

**RELAÇÃO ENTRE IMUNOGLOBULINA E (IgE) SÉRICA EM  
PORTADORES DE ALERGIAS RESPIRATÓRIAS E ALÉRGENOS INALANTES  
DOMICILIARES.**

LUCIANA STOHLER NOGUEIRA

ORIENTADORA: DRA OLGA LIMA TAVARES MACHADO

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

Setembro /2021

**RELAÇÃO ENTRE IMUNOGLOBULINA E (IgE) SÉRICA EM  
PORTADORES DE ALERGIAS RESPIRATÓRIAS E ALÉRGENOS INALANTES  
DOMICILIARES.**

LUCIANA STOHLER NOGUEIRA

Dissertação de mestrado  
apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Estadual do  
Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte das  
exigências para obtenção do  
título de Mestre em Biociências  
e Biotecnologia

ORIENTADORA: DRA OLGA LIMA TAVARES MACHADO

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

Setembro /2021

**RELAÇÃO ENTRE IMUNOGLOBULINA E (IgE) SÉRICA EM  
PORTADORES DE ALERGIAS RESPIRATÓRIAS E ALÉRGENOS INALANTES  
DOMICILIARES.**

LUCIANA STOHLER NOGUEIRA

Comissão Examinadora

---

Dr Antônio Teva (FMC/FioCruz)

---

Dr Arnaldo Rocha Façanha (UENF)

---

Dr Milton Masaiko Kanashiro (UENF)

---

Orientadora: Professora Olga Lima Tavares Machado

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, sob a orientação da Professora Dra. Olga Lima Tavares Machado.

Dedico este trabalho ao meu marido, Paulinha e Davi, que sempre me apoiaram, cada um de um jeitinho especial.

## **AGRADECIMENTOS**

Não foi fácil chegar aqui e sei que ainda tenho muita jornada pela frente. Ao final desta importante etapa da minha vida, quero agradecer a algumas pessoas.

Primeiramente e sempre, sempre, eu quero agradecer a Deus por ter me sustentado durante todo o mestrado. Foram anos de estudos e dedicação e o Senhor em todo o tempo me sustentou nos momentos de angústia, desânimo e dificuldade. Agradeço por Seu imenso amor e compaixão por mim.

Como não homenagear meu marido, Tito. Homem de Deus, companheiro e amigo que sempre esteve ao meu lado me dando suporte e incentivo. Aos meus filhos, Paulinha e Davi, pelos quais sinto amor imenso que não cabe dentro de mim. Não só agradeço a vocês como peço perdão pelos momentos de ausência. Essa conquista é nossa!

Aos meus amigos e familiares que sempre me ajudaram e estiveram disponíveis. Aos meus pais que tiveram a percepção de que o estudo é importante para minha vida e, do jeito deles, me incentivaram a estudar cada vez mais.

Agradeço demais à minha orientadora, professora Olga, que sempre esteve ao meu lado me ajudando e ensinando. Você é um grande exemplo de pessoa e profissional, que conseguiu se destacar profissionalmente, sem deixar de cuidar da família.

Aos professores Arnoldo, Milton e Teva que aceitaram participar desta banca examinadora, dedicando o tempo e conhecimento no meu estudo.

Ao professor Valmir que sempre acreditou em mim, me aconselhou e ajudou. Pessoa incrível, profissional de excelência. “Quando eu crescer quero ser igual a você”.

Aos meus colegas de laboratório, Jucelia, Tatiana, Debora, Francianne, Mariana, Caroline, Raquel. Agradeço aos conselhos, dicas e sugestões. Débora, a você agradeço em especial por todo ensinamento e paciência durante nossos intermináveis experimentos e revisão desta dissertação. Jucélia, você é especial,

serva do Senhor, honrada, com uma história de vida digna de um livro. Muito obrigada por sua disponibilidade.

Agradeço à UENF que me recebeu de braços abertos e me proporcionou ensinamentos que jamais imaginei que teria.

E não poderia deixar de agradecer aos meus pacientes que contribuíram para que esse estudo pudesse ser realizado.

A todos vocês, o meu mais profundo agradecimento.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir



## SUMÁRIO

1- Introdução-----	1
1.1 Poluentes ambientais-----	3
1.2 Ácaros da poeira domiciliar-----	5
1.3 Epitélio de animais-----	9
1.4 Barata -----	9
1.5 Alergias respiratórias -----	12
1.5.1 Anatomia do trato respiratório-----	12
1.5.2 Fisiopatologia das alergias respiratórias-----	13
1.5.2.1 Imunoglobulina E -----	15
1.5.3 Quadro clínico -----	18
1.5.4 Diagnóstico das alergias respiratórias -----	20
1.5.5 Tratamentos-----	20
1.5.5.1 Tratamento da rinite alérgica-----	20
1.5.5.2 Tratamento da asma -----	21
1.5.5.3 Imunoterapia alérgeno específica-----	21
1.5.5.4 Outros tratamentos-----	22
1.5.6 Complicações -----	23
1.6 Considerações Gerais-----	24
2- Objetivos-----	25
2.1- Objetivos gerais -----	25
2.2- Objetivos específicos-----	25
3- Metodologia -----	26
3.1- Seleção de pacientes alérgicos -----	26
3.2- Coleta do material aerobiológico-----	26
3.3- Extração de componentes aéreos retidos em filtros de coleta	27
3.4- Avaliação do perfil proteico dos alérgenos em extratos padrões comerciais e nos extratos dos filtros de coleta-----	28
3.5- Quantificação da IgE total e IgE específica em soros de pacientes com diagnóstico de alergia respiratória-----	28
3.6- Ensaio de imunodeteção- ELISA-----	29
3.6.1- ELISA-----	29

3.6.1.1- ELISA 1:-----	29
3.6.1.2- ELISA 2 -----	30
3.6.1.3- ELISA 3-----	31
3.7- Avaliação da complexidade das proteínas dos extratos por SDS- PAGE -----	31
3.8- Imunodeteção das proteínas extraídas por Western Blotting	32
3.9- Identificação de epítomos de IgE através de programas computacionais (estudos <i>In Sílico</i> )-----	33
4- Resultados-----	34
4.1- Seleção dos pacientes e coleta do material aerobiológico-----	34
4.2- Dosagem de IgE sérica pelo método ImmunoCap® -----	34
4.3- ELISA-----	37
4.4 Avaliação da complexidade proteica dos extratos alergênicos por Eletroforese em Gel de acrilamina -----	38
4.5- Avaliação da imunodeteção de soros de pacientes alérgicos após concentração das amostras- Western-blotting -----	40
4.6- Imunodeteção das amostras concentradas por ensaio de imunoabsorção enzimática, “ELISA 3”-----	41
4.7- Análises in sílico -----	42
5- Discussão-----	46
6- Conclusões-----	50
7- Referências bibliográficas -----	51
Anexos -----	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AIT** Imunoterapia alérgeno-específica

**BT** *Blomia tropicalis*

**DP** *Dermatophagoide pyteronissenus*

**DF** *Dermatophagoide farinae*

**Der p1** Antígeno 1 de *Dermatophagoide pyteronissenus*

**Der p21** Antígeno 2 de *Dermatophagoide pyteronissenus*

**ELISA** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima)

**FF** Filtro fino - Filtro retenção partículas 0,4 a 1.6  $\mu\text{M}$

**FG** Filtro grosso - Filtro retenção partículas 9 a 10  $\mu\text{M}$

**IgA** Imunoglobulina A

**IgE** Imunoglobulina E

**IgG** Imunoglobulina G

**IgM** Imunoglobulina M

**PBS T** PBS em Tween 7,0

**PBS** PBS em tween 0,05

**Pct** paciente

**Th1** Linfócito T Helper 1

**Th2** Linfócito T Helper 2

## **Lista de Figuras**

<b>Figura 1-</b> Microscopia eletrônica do <i>Dermatophagoide puteronissenus</i> -----	6
<b>Figura 2-</b> Exoesqueleto dos ácaros-----	6
<b>Figura 3-</b> Desenho esquemático do processo inflamatório induzido por antígenos das baratas-----	11
<b>Figura 4-</b> Anatomia do trato respiratório-----	13
<b>Figura 5-</b> Fisiopatologia da rinite-----	14
<b>Figura 6-</b> Desenho esquemático do receptor da IgE-----	16
<b>Figura 7-</b> Representação esquemática da IgE-----	17
<b>Figura 8-</b> Estrutura cristalizada da IgE-----	17
<b>Figura 9-</b> Molécula de IgE ligada ao receptor-----	18
<b>Figura 10-</b> Aparelho de coleta de ar domiciliar-----	27
<b>Figura 11-</b> Esquema ilustrativo de alguns experimentos realizados -----	33
<b>Figura 12:</b> resultado da IgE específica-----	36
<b>Figura 13-</b> SDS-PAGE 12,5%-----	39
<b>Figura 14-</b> SDS- PAGE-----	40
<b>Figura 15-</b> Membrana de nitrocelulose-----	41

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela I:</b> exames laboratoriais -----	35
<b>Tabela II:</b> Dosagem de IgE específica-----	36
<b>Tabela III:</b> Resultado do ELISA 2-----	38
<b>Tabela IV:</b> Resultado do Elisa 3-----	42
<b>Tabela V:</b> Avaliação das sequências e predição de epítomos de IgE-----	43

## **RESUMO**

Atualmente o número de pessoas portadoras de doenças alérgicas, como asma, a rinite alérgica e a alergia alimentar está aumentando. Alérgenos presentes no ar ambiente, principalmente no domicílio, são capazes de desencadear a produção de Imunoglobulina E (IgE) por linfócitos B ativados. Esta IgE, ligada a receptores na superfície de mastócitos, pode desencadear a desgranulação destas células, com liberação de histamina. Desta forma, teremos manifestações clínicas caracterizadas na rinite alérgica por espirros em salva, prurido nasal, ocular e/ou faríngeo, obstrução nasal e alteração do sono. Este trabalho teve por objetivo conhecer a natureza de proteínas alergênicas dispersas no ar domiciliar e buscar possíveis correlações com os níveis séricos de IgE específica para os alérgenos dominantes em ácaros, barata, pelos de cão e gato. O sangue de 12 dos 14 pacientes desta pesquisa foi coletado e os soros foram analisados quanto ao estado geral, hemograma completo e dosagem de imunoglobulinas (A, G, E e M). Para os que apresentaram níveis de IgE acima dos valores normais, foi solicitada a dosagem de IgE específica para os alérgenos mais abundantes em ambientes domiciliares. Para investigar possíveis correlações entre as proteínas do ar e a IgE sérica, testes sorológicos imunoenzimáticos, **ELISA** (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) foram empregados. Nossos resultados indicaram baixa extração de proteínas no ar, incompatível com a identificação por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5% ou 15%) e por ensaios de western blotting. No entanto, observamos reatividade do material extraído dos filtros coletores com o soro de três dos quatro pacientes investigados. Análises *in silico* de estruturas de alérgenos e epítomos ligantes de IgE mostraram 100% de homologia entre dois epítomos dos alérgenos majoritários de *Dermatophagoides* e similaridades entre epítomos dos alérgenos de *Blomia tropicalis* e alérgenos de barata o que poderia explicar a imunorreatividade a mais de um alérgeno pelo soro dos pacientes investigados. Concluímos que o protocolo de coleta de amostras do ar e métodos extrativos permitiram correlacionar parcialmente as IgE sérica de pacientes alérgicos com proteínas dispersas no ar, mas algumas etapas do processo devem ser melhoradas para aumentar o rendimento das proteínas extraídas.

**Palavras-chave:** aeroalérgeno, *Dermatophagoide pyteronissenus*, *Dermatophagoide farinae*, *Blomia tropicalis*,

## **ABSTRACT**

Currently, the number of people with allergic diseases such as asthma, allergic rhinitis and food allergy is increasing. Allergens present in ambient air, especially in the home, are capable of triggering the production of Immunoglobulin E (IgE) by activated B lymphocytes. This IgE bound to receptors on the surface of mast cells, can trigger the degranulation of these cells, with the release of histamine. Thus, we will have clinical manifestations characterized in allergic rhinitis by sneezing, nasal, eye and/or pharyngeal itching, nasal obstruction and sleep disturbance. This work aimed to understand the nature of allergic proteins dispersed in the home air and to search for possible correlations with the serum levels of specific IgE for the dominant allergens in mites, cockroaches, dog and cat hair. Blood from 12 of the 14 patients in this study was collected and the sera were analyzed for general status, complete blood count and immunoglobulin levels (A, G, E and M). For those with IgE levels above normal values, a specific IgE dosage was requested for the most abundant allergens in the home environment. To investigate possible correlations between air proteins and serum IgE, immunoenzymatic serological tests ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) were used. Our results indicated low air protein extraction, incompatible with identification by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE 12,5% or 15%) and by western blotting assays. However, we observed reactivity of the material extracted from collector filters with the serum of three of four patients investigated. In silico analysis of allergen structures and IgE binding epitopes showed 100% homology between two epitopes of major allergens from *Dermatophagoide* and similarities between epitopes of *Blomia tropicalis* allergens and cockroach allergens which could explain the immunoreactivity of more than one allergen by serum of investigated patients. We conclude that the air sampling protocol and extractive methods allowed to partially correlate the serum IgE of allergic patients with air-dispersed proteins, but some steps in the process should be improved to increase the yield of extracted proteins.

**Keywords:** aeroallergen, *Dermatophagoide pyteronissenus*, *Dermatophagoide farinae*, *Blomia tropicalis*,

## 1- INTRODUÇÃO:

Atualmente há um aumento do número de pessoas portadoras de doenças alérgicas em todo o mundo, com reflexos na qualidade de vida e despesas com atendimento de saúde. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em todo o mundo 600 milhões de pessoas são acometidas por rinite e 200 milhões por asma (YANG, 2017 a)

Apesar das alergias respiratórias terem uma baixa mortalidade, possuem uma alta morbidade, com grande impacto na qualidade de vida dos portadores destas doenças. Deng e col mostraram em 2016 que pacientes com rinite alérgica possuem pior rendimento escolar e no trabalho devido a alterações no sono que são muito frequentes nos portadores destas doenças (DENG AT AL., 2016).

A rinite alérgica é uma doença muito frequente em todas as faixas etárias, sendo considerada a doença crônica mais prevalente em crianças (SEIDMAN AT AL., 2015). Não é só um problema de saúde, mas também econômico. Estima-se que um paciente asmático gaste em torno de \$3.000 anualmente com tratamentos (JOHNSON AT AL., 2019). Além da piora da qualidade de vida, o que não temos como estimar.

