-se HPLC como ferramenta de avaliação do perfil protéico pós diálise, notamos que no tempo de diálise de 24 horas o perfil de eluição protéico era bem definido ao contrário da diálise por 48 horas na qual não foi observado perfil de eluição. LIND (1985) detectou o mesmo problema, ao fazer extração e purificação de *Dermatophagoides pteronyssinus*, observando que ao submeter o material extraído a sucessivas diálises, o rendimento protéico apresentava-se muito baixo.

Na literatura disponível não pudemos identificar uniformidade nos métodos de purificação de antígenos acarinos, podendo ser observado que grupos de pesquisa promovem os procedimentos de purificação de acordo com a necessidade momentânea. Ao analisar-mos a extensa bibliografia disponível, com respeito as características da massa molecular dos antígenos acarinos,

optamos pelo processo inicial de cromatografia por exclusão molecular. Em estudo preliminar utilizamos filtração em gel Sephadex G-100, contudo os resultados não foram satisfatórios com as frações não apresentando constância em seus perfis, resolvemos, então, pela utilização de G-75.

Ao submetermos o extrato total de *Ao*, na presença de inibidores de proteases, a filtração em gel Sephadex G-75, obtivemos 3 frações que foram designadas de frações A, B e C. As quais foram testadas em pacientes atópicos do Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNICAMP. A análise desta reatividade permitiu a observação que apesar da fração A apresentar um diâmetro de pápula maior que as outras duas frações os pacientes apresentaram maior reatividade à fração C. A fração B além de causar menos reatividade cutâneo nos pacientes, o diâmetro da pápula reativa era menor. Esses resultados levaram-nos a interpretação que possivelmente a fração C possui maior potencial alergênico em relação as outras duas frações. Interessante notar que através de seu perfil cromatográfico este "pool" possui menor peso molecular, fato pouco explorado na literatura.

Os ácaros melhor estudados são os do genero *Dermatophagoides* , considerados os mais importantes dentre os ácaros dito domésticos. Um grande número de alérgenos tem sido identificados em extratos de cultura de *Dermatophagoides sp.* , onde o número de componentes varia de 4 a 26 oriundos de seu corpo e de 5 a 19 de suas fezes (FUJIKAWA & cols., 1996). Os diferentes métodos de extração e/ou os procedimentos de purificação pode ser uma das causas dessas diferenças (FORD & cols., 1985; FERRÁNDIZ & cols., 1995).

O mesmo foi observado com o ácaro de estocagem *Lepidoglyphus destructor*, quando VENTAS & cols.(1992), purificaram e caracterizaram o

alérgeno "principal" desse ácaro, como sendo de 14 kDa, ao fazerem a eletroferese SDS-PAGE sob condições reduzidas, diferentemente dos resultados obtidos por JOHANSSON & cols.(1991) que ao trabalharem com a mesma espécie de ácaro, obtiveram um alérgeno "principal" de 15 kDa, fazendo a eletroferese SDS-PAGE sob condições não reduzidas. Outro fator observado por JOHANSSON & cols.(1991) foi que outro componente de peso molecular de 53 kDa reagia com 50% do soro de pacientes sensíveis a *Lepidoglyphus destructor*, considerando, então, esses autores que haveria 2 alérgenos "principais".

Em nossos experimentos, também, observamos diferenças nos pesos moleculares das amostras, quando estudadas sob condições reduzidas e não reduzidas. O extrato total sob condição "não reduzida" mostrou bandas eletroforéticas de difícil visualização, sendo que esse fato já havia sido observado por SILTON & cols. (1991), ao trabalharem com extrato total de *Ao*. No entanto sob condições reduzidas observa-se várias bandas bem delimitadas com peso molecular variando de 77a 12 kDa.

Da mesma forma as frações A e B, mostraram também algumas diferenças entre si quando as amostras estavam sob condições reduzidas e não reduzidas. Sob condição reduzida a fração A mostrou melhor visualização eletroforética, enquanto que a fração B apresentou menor número de bandas. Contudo a fração C foi, dentre as 3 frações, que apresentou melhor visualização sob condições reduzidas, onde se pode observar as bandas bem determinadas.

As frações A e B apresentaram peptídeos com peso molecular variando de 17 a 70 kDa, a fração C por sua vez, apresentou bandas de peso molecular abaixo de 30 kDa, resultado concordante com a literatura que descreve que os alérgenos, tanto de pó doméstico como o de estocagem apresentam peso molecular abaixo de 60 kDa, ressaltando que os alérgenos principais teriam peso molecular em torno de 25 kDa (TOVEY & cols.,1989; CHUA & cols., 1990;

YUUKI & cols., 1990; ANSOTEGUI & cols., 1991; AKI & cols., 1994; SHEN & cols., 1995; THOMAS & CHUA, 1995; VAN HAGE-HAMSTEN & cols., 1995), levando-nos a correlacionar esses resultados aos obtidos com reatividade cutânea dos pacientes, e com isso especular que a fração C seria a mais antigênica das 3 frações.

O perfil alergênico analisado por SDS-PAGE *Immunoblot*, usando soro de pacientes com teste epicutâneo positivo para *Ao* demonstrou que há mais de 10 proteínas de diferentes pesos moleculares (entre 6 a 97 kDa), que se ligam a IgE. Contudo, deve-se ressaltar que todos os soros ligaram-se as proteínas de baixo peso molecular, variando de 5 a 14 kDa. Com as proteínas de pesos moleculares diferentes houve uma variação de reatividade dos soros. Apesar da alta reatividade dos soros com proteínas de baixo peso molecular, não podemos afirmar que os alérgenos "principais" de *Ao* estariam nessa faixa, porque o número de pacientes estudados é pequeno e precisaremos aumentar esse percentual. Contudo, como todos os soros ligaram-se as proteínas, em maior ou menor grau, poderia ser indicativo da intensidade dos níveis de exposição desses pacientes a *Ao*, fato que merecerá melhor investigação.

Blomia tropicalis e *Lepidoglyphus destructor*, até agora, são os ácaros de estocagem melhor estudado, e observou-se que das proteínas, até aqui, caracterizadas apresentam baixo peso molecular, variando de 11 a 15 kDa para *Blomia tropicalis* e 16 a 18 para *Lepidoglyphus destructor*, e suas funções bioquímicas ainda continuam desconhecidas.

Ao analisamos as frações A, B e C em HPLC, observamos que as frações A e B apresentam um perfil semelhante, com um pico aparecendo no começo da corrida. Por sua vez a fração C apresentou um primeiro pico, de mesmo perfil com aquele apresenta do pelas frações A e B, contudo mostra um segundo pico que ao ser repurificado apresenta o mesmo perfil, diferentemente

das frações A e B que quando foram repurificados apresentaram perfis diferentes.

Alguns fatores que vem sendo discutidos na literatura, há mais de 20 anos é o entendimento do processo de sensibilização para alérgenos aéreos e qual fator estaria ligado ao fato de algumas moléculas estarem associadas a atividade alergênica, enquanto outras não.

A susceptibilidade individual para sensibilização alergênica, esta ligada a vários fatores, entre eles, a predisposição genética. Entretanto, nem toda substância estranha evoca uma resposta antigênica ou alérgica e a frequência com que tal reatividade possa acontecer parece ser dependente de outros fatores que não a concentração de substâncias particulares no ambiente, dentre esses fatores podemos citar o tamanho molecular, solubilidade e concentração absoluta, que poderiam contribuir nesse processo (VAN BRONSWIGK & cols.,1989; VRTALA & cols.,1993). Entretanto é possível que propriedades bioquímicas inerentes como por exemplo, a atividade enzimática, atributos físico-químicos específicos (alto pI) ou modificações pós-translacionais (glicosilação) contribuam (STEWART & THOMPSON, 1996).