Muito se discute sobre o porquê do aumento da incidência das alergias respiratórias (ARRUDA, 2015). Um fato marcante em todo o mundo é a ocorrência de uma mudança no padrão familiar, com mães precisando trabalhar fora de casa e, desta forma, reduzindo o tempo de aleitamento materno. Além disso, a população passou de uma vida rural para uma concentração urbana, com maior exposição a poluentes, vida sedentária, vivendo em ambientes fechados e mantendo um padrão alimentar caracterizado por alimentos processados, um fator indiscutível para o aumento do número de casos de alergias não só alimentares, mas respiratórias também (GRUZIEVA ET AL., 2014).

Desde a década de 80, tem-se observado que crianças oriundas de famílias com muitos membros e/ou expostas precocemente a animais de estimação, teriam uma incidência menor de atopia. Isso em decorrência da exposição a infecções comuns na infância como sendo um fator protetor das atopias, a conhecida “Hipótese da Higiene” (PROKOPAKIS, 2013).



1 O uso precoce ou frequente de antibióticos durante a infância também seria  
2 um associado ao risco do desenvolvimento de alergias (FAROOQI, 1998). Isso  
3 pode ser explicado devido a mudanças na microbiota intestinal ocasionada por  
4 tais medicamentos, com diminuição da flora intestinal de bactérias e este  
5 desequilíbrio bacteriano associado ao aumento de sensibilizações alérgicas  
6 (BISGAARD, 2011).

7 A Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou que uma importante  
8 causa de agravo à saúde é a exposição a poluentes ambientais. A queima de  
9 combustível usada nos meios de transporte e na indústria é responsável por cerca  
10 de 40% do total de poluentes atmosféricos. (CAMPBELL-LENDRUM & PRÜSS-  
11 USTÜN, 2019).

12 A exposição a alérgenos domiciliares é o principal desencadeante das  
13 doenças alérgica. (SALO ET AL., 2018). Ácaros da poeira, epitélio de animais,  
14 principalmente cães e gatos, exposição a antígenos das baratas e fungos fazem  
15 parte dos alérgenos intradomiciliares (SÁNCHEZ-BORGES ET AL., 2017). Os  
16 cômodos que servem como dormitório são os mais envolvidos devido ao tempo  
17 que as pessoas permanecem dentro deles e, também, devido à proximidade do  
18 contato das vias aéreas com o colchão e travesseiro.(SALO ET AL., 2018).

19 Diversos estudos mostraram que quanto maior a concentração de ácaros  
20 maior os riscos de sensibilização para outros antígenos.(Miller, 2019). Os ácaros  
21 mais prevalentes na poeira doméstica são das espécies *Dermatophagoide*  
22 *pyteronissenus*, *Dermatophagoide farinae* e *Blomia tropicalis*, principalmente em  
23 locais de clima tropical e úmido (CUI ET AL., 2016).

24 Um estudo alemão mostrou que a sensibilização aos ácaros está  
25 diretamente relacionada às concentrações às quais o paciente é exposto, ou seja,  
26 quanto maior a concentração do ácaro no ambiente domiciliar, maiores seriam as  
27 chances desta pessoa ser sensibilizada (CALDERÓN et al., 2015).

28 Os animais domésticos mais frequentemente encontrados em residência são  
29 cachorro e gato. O número de gatos como animais de estimação vem aumentando  
30 nos últimos anos. Alguns estudos mostram que a exposição a cães e gatos é

1 capaz de induzir tolerância imunológica a esses animais a longo prazo, porém a  
2 explicação fisiopatológica para isso ainda não está clara (NICHOLAS DIAS, 2017).

3 A exposição a baratas se mostrou um fator de risco para alergias  
4 respiratórias e controle dos insetos foi o suficiente para melhorar morbidade por  
5 asma (EGGLESTON, 2017). Isso acontece porque a exposição a baratas induz  
6 quadros de asma com menores concentrações de alérgenos de ácaros e epitélios  
7 de animais (RABITO ET AL., 2017).

8 Diferentemente dos antígenos da barata, a redução da concentração de  
9 antígenos de ácaros intradomiciliar não reduz os sintomas de rinite e de asma  
10 (YANG & ZHU, 2017b). Diversos estudos foram feitos com objetivo de mostrar se  
11 a limpeza do ambiente domiciliar (quarto e sala) com filtros específicos seria capaz  
12 de reduzir as exacerbações das doenças alérgicas. Os resultados foram  
13 inconclusivos, pois não ficou evidenciado melhora nos escores clínicos e  
14 atualmente não existe uma recomendação com relação a isso (WOOD, 2002).

15

#### 16 **1.1- POLUENTES AMBIENTAIS:**

17 A exposição a poluentes no ar é um importante fator de morbimortalidade  
18 mundialmente e pode ser considerado o maior risco relacionado ao ambiente para  
19 a saúde. Os poluentes do ar podem ser na forma gasosa, liberados através de  
20 indústrias, e queima de combustíveis, por meios de transporte. Além disso, alguns  
21 gases liberados, chamados de gases primários, podem dar origem a outros gases,  
22 conhecidos como gases secundários ou “poluentes secundários”  
23 (SCHRAUFNAGEL ET AL., 2019).

24 É sabido que a poluição atmosférica pode causar inúmeras doenças,  
25 dependendo da concentração da exposição, tempo, umidade do ar no local da  
26 exposição, composição do poluente (por exemplo, os poluentes ácidos  
27 apresentam maior toxicidade), entre outros fatores. As partículas podem ser  
28 divididas pelo tamanho, sendo que as partículas menores têm capacidade de  
29 chegar até vias aéreas inferiores, principalmente bronquíolo terminal, por serem  
30 de mais fácil dispersão. Já as partículas maiores, por ficarem impactadas em vias  
31 aéreas superiores, podem causar principalmente sintomas respiratórios de trato

1 respiratório superior, como tosse e lacrimejamento. A exposição a poluentes está  
2 relacionada à apneia do sono e a outros distúrbios do sono (ZANOBETTI ET AL.,  
3 2010).

4 A exposição à poluição do ar pode induzir doenças alérgicas em pacientes  
5 predispostos. Não só pode aumentar a sensibilização, como também pode  
6 aumentar os níveis de IgE (SCHRAUFNAGEL ET AL., 2019). Além disso é  
7 responsável por uma gama de doenças cardiovasculares.

8 Inúmeros estudos têm sido realizados para tentar identificar partículas  
9 presentes no ar e componentes com potencial alergênico. MAESTRE e col  
10 estudaram em 2018 a correlação de desencadeantes da asma em crianças no  
11 Texas, EUA (BI ET AL., 2018). Eles perceberam haver uma variação sazonal nas  
12 partículas presentes no ar. Desta forma, a filtragem, identificação e dosagens em  
13 diferentes períodos do ano são superiores às coletas em um período isolado do  
14 ano.

15 A poluição do ar está relacionada a um quadro de declínio cognitivo e piora  
16 da função pulmonar. Além disso, pode estar associada a dano cerebral em  
17 desenvolvimento, causando um déficit cognitivo permanente. Foi feita uma  
18 associação entre exposição aos poluentes ambientais e atraso na aquisição da  
19 linguagem e autismo (SCHRAUFNAGEL ET AL., 2019).

20 Atualmente 80 % das pessoas vivem em grandes centros, onde a poluição é  
21 uma marca. Cada vez mais precocemente e por período maior as pessoas estão  
22 sendo expostas a poluentes ambientais, com conseqüente adoecimento da  
23 população. Em 2016, DENG e colaboradores mostraram que a exposição pré-  
24 natal a poluentes ambientais é importante no desfecho de rinite alérgica em  
25 crianças. Isso mostra que, não é só após o nascimento, os pacientes expostos à  
26 poluição podem desenvolver doenças alérgicas, mas a exposição antes do  
27 nascimento é um importante fator de risco para a sensibilização (SALO ET AL.,  
28 2018).

29

30

31

## 1.2- ÁCAROS DA POEIRA DOMICILIAR:

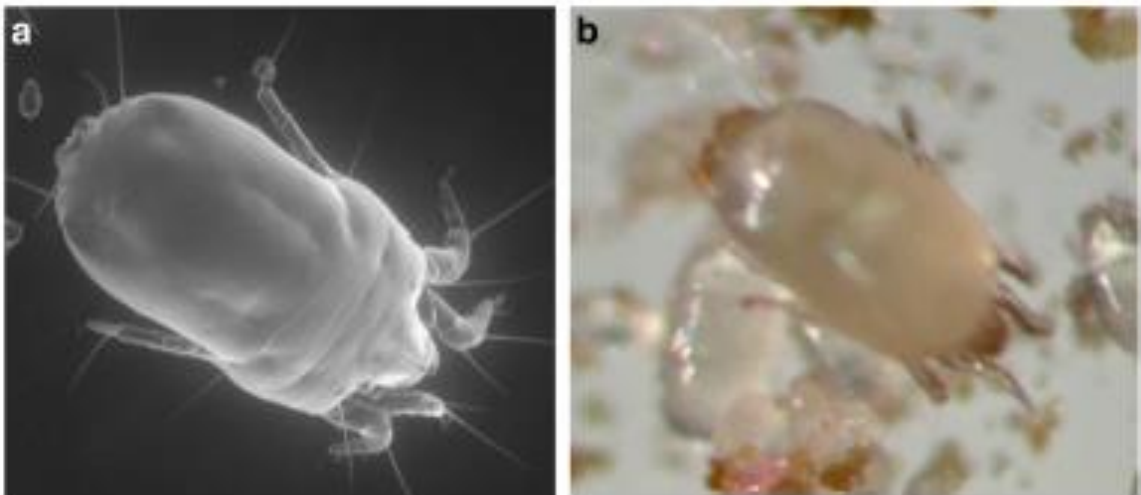
Neste trabalho iremos chamar genericamente de ácaros as espécies *Dermatophagoide farinae*, *Dermatophagoide pyteronissenus* e *Blomia tropicalis*.

Os ácaros são animais aracnídeos, possuem 4 patas e a maioria deles possui menos de 1mm de diâmetro. Os primeiros fósseis datam de 400 milhões de anos, existindo mais de 30 mil espécies. Estes animais são distribuídos em todo o mundo e são adaptados a ambientes rurais e urbanos. Já formam encontrados em árvores e cavernas (SÁNCHEZ-BORGES et al., 2017a)

Os ácaros podem ser divididos em ácaros da poeira doméstica e de armazenamento. Os ácaros de armazenamento são encontrados em locais de estocagem de trigo, milho, aveia, cevada e feno, sendo importante causa de doenças ocupacionais (relacionadas ao ambiente de trabalho) (SÁNCHEZ-BORGES et al., 2017a). Neste trabalho iremos estudar apenas os ácaros da poeira doméstica.

Há mais de 100 anos, os ácaros foram descritos como desencadeantes dos processos alérgicos. A relação entre os ácaros da poeira domiciliar e as alergias respiratórias foi descrita em 1920 (YANG; ZHU, 2017b). As doenças causadas pelos ácaros são um problema de saúde global, reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde (SÁNCHEZ-BORGES et al., 2017a).

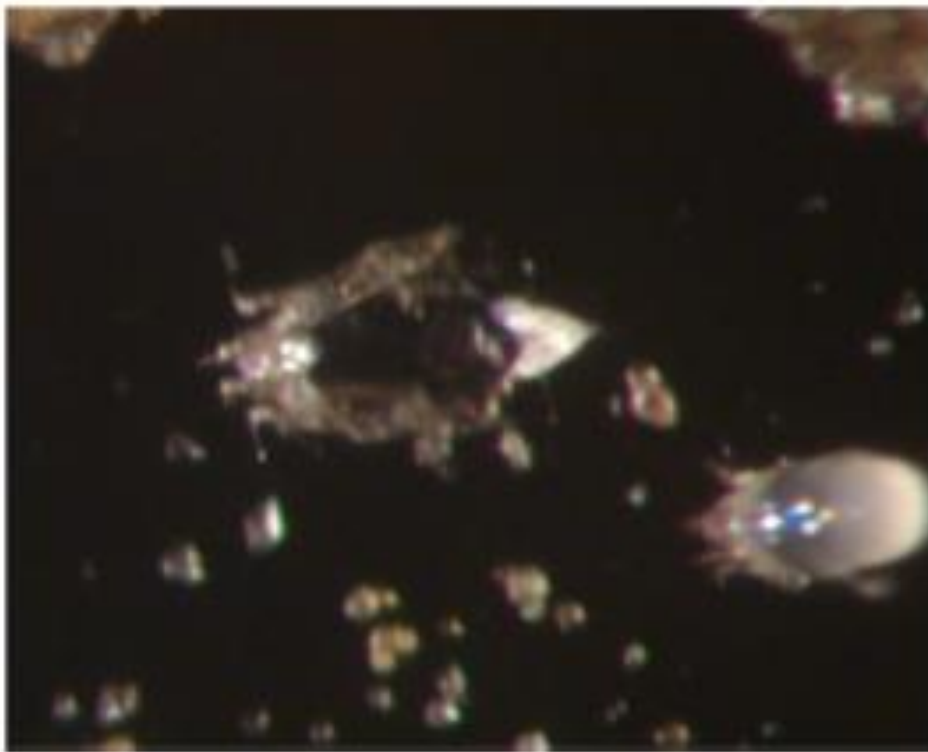
Mais recentemente, foram identificadas algumas das proteínas capazes de causar sensibilização alérgica em humanos. A figura 1 mostra a ultraestrutura de um *Dermatophagoide pyteronissenus* (MILLER, 2019).



1

2 **Figura 1.** a) Microscopia eletrônica do *Dermatophagoide pyteronissenus* mostrando corpo  
3 b) imagem mostrando corpo translúcido do animal. Adaptado de (Miller, 2019).

4 Os ácaros são animais aracnídeos e sua reprodução ocorre exclusivamente  
5 através de machos e fêmeas. (HART, 1998). Vivem em média 70 dias e, durante o  
6 processo de desenvolvimento, ocorre a troca o exoesqueleto, que é rico em quitina,  
7 um alérgeno em potencial (Figura 2).



8

9 **Figura 2** Exoesqueleto dos ácaros. Durante o período de vida do animal, ocorre troca do  
10 exoesqueleto que é rico em quitina, uma proteína com potencial alergênico Adaptado de  
11 (MILLER, 2019).

1 O principal fator para proliferação destes animais seria a umidade do ar. A  
2 umidade do ar é necessária para evitar que eles percam excessiva quantidade de  
3 água. Fatores socioeconômicos também estão relacionados a concentração dos  
4 ácaros, quanto menor o poder aquisitivo da família, maior é a concentração de  
5 ácaros (HART, 1998).