Uma das sugestões apresentadas por HERBERT & cols. (1995) seria que certos alérgenos teriam potencial direto para penetrar barreiras epiteliais e isso estaria corroborado por duas evidências:

- 1) A descoberta que certos alérgenos de origem ocupacional e doméstica expressam atividade enzimática e,
- 2) A observação de que tais alérgenos podem causar dano epitelial "in vitro".

Pesquisas recentes tem adicionado uma nova dimensão para essa questão por sugerir que certos alérgenos possam ser enzimas de várias classes

proteolíticas, que são conhecidas por causar quebra das interações celulares epiteliais, por mecanismos não citotóxicos (HERBERT & cols., 1993, 1995, 1996). Entretanto é importante assinalar que nem todos os alérgenos precisam ser enzimas pois, segundo ROBINSON (1997), os "alérgenos enzimáticos" poderiam facilitar a apresentação daqueles que não apresentam atividade enzimática.

Existem muitas informações dos ácaros domésticos do gênero *Dermatophagoides* sp., que representam importante origem de alérgenos domésticos. Alguns alérgenos tem sido mostrados ser enzimas digestivas. Os alérgenos dos grupos 1 (considerado o alérgeno "principal") e 4 são cisteínas proteases e amilase, respectivamente, e os dos grupos 3, 6 e 9 correspondem as serinas proteases tripsina-like e quimotripsina-like. Outros ainda permanecem em aberto como o grupo 2, que mostra homologia com a proteína epidêrmica humana, sugerindo que esses alérgenos teriam papel na reprodução dos ácaros (THOMAS & CHUA, 1995).

Outro fator observado foi de que os outros ácaros domésticos estudados mostram homologia entre si, ou seja, a *Der f 1* (*Dermatophagoide farinae* grupo 1) seria uma cisteína protease como a *Der p 1* (*Dermatophagoide pteronyssinus* grupo 1) e *Eur m 1* (*Euroglyphus maynei*). Apesar de sua grande importância na etiologia das doenças respiratórias, pouco se tem na literatura sobre os alérgenos dos ácaros de estocagem.

Na tentativa de caracterizar se as frações A, B e C pertenceriam a alguma classe de proteases, submetemos as frações a ação de diferentes inibidores de protease, com um substrato inespecífico. Observamos que a fração A foi parcialmente inibida por todos inibidores estudados, inclusive por EDTA, que é um inibidor de metaloproteases. Por sua vez a fração B só foi inibida por PMSF,

um inibidor de serina protease. A fração C só respondeu ao Ácido Iodoacético, um inibidor de cisteína protease.

EDWARDS & cols. (1992) fracionaram Meio de Cultura Total de Ao por ultrafiltração e obtiveram 3 frações divididas em <10kDa, >10kDa e <30kDa e uma terceira fração de >30k Da. Ao fazerem ensaio com dois inibidores de protease, um para cisteína e outro para serina, observaram que a fração menor que 10 kDa não apresentou nenhuma resposta enquanto que as outras duas frações apresentaram inibição, frente aos dois inibidores. Por outro lado, maior inibição foi obtida com o inibidor de serina protease, principalmente a fração de peso molecular maior que 30 kDa. Mas, contudo, a associação destes dados com os por nós obtido ainda parece-nos prematura, principalmente porque as nossa frações são obtidas só do corpo do ácaro, livre do meio de cultura, ao contrário desses autores que trabalharam com extrato e Meio de Cultura Total. Essa diferença, entre os procedimentos, só com o corpo do ácaro e o Meio de Cultura Total, foi observada por STEWART & cols. (1994), ao fazerem um estudo comparativo de 3 serinas proteases de *Der p* e *Der f*, observaram um aumento de até sete vezes de proteases quando trabalharam com SCM do que com o corpo de ácaro.

A análise comparativa entre os resultados por nós obtidos e os dados da literatura, possibilita classificar a fração B como pertence ao grupo das serina protease, enquanto que a fração C poderia ser incluída no grupo das cisteínas protease. No entanto, a fração A apresentou características mistas, isto é, tanto atividade cisteína-serina como também para metaloprotease, necessitando ser melhor caracterizada.

HEWITT & cols. (1995, 1997) obtiveram resultados interessantes ao trabalharem com *Der p* 1, considerado o alérgeno "principal" de *Dermatophagoides pteronyssinus*, que sabidamente é uma cisteína protease. Ao

usarem inibidores específicos de cisteína e serina protease, observaram que *Der p 1* exibe uma mistura na atividade cisteína-serina, sugerindo esses autores que se as evidências estruturais mostram que *Der p 1* tem um único sítio ativo, então isso seria explicado pela existência de outras isoformas, e a possibilidade de que *Der p 1* exista em mais de uma forma significa a importância de se caracterizar cada uma das formas e determinar sua habilidade para romper a rede de IgE na superfície epitelial respiratória e provocar a resposta "IgE alérgica".

SILTON & cols. (1991) estudaram a ação de *Ao* e *Der p* em pacientes alérgicos, em Tampa, Flórida, observaram que, apesar de *Ao* não ser comum na poeira doméstica nas casas dessa localidade, foi encontrado alta prevalência de sensibilização principalmente para pessoas asmáticas, enquanto que pacientes só com rinite apresentaram menor sensibilidade. Esses autores também encontraram reatividade cruzada moderada entre *Ao* e *Der p*, pois os testes positivos para *Ao* estavam sempre associados a *Der p*, também positivos. A explicação, possível, segundo esses autores, seria a existência de outros ácaros de estocagem em Tampa, entre eles *Blomia tropicalis*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Chortoglyphus arcuatus*, (como foi observado também por CARABALLO & cols., 1991), haveria reatividade cruzada significativa entre esses ácaros de estocagem e *Ao*, então a resposta observada para *Ao* seria devido a sensibilização para esses outros ácaros de estocagem.

A mesma observação foi feita por PUERTA & cols. (1993), ao estudarem a sensibilização para *Chortoglyphus arcuatus* e *Aleuroglyphus ovatus*, em pacientes alérgicos moradores em Cartagena, Colômbia. *Chortoglyphus arcuatus* é um ácaro comumente encontrado na poeira doméstica das casas dessa localidade, o mesmo não acontecendo a *Ao*. Sugerindo, esses autores que a prevalência de IgE específico para *Ao* seria devido a reatividade cruzada com *Ca* e/ou outras espécies.

A análise da reatividade cutânea, feita em pacientes atópicos, tanto com asma com ou sem rinite como pacientes somente com rinite, no Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia, HC/FCM/UNICAMP, com 3 diferentes ácaros (*Ao*, *Bt*, *Der p*) demonstrou que esses pacientes apresentavam sensibilidade as espécies estudadas. Do total de 89 pacientes com asma c/s rinite, 56% apresentaram reatividade aos 3 ácaros, enquanto que dos 82 pacientes com rinite, 54,8% apresentaram resposta a esses ácaros.

Quanto as respostas aos testes envolvendo somente uma espécie, observou-se que não houve variação, entre os pacientes com asma com ou sem rinite e os pacientes somente com rinite. Um fator observado foi a maior reatividade para *Ao*, em ambos os casos, do que foi observado tanto para *Bt* como para *Der p*. Apesar do alto índice de sensibilidade observado entre os 3 ácaros, *Ao* e *Bt* parece induzir sensibilidade específica, porque, como pode ser observado pelos nossos resultados, 9 pacientes com asma com ou sem rinite e 5 pacientes com rinite apresentaram reação positiva para esse ácaro e negativa para os outros dois ácaros estudados. Um número menor de pacientes, com resultado positivo para *Bt* foi observado. Esses resultados confirmam aos obtidos anteriormente por ZOLLNER & cols.(1992) onde esses autores observaram predominância de testes positivos para *Ao*, seguido pela *Bt* e *Der p*

Esses resultados diferem daqueles obtidos por SILTON & cols. (1991) que relataram que pacientes com asma c/s rinite apresentavam maior reatividade aos ácaros ditos de estocagem, enquanto que pacientes somente com rinite respondiam com maior intensidade aos ácaros de poeira doméstica, porque tanto os pacientes com asma c/s rinite como os pacientes com rinite responderam aos ácaros ditos de estocagem com a mesma intensidade.

ARLIAN & DIPPOOLD (1996), ao fazerem estudos sobre a fecundidade dos *Dermatophagoides*, observaram nas casas co-habitadas por diferentes espécies

de ácaros sempre há uma espécie dominante. Segundo esses autores, não está claro se diferenças nos fatores climáticos dentro dos micro-habitat, no interior das diferentes casas, inter-específica diferenças na biologia dos diferentes ácaros, sob condições climáticas idênticas ou a combinação dos fatores climáticos e biológicos são responsáveis pelas prevalência nas espécies observadas em casas localizadas dentro e entre áreas geográficas. Já havia sido observado por ARLIAN (1992) que a umidade relativa e diferença entre o equilíbrio de água e a água requerida entre *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*, é a chave para a prevalência entre esses ácaros.

Outro fator importante foi estudado por ERASO & cols. (1997). Esses autores observaram, ao estudarem a cinética da expressão dos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*, em culturas de poeira doméstica, que durante a fase de crescimento máximo, os alérgenos eram expressos mais intensamente e em grandes quantidades, bem como o conteúdo de proteínas aumentava para o seu ponto máximo. A diminuição das concentrações dos alérgenos bem como das proteínas, era coincidente com o período em que a fase de mortalidade estava em alta.

Ao se trabalhar com cultura de ácaros outros fatores, além daqueles observado por ERASO & cols. (1997), devem ser considerados. KORT & cols. (1997) notaram que não havia excreção de guanina por *Dermatophagoides pteronyssinus* em ambientes úmidos, por outro lado *Glycyphagus domesticus*, um ácaro de estocagem, apresentou aumento da quantidade de guanina na poeira, provavelmente pela associação de umidade com crescimento de mofo. Segundo esses autores, alérgenos e guanina são produtos metabólicos dos ácaros, quando a dieta dos ácaros muda, a composição dos seus produtos metabólicos também mudará. Em casas úmidas, os ácaros de estocagem comerão, quase, exclusivamente fungo e poderão produzir substâncias irritantes

ou alergênicas diferentes daquelas resultantes de meios ricos em proteínas usados em laboratórios na produção de extratos alérgenos.

LIU & LIN (1998) avaliaram extratos alergênicos de ácaros, *Der p 1*, *Der p 2*, *Der f 1* e *Der f 2*, usados comercialmente, preparados com o corpo total de ácaros, em solução tampão contendo 50% de glicerol e armazenados em geladeira. Esses extratos usados como "standard" manteriam sua integridade imunológica por pelo menos 3 anos. No entanto, não foi observado por esses autores ao fazerem a avaliação desses extratos através de técnica de ELISA e immunoblot. Guardaram os extratos em 4 diferentes temperaturas e por diferentes intervalos de tempo, observaram que com exceção de *Der f 1*, que permanecia estável por pelo menos 3 anos de *Der f 2* por 1 ano, *Der p 1* e *der p 2* encontravam-se menos estáveis. Segundo esses autores, sabe-se que extrato de ácaros contém uma variedade de enzimas proteolíticas e poderiam causar a degradação do alérgeno durante a estocagem e o ideal seria guardar esses extratos em temperaturas baixas em pequenas aliquotas para diminuir a possível degradação.

Outro importante estudo foi descrito por PLATTS-MILLS & CHAPMAN (1987) o qual diferenças de potência entre extratos feitos a partir de cultura de ácaros ou de corpo de ácaros parece refletir diferenças na proporção relativa dos alérgenos dos grupos 1 e 2, segundo esses pesquisadores, extratos de cultura conteriam relativamente mais *Der p 1* do que *Der p 2*, em decorrência de existir nestas culturas, grande número de fezes, sendo *Der p 1* considerado enzima digestiva, enquanto que o extrato do corpo contém relativamente mais *Der p 2*, que parece estar mais concentrado nos corpos de ácaros. Assim, dessas observações, pode-se concluir que a utilização de ácaros, como fonte alergênica, vários fatores terão que necessariamente ser considerados, dentre eles o meio de crescimento, as características do extrato (total, só o corpo ou

partícula fecal do ácaro) e principalmente a metodologia a ser usada nessa avaliação.

A análise de nossos resultados permite afirmar que o Ao é um ácaro classificado como de estocagem que provoca asma e rinite alérgica em pessoas susceptíveis. Sendo que os alérgenos principais parecem ser de baixo peso molecular; reagem com a maioria dos soros de pacientes reativos aos extrato puro de Ao e as 3 frações obtidas pela filtração em gel-sephadex G-75 que mostram identidade proteásica. Através da avaliação dos testes epi-cutâneos, viu-se que dentre os ácaros estudados, 10% dos pacientes respondiam somente a Ao, levando-nos a aventar a possibilidade do Ao apresentar alérgeno espécie-específico.

Acreditamos que na tentativa de atingir os objetivos inicialmente propostos neste trabalho, isto é, a identificação de componentes até então pouco explorados, de alérgenos de baixo peso molecular do ácaro *Aleuroglyphus ovatus*, foi possível reunir subsídios que, em adição aos dados da literatura, poderão facilitar, através da abertura de novos enfoques, o entendimento da participação destes alérgenos como fatores atuantes no desencadeamento das doenças alérgicas. Além disso, mostramos que no processo de extração antigênica, é fundamental a adição de inibidores de protease, devido a natureza proteásica destes alérgenos. Contudo, estudos complementares destes alérgenos serão necessários, principalmente, quanto a determinação da estrutura protéica visando melhor compreensão de sua relação com a resposta imunológica.

RESUMO

Aleuroglyphus ovatus (Ao), ácaro considerado de estocagem, vem adquirindo importância quanto a sensibilização alérgica a pacientes atópicos. Em vista disso, estudos enfocando a caracterização alergênica de seus constituintes têm motivado sua investigação objetivando os principais antígenos envolvidos na imunopatogenia das doenças alérgicas. Submetemos o Extrato total do Ao a diferentes condições e soluções extratoras (PBS, carbonato ácido de amônia e coca). A solução de carbonato ácido de amônia apresentou "capacidade" extratora relativamente maior que as outras soluções. Analisado os tempos de extração de cada solução, estes não mostraram diferenças. Da mesma forma, o perfil eletroforético não mostrou diferenças qualitativas entre os vários produtos extraídos. O uso de inibidores de protease permitiu um melhor perfil cromatográfico dos extratos obtidos com PBS e carbonato, mas não houve diferença de perfil quando a substância extratora utilizada foi coca. Após diálise por 24 horas, obtinha-se um perfil de eluição protéico bem definido, ao contrário da diálise por 48 horas, na qual não foi observado perfil de eluição. Quando os extratos foram submetidos a filtração em Gel Sephadex G-75, obtivemos 3 frações, designadas de frações A, B e C. Ao emprega-las em testes epicutâneos para verificação da reatividade em pacientes atópicos, notou-se que apesar da fração A apresentar diâmetro de pápula maior que as outras duas frações, o número de pacientes reativos a fração C foi maior. A análise através de eletroforese de gradiente mostrou que as frações A e B apresentaram peptídeos de P.M. variando de 30 a 70 kDa, enquanto que a fração C apresentou bandas de P.M. abaixo de 30 kDa, demonstrado pelo sistema de tricina em gel. O perfil alergênico analisado por SDS-PAGE imunoblot, empregando-se soros de pacientes reativos aos testes epicutâneos ao Ao, é constituído por antígenos que variaram entre 12 e 70 kDa com a reatividade antigênica concentrada na faixa de peso molecular menor que 46 kDa. A análise comparativa entre os resultados por nós obtidos e os dados da literatura,

possibilita classificar a fração B como pertence ao grupo das serinas proteases, enquanto que a fração C poderia ser incluída no grupo das cisteínas protease. No entanto, a fração A apresentou características mistas, isto é, tanto atividade cisteína, serina e metaloprotease, necessitando melhor caracterização. Comparando-se a reatividade a testes epi-cutâneos, dos extratos solúveis dos ácaros *Ao*, *Bt* e *Der-p*, pacientes apresentando rinite alérgica ou asma brônquica associada ou não a rinite, apresentaram frequência maior de testes epi-cutâneos positivos ao *Ao* do que para *Bt* e *Der p*.