6 Os ácaros necessitam de água para seu crescimento, por isso há predileção  
7 por ambientes úmidos e quentes. Da mesma forma que em ambientes muito secos,  
8 com umidade relativa do ar abaixo de 50%, eles desidratam e morrem (OSINSKI,  
9 2015). Nas residências, o desenvolvimento no chão, onde as temperaturas são  
10 mais baixas, ocorre mais lentamente do que em camas e sofás. O ciclo de vida é  
11 acelerado em altas temperaturas. Por exemplo, um ciclo de ovo ao adulto leva 122  
12 dias a temperatura de 6°C e 15 dias em 35°C (SÁNCHEZ-BORGES et al., 2017a).

13 A concentração de ácaros pode ter três importantes variações:  
14 microambiente, macroambiente e escala regional. O microambiente é considerado  
15 o mais importante, com variações de concentrações durante o dia, pois existe  
16 interação com outros ácaros e mudança na disponibilidade de alimentos. O  
17 macroambiente está relacionado ao material da qual o domicílio foi construído, o  
18 tipo de material que foi usado durante a construção, o tipo de ventilação e a  
19 temperatura intradomiciliar. Por escala regional, entende-se as variações  
20 geográficas do local, como estação do ano e características geográficas (altitude e  
21 latitude) (COLLOFF, 1998a).

22 O nome *Dermatophagoide* é originado do grego “dermis” que significa pele  
23 e “phagos” que significa alimentação, fazendo uma analogia ao tipo de alimentação  
24 desta espécie (COLLOFF, 1998b). Epitélio de animais de sangue quente, como ser  
25 humano, fungos e bactérias são os alimentos preferidos pelos ácaros. Nas  
26 residências, os locais principais de reservatório deste animal são camas,  
27 travesseiros, brinquedos de pelúcia e carpetes. O quarto é considerado o local da  
28 casa com maior risco para a sensibilização, por se tratar do local onde passamos  
29 grande parte do dia (SEIDMAN, 2015).

30 A sensibilização alérgica pode ocorrer de várias maneiras, sendo que as  
31 principais portas de entrada seriam mucosas ocular e nasal, trato respiratório  
32 inferior e pele (MILLER, 2019). A exposição crônica aos ácaros pode causar

1 inalação e sensibilização dos pacientes geneticamente predispostos (SEIDMAN,  
2 2015). É provável que os ácaros causem sensibilização quando transportados pelo  
3 ar, a medição dos alérgenos nesta fase tem sido um desafio (SÁNCHEZ-BORGES  
4 et al., 2017a).

5 Foram identificadas diversas proteínas com potencial antigênico nos ácaros  
6 (SEIDMAN, 2015). Para o *Dermatophagoide farinae* foram identificados e  
7 descritos 31 alérgenos, 20 para *Dermatophagoide pyteronissenus* e 14 para  
8 *Blomia tropicalis* (MILLER, 2019).

9 Os alérgenos mais responsáveis por sensibilização descritos são Der p1 e  
10 Der p2, de *Dermatophagoide pyteronissenus* e são responsáveis pela  
11 sensibilização em mais de 50% dos pacientes atópicos (RESENDE ET AL., 2019).  
12 O Der p 1 de *Dermatophagoide pyteronissenus* e o Der f 1 de *Dermatophagoide*  
13 *farinae*, são muito semelhantes, chegando a ter estrutura primária semelhante em  
14 mais de 80%. Desta forma, existe grande chance de reatividade cruzada de IgE  
15 específica entre os diferentes tipos de ácaros (CUI ET AL., 2016).

16 O Der p1 é uma proteína glicosilada com função de cisteína protease, com  
17 atividade proteolítica. O Der p2 é uma serina protease, possui sequência de  
18 aminoácidos homóloga a alguns antígenos presentes em camarões, daí a  
19 possibilidade de reação cruzada entre ácaros e camarão (CUI ET AL., 2016).

20 As proteases dos ácaros são responsáveis por respostas imunológicas  
21 mediadas por citocinas que vão desencadear resposta imune mediada pelo  
22 linfócito T helper 2 (Th-2) na ausência de IgE. Além disso, essas proteases são  
23 responsáveis por um desvio de resposta Th-1 para Th-2. A sensibilização aos  
24 ácaros pode levar a sensibilização a outros alérgenos, com piora do quadro de  
25 atopia (CUI ET AL., 2016).

26 Antígenos presentes nos ácaros podem induzir ativação de uma resposta  
27 imune inata, através da ativação de receptores tipo Toll 4 (Toll Like receptor 4 ou  
28 LLR4) (CAI ET AL., 2019).

29 Os pacientes portadores de alergias respiratórias geralmente são  
30 sensibilizados contra diversos antígenos. Sabe-se que esses pacientes, expostos  
31 a altas concentrações de ácaros, apresentam piora do controle clínico, maior

1    escore de gravidade e pior resposta ao tratamento medicamentoso. A  
2    sensibilização aos ácaros é o maior fator de risco para asma na adolescência  
3    (CALDERÓN ET AL., 2015).

4            Resch e col mostraram que a sensibilidade a diferentes partes dos ácaros  
5    pode ter manifestações diferentes. Por exemplo prático, seria que a presença de  
6    IgE sérica específica para o corpo do ácaro está associada a quadros de dermatite  
7    atópica. Por outro lado, a reatividade às fezes do animal estaria associado a alergia  
8    respiratória (RESCH ET AL., 2016).

### 9                    **1.3- EPITÉLIO DE ANIMAIS:**

10            Como já foi dito anteriormente, a exposição a antígenos derivados de epitélio  
11    de animais pode ser um fator responsável pelas alergias. As proteínas com  
12    potencial de sensibilizar estão presentes na urina, saliva e pelos dos animais.  
13    Esses antígenos podem ser encontrados principalmente no ambiente onde o  
14    animal fica, mas podem estar espalhados em toda a casa (SALO ET AL., 2018).

15            Os animais de estimação mais frequentes são cães e gatos. A exposição a  
16    esses animais pode ser medida através da presença de alérgenos maiores Fel d1  
17    e Can f1 no ambiente domiciliar. Sabe-se que 90% dos indivíduos alérgicos a  
18    gatos apresentam reatividade ao Fel d1 (SALO ET AL., 2018).

19            Parece que a exposição a altas doses do antígeno Fel d1 estaria associado  
20    a indução da produção de IgG 4, que teria uma ação de bloqueio da IgE específica,  
21    com indução de tolerância e não resposta aos ácaros (SALO ET AL., 2018). Isso  
22    explicaria uma teoria muito difundida a partir de 1989, a “Teoria da Higiene”, que  
23    tenta explicar a exposição a antígenos e a proteção contra doenças alérgicas  
24    (HASPESLAGH ET AL., 2018).

25

### 26                    **1.4- BARATAS:**

27            Há mais de 50 anos é conhecido que as baratas podem estar associadas a  
28    doenças alérgicas. Estudos mostram que pacientes expostos a antígenos da  
29    barata e teste cutâneo positivo, apresentam piora do quadro clínico. Uma das  
30    justificativas para isso seria a necessidade de menores concentrações de ácaros



1 para desencadeamento de sintomas alérgicos, como acontece com a exposição a  
2 gatos (POMÉS & ARRUDA, 2014).

3 Foram descritas mais de 4 mil espécies de baratas, com 25 delas adaptas a  
4 ambientes humanos. Duas espécies predominam em locais de clima temperado e  
5 tropical: *Blatella germânica* e *Periplaneta americana*. Os alérgenos associados a  
6 esses animais seriam oriundos da saliva, pele, ovos e fezes (Araujo, L, 2018).

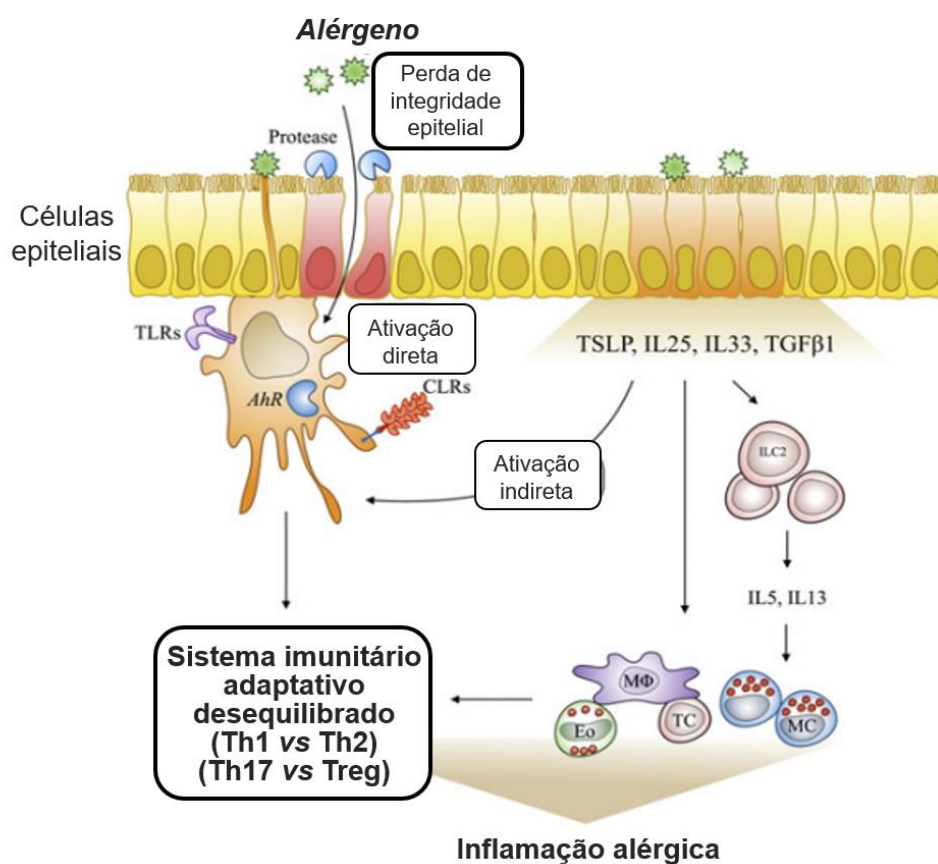
7 A exposição a alérgenos da barata se mostrou um fator desencadeante das  
8 doenças alérgicas (SALO ET AL., 2018). As partículas antigênicas são muito  
9 pequenas e podem facilmente se difundir por toda a casa, mesmo na ausência do  
10 animal (DO ET AL., 2016a). A cozinha é o ambiente domiciliar onde este alérgeno  
11 é preferencialmente encontrado, com predileção por frestas de móveis e portas  
12 (RABITO ET AL., 2017).

13 Foram descritos 9 alérgenos de *Blatella germânica* e 9 para *Periplaneta*  
14 *americana*, sendo que os mais estudados seriam Bla g1, Bla g2 e Per a 1. O Bla  
15 g1 e Per a1 seriam uma repetição de 100 aminoácidos e o Bla g2 uma proteína  
16 globular pertencente à família das proteases aspárticas (DO AT AL., 2016a).

17 Os alérgenos da barata possuem atividade proteolítica, com indução na  
18 liberação de citocinas inflamatórias por células do epitélio do trato respiratório em  
19 pacientes atópicos. O epitélio é uma barreira contra a penetração de antígenos e,  
20 uma vez lesionado, pode favorecer a sensibilização. Essas proteases podem clivar  
21 a metaloproteinase promatriz e, conseqüentemente, induzir o remodelamento  
22 pulmonar. Contudo, poucos antígenos de baratas descritos são proteases (LEE  
23 ET AL., 2018).

24 Além disso, pode haver a ativação de receptores tipo toll (Toll-like receptor -  
25 TLR), com ativação de neutrófilos e da resposta imune inata. (HENDRIX, AT AL.,  
26 2013).

27 Os alérgenos da barata podem causar dano epitelial por contato direto ou  
28 atingir os pulmões após a entrada pela cavidade nasal. Eles podem ativar células  
29 epiteliais a secretar citocinas pró-inflamatórias, que vão induzir o processo  
30 inflamatório local (FIGURA 3). Essas citocinas pró-inflamatórias podem induzir  
31 uma resposta no perfil Th2 (DO; AT AL, 2016B).



1

2 **Figura 3:** Desenho esquemático mostrando o dano epitelial e o processo  
 3 inflamatório induzido por antígenos da barata. Estes alérgenos possuem a  
 4 capacidade de lesar o epitélio, com ativação da resposta imune. Adaptado de  
 5 (DO;AT AL, 2016B).

6 Pacientes asmáticos com teste cutâneo positivo para barata (indicando  
 7 sensibilização), possuem maiores chances de necessidade de ida à emergência  
 8 e de medicamentos para controle da asma. Estudo mostram que até 40% dos  
 9 pacientes com asma apresentam sensibilização para barata (WU & LEE, 2005).

10 Diversos antígenos são estudados para avaliar a exposição às baratas,  
 11 sendo os mais importantes o Bla g1 e 2. Como dito anteriormente, quanto maior a  
 12 concentração do antígeno na exposição, maior será a chance de sensibilização  
 13 alérgica. Concentrações maiores do que 8U/g são considerados morbidade para  
 14 asma (LOGAN, 2014).

15

1

2

## **1.5- ALERGIAS RESPIRATÓRIAS:**

3

4

5

6

A associação entre a asma e fatores desencadeantes foi descrita desde o início do século XIX, sendo os primeiros medicamentos introduzidos na primeira metade do século XX. É uma doença com diferentes fenótipos, histórias naturais e resposta aos medicamentos (GAUTHIER AT AL, 2015).

7

8

9

10

As doenças alérgicas podem acometer diversos órgãos e sistemas humanos. Estima-se que 20 a 30% da população seja acometida por rinite alérgica (Sakano et al., 2017). Uma coorte europeia descreveu a prevalência de 24-40% da população com idade entre 4 e 6 anos (GRUZIEVA ET AL., 2014).

11

12

### **1.5.1- ANATOMIA DO TRATO RESPIRATÓRIO:**

13

14

15

16

O trato respiratório é dividido anatomicamente em 3 regiões: superior, médio e inferior (figura 3). A região superior é composta por nariz e cavidade nasal até a faringe. A porção média pela laringe, traqueia, brônquio e bronquíolos e a inferior por bronquíolo terminal e alvéolos (NETTER, 2019).

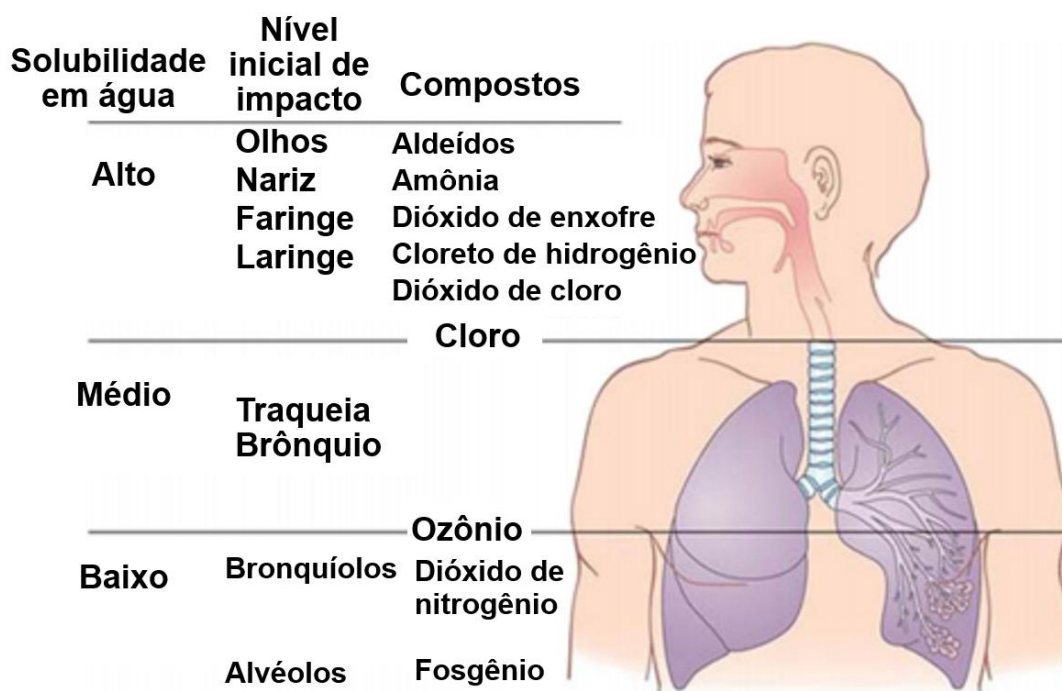
17

18

19

20

O nariz é a primeira porção do trato respiratório e serve como porta de entrada, com função de filtrar, umidificar e aquecer o ar inspirado. Desta forma, é susceptível a ação de agentes irritantes que podem causar alteração crônica na mucosa nasal (SHUSTERMAN, 2014).



1

2 **Figura 4:** Anatomia do trato respiratório (adaptado de (WHEATLEY, 2015)).

3

4

### 1.5.2- FISIOPATOLOGIA DAS ALERGIAS RESPIRATÓRIAS:

5

A rinite é uma doença crônica caracterizada por um intenso processo inflamatório presente na mucosa nasal, na maioria dos casos mediada pela

6

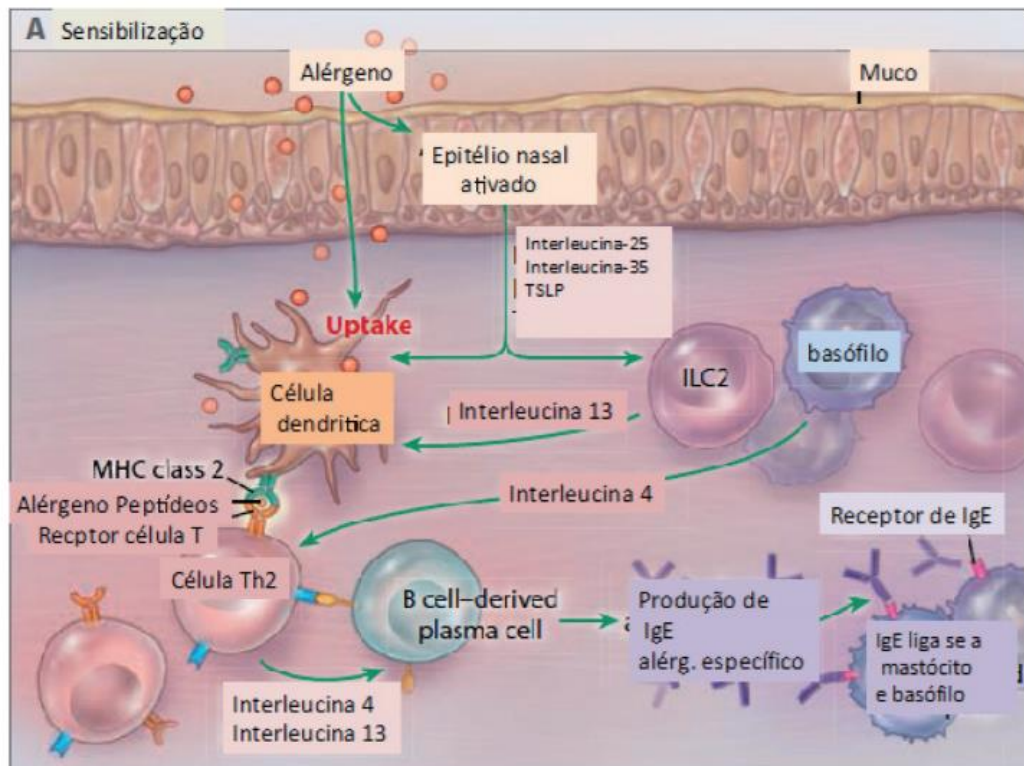
7

8

9

10

Imunoglobulina E (IgE) produzida contra antígenos que foram capazes de desencadear sensibilização prévia (SAKANO ET AL., 2017). Como mostrado na figura 4, existe a participação de diferentes tipos celulares e diversas citocinas, com as respostas do sistema imune inato e da imunidade adaptativa.



1

2 **Figura 5** Fisiopatologia da rinite alérgica. O alérgeno é capaz de desencadear  
 3 uma resposta imunológica com ativação de linfócitos Th2 e consequente produção  
 4 de IgE e desgranulação de mastócitos e basófilos. Imagem adaptada de (SAKANO  
 5 ET AL., 2017).

6 A asma é caracterizada por um processo inflamatório pulmonar crônico,  
 7 sendo uma doença heterogênea e multifatorial. São descritos vários tipos  
 8 celulares envolvidos na patogênese da doença, com importante participação de  
 9 linfócitos B e a produção de imunoglobulina E (IgE). Em cerca de 70% dos  
 10 pacientes asmáticos existe a participação da IgE no mecanismo fisiopatológico da  
 11 doença. Já em torno de 30%, outros mecanismos estão envolvidos, como  
 12 medicamentos, exercício e frio (ABUL, K, 9ª edição). A asma alérgica é o fenótipo  
 13 mais comum da asma e a correlação clínica entre exposição a alérgenos  
 14 ambientais e quadro clínico nem sempre é definida (SCHATZ, 2014).

15 O processo alérgico é iniciado pelo reconhecimento dos antígenos por  
 16 células especializadas, conhecidas como células apresentadoras de antígenos  
 17 (APC- do inglês Antigen presenting cells), principalmente as células dendríticas.

1 Este reconhecimento gera uma série de eventos que irão culminar com a produção  
2 de IgE e a desgranulação de mastócitos (SHARQUIE et al., 2013).

3 Linfócitos B humanos ativados, conhecidos como plasmócitos, podem ser  
4 capazes de secretar 4 tipos de imunoglobulinas (Ig): A, M, G e E. A IgE está  
5 relacionada às alergias, podendo estar envolvida na fisiopatologia das alergias  
6 respiratórias (ABBAS, K, 2019).

7

### 8 **1.5.2.1- IMUNOGLOBULINA E:**

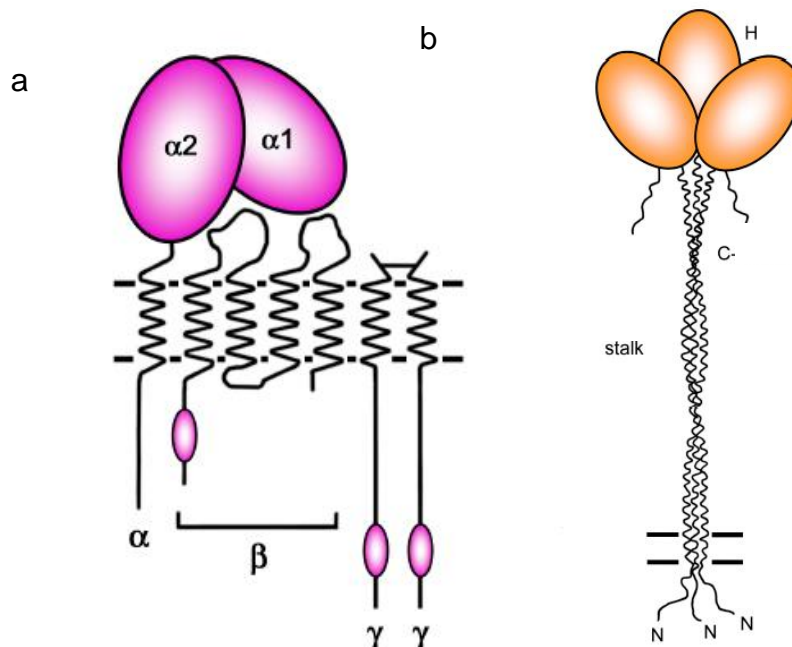
9 A IgE foi a última imunoglobulina a ser descrita, em 1968. Está envolvida em  
10 uma série de processos alérgicos, como na asma, rinite, urticária, dermatite  
11 atópica e alergia alimentar. Também está associada à defesa contra parasitos e  
12 helmintos (LAHIANI ET AL., 2018).

13 Para ter funções efetoras, é necessário que a IgE se ligue a receptores  
14 presentes em células específicas. Em humanos, existem duas categorias de  
15 receptores: FcεRI, também conhecido como receptor de alta afinidade e FcεRII ou  
16 cluster of differentiation (CD) 23 (figura 6). O FcεRI está presente na superfície de  
17 uma grande variedade de células, como basófilos, mastócitos, células epiteliais e  
18 musculares do trato respiratório, monócitos, macrófagos e eosinófilos (SUTTON  
19 ET AL., 2019).

20

21

22



1

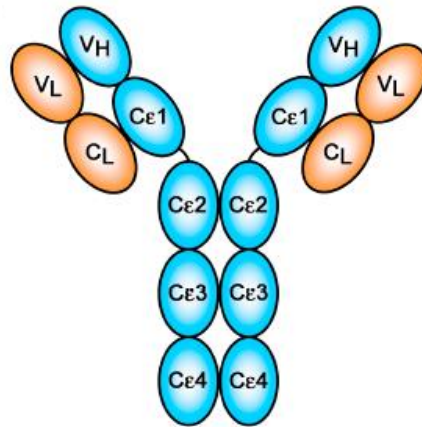
2 **Figura 6:** a) Representação esquemática do receptor para IgE de alta afinidade,  
 3 ou FcεRI. Em b) Representação esquemática do receptor para IgE FcεRII ou CD  
 4 23 (SUTTON ET AL., 2019).

5 Existe uma alta afinidade da Ig E pelo receptor FcεRI. Desta forma a maior  
 6 parte da IgE que foi secretada está ligada a esses receptores. Na presença de  
 7 uma pequena quantidade do antígeno, há uma mudança conformacional do  
 8 receptor com uma série de estímulos dentro da célula e a liberação de  
 9 substâncias, como grânulos de histamina pré-formados pelos mastócitos  
 10 (SUTTON ET AL., 2019).

11 O CD 23 possui uma estrutura diferente do FcεRI, sendo uma molécula  
 12 trimérica, com três sítios de ligação, conhecidos como “cabeças de ligação”. O CD  
 13 23 é conhecido por ser um receptor de baixa afinidade, mas de uma avidéz maior,  
 14 uma vez que apresenta mais de um sítio de ligação com o antígeno. É expresso  
 15 em diversos tipos celulares, como linfócitos B, Linfócitos T, células apresentadoras  
 16 de antígeno, células epiteliais do intestino e trato respiratório, entre outras células  
 17 (SUTTON ET AL., 2019).

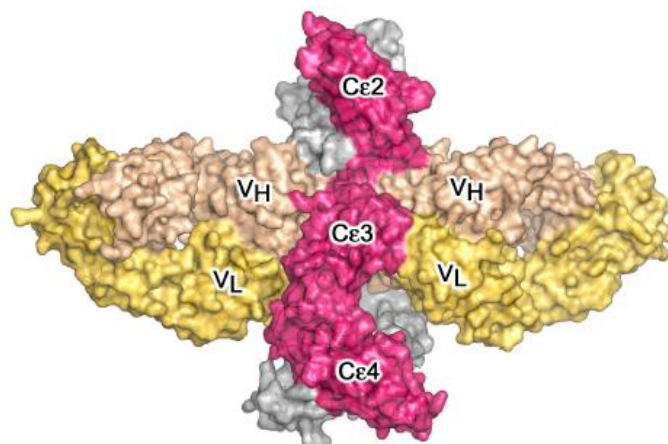
18 A molécula de IgE, como todas as imunoglobulinas, apresenta duas cadeias  
 19 leves e duas cadeias pesadas (figura 6), sendo o reconhecimento antigênico  
 20 localizado no sítio de ligação formado pelas regiões variáveis das cadeias leves e

1 pesadas, mais especificamente na região hipervariável, ou Região Determinante  
2 de Complementariedade (CDR). A IgE apresenta duas regiões nas cadeias leves  
3 (VL e CL) e 4 regiões nas cadeias pesadas (VH, Cε1, Cε2, Cε3, Cε4). Uma  
4 característica importante é que esta imunoglobulina não apresenta capacidade de  
5 mudança conformacional (SUTTON ET AL., 2019).



6

7 **Figura 7:** Representação esquemática da Ig E, mostrando as duas cadeias leves,  
8 com as regiões variáveis (VL) e constante (CL) e as duas cadeias pesadas, com  
9 a região variável (VH) e as quatro regiões constantes (Cε1, Cε2, Cε3 e Cε4)  
10 Adaptado de (SUTTON ET AL., 2019).



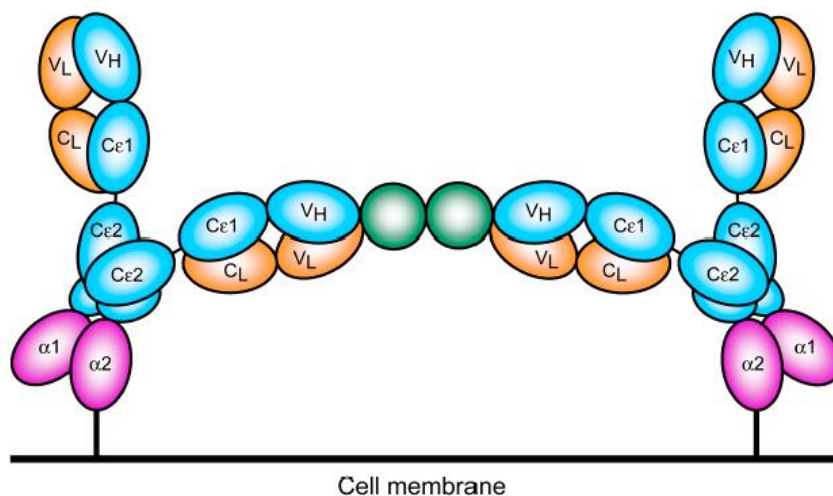
11

12 **Figura 8:** Estrutura cristalizada da Ig E, mostrando as cadeias leves e pesadas.  
13 Adaptado de (SUTTON ET AL., 2019).