SUMMARY

Clinical reports have suggested an unusual frequency in skin prick test of atopic patients using *Aleuroglyphus ovatus* (Ao), a storage mite, as allergen. To evaluate the most important Ao antigenic fractions we submitted the Ao to different conditions of extractions. Three extractors solutions were investigated, ammonium acid carbonate, phosphate buffer saline and bicarbonate solution (Coca solution). The soluble antigens were analyzed by SDS-PAGE; Gel filtration; High performance chromatography (HPLC) in reverse phase; Immunoblotting and skin prick test (spt). To characterize the biochemical properties of the fractions, the fractions obtained were assessed by protease's assay. The gel filtration (sephadex G-75) allowed a fractionation of Ao in 3 "pools" of fractions: A, B and C. Patients test with those fraction were reactive to all of them. Nevertheless, the frequency of the reactivity of fraction C was higher than A or B. Immunoblotting showed a specific binding on the Ao fractions; molecular weights ranged from <12 to 70 kDa. Our results compared to the literature allow biochemical classification: Faction B belonging to serine protease group; Fraction C as a cystein protease. Fraction A showed mixed properties, cystein-protease, serine and metaloprotease. Finally, to assess possible differences among allergenic sensitivity to *Aleuroglyphus ovatus*, *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* atopic, patients with asthma or rinitis were tested. Patients with allergic rhinitis or asthma, associated or not to rhinitis presented higher frequency of positive spt to *Aleuroglyphus ovatus* than to *Blomia tropicalis* or *Dermatophagoides pteronyssinus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, K. - What makes an allergen an allergen? *Allergy* 33:3-14, 1978.

AKI, T.; FUJIKAWA, A; WADA, T.; JYO, T.; SHIGETA, S.; MOROOKA, Y. and ONO, K. - Cloning and expression of cDNA coding for a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*: homologia with human heat shock cognate proteins in the heat shock protein 70 family. *J. Biochem.* 115:435-440, 1994 a.

AKI, T.; ONO, K.; PAIK, S.; WADA, T.; JYO, T.; SHIGETA, S.; MUROOKA, Y. and OKA, S. - Cloning and characterization of cDNA coding for a new allergen from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 103:349-356, 1994 b.

AKI, T.; KODAMA, T.; FUJIKAWA, A.; MIURA, K.; SHIGETA, S.; WADA, T.; JYO, T.; MOROOKA, Y.; OKA, S. and ONO, K. - Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *J.Clin. Immunol.* 96:74-83, 1995.

AMBRÓZIO, L. C.; BAGGIO, D. and MELLO, J. F. - *Suidásia pontificiae* - Alergizante de vias aéreas. *Rev. Alergia e Imunopatol.* 11:172, 1988 (Abstract).

AMBRÓZIO, L. C.; BAGGIO, D.; MORI, J. C.; et.al. - Avaliação de antígenos de *Blomia tropicallis* em comparação com outros ácaros do pó domiciliar. *Cad.Immunol.Alergol.Pediatr.* 4:24, 1989.

ANDO, T.; INO, Y.; HAIDA, M.; HONMA, R.; MAEDA, H.; YAMAKAWA, H.; IWAKI, M. and OKUDAIRA, H. - Isolation of cysteine protease in the crude mite

extract, *Dermatophagoide farinae* . Int.Arch.Allergy Appl.Immunol. 96:199-205, 1991.

ANSOTEGUI, I. J.; HARFAST, B.; JEDDI-TEHRANI, M.; JOHANSSON, E.; JOHANSSON, S. G. O.; VAN HAGE-HAMSTEN, M. and WIGZELL, H. - Identification of a new major allergen of 39 kilodaltons of the storage mite. Immunol. Lett. 29:229-234, 1991.

ARLIAN, L. G.; BERNSTEIN, D.; BERNSTEIN, I. L.; FRIEDMAN, S.; GRANT, A.; LIEBERMAN, P.; LOPEZ, M.; METZGER, J.; PLATTS-MILLS, T.; SCHATZ, M.; SPECTOR, S.; WASSERMAN, S. I. and ZEIGER, R. S. - Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. J. Allergy Clin. Immunol. 90:292-300, 1992.

ARLIAN, L. G.; VYSZENSKI-MOHER, D. and FERNANDEZ-CALDAS, E. - Allergenicity of the mite *Blomia tropicalis*. J. Allergy Clin. Immunol. 91:1042-1050, 1993.

ARLIAN, L. G. & DIPPOLD, J. S. - Development and fecundity of *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae). J.Med.Entomol. 33(2):257-260, 1996.

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

BAGGIO, D. & CORDARO, C. - Household mites from Brazil summary and annual seasonal variation. Anais do XIX International Congress of Entomology, Beijing, China, 1991.

BALDO, B. - Standardization of allergens. Allergy 38:535-546, 1983.

BERARDINO, L. D.; ANGRISANO, A.; GORLI, L.; CATTANEO, M. and LODI, A.
- Allergy to house dust and storage mites in children: epidemiologic observations.
Ann. Allergy 59:104-106, 1987.

BEYNON, R. J. - Prevention of uncontrolled proteolysis. In: "Protein Purification Methods" - A practical approach. ed: Harris, E. L. V and Angal, S., pp 40-51.
Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, 1995.

BONER, A. L.; RICHELLI, C. and VALLONE, G. - Skin and serum reactivity to some storage mites in children sensitive to *Dermatophagoides pteronyssinus*.
Ann. Allergy 63:82-85, 1989 .

BYRON, K. A.; O'BRIEN, R. M.; VARIGOS, G. A. and WOOTTON, M. -
Dermatophagoides pteronyssinus 2-induced Interleukin-4 and Interferon-g
Expression by Freshly Isolated Lymphocytes of Atopic Individuals. Clin. Exp.
Allergy 24:878-883, 1994.

CARABALLO, L.; PUERTA, L.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E. and LOCKEY, R. F. -
Crossreactivity among *Aleuroglyphus ovatus*, *Chortoglyphus arcuatus*, and
Dermatophagoides pteronyssinus. J. Allergy Clin. Immunol. 87(1):189, 1991
(abstract).

CARDOT, E.; PESTEL, J.; CALLEBAUT, T.; LASSALLE, P.; TSICOPOULOS, A.;
GRAS-MASSE, H.; CAPRON, A. and JOSEPH, M. - Specific activation of
platelets from patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* by synthetic
peptides derived from allergen *Der p 1*. Int.Arch.Allergy Immunol. 88:127- 134,
1992.

CHAPMAN, M.D. & PLATTS-MILLS, T.A.E. - Purification and characterization of
the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* - Antigen *P 1*. J.
Immunol. 125:587-592, 1980.

CHAPMAN, M. D.; SUTHERLAND, W. N. and PLATTS-MILLS, T. A. E. - Recognition of two *Dermatophagoides pteronyssinus* - specific epitopes on antigen *P 1* using monoclonal antibodies: binding to each epitope can be inhibited by sera from dust mite-allergic patients. *J. Immunol.* 133:2488-2495, 1984.