14 Os dois receptores de IgE descritos apresentam capacidade de ligação em  
15 locais diferentes da molécula, ou seja, reconhecem partes distintas da IgE. Mesmo



1 assim, a ligação da IgE ao FcεRI inibe a ligação ao CD 23 e vice-versa (Sutton et  
2 al., 2019). Desta forma, existe uma certa seletividade na ativação celular, com  
3 predominância do FcεRI, por ter maior afinidade. (figura 8).



4

5 **Figura 9:** Esquema mostrando duas moléculas de Ig E ligadas ao antígeno e ao  
6 receptor FcεRI na superfície celular (SUTTON ET AL., 2019).

7

### 8 1.5.3- QUADRO CLÍNICO

9 A rinite alérgica é definida como a resposta inflamatória da mucosa nasal  
10 mediada pela IgE após exposição a antígenos inalados. É caracterizada por  
11 espirros, obstrução nasal, coriza, prurido nasal, ocular e faríngeo. Apesar de serem  
12 sintomas de menor gravidade, apresentam grande impacto na qualidade de vida  
13 dos pacientes (SEIDMAN, 2015).

14 A rinite pode ser induzida ou exacerbada por fatores ocupacionais, onde  
15 ocorre surgimento ou piora do quadro no ambiente de trabalho. Cabe ressaltar que,  
16 neste caso, não ocorre a participação da IgE na fisiopatologia, portanto os testes  
17 de detecção de IgE in vivo ou in vitro serão negativos. O quadro clínico é muito  
18 semelhante às formas mediadas pela IgE e no manejo dos pacientes estará  
19 recomendada a diminuição da exposição ao agente irritante (SHUSTERMAN,  
20 2014).

21 A rinite alérgica pode ser sazonal ou perene, com sintomas intermitentes ou  
22 persistentes. A classificação e a quantificação dos sintomas são importantes para

1 o manejo clínico e a escolha da melhor modalidade terapêutica (SAKANO et al.,  
2 2018).

3 A doença pode estar associada a outras patologias alérgicas, como asma  
4 em até 40% dos casos (GINA, 2021). Muitas crianças apresentam alteração no  
5 sono, com queda no rendimento escolar. Além disso, a rinite alérgica é um  
6 importante fator de risco para o desenvolvimento de asma e conjuntivite alérgica  
7 (GRUZIEVA ET AL., 2014).

8 Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a asma é a doença  
9 pulmonar crônica mais frequente, acometendo mais de 350 milhões de pessoas  
10 em todo o mundo (GINA, 2021).

11 A asma é caracterizada clinicamente por uma variedade de sintomas, como  
12 episódios recorrentes de chiado, aperto no peito, falta de ar, tosse, limitação de  
13 atividade física e despertar noturno com falta de ar. As crises podem ter como  
14 gatilho, principalmente, infecções virais, mas também podem ser desencadeadas  
15 após exposição a irritantes (fumaça, cigarro, produtos químicos) ou alérgenos  
16 (principalmente ácaros da poeira domiciliar, epitélios de animais, fungos e pólen),  
17 estresse, exercício e podem ter gravidade variada (GINA, 2021).

18 A maioria dos pacientes apresenta início da doença nos primeiros anos de  
19 vida, com crises desencadeadas principalmente por infecções virais. O controle  
20 clínico dos episódios de broncoespasmo geralmente ocorre por volta de 5 anos de  
21 idade (CHONG NETO ET AL., 2018). Porém, algumas continuam apresentando  
22 episódios agudos de broncoespasmo, principalmente aquelas que apresentavam  
23 crises sem a infecção viral como desencadeante (GINA, 2021).

24 Crianças que iniciaram a doença após 5 anos de vida apresentam maior risco  
25 de terem quadros persistentes. Da mesma forma que pacientes que apresentaram  
26 crise grave, com necessidade de internação hospitalar, apresentam maior risco de  
27 novo episódio grave, devendo ser tratados com maior cautela (GINA, 2021).

28

29

30

#### 1.5.4 DIAGNÓSTICO DAS ALERGIAS RESPIRATÓRIAS

O diagnóstico das alergias respiratórias pode ser feito através de dados clínicos e identificação de IgE específica, *in vivo* ou *in vitro*. Os dois exames apresentam sensibilidade e especificidade muito próximos, sendo que o teste de punção (exame *in vivo*) é rapidamente realizado em ambiente ambulatorial, de rápida execução, acessível e barato (SAKANO et al., 2018).

Já a dosagem laboratorial de IgE (exame *in vitro*) é mais cara, necessita de coleta de material e processamento do sangue, o que faz com que haja necessidade de maior tempo para os resultados. Porém, a dosagem da IgE sérica por ELISA permite a quantificação em unidades, o que pode ser bastante útil para acompanhamento de alguns pacientes.

A asma é diagnosticada em pacientes com o quadro clínico compatível associado à variação do fluxo expiratório demonstrado na espirometria, exame que ajuda a avaliar a função pulmonar (GINA, 2021).

#### 1.5.5 TRATAMENTO

As alergias respiratórias possuem um grande impacto econômico e o desenvolvimento de novos tratamentos é uma meta crucial. Ainda estamos longe de desenvolver uma terapia realmente eficaz devido ao fator multifatorial das doenças (LÁZARO-GORINES et al., 2020).

##### 1.5.5.1 TRATAMENTO DA RINITE ALÉRGICA

A primeira linha para tratamento medicamentoso da rinite alérgica é composta por medicamentos anti-histamínicos orais. Os corticoides de uso nasal são largamente usados para controle do processo inflamatório da mucosa nasal, sendo os medicamentos mais efetivos para controle clínico da doença. Podem ser usados isolados ou associados aos anti-histamínicos nasais (SAKANO ET AL., 2017) .

### 1.5.5.2 TRATAMENTO DA ASMA

O tratamento preconizado atualmente vai depender de cada paciente, da gravidade da doença e do estado de controle clínico. Os medicamentos mais usados na prática clínica são corticoides inalatórios, associados ou não aos agentes beta agonistas de longa ação (LABA). Para o tratamento dos quadros agudos, indica-se corticoides inalatórios associados aos LABA ou beta agonistas de ação curta (GINA, 2021).

### 1.5.5.3 IMUNOTERAPIA ALÉRGENO ESPECÍFICA

A imunoterapia alérgeno-específica (AIT- do inglês allergen immunotherapy) é o único tratamento comprovadamente capaz de mudar a história natural das doenças atópicas (MARTÍNEZ ET AL., 2019). Pode diminuir a necessidade do uso de medicamento, induzir tolerância imunológica e prevenir o desenvolvimento de novas alergias (ALVARO-LOZANO et al., 2020).

Estudos mostraram que com o uso da AIT, houve melhora clínica e maior tempo de remissão da doença (SAKANO ET AL., 2017).

Atualmente tem-se compreendido melhor essa modalidade terapêutica e o seu mecanismo fisiopatológico. A exposição aos antígenos induz a produção de IgG 4 (que atua competindo com a IgE específica) e reduz a produção de IgE específica (Yang & Zhu, 2017a). A AIT induz a expressão de células T reguladoras que secretam citocinas, entre elas IL-10 e TGF- $\beta$ , com diminuição do processo inflamatório e conseqüentemente dos sintomas (ALVARO-LOZANO et al., 2020).

Como os ácaros da poeira domiciliar são os maiores desencadeantes das alergias respiratórias, a IT para esses antígenos é a mais utilizada e estudada mundialmente. Poucos estudos estão disponíveis para IT contra fungos, baratas e epitélio de cão e gato (ALVARO-LOZANO et al., 2020).

Pacientes que não tiveram controle clínico da alergia respiratória (rinite ou asma) com medicamentos ou se houver retorno dos sintomas com a suspensão da medicação, têm indicação de fazerem uso da AIT (GINA, 2021).

1 Estudos recentes foram feitos com AIT na forma de comprimidos sublinguais,  
2 com segurança clínica para tratamento da rinite e da asma. A AIT tem um benefício  
3 a mais de manter o controle clínico da doença por anos mesmo após a interrupção  
4 do tratamento (VITIELLO, ET AL, 2020).

5 Nesta modalidade de tratamento, são realizadas semanalmente doses  
6 crescentes e concentrações progressivas do alérgeno envolvido nos quadros de  
7 atopia. Porém existem poucos extratos comerciais específicos disponíveis, com a  
8 necessidade do desenvolvimento de novas técnicas.

#### 9 10 **1.5.5.4 OUTROS TRATAMENTOS**

11 Em pacientes mais graves ou sem resposta a medicamentos, pode ser  
12 necessário o uso de medicamentos imunobiológicos, que afetam direta ou  
13 indiretamente a ação da IgE. Observou-se que pacientes alérgicos possuem  
14 titulações mais altas de IgE do que a população geral. Desta forma, o uso de  
15 anticorpos monoclonais com o objetivo de bloquear a IgE tornou-se uma prática  
16 clínica rotineira em nosso meio. O fármaco mais utilizado é o Omalizumab,  
17 anticorpo monoclonal da classe IgG que se liga a uma região específica da IgE, a  
18 porção Fc, com diminuição da IgE total circulante e, conseqüentemente, da  
19 ativação de basófilos e mastócitos (JOHNSON ET AL., 2019).

20 A AIT possui algumas limitações, como a eficácia desigual no pacientes,  
21 qualidade variável dos componentes, além de risco de feito adverso (embora eles  
22 raramente sejam relatados). Os mecanismos do sucesso e do fracasso ainda são  
23 desconhecidos. Em fase ainda experimental para doenças alérgicas estão sendo  
24 usados imunotoxinas. As imunotoxinas são moléculas quiméricas usadas para  
25 tratamento de câncer, principalmente hematológico. Para uso em humanos  
26 portadores de alergias respiratórias ainda necessita de mais estudos (LÁZARO-  
27 GORINES et al., 2020).

28 Uma abordagem terapêutica ainda experimental seria o uso de aminoácidos  
29 na tentativa do bloqueio de IgE. Estudos iniciais, realizados por Campos-  
30 Mesquita, 2020, usando ácido glutâmico, foram realizados em camundongos, com  
31 resultados animadores. Foram testados IgEs específicas para albumina 2S, uma

1 proteína antigênica presente em mamona (*Ricinus communis* L). Os resultados  
2 mostraram que o uso de ácido glutâmico nos animais sensibilizados contra esta  
3 proteína, foi capaz de bloquear a IgE específica, de forma que não houve ligação  
4 ao alérgeno. Resultados semelhantes foram encontrados com as proteínas do  
5 leite de vaca. Não foram observados efeitos colaterais em animais, sendo  
6 analisados quanto a alterações comportamentais e motoras (CAMPOS-  
7 MESQUITA, 2020).

#### 8 **1.5.6- COMPLICAÇÕES:**

9 A rinite é uma doença com baixa mortalidade, mas alta morbidade. Pessoas  
10 portadoras de rinite podem ter alterações cognitivas de correntes do distúrbio do  
11 sono que apresentam, causando sonolência, baixo rendimento escolar e  
12 depressão (KAPLAN, AT AL, 2020).

13 Remodelamento pode ser definido como uma alteração na histologia natural  
14 de um órgão como consequência de lesões mecânicas ou inflamatórias. (AL-  
15 MUSSEN, 2011). Embora a fisiopatologia da asma e da rinite sejam muito  
16 semelhantes, não se sabe o papel do remodelamento na cavidade nasal  
17 (BOUSQUET et al., 2008). No pulmão, o ocorre em decorrência de diversas  
18 doenças, entre elas a asma. Com isso, pode ocorrer o espessamento da parede  
19 brônquica, com limitação do fluxo aéreo. Quanto maior e mais precoce for a  
20 limitação do fluxo aéreo, maiores serão as alterações clínicas encontradas, que  
21 podem chegar até a dificuldade em atividades cotidianas (AL- MUSSEN, 2011).

22 O remodelamento pulmonar pode ser reversível nos quadros leves, sendo  
23 geralmente persistente nos quadros graves. O uso dos corticosteroides inalatórios  
24 em pouco afeta esta complicação e há necessidade de mais estudos com relação  
25 aos outros medicamentos (HALWANI, 2021).

26

27

28

29

30

## 1.6- CONSIDERAÇÕES GERAIS

Apesar dos diversos tratamentos de combate às doenças alérgicas e algumas medidas preventivas, sabe-se que está ocorrendo um aumento do número de portadores de alergias respiratórias. Estas doenças são em sua maioria desencadeadas por múltiplos alérgenos e os tratamentos disponíveis muitas vezes ineficazes. Além do impacto socioeconômico, existe limitação no diagnóstico e manejo clínico destes pacientes. Atualmente, os estudos têm caminhado para a correlação entre a IgE específica e o alérgeno desencadeante e, após a identificação, tentar bloqueio da IgE. A identificação de novos alérgenos é muito importante não só para diagnóstico, mas para propor novas modalidades terapêuticas.

Diversos estudos mostraram que quanto maior o tempo de exposição e maiores as concentrações dos alérgenos, maiores serão as chances de sensibilização e desenvolvimento de doenças atópicas. Assim, o estudo do ambiente domiciliar, local onde as pessoas passam a maior parte do dia, é de extrema importância tanto para o manejo das doenças já estabelecidas, como para prevenção de sensibilização futura, diagnóstico e tratamento personalizado.

1    2- **OBJETIVOS:**

2                   **2.1- OBJETIVO GERAL**

- 3                   • Identificar alérgenos presentes em ambiente domiciliar e correlacionar a presença  
4 de alérgenos domiciliares com a IgE sérica em pacientes selecionados.

5

6                   **2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 7                   • Selecionar, por pesquisa clínica, pacientes com histórico de alergia a  
8 componentes aéreos.

- 9                   • Coletar o ar em ambientes domiciliares.

- 10                  • Extrair componentes aéreos retidos em filtros coletores e avaliar a complexidade  
11 proteicas dos extratos obtidos em locais de permanência de pacientes com diagnóstico de  
12 alergia.

- 13                  • Quantificar IgE total e IgE específica direcionadas aos alérgenos presentes em  
14 fungos, ácaros, pelos de animais domésticos e baratas.

- 15                  • Avaliar se é possível correlacionar a presença de IgE sérica específica para  
16 antígenos presentes no ar do próprio domicílio.