CHAPMAN, M. D.; HEYMANN, P.W.; SPORIK, R.B. and PLATTS-MILLS, T.A.E. - Monitoring allergen exposure in asthma: new treatment strategies. *Allergy* 50 (Suppl. 25): 29-33, 1995.

CHAPMAN, M.D.; SMITH, A. M.; VAILES, L. D. and ARRUDA, L. K. - Recombinante mite allergens. *Allergy* 52:374-379, 1997.

CHOU, P. Y. & FASMAN, G. D. - Empirical predictions of protein conformation. *Ann.Rev.Biochem.* 47:251-276, 1978.

CHUA, K. Y.; DOYLE, C. R.; DILWORTH, R. J.; CAMERON, K. J.; TURNER, K. J.; STEWART, G. A. and THOMAS, W. R. - Expression and analysis of cDNA coding for the house dust mite allergens *Der p 1* and *Der p 2*. *NER Allergy Proceedings-Abstract* 667: 415, 1988(a).

CHUA, K. Y.; STEWART, G. A.; THOMAS, W. R.; SIMPSON R. J.; DILWORTH, R. J.; PLOZZA, T. M. and TURNER, K. J. - Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen *Der p 1*. Homology with cysteine proteases. *J.Exp.Med.* 167:175- 182, 1988(b).

CHUA, K. Y.; DILWORTH, R. J. and THOMAS, W. R. - Expression of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen, *Der p 2*, in *Escherichia coli* and the binding studies with human IgE. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91:124-129, 1990.

COOKE, R. A. - Studies in specific hypersensitiveness. IV. New etiologic factors in bronchial asthma. *J. Immunol.* 7:142, 1922.

CROMWELL, O. - Mediators in allergen-induced asthma. In: "The allergic basis of asthma" ed. A. B. Kay, pp 197-216 London: Balliere & Tindall, 1988.

CUTHBERT, O. D.; BROSTOFF, J.; WRAITH, D.G. and BRIGHTON, W. D. - Barn allergy: asthma and rhinitis due to storage mites. Clin. Allergy 9:229-236, 1979.

DEKKER, H. - Asthma and Milben. Munch.Med.Wochenschr. 75:515, 1928 (Trad. J. Allergy Clin. Immunol. 48: 251, 1971).

EBNER, C.; FELDNER, H.; EBNER, H. and KRAFT, D. - Sensitization to storage mites in house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergic patients. Comparison of a rural and a urban population. Clin. Exp. Allergy 24:347-352, 1994.

EDWARDS, T. B.; TRUDEAU, W. L.; FERNANDEZ-CALDAS E; LEE, D. K.; SELEZNICK, M. J. and LOCKEY, R. F. - Proteinases in extracts of the storage mite, *Aleuroglyphus ovatus*. J. Allergy.Clin.Immunol. 90:129-131, 1992.

ERASO, E.; GUI SANTES, J. A.; MARTÍNEZ, J.; SÁENZ-DE-SANTAMARIA, M.; MARTÍNEZ, A.; PALACIOS, R. and CISTERNA, R. - Kinetics of allergen expression in cultures of house dust mites, *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae). J. Med. Entomol. 34(6):684-689, 1997.

FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; FOX, R. W.; BUCHOLZ, G. A.; TRUDEAU, W. L. and LOCKEY, R. F. - House dust mite allergy in Florida. Mite survey in households of mite sensitive individuals in Tampa, Florida. Allergy Proceedings 11:263-267, 1990.

FERNANDEZ, A. M.; PATINO, C. M.; SALVUCCI, K. D. - Prevalence of skin test sensitivity to 6 mite Species in asthmatic adults. J. Allergy Clin.Immunol. 91:354, 1993.(Abstract).

FERRÁNDIZ, R.; CASAS, R.; DREBORG, S.; EINARSSON, R. and FERNÁNDEZ, B. - Crossreactivity between *Dermatophagoides siboney* and other house dust mite allergen in sensitized asthmatic patients. Clin. Exp. Allergy 25:929-934, 1995.

FINKELMAN, F. D. and URBAN, J. F. Jr. - Cytokines: making the right choice. Parasitology Today 8:311-314, 1992.

FORD, A.; SEAGROATT, V.; PLATTS-MILLS, T. A. E. and LOWENSTEIN, H. - A collaborative study on the first international standard of *Dermatophagoides pteronyssinus* (house dust mite) extract. J. Allergy Clin. Immunol. 75:676-686, 1985.

FOX, R. W.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; BUCHOLTZ, G. A. - Tampa Bay house dust mite survey. J. Allergy Clin. Immunol. 79:194, 1987 (Abstract).

FUJIKAWA, A.; ISHIMARU, N.; SETO, A.; YAMADA, H.; AKI, T.; SHIGETA, S.; WADA, T.; JYO, T.; MUROOKA, Y.; OKA, S. and ONO, K. - Cloning and characterization of a new allergen, Mag 3, from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*: cross-reactivity with high-molecular-weight allergen. Molec. Immun. 33(3):311-319, 1996.

GABRIEL, M.; CUNNINGTON, A. M.; ALLAN, W. G. L.; PICKERING, C. A. C. and WRAITH, D. G. - Mite allergy in Hong-Kong. Clin. Allergy 12:157-171, 1982.

GASGAN, H.; GAUCHAT, J. F.; RONCAROLO, M. G.; YSSEL, H.; SPITES, H. and URIES, J. E. - Human B cell clones can be induced to proliferative and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. J. Exp. Med. 173:747-750, 1991.

GOLDBERG, A. L. and DICE, J. F. - Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. Annu. Rev. Biochem. 43:835-869, 1974.

GRIFFIN, P.; FORD, A. W.; ALTERMAN, L.; THOMPSON, J.; PARKINSON, C.; BLAINEY, A. D.; DAVIES, R. J. and TOPPING, M. D. - Allergenic and antigenic relationship between three species of storage mite and the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. J. Allergy Clin. Immunol. 84:108-117, 1989.

HAIDA, M.; OKUDAIRA, H.; OGITA, T.; ITO, K.; MIYAMOTO, T.; NAKAJIMA, T. and HONGO, O. - Allergens of the house dust mite *Dermatophagoides farinae* - Immunochemical studies of four allergenic fractions. J. Allergy Clin. Immunol. 75:686-692, 1985.

HARFAST, B.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; ANSOTEGUI, I. J.; JOHANSSON, E.; JEDDI-TEHRANI, M. and JOHANSSON, S. G. O. - Monoclonal antibodies to *Lepidoglyphus destructor*: delineation of crossreactivity between storage mites and house dust mites. Clin. Exp. Allergy 22:1032-1037, 1992.

HARTREE, E. F. - Determination of protein. A modification of Lowry method that gives a linear photometric response. Ann. Biochem. 48:422, 1972.

HEINIG, J. H.; MOSBECH, H. and HAUGAARD, L. - Diagnosis of house dust mite allergy. Allergy 46(Suppl.):19-22, 1991.

HERBERT, C. A.; EDWARDS, D.; BOOT, J. R. and ROBINSON, C. - Stimulated eosinophils and proteinases augment the transepithelial flux of albumin in bovine bronchial mucosa. Br. J. Pharmacol. 110:840-846, 1993.

HERBERT, C. A.; KING, C. M.; HOLGATE, S. T.; STEWART, G. A.; THOMPSON, P. J. and ROBINSON, C. - Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the dust mite allergen, *Der p 1*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 12:369-378, 1995.

HERBERT, C. A.; ARTHUR, M. J. P. and ROBINSON, C. - Eosinophils augment gelatinase activity in the airway mucosa. Comparative effects as a putative mediator of epithelial injury. *Br. J. Pharmacol.* 117:667-674, 1996.

HEWITT, C. R. A.; BROWN, A. P.; HART, B. J. and PRITCHARD, D. I. - A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J. Exp. Med.* 182:1537-1544, 1995.