- 17                  • Identificar epítomos de IgE através de programas computacionais

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33



### **3- METODOLOGIA:**

#### **3.1- SELEÇÃO DE PACIENTE ALÉRGICOS:**

Pacientes, com idades entre 5 e 60 anos, portadores de asma ou rinite, atendidos no ambulatório de alergia no Município de Campos dos Goytacazes foram convidados a participar desta pesquisa. O grupo selecionado era formado por pacientes que não responderam ao tratamento medicamentoso inicial ou que tiveram recrudescimento dos sintomas com a suspensão da medicação prescrita

Foram excluídos os pacientes que se recusaram a participar da pesquisa ou que não apresentavam boa adesão ao tratamento no momento.

O projeto foi submetido ao Comitê de ética Médica, com liberação N° CAAE 14824818.1.0000.5244. Os pacientes foram orientados verbalmente sobre a pesquisa e através do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), com uma cópia em anexo.

#### **3.2- COLETA DO MATERIAL AEROBIOLÓGICO:**

O material aerobiológico foi coletado através do sistema de coleta de material particulado para pequenos volumes-MICRO VOL (figura 10a). Foram usados filtros especificados pelo fabricante, colocado em duas posições diferentes de coleta: uma com maior diâmetro, filtro 9 a 10  $\mu\text{M}$ , chamado aqui de filtro grosso - FG e outra com o menor diâmetro 0,4 a 1,6  $\mu\text{M}$ , chamado filtro fino- FF. O equipamento microvol apresenta seções que mimetizam o trato respiratório, conforme descrito na Figura 10B.

1



Simulação do trato respiratório

Partículas superiores a 10uM

ESTÁGIO 0 9-10 uM

ESTÁGIO 1 5,8 -9 uM

ESTÁGIO 2 4,7-8 faringe

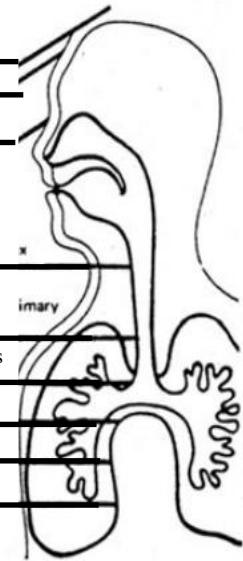
ESTÁGIO 3 3,3 -4,7 traqueia e brônquios primários

ESTÁGIO 4 2,1 -3,3 brônquios secundários

ESTÁGIO 5 1,1 -2,1 brônquio terminal

ESTÁGIO 6 0,6 -1,1 alvéolo

ESTÁGIO 7 0,4 -1,6 alvéolo



2 **Figura 10:** A) aparelho de coleta de ar domiciliar Eighth Stage-Viable Impactor  
3 usado para coleta do ar em domicílio dos pacientes selecionados; B) Amostrador  
4 estilo BGI simulando o sistema respiratório humano

5

6 Os pacientes selecionados foram orientados a colocar o aparelho de coleta  
7 em seus domicílios, de preferência no cômodo feito de dormitório durante 8 horas,  
8 por 3 dias consecutivos, totalizando 24 horas de coleta.

9

### 10 3.3- EXTRAÇÃO DE COMPONENTES AÉREOS RETIDOS EM FILTROS 11 DE COLETA:

12 Os filtros obtidos foram retirados do aparelho com ajuda de uma pinça e  
13 condicionados em temperatura ambiente, protegidos de umidade, em ambiente  
14 seco e limpo. Estes filtros circulares com diâmetro 08 cm, foram cortados  
15 inicialmente em pedaços com 4 cm<sup>2</sup> e colocados em frascos de plástico cônico de  
16 2 mL (tipo eppendorff) para extração das proteínas retidas. A extração proteica  
17 foi realizada pela adição de 800 µL de tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6,  
18 agitação e sonicação por 3 períodos de 10 minutos. Entre as etapas de sonicação,

1 o material foi colocado em banho a 40°C sendo mantido em agitação por 1 hora e  
2 3 horas. Foi retirado 500 µL de cada amostra e este extrato foi mantido congelado  
3 para utilização futura. Estas amostras foram chamadas de “AMOSTRAS DOS  
4 FILTROS”, FF, para as obtidas do filtro fino, ou FG, para as obtidas dos filtros com  
5 maior diâmetro.

### 6 **3.4- AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DOS ALÉRGENOS EM** 7 **EXTRATOS PADRÕES COMERCIAIS E NOS EXTRATOS DOS FILTROS DE** 8 **COLETA:**

9 Com objetivo de termos filtros como alérgenos controle, filtros limpos com  
10 tamanho de 4 cm<sup>2</sup> foram embebidos em soluções contendo amostras proteínas  
11 alergênicas de *Ricinus communis* (albuminas 2S obtidas de sementes de mamona),  
12 e de extratos alergênicos fornecido pela empresa FDA Allergenic®, obtidos através  
13 de doação. Os extratos são fornecidos em volume de 4ml, com validade de março  
14 de 2022, mostrando uma concentração de 20% das proteínas pesquisadas. 1ml de  
15 soluções contendo 1mg/mL de albuminas 2S foram empregados nos ensaios para  
16 padronização. Para os extratos comerciais foram usadas as soluções normalmente  
17 empregada para testes alérgicos (Prick Test), produzidas pela FDA Allergenic®.  
18 Extratos brutos de poeira, barata, ácaros, fungos, epitélio de cão, epitélio de gato,  
19 extratos de *Dermatophagoide pyteronissenus* (DP), *Dermatophagoide fariane* (DF),  
20 *Blomia tropicalis* (BT) diluídos 1:10 em água mili-Q (TÉDIA®). Os filtros foram  
21 retirados da solução, secos em ambiente de capela à temperatura ambiente (~27°  
22 C), mimetizando a retenção de alérgenos obtidas durante filtração domiciliar. As  
23 proteínas retidas nos filtros foram extraídas conforme descrito no item 4.3.

24

### 25 **3.5- QUANTIFICAÇÃO DA IGE TOTAL E IGE ESPECÍFICA EM SOROS** 26 **DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE ALERGIA RESPIRATÓRIA:**

27 Foram coletadas amostras de sangue periférico em laboratórios de análises  
28 clínicas de referência na região de Campos dos Goytacazes. Foram dosadas  
29 imunoglobulinas A, M, G e E, além de IgEs específicas para *Dermatophagoide*

1 *pyteronissenus*, *Dermatophagoide fariane*, *Blomia tropicalis*, barata, epitélio de  
2 cão, epitélio de gato e fungos.

3 Amostras adicionais de sangue periférico foram coletadas, centrifugadas e  
4 foi separado o soro que foi mantido congelado até que as análises posteriores  
5 fossem realizadas. O material foi enviado para o Centro de Biociências e  
6 Biotecnologia, localizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF),  
7 onde foi mantido a -20° C, em freezer reservado para amostras biológicas.

### 8 **3.6- ENSAIOS DE IMUNODETECÇÃO-ELISA:**

#### 9 **3.6.1- ELISA:**

10 Neste estudo, foram realizados testes ELISA utilizando três protocolos  
11 diferentes, chamados aqui de ELISA 1, 2 e 3. Todos com o objetivo de identificar  
12 IgE humana específica direcionadas para antígenos pré-determinados.

13

#### 14 **3.6.1.1- ELISA 1- Detecção de IgE específica para albumina** 15 **2S de *Ricinuns comunis* através de extração em filtro:**

16 Neste ensaio foram utilizadas três concentrações de albuminas 2S de  
17 *Ricinuns comunis*, alérgenos amplamente estudados no laboratório pela  
18 disponibilidade de soros previamente analisados. O teste foi realizado em triplicata  
19 utilizando placa de poliestireno Nunc-Immuno Plate IF. Como branco empregamos  
20 tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 (60 µL/poço). Foram empregados albumina  
21 2S de *Ricinus communis* nas concentrações de 100pg/µL, 1ng/µL e 1mg/mL (60  
22 µL/poço).

23 Foram utilizadas amostras obtidas a partir das amostras dos filtros, conforme  
24 descrito em 3.4, usando 60 µL/poço de solução.

25 Após a colocação das amostras, a placa foi mantida em geladeira durante  
26 12 horas, e a seguir foram feitas lavagens com PBS em Tween pH 7,0 (PBS T) por  
27 4 vezes. Após as lavagens, foi feito bloqueio com 200 µL/poço do tampão com  
28 gelatina em PBS -Tween, sendo as placas mantidas em estufa a 37° C por 60  
29 minutos. A seguir os poços foram lavados por 3 vezes com PBS T e incubados com

1 50 µL do anticorpo primário, soro dos pacientes imunorreativos com albuminas 2S  
2 de *R. communis*, diluídos 1:2 no tampão de gelatina. A placa foi levada para estufa  
3 por 2 horas, lavada com PBS T. Como anticorpo secundário empregamos 50  
4 µL/poço soro anti-IgE humana (GOAT anti IgE human, KPL na diluição 1: 1.000). A  
5 placa foi mantida em estufa a 37° C por 1 hora, lavada em PBS T por 3 vezes antes  
6 da etapa de revelação. Nesta etapa, foram adicionados 60 µL/poço da solução de  
7 substrato, o-fenilenodiamina (OPD), sendo esta, protegida da claridade com papel  
8 alumínio, por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 60µL/poço de  
9 ácido sulfúrico 3M. A intensidade colorimétrica foi medida por absorbância 492 nm,  
10 utilizando um Microplate Reader (Thermo Plate).

11

### 12 **3.6.1.2- ELISA 2: Detecção de IgE específica para aeroalérgenos** 13 **extraídos dos filtros**

14 Para verificar a presença de alérgenos nos filtros, neste experimento foram  
15 empregadas amostras extraídas do filtro grosso (FG) e filtro fino (FF) instalados na  
16 residência de 3 dos pacientes, denominado paciente1,2 e 3 (pct 1,2 e 3). O teste  
17 foi realizado em triplicata utilizando placa de poliestireno (Nunc-Immuno Plate IF).  
18 Foram utilizados também 50 µL/poço de solução obtida a partir de extratos FDA  
19 Allergenic® (na diluição 1:4 com tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6), aplicadas  
20 diretamente nas placas. Placas embebidas com os extratos foram mantidas em  
21 estufa a 37° C por 1 hora. Feita lavagem com PBS em Tween 0,05% por 3 vezes e  
22 colocado 200 µL/ poço soro fetal bovino a 5%, em estufa por 1 hora e, em seguida,  
23 nova lavagem. Foram utilizados 100 µL/ poço do soro dos pct 1, 2 e 3 e deixado  
24 “overnight”.

25 Como anticorpo secundário foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-IgE  
26 humana associado à fosfatase alcalina (Monoclonal anti IgE alkaline fosfatase  
27 antibody, diluído 1:2.000, diluído em soro fetal bovino a 3%). A placa foi mantida a  
28 27°C por duas horas e submetida às lavagens como descritas acima. Para a  
29 revelação foi empregado 100 µL/ poço do substrato p-nitrofenil-fosfato (PNFF)  
30 1mg/mL, sendo a placa protegida da luz por 15 minutos. A reação foi interrompida  
31 pela utilização da solução de EDTA 0,1 M. A intensidade colorimétrica foi medida  
32 por absorbância 405 nm, utilizando um Microplate Reader (Thermo Plate).

1           **3.6.1.3- ELISA 3 Detecção de IgE específica para aeroalérgenos obtidos**  
2 **através de Extratos comerciais concentrados:**

3           Neste teste, todas as amostras oriundas do extrato comercial FDA Allergenic  
4 ® foram previamente concentradas quatro vezes em centrífuga a vácuo  
5 (speedvac). O teste foi realizado em triplicata utilizando placa de poliestireno (Nunc-  
6 Immuno Plate IF). Em todas as elas foram adicionadas ao tampão  
7 carbonato/bicarbonato pH 9,6 na proporção 1:3. As amostras utilizadas nas placas  
8 foram: extrato comercial FDA Allergenic ®: DP, DF, BT, ácaro, fungo, barata,  
9 epitélio de cão e gato; FF e FG dos pacientes. Foram colocadas 50 µL/poço das  
10 amostras nas placas, deixado em estufa a 37°C por 1 hora. Após lavagem com 200  
11 µL/poço com PBS em TWEEN 0,05%, foi adicionado 200 µL/poço de soro fetal  
12 bovino a 5% e colocado em estufa por 1 hora. Após esta incubação foi feita nova  
13 lavagem e adicionado 100 µL/poço do soro de cada um dos pacientes,  
14 denominados pct 1, pct 2, pct 3 e pct 4. As etapas posteriores foram as mesmas  
15 descritas no item 4.6.1.3.

16  
17           **3.7- AVALIAÇÃO DA COMPLEXIDADE DAS PROTEÍNAS DOS**  
18 **EXTRATOS POR SDS-PAGE:**

19           Os extratos das proteínas retidas nos filtros foram fracionados por SDS-  
20 PAGE. Foram preparados géis de fracionamento a 12,5% de acrilamida, pH 8,8 e  
21 géis de concentração a 3% acrilamida +bis-acrilamida, pH 6,8

22           Foram preparados dois géis, um para as amostras extraídas dos filtros e  
23 outro para amostras do FDA Allergenic ®. Os extratos foram diluídos em tampão  
24 de amostra 4X concentrado (8 µL do tampão de amostra e 24 µL da amostra). Para  
25 a corrida foi empregada inicialmente uma corrente de 60 mA/placa e 117 Volts  
26 constante. As placas foram lavadas em água destilada (AD) e as proteínas coradas  
27 por coomassie Blue-R 1,25%, sob agitação por 2 horas. Em seguida, as placas  
28 foram imersas em descorante metanol-ácido-acético-água (45/10/45), com trocas  
29 frequentes.

1 Após a descoloração e a não visualização de proteínas, foi realizada a  
2 revelação pela prata (nitrito de prata a 2,5%) de acordo com Towbin e col, 1979  
3 sendo a revelação interrompida pela adição de ácido acético a 5%.

### 4 **3.8- IMUNODETECÇÃO DAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS POR WESTERN** 5 **BLOTTING:**

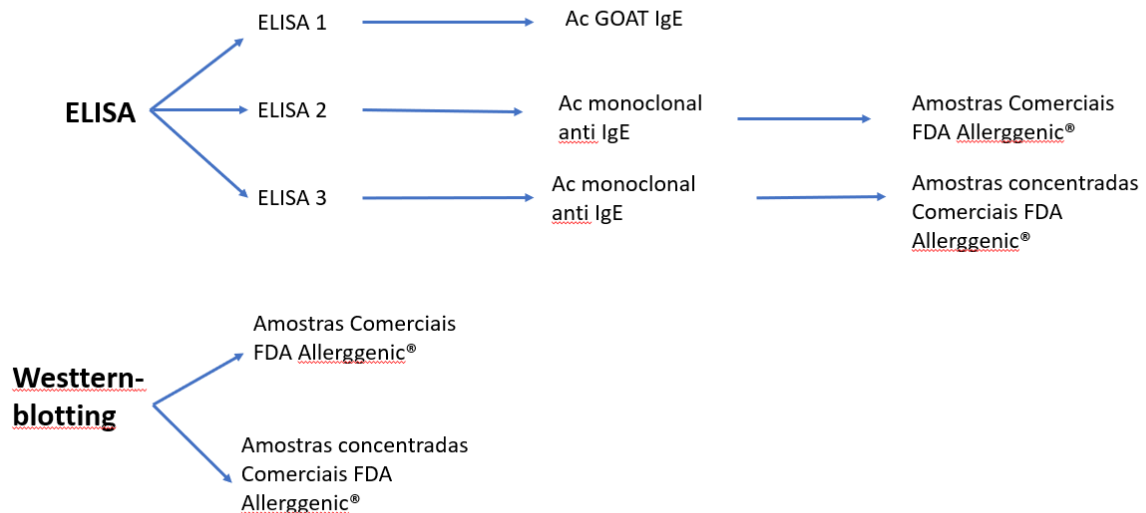
6 Foram feitos 2 géis com dez poços cada. O gel 1 foi utilizado para  
7 imunodeteccção das amostras dos extratos de BT, DP, DF, ácaros, barata, fungos,  
8 epitélio de cão e gato, aplicados diretamente no gel. No gel 2 foram usadas  
9 amostras obtidas a partir do FF e FG dos pacientes 1, 2 3 e 4. Foi realizada a  
10 eletroforese conforme descrito em 4.7.

11 No gel 1 foi feita a transferência das bandas para membrana de nitrocelulose  
12 e posterior imunodeteccção e o gel 2 foi utilizado corado para avaliar a extração das  
13 proteínas dos filtros da casa dos pacientes. O gel 2 permaneceu no corante, sob  
14 agitação por 20 horas, sendo feita descoloração posteriormente.

15 As bandas do gel 1 foram transferidas para a membrana de nitrocelulose  
16 utilizando o papel filtro embebido previamente em tampão de transferência (20 mM  
17 de Tris, 145 mM de glicina e metanol 20%) e formado um sistema "sanduíche". A  
18 transferência foi realizada com uma corrente de 1 mA/cm<sup>2</sup> da membrana por um  
19 período de 2 horas. Finalizada a transferência, a membrana foi retirada do sistema  
20 "sanduíche" e corada com o reagente Ponceau. Após a visualização das proteínas,  
21 a membrana foi lavada com água mili Q e embebida no tampão bloqueador (PBS -  
22 tampão fosfato salino pH 7,6 e 2% de leite em pó desnatado) por 2 horas sob  
23 agitação. Em seguida a membrana foi lavada com PBS por 5 vezes, trocando o  
24 tampão a cada 1 minuto. Após, a membrana foi incubada com o soro do paciente  
25 4, anticorpo primário, diluído 1:4 em tampão bloqueador, por 18 horas a  
26 temperatura de 4°C. Posteriormente a membrana de nitrocelulose foi lavada com  
27 tampão PBS por 5 vezes, trocando o tampão a cada 1 minuto, e a seguir incubada  
28 por 2 horas com anticorpo secundário, monoclonal anti-human IgE alcaline  
29 fosfatase, diluído 1:2.000 no tampão bloqueador. Foi realizada nova lavagem com  
30 PBS 1x e colocado o substrato, composto por p-Nitrophenil fosfato em tampão  
31 para fosfatase alcalina. Como não houve coloração, optamos por colorir com  
32 NBT/BCIP. A reação ocorreu sob o abrigo de luz por 15 minutos.

1

## Materiais e Métodos



2

3 **Figura 11:** Esquema ilustrativo de alguns dos experimentos realizados

4

### 5 3.9- IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS DE IGE ATRAVÉS DE PROGRAMAS 6 COMPUTACIONAIS:

7 Foram selecionadas algumas proteínas presentes nos alérgenos descritas  
8 amplamente na literatura como alérgenos maioritários. Foram estudadas 7  
9 proteínas: Der p1, Der p 1, Der f1, Der f 2, Blo t 5, Bla g4 e Per a 4.

10 Inicialmente foi feita a pesquisa da sequência de aminoácidos e a sequência  
11 FASTA foi obtida através da pesquisa em <http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>

12 Após o reconhecimento das sequências FASTA, a predição dos epítomos de  
13 célula B, em geral muito similares aos epítomos ligantes de IgE, foi realizada in  
14 sílico em 3 fontes diferentes. A análise foi realizada através do software PHD,  
15 disponível na plataforma [http://ailab-](http://ailab-projects1.ist.psu.edu:8080/bcpred/predict.html)  
16 [projects1.ist.psu.edu:8080/bcpred/predict.html](http://ailab-projects1.ist.psu.edu:8080/bcpred/predict.html)

17

18



## **4- RESULTADOS:**

### **4.1- SELEÇÃO DOS PACIENTES E COLETA DO MATERIAL AEROBIOLÓGICO:**

No período de julho a outubro de 2019, 14 pacientes, com idades entre 5 e 60 anos e histórico de doenças respiratórias, foram selecionados e aceitaram participar deste projeto de pesquisa.

Após preenchimento do termo de livre esclarecimento (em anexo), os pacientes foram instruídos com relação ao procedimento para a coleta de material disperso no ar em seus aposentos. Os pacientes 5 e 6 não fizeram a coleta do material residencial e cinco aqui chamados de pct 10,11,12,13,14 fizeram a coleta do material aerobiológico, mas não retornaram para a coleta do sangue

Os resultados dos exames laboratoriais, hematócrito, dosagem de hemoglobina, teor de leucócitos e hemácias dos pacientes selecionados indicaram que eles poderiam participar dos estudos subsequentes. Os valores de IgA, IgG, IgM e IgE dos pacientes que participaram do experimento estão apresentados na tabela I.

### **4.2- DOSAGEM DE IGE SÉRICA PELO MÉTODO IMMUNOCAP®**

Com o objetivo de identificar pacientes sensibilizados aos alérgenos da poeira domiciliar, foi realizada a dosagem de imunoglobulinas e IgEs específicas em nove pacientes, como mostrado na tabela II. Dos 9 pacientes que fizeram os exames laboratoriais, 5 apresentaram IgE específica para os ácaros da poeira domiciliar. As dosagens para barata, fungos, epitélio de cão e gato foram negativas ou com valores irrelevantes. A Figura 12 mostra a alta reatividade das IgE sérica do paciente 6 aos alérgenos DP e DF. Para os ensaios de imunoafinidade foram usados os soros dos pacientes 1,2,3 e 4, visto que o paciente 6, o mais reativo para aeroalérgenos, não realizou a coleta do ar domiciliar.

**Tabela I - Exames laboratoriais do soro dos pacientes com sintomas de doenças alérgicas que participaram desta pesquisa.**

	IgA	IgG	IgE	IgM
<b>Valores de ref.</b>	70-400	700-1600	< 87	40-230 <sup>5</sup>
<b>Pct 1</b>	240	1.310	<b>105</b>	174
<b>Pct 2</b>	406	925	<b>155</b>	42
<b>Pct 3</b>	-	-	82	-
<b>Pct 4</b>	554	1.187	<b>164</b>	77
<b>Pct 5</b>	372	1.332	11,3	120
<b>Pct 6</b>	116	840	1.294	130
<b>Pct 7</b>	243	1.097	6	143
<b>Pct 8</b>	329	1.427	60	131
<b>Pct 9</b>	160	1.097	18	116

**Tabela II – Dosagem de IgE específica de pacientes com sintomas de doenças alérgicas que participaram desta pesquisa.**

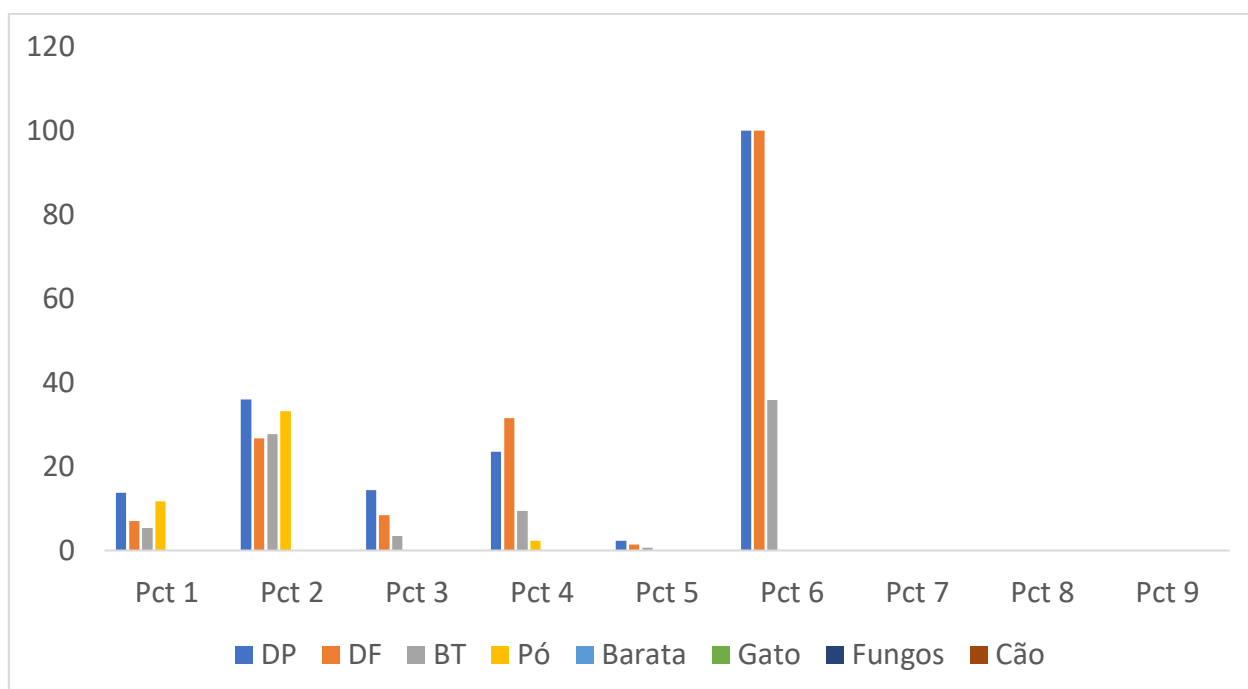
	DP	DF	BT	Pó	Barata	Gato	Fungos	Cão
<b>Pct 1</b>	<b>13,70</b>	<b>6,99</b>	<b>5,31</b>	<b>11,70</b>	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
<b>Pct 2</b>	<b>36</b>	<b>26,70</b>	<b>27,70</b>	<b>33,2</b>	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
<b>Pct 3</b>	<b>14,4</b>	<b>8,37</b>	<b>3,44</b>		< 0,10	<0,10	< 0,10	< 0,10
<b>Pct 4</b>	<b>23,5</b>	<b>31,5</b>	<b>9,42</b>	<b>2,36</b>	0,49	< 0,10	< 0,10	< 0,10
<b>Pct 5</b>	2,3	1,4	0,7	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10
<b>Pct 6</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>	<b>35,8</b>		0,2	<0,10	<0,10	<0,10
<b>Pct 7</b>	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
<b>Pct 8</b>	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	<0,10	0,13	< 0,10	0,20
<b>Pct 9</b>	< 0,10	0,12	< 0,10	< 0,45	< 0,10	0,30	< 0,10	0,50

1

2 Valores de referência:

- 3 • 0,1-0,7 baixo
- 4 • 0,7-3,5 moderado

5 3,5 alto (marcados em vermelho na tabela)



6

7 **Figura 12:** Quantificação de IgE específica para alérgenos dispersos no ar para  
8 pacientes com doenças alérgicas determinadas pela técnica Immunocap®

9

### **4.3- ELISA – Imunodeteção de proteínas alergênica usando soro de pacientes como fonte de IgE**

O primeiro teste realizado, conforme descrito em 4.6.1.1, não apresentou resultados satisfatórios. Os poços onde haviam sido colocados apenas no tampão carbonato/bicarbonato ficaram com alta coloração, tornando difícil qualquer interpretação dos dados. Este resultado poderia ser atribuído a possíveis reconhecimentos inespecíficos, ou falhas durante etapas de bloqueio ou ainda, pelo uso de anticorpo secundário “GOAT IgE human”. Os demais testes de ELISA foram feitos com “Ac monoclonal anti IgE alcaline fosfatase”, sendo a reação interrompida pelo uso de EDTA. Os resultados obtidos para os diversos alérgenos testados e amostras obtidas dos dormitórios familiares são apresentados na tabela III, onde estão descritas as médias dos valores obtidos em triplicata, após o uso de EDTA para interromper a reação.

Apesar de aumentos discretos nas leituras das absorvâncias destacadas em vermelho na tabela, os resultados são indicativos de que os pacientes 1, 2 e 3 apresentam IgE que reconheceram de modo específicos os alérgenos presentes em DF e alérgenos de barata. Também há indicações que as proteínas retidas nos filtros de coleta feitas nos domicílios, tenham sido extraídas e imunorreagiram com o soro dos pacientes 1, 2 e 3. Em função do baixo valor de ABS, estas amostras foram concentradas e posteriormente reanalisadas.