HEWITT, C. R. A.; HORTON, H.; JONES, R. M. and PRITCHARD, D. I. - Heterogeneous proteolytic specificity and activity of the house dust mite proteinase allergen *Der p 1*. *Clin. Exp. Allergy* 27:201-207, 1997.

HEYMANN, P. W.; CHAPMAN, M. D.; AALBERSE, R. C.; FOX, J. W. and PLATTS-MILLS, T. A. E. - Antigenic and structural analysis of group II allergens (*Der-f 2* and *Der-p 2*) from house dust mites (*Dermatophagoides spp.*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:1055-1067, 1989.

HURTADO, I.; PARINI, M. - House dust mites in Caracas, Venezuela. *Ann.Allergy* 59:128-130, 1987.

INGRAM, C. G.; JEFFREY, I. G.; SYMINGTON, I. S.; GUTHBERT, O. D. - Bronchial provocation studies in farmers allergic to storage mites. *Lancet* 2:1330-1332, 1979.

INO, Y.; ANDO, T.; HAIDA, M.; NAKAMURA, K.; IWAKI, M.; OKUDAIA, H. and MIYAMOTO, T. - Characterization of the proteases in the crude mite extract. *Int.Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89:321-326, 1989.

IVERSEN, M. and DAHL, R. - Allergy to storage mites in asthmatic patients and its relation to damp housing conditions. *Allergy* 45:81-85, 1990.

JOHANSSON, E.; BORGA, A.; JOHANSSON, S. G. O. and VAN HAGE-HAMSTEN, M. - Immunoblot multiallergen inhibition studies of allergen crossreactivity of the dust mite *Lepidoglyphus destructor* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. Clin. Exp. Allergy 21:511-518, 1991.

JOHANSSON, E.; HARFAST, B.; JOHANSSON, S. G. O. - Assay for quantification of a *Lepidoglyphus destructor* allergen in dust samples. J. Allergy Clin.Immunol. 91:354, 1993 (Abstract).

JOHANSSON, E.; HARFAST, B.; JOHANSSON, S. G. O. and VAN HAGE-HAMSTEN, M. - IgG1 and IgG4 antibody responses to the dust mite *Lepidoglyphus destructor* in a naturally exposed farming population. Allergy 50:473-477, 1995.

JOHANSSON, E.; SCHMIDT, M.; JOHANSSON, S. G. O.; MACHADO, L.; OLSSON, S. and VAN HAGE-HAMSTEN, M. - Allergenic crossreactivity between *Lepidoglyphus destructor* and *Blomia tropicalis*. Clin. Exp. Allergy 27:691-699, 1997.

JOOST VAN NEERVEN, R. J.; EBNER, C.; YSSEL, H.; KAPSENBERG, M. L. and LAMB, J. R. - T-cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance. Immunol. Today 17(11):526-531, 1996

JORGE-NETO, J.; CROCCE, J.; and BAGGIO, D. - Ácaros da poeira domiciliar em habitação na cidade de São Paulo. Rev.Bras. Alergia e Imunopatol. 2:140, 1980.

KAWAI, T.; MARSH, D. G.; LICHTENSTEIN, L.; and NORMAN, P. S. - The Allergens responsible for house dust allergy. I. Comparison of *Dermatophagoides pteronyssinus* and house dust extracts by assay of histamine release from allergic human leukocytes. J. Allergy Clin.Immunol. 50:117-127, 1972.

KAY, A. B. - Mechanisms in allergic and chronic asthma which involve eosinophils, neutrophils, lymphocytes and other inflammatory cells, In: "The allergic basis of asthma" ed. A. B. KAY, pp 1-14, London: Balliere & Tindall, 1988.

KENT, N. A.; HILL, M. R.; KEEN, J. N.; HOLLAND, P. W. H. and HART, B. J. - Molecular characterization of group I allergen *Eur m 1* from house dust mite *Euroglyphus mainei*. Int. Arch. Allergy Immunol. 99:150-152, 1992.

KERN, R. A. - Dust sensitization in bronchial asthma. Med. Clin. North Am. 5:751-758, 1921.

KING, T. P. - Chemical and biological properties of some atopic allergens. Adv. Immunol. 23:77-105, 1976.

KING, T. P. - Purification and characterization of atopic allergens. Allergy 35:169-171, 1980.

KING, T. P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D. G.; PLATTSMILLS, T. A. E. and THOMAS, W. - Allergen nomenclature WHO/IUIS allergen nomenclature subcommittee. Clin. Exp. Allergy 25:27-37, 1995.

KING, C.; SIMPSON, R. J.; MORITZ, R. L.; REED, G. E.; THOMPSON, P. J. and STEWART, G. A. - The isolation and characterization of a novel collagenolytic serine protease allergen (*Der p 9*) from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. J. Allergy Clin. Immunol. 98:739-747, 1996.

KORT, H. S. M.; SCHÖBER, G.; KOREN, L. G. H. and SCHARRINGA, J. - Mould-devouring mites differ in guanine excretion from dust-eating Acari, a possible error source in mite allergen exposure studies. Clin. Exp. Allergy 27:921-925, 1997.

LAEMMLI, U. K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T. - Nature 227:680, 1970.

LIN, K. L.; HSIEH, K. H.; THOMAS, W. R.; CHIANG, B. L. and CHUA, K. Y. - Characterization of *Der p V* allergen, cDNA analysis, and IgE mediated reactivity to the recombinant protein. - J. Allergy Clin. Immunol. 94:989-996, 1994.

LIND, P. - Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. J. Allergy Clin. Immunol. 76:753-761, 1985.

LIND, P.; INGEMANN, L. and BROUVEZ, M. - Demonstration of species-specific sensitization to major allergens of *Dermatophagoides* species by solid-phase absorption of human IgE antibodies. Scand. J. Immunol. 25:1-10, 1987.

LIND, P.; HANSEN, O. C. and HORN, N. - The binding of mouse hybridoma and human IgE antibodies to the major fecal allergen, *Der pI*, of *Dermatophagoides pteronyssinus*. J. Immunol. 140:4256-4262, 1988.

LIU, T. and LIN, Y. - The epitope stability of Group 1 and Group 2 allergens in mite extracts. Ann. Allergy Asthma Immunol. 80:177-183.

LOWENSTEIN, H. - Quantitative immunoelectrophoretic methods as a tool for the analysis and isolation of allergens. Prog. Allergy 25:1-62, 1978.

LUCZYNSKA, C. M.; GRIFFIN, P.; DAVIES, R. J. and TOPPING, M. D. - Prevalence of specific IgE to storage mites (*A.siro*, *Lepidoglyphus destructor* and *T. longior*) in an urban population and crossreactivity with the house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*). Clin. Exp. Allergy 2:403-406, 1990.

LUNDGREN, M.; PERSSON, V.; LARSSON, P.; MAGNUSSON, C.; SMITH, C. I. E.; HAMMARSTROM, L. and SEVERINSON, E. - Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG 4 in human B cells. Eur. J. Immunol. 19:1311-1315, 1989.

MARSH, D. G. - Allergens and genetic of allergy. In Sela, M (ed)"The Antigens". Vol. IV, N.Y.; Acad. Press., Inc., 1975.

MARSH, D. G.; GOODFRIEND, L.; KING, T. P.; LOWENSTEIN, H. and PLATTS-MILLS, T. A. E. - Allergen nomenclature. Bull. WHO 64: 767-770, 1986.

MARSH, D. G.; GOODFRIEND, L.; KING, T. P.; LOWENSTEIN, H. and PLATTS-MILLS, T. A. E. - Allergen nomenclature. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 85:194-200, 1988.

MARUO, K.; AKAIKE, T.; MATSUMURA, Y.; KOHMOTO, S.; INADA, Y.; ONO, T.; ARAO, T. and MAEDA, H. - Triggering of the vascular permeability reaction by activation of the Hageman factor-prekallikarein system by house dust mite proteinase. Biochem. Biophys. Acta 1074:62-68, 1991.