1

**Tabela III: Leituras de Absorbância a 405 nm obtidas após ensaios imunoreativos (ELISA, descritos no item 4.6.1.2) usando soro de três pacientes com IgE total superior a 100 U. Valores referentes às médias das triplicatas**

	Sem soro	Pct 1	Pct 2	Pct 3
<b>Branco</b>	0,080	0,076	0,090	0,078
<b>Água miliQ</b>	0,087	0,092	0,089	0,094
<b>FF</b>	0,088	ND*	0,090	<b>0,108</b>
<b>FG</b>	0,100	<b>0,124</b>	<b>0,100</b>	<b>0,125</b>
<b>DF</b>	0,900	<b>0,114</b>	<b>0,130</b>	<b>0,112</b>
<b>DP</b>	0,100	0,105	<b>0,107</b>	<b>0,104</b>
<b>BT</b>	0,090	0,095	<b>0,110</b>	0,099
<b>Barata</b>	0,094	<b>0,115</b>	<b>0,160</b>	<b>0,116</b>
<b>Ácaro</b>	0,080	0,081	0,084	0,088
<b>Poeira</b>	0,093	0,090	0,091	0,097
<b>ep cão</b>	0,097	0,099	0,099	0,099
<b>ep gato</b>	0,097	0,092	0,095	0,095
<b>Ácaro</b>	0,085	0,091	0,094	0,092

2

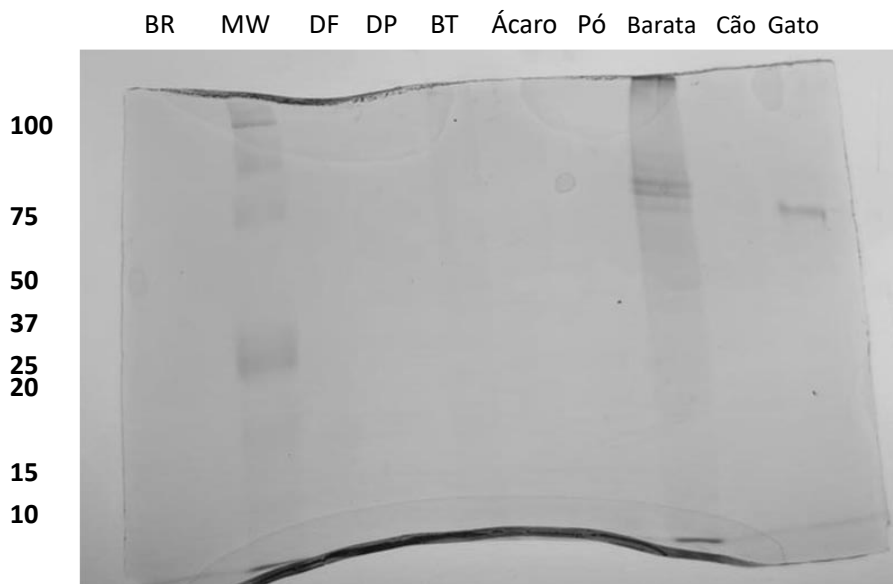
3

#### 4 **4.4 AVALIAÇÃO DA COMPLEXIDADE PROTEICA DOS EXTRATOS** 5 **ALERGÊNICOS POR ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMINA:**

6 Como descrito na introdução deste trabalho, os extratos alergênicos  
7 utilizados consistem em mistura de alérgenos, por exemplo, os alérgenos de  
8 *Dermatophagoides farinae* (DF) consistem em uma mistura contendo pelo menos  
9 31 proteínas. Com o objetivo de analisar os extratos empregados, bem como  
10 avaliar a complexidade dos extratos dos filtros de coleta, o perfil proteico destas  
11 amostras foi avaliado por eletroforese em gel de Acrilamida. As figuras 13 e 14  
12 mostram os resultados obtidos. Na figura 13, não identificamos componentes  
13 proteicos, (coloração com Coomassie brilliant blue R) para a maioria dos alérgenos

1 componentes do kit FDA allergenic, exceto a presença de componentes proteicos  
2 em extratos de barata, sendo os mais abundantes com massa molecular próximas  
3 a 10 e 75 kDa e uma proteína com massa molecular próximo a 75 kDa para o  
4 extrato de pelo de gato. Nenhuma banda proteica foi visualizada para os extratos  
5 dos filtros de coleta na casa dos quatro pacientes.

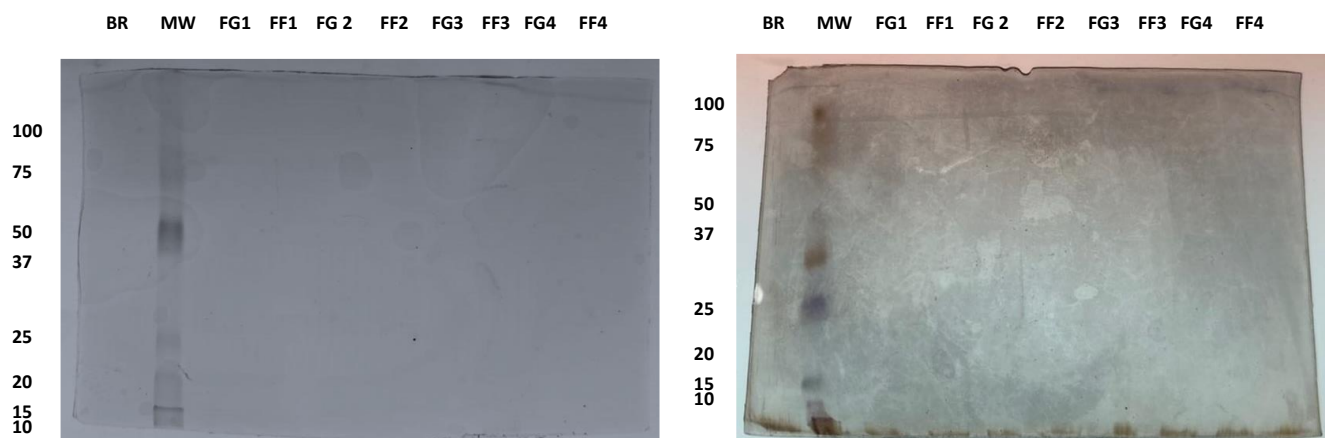
6



7

8 **Figura 13:** SDS-PAGE 12,5% dos extratos comerciais do Kit comercial do  
9 FDA Allergenic ®

10



1 **Figura 14:** SDS-PAGE dos extratos dos filtros de coleta. Filtro Grosso (FG) e Filtro  
 2 Fino (FF) das casas dos pct 1, pct2, pct3 e pct4, obtidos conforme descrito no item  
 3 4.7. A) Coloração por coomassie brilliant R ; B) revelação por nitrato de prata.

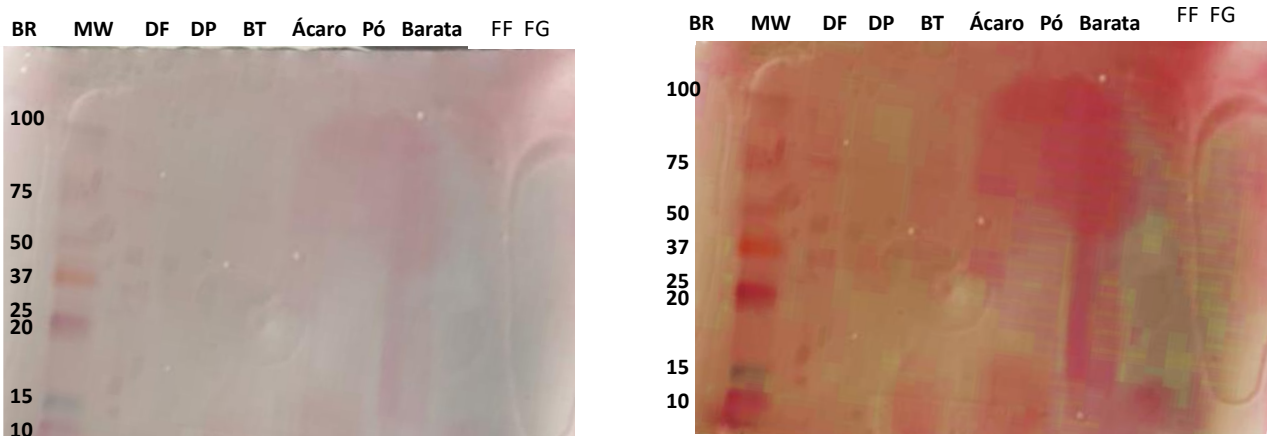
4 O gel, apresentado na figura 14A foi descolorado e nova revelação foi feita na  
 5 tentativa de visualizar as bandas por uma técnica com maior sensibilidade,  
 6 revelação por prata conforme descrita no item 4.9. Após a revelação por prata  
 7 (Figura 14B), uma banda foi visualizada na base do gel, provavelmente algum  
 8 contaminante do tampão, pois aparece também no branco. Traços são visualizados  
 9 no topo do gel, mas os dados são inconclusivos, indicando a não extração de  
 10 proteínas ou aplicação de quantidades insuficientes para detecção.

11

#### 12 **4.5- AVALIAÇÃO DA IMUNODETECÇÃO DE SOROS DE PACIENTES** 13 **ALÉRGICOS APÓS CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS- WESTERN-** 14 **BLOTTING:**

15 Como não foram visualizadas as bandas para a maioria dos extratos FDA  
 16 (figura 13) e para os extratos dos filtros (figura 14), os extratos do Kit FDA Allergenic  
 17 foram concentrados 4 vezes e os extratos dos filtros, por 10 vezes, em centrífuga  
 18 a vácuo (speedvac), antes dos ensaios de western blotting. Após o fracionamento  
 19 do extrato FDA concentrado em sistema SDS-PAGE, as proteínas foram  
 20 transferidas para membrana de nitrocelulose. Uma foto desta membrana, após  
 21 coloração com reagente Ponceau é mostrada na figura 15A. Somente bandas  
 22 referentes às proteínas do padrão puderam ser visualizadas. Através de recursos  
 23 de brilho e contraste do “powerpoint”, figura 15B, foi possível verificar algumas

1 bandas proteicas na região onde foram aplicados os extratos de alérgenos de  
2 barata, de DF (bandas definidas entre 15 e 75 kDa; bandas de massa molecular  
3 entre 10 e 15 kDa para BT, poeira (PO) e FF; bandas próximas a 37 e 75 kDa para  
4 ácaro e BT. Como algumas bandas foram visualizadas, demos sequência ao  
5 experimento. Nestes ensaios de imunodeteção, utilizamos como anticorpo  
6 primário o soro do paciente 4 e como anticorpo secundário anti-IgE humana ligada  
7 a fosfatase alcalina. Os substratos para a fosfatase alcalina foram inicialmente p-  
8 nitrofenil-fosfato (PNPP) e em um segundo experimento NBT/BCIP (nitro blue  
9 tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate). Em ambos ensaios não foram  
10 visualizadas bandas imunorreativas. Controles positivos de reação de fosfatase  
11 foram realizados e mostraram a funcionalidade da enzima.



12 **Figura 15** – A) membrana de nitrocelulose corada com reagente Ponceu  
13 após transferência de proteínas dos extratos do kit FDA allergenic, concentrados 4  
14 vezes e fracionados por SDS-PAGE; B) mesma membrana modificada em brilho e  
15 contraste.

16

#### 17 **4.6- IMUNODETECÇÃO DAS AMOSTRAS CONCENTRADAS POR** 18 **ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA, ELISA 3”**

19 Neste ensaio empregamos os extratos concentrados, 4 vezes FDA e 10  
20 vezes, extratos dos filtros coletados nas casas dos pacientes. Os soros dos quatro



1 pacientes selecionados foram imunorreativos. Como apresentado na tabela IV,  
 2 verificamos que o soro do paciente 1, o mais reativo, reconheceu proteínas nos  
 3 extratos de DF (maior intensidade), DP, BT, barata, sendo menos reativo para os  
 4 alérgenos de ácaro, fungo e cão. O soro do paciente 2 foi mais reativo para extratos  
 5 de fungo e DP enquanto o soro do paciente 3 foi mais reativo para DF e BT. O soro  
 6 do paciente 4 foi imunorreativo, de forma similar para os alérgenos de DP, ácaro e  
 7 fungo. Os soros dos pacientes 1, 2, e 4 reconheceram proteínas presentes no  
 8 filtrado fino (FF) das suas residências.

9

**Tabela IV - Ensaio de imunoabsorção enzimática empregando soros de pacientes alérgicos**

	pct 1	pct 2	pct 3	pct 4
<b>Branco</b>	0,212	0,139	0,149	0,122
<b>DP</b>	<b>0,276</b>	<b>0,168</b>	<b>0,154</b>	<b>0,152</b>
<b>DF</b>	<b>0,612</b>	0,128	<b>0,172</b>	0,122
<b>BT</b>	<b>0,417</b>	0,127	<b>0,163</b>	0,124
<b>Ácaro</b>	0,260	0,120	0,134	<b>0,157</b>
<b>Fungo</b>	0,220	<b>0,188</b>	0,150	0,130
<b>Barata</b>	<b>0,377</b>	0,144	0,139	<b>0,147</b>
<b>Cão</b>	0,245	0,140	0,127	<b>0,143</b>
<b>Gato</b>	0,231	0,114	0,15	<b>0,159</b>
<b>Água</b>	0,215	0,145	0,142	0,118
<b>FF</b>	<b>0,323</b>	<b>0,164</b>	0,149	<b>0,209</b>
<b>FG</b>	0,245	0,160	0,137	0,137

21

22

23 **4.7- Análises in sílico:**

24 A tabela V apresenta análises in sílico, realizadas conforme descrito no item  
 25 4.10. para as sequenciais e os epítomos identificados para os alérgenos  
 26 majoritários dos ácaros da poeira domiciliar Der p1, Der p2, Der f1, Der f2, Blo t5 e  
 27 de barata Bla g4 e Per a4.

Tabela V – Avaliação das sequências e predição de epítopos de IgE para os principais alérgenos dispersos no ar previstos em ambientes familiares.

Alérgeno	Sequência FASTA	Predição de epítopo
<b>Der p1</b> <i>Dermatophagoide pyteronissenus</i>	TNAC SINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQ GGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRQQSLD LAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQ HNGVVQESYYRYVAREQSCRPNARFG ISNYCQIYPPNANKIREALAQTHSAIAV IIGIKDLDAFRHYDGRITIIQRDNGYQPN YHAVNIVGYSNAQGVVDYWIVRNSWDTNW GDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL	TNAC <b>SINGNAPAEIDLRQMRTVTP</b> IRMQ GGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRQQSLDLA EQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYI <b>QHNG</b> <b>VVQESYYRYVAREQSCRPNARFG</b> ISNY CQIYPPNANKIREALAQTHSAIAVIIGIK DLDAFRHY <b>YDGRITIIQRDNGYQPN</b> YHAVNI VGYSNAQGVVDYWIVRNSWD <b>TNWGDNGYGY</b> FAANIDLMMIEEYPYVVIL
<b>Der p2</b> <i>Dermatophagoide pyteronissenus</i>	SQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCI IHRGKPFQLEAVFEANQNTKTAKIEIKA SIDGLEVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQ QYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKVMG DDGVLACAIATHAKIRD	SQVDVKDCANHEIKKVLVPG <b>CHGSEPCI</b> I HRGKPFQLEAV <b>FEANQNTKTAKIEIKAS</b> I DGLE <b>VDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQQYD</b> IKYT <b>WNVPKIAPKSENVVVTVKVMGDDGV</b> LACAIATHAKIRD
<b>Der f1</b> <i>Dermatophagoide pyteronissenus</i>	TSACRINSVNVPSSELDLRSRLRTVTPIRM QGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNTSL DLSEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYI QQNGVVEERSYPYVAREQRCRRPNSQHY GISNYCQIYPPDVKQIREALTQHTAIA VIIGIKDLRAFQHYDGRITIIQHDNGYQP NYHAVNIVGYGSTQGGDYWIVRNSWDTT WGDSGYGYFQAGNNLMMIEQYPYVVIM	TSACRINSVNVPSSELDLRSRLRTVTPIRM QGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNTSLDL SEQELVDCAS <b>QH</b> GCHGDTIPRGIEYIQQN GVVEERSYP <b>YVAREQRCRRPN