MARUO, K.; AKAIKE, T.; INADA, Y.; OHKUBO, I.; ONO, T. and MAEDA, H. - Effect of microbial and mite proteases on low and high molecular weight kininogens. J. Biol. Chem. 268(24):17711-17715, 1993.

MARUO, K.; AKAIKE, T.; ONO, T.; OKAMOTO, T. and MAEDA, H. - Generation of anaphylatoxins through proteolytic processing of C3 and C5 by house dust mite protease. J. Allergy Clin. Immunol. 100:253-260, 1997.

MEYER, C. H.; BOND, J. F.; CHEN, M. S. and KASAIAN, M. T. - Comparison of the levels of the major allergens *Der p 1* and *Der p 2* in standardized extracts of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. Clin. Exp. Allergy 24:1041-1048, 1994.

MIYAMOTO, T.; OSHIMA, S.; ISHIZATI, T. and SATO, S. - Allergenic identity between the common floor mite (*Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961) and house dust as a causative antigen in bronchial asthma. J. Allergy 42:14-28, 1968.

MIYAMOTO, T.; OSHIMA, S. and ISHIZAKI, T. - Antigenic relation between house dust and a dust mite, *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961, by a fractionation method. J. Allergy 44:282-291, 1969.

MIYAMOTO, T.; OSHIMA, S.; MIZUNO, K.; SASA, M. and ISHIZAKI, T. - Cross-antigenicity among six species of dust mites and house dust antigens. J. Allergy 44(4): 228-238, 1969.

MORGAN, M. S.; ARLIAN, L. G. and FERNÁNDEZ-CALDAS, E. - Cross-allergenicity of the house dust mites *Euroglyphus maynei* and *Blomis tropicalis*. Ann. Allergy Asthma Immunol. 77:386-392, 1996.

MULLER-EBERHARD, H. J. - Molecular organization and function of the complement system. Annu. Rev. Biochem. 57:321-347, 1988.

NORTH, M. J. - Prevention of unwanted proteolysis. In: "Proteolytic enzymes." - a practical approach. ed: Beynon, R. J. and Bond, J. S. pp:105-124. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, 1994.

O'HEHIR, R. E.; GARMAN, R. D.; GREENSTEIN, J. L. and LAMB, J. R. - The specificity and regulation of T-cell responsiveness to allergens. Annu Rev. Immunol. 9:67-95, 1991

O'NEILL, G. M.; DONOVAN, G. R. and BALDO, B. A. - Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. Biochim. Biophys. Acta 1219:521-528, 1994

O'NEILL, G. M.; DONOVAN, G. R.; BALDO, B. A. - Glutathione S-Transferase a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. Immunol. Letters 48:103, 1995.

ORTENZI, A. V. & ZOLLNER, R. L. - Sistema imunológico e a anestesia. In: "Atualização em anesthesiologia - Volume III" ed: Galvão Vianna, P. T. and Ferez, D. pp. 108-127. Ambito Editores, São Paulo, Brasil, 1997.

OSADA, T.; NORO, N.; KURODA, Y. and IKAI, A. - Murine T cell proliferation can be specifically augmented by macrophages fed with specific antigen: alpha 2-macroglobulin conjugates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146:26-31, 1987.

PARRONCHI, P.; MACCHIA, D.; PICCINNI, M. P.; BISWAS, P.; SIMONELLI, C.; MAGGI, E.; RICCI, M.; ANSARI, A. A. and ROMAGNANI, S. - Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 88:4538-4543, 1991.

PEPYS, J. - Skin Testing. *Br. J. Hosp. Med.* 14:412, 1975.

PINHO-JR., A. J.; AMBRÓZIO, L. C.; BAGGIO, D. and ZOLLNER, R. L. Caracterização das frações antigênicas dos ácaros, *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus*, mais importantes na sensibilidade de indivíduos atópicos. *Rev. Bras. Alergia e Imunopatol.* 15:37, 1992 (Abstract).

PINHO-JR., A. J.; ZOLLNER, R. L. - Prevalência de sensibilização a ácaros de poeira domiciliar em pacientes atópicos, na Região de Campinas, SP. *Rev. Bras. Alergia e Imunopatol.* 15:82, 1992 (Abstract).

PLATTS-MILLS, T. A. E. and CHAPMAN, M. D. - Dust mites: immunology, allergic disease and environmental control. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80:755-775, 1987.

PLATTS-MILLS, T. A. E. and DE WECK, A. L. - Dust mite allergens and asthma - A world wide problem. *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:416-427, 1989.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C. and CHAPMAN, M. D. - Indoor allergens and asthma: Report of the Third International Workshop. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100:S1-S24, 1997.

POLLART, S. M.; CHAPMAN, M. D.; FIOCCO, G. P.; ROSE, G. and PLATTS-MILLS, T. A. E. - Epidemiology of acute asthma: IgE antibodies to common inhalant allergens as a risk factor for emergency room visits. *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:875-882, 1989.

PRICE, J. A.; POLLOCK, I.; LITTLE, S. A.; LONGGBOTTOM, J. L. and WARNER, J. O. - Measurement of airborne mite antigen in homes of asthmatic children. *Lancet* 336:895-897, 1990.

PUERTA, L.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; CARABALLO, L. R. and LOCKEY, R. F. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides* spp.-allergic individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88:943-950, 1991.

PUERTA, L.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; LOCKEY, R. F. and CARABALLO, L. R. Sensitization to *Chortoglyphus arcuatus* and *Aleuroglyphus ovatus* in *Dermatophagoides* spp.-allergic individuals. *Clin. Exp. Allergy* 23:117-123, 1993.

PUERTA, L.; MERCADO, R.; MARTINEZ, B. - Emergency room asthma and domestic mites in Cartagena, Colombia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:354, 1993(Abtract).

ROBINSON, C.; KALSHEKER, N. A.; SRINIVASAN, N.; KING, C. M.; GARROD, D. R.; THOMPSON, P. J. and STEWART, G. A. - On the potential significance of the enzymatic activity of mite allergens to immunogenicity. Clues to structure and function revealed by molecular characterization. *Clin. Exp. Allergy* 27:10-21, 1997.

SCHAGGER, H and von JAGOW, G. - Tricine - sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166:368-397, 1987.

SCHEINER, O. - Recombinant Allergens: Biological, immunological and practical aspects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 98:93-96, 1992.

SCHOU, C. and LIND, P. - The Antigenicity of House dust mites.

Allergy 46(Supp.11):10-13, 1991.

SHEN, H. D.; CHUA, K. Y.; LIN, K. L.; HSIEH, K. H. and THOMAS, W. R. - Molecular cloning of a house dust mite allergen with common antibody binding specificities with multiple components in mite extracts. *Clin. Exp. Allergy* 23:934-940, 1993.

SHEN, H. D.; CHUA, K. Y.; LIN, W. L.; HSIEH, K. H. and THOMAS, W. R. - Molecular cloning and immunological characterization of the house dust mite allergen *Der f 7*. *Clin. Exp. Allergy* 25:1000-1006, 1995.

SILTON, R. P.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; TRUDEAU, W. L.; SWANSON, M. C. and LOCKEY, R. F. - Prevalence of specific IgE to the storage mite *Aleuroglyphus ovatus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88:595-603, 1991.

SMITH, W. A.; CHUA, K. Y.; KUO, M. C.; ROGERS, B. L. and THOMAS, W. R. - Cloning and sequencing of the *Dermatophagoides pteronyssinus* group III allergen, *Der p III*. *Clin. Exp. Allergy* 24:220-228, 1994.

SMITH, W. A. and THOMAS, W. R. - Comparative analysis of the genes encoding group 3 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 109:133-140, 1996.

STANALAND, B. E.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; JACINTO, C. M.; TRUDEAU, W. L. and LOCKEY, R. F. - Sensitization to *Blomia tropicalis*: Skin test and cross-reactivity studies. J. Allergy Clin. Immunol. 94:452-457, 1994.

STEWART, G. A.; KOLLINGER, M. R.; KING, C. M. and THOMPSON, P. J. - A comparative study of three serine proteases from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*. Allergy 49:553-560, 1994.

STEWART, G. A.; WARD, L. D.; SIMPSON, R. J. and THOMPSON, P. J. - The group III allergen from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is a trypsin-like enzyme. Immunology 75:29-35, 1992.

STEWART, G. A. and THOMPSON, P. J. - The biochemistry of common aeroallergens. Clin. Exp. Allergy 26:1020-1044, 1996.

TAKAHASHI, K.; AOKI, T.; KOHMOTO, S.; NISHIMURA, H.; KODERA, Y.; MATSUSHIMA, A. and INADA, Y. - Activation of kallikrein-kinin system in human plasma with purified serine protease from *Dermatophagoides farinae*. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 91:80-85, 1990.

TERHO, E. O.; HUSMAN, K.; VOHLONEN, I.; RAUTALAHTI, M. and TUKIAINEN, H. Allergy to storage mites or cow dander as a cause of rhinitis among Finnish dairy farmers. Allergy 40:23-26, 1985.

THOMAS, W. R. - Mite allergens groups I - VII. A catalogue of enzymes. Clin. Exp. Allergy 23:350-353, 1993.

THOMAS, W. R. and CHUA, K. Y. - The major mite allergen *Der p 2* - a secretion of the male mite reproductive tract?. Clin. Exp. Allergy 25:666-669, 1995

THOMAS, W. R.; SMITH, W.; HALES, B. J. and CARTER, M. D. - Functional effects of polymorphisms of house dust mite allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:96-98, 1997

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

TOVEY, E. R.; JOHNSON, M. C.; ROCHE, A. L.; GOBON, G. S. and BALDO, B. A. Cloning and sequencing of a cDNA expressing a recombinant house dust mite protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen. *J. Exp. Med.* 170:1457-1462, 1989.

TRUDEAU, W. L.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; MAY, J. J.; PRATT, D. S. and LOCKEY, R. F. - Allergenicity of the mite *Chortoglyphus arcuatus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 85:238, 1990 (Abstract).

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

VAN BRONSWIGK, J. E. M. H.; BISCHOFF, E.; SCHIRMACHER, W. and KNIEST, F. M. - Evaluating mite (Acari) allergenicity of house dust by guanine quantification. *J. Med. Entomol.* 26:55-59, 1989.

VAN DER HEIDE, S.; NIEMEIJER, N. R.; HOVENGA, H.; de MONCHY, J. G. R.; DUBOIS, A. E. J. and KAUFFMAN, H. F. *Allergy* 53:426-430, 1998.

VAN HAGE-HAMSTEN, M.; JOHANSSON, S.G.O.; HOGGLUND, S; TULL, P.; WIRÉN, A. and ZETTERSTROM, O. - Storage mite allergy is common in a farming population. *Clin. Allergy* 15:555-565, 1985

VAN HAGE-HAMSTEN, M.; JOHANSSON, S.G.O.; JOHANSSON, E. and WIREN, A. - Lack of allergenic cross-reactivity between storage mites and *Dermatophagoides pteronyssinus*. Clin. Allergy 17:23-31, 1987.

VAN HAGE-HAMSTEN, M.; JOHANSSON, S.G.O. and ZETTERSTRÖMS, O. - Predominance of mite allergy over allergy to pollens and animal danders in a farming population. Clin. Allergy 17:417-423, 1987.

VAN HAGE-HAMSTEN, M.; MACHADO, L.; BARROS, M.T. & JOHANSSON, S.G.O. - Comparison of clinical significance and allergenic cross-reactivity of storage mites *Blomia kulagini* and *Lepidoglyphus destructor* in Sweden and Brazil. Allergy 45:409-417, 1990.

VAN HAGE-HAMSTEN, M.; BERGMAN, T.; and JOHANSSON, M. - N-Terminal aminoacid sequence of major allergen of the mite *Lepidoglyphus destructor*. J. Allergy Clin. Immunol. 91:353, 1993 (Abstract).

VAN HAGE-HAMSTEN, M.; OLSSON, S. and EMILSON, A. - Localization of major allergens in the dust mite *Lepidoglyphus destructor* with confocal laser scanning microscopy. Clin. Exp. Allergy 25:536-542, 1995.

VAN NEERVEN, R. J.; EBNER, C.; YSSEL, H.; KAPSENBURG, M. L. and LAMB, J. R. - T cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance. Immunol. Today 17:526-532, 1996.

VENTAS, P.; CARREIRA, J. and POLO, F. - Identification of IgE-binding proteins from *Lepidoglyphus destructor* and production of monoclonal antibodies to a major allergen. Immunol. Letters 29:229-234, 1991.

VOORHORST, R. and SPIEKSMABOEZEMAN, M. I. A. - Is a mite (*Dermatophagoides spp*) the producer of house dust allergen?. Allergy Asthma 10:329-334, 1964.

VOORHORST, R.; SPIEKMA, F. T. M.; VAREKAMP, H.; LEUPEN, M. J. and LYKLEMA, A. W. - The house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and allergens it produces. Identify with the house-dust allergen. J. Allergy 39:325-339, 1967.

VRTALA, S.; GROTE, M.; DUCHENE, M.; VAN REE, R.; KRAFT, D.; SCHEINER, O. and VALENTA, R. - Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity. Int. Archs. Allergy Immunol. 102: 160-169, 1993.

WIERENGA, E. A.; SNOEK, M.; de GROOT, C.; CHRÉTIEN, I.; BOS, J. D.; JANSEN, H. M. and KAPSENBERG, M. L. - Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4⁺ T lymphocytes in atopic patients. J. Immunol. 144:4651-4656, 1990.

WRAIHT, D. G.; GUNNINGTON, A. M.; SEYMOUR, W. M. - The role and allergenic importance of storage mites in house dust and other environments. Clin. Allergy 9:545-561, 1979.

YAMASHITA, N.; HAIDA, M.; SUKO, M.; OKUDAIRA, H. and MIYATA, T. - Allergens of the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. II. Immunological characterization of four allergic molecules. Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 88:173-175, 1989.

YASUEDA, H.; MITA, H.; YUI, Y. and SHIDA, T. - Comparative analysis of physicochemical and immunochemical properties of the two major allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and the corresponding allergens from *Dermatophagoides farinae*. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 88:402-407, 1989.

YUUKI, T.; OKUMUSRA, Y.; YAMAKAWA, H.; SUKO, M.; HAIDA, M. and OKUDAIRA, H. - Cloning and sequencing of cDNAs corresponding to mite major allergen *Der f 2*. Jpn. J. allergol. 39: 557-561, 1990.

ZOLLNER, R.L.; PINHO-JR., A.J.; VILELLA, C.A.; LAZZARINI, S. - Estudo do grau de sensibilização de população atópica ao ácaro *Euroglyphus maynei*. Rev. Bras. Alergia e Immunopatol. 15:77, 1992 (Abstract), (a).

ZOLLNER, R.L.; PINHO-JR., A.J.; VILELLA, C.A.; LAZZARINI, S. - Expressão de isotipos IgE específicos a ácaros ambientais, em população atópica. Rev. Bras. Alergia e Immunopatol. 15:81, 1992 (Abstract), (b).

ZOLLNER, R.L.; ZOLLNER, T.C.; PINHO Jr., A.J.; LAZZARINI, S.; BAGGIO, D. & AMBRÓZIO L.C. - Partial purification of faecal particles of *Aleuroglyphus ovatus*. Allergy and Clinical Immunology News, 1994(Supl. 2) - International Congress of Allergy and Clinical Immunology.(Abstract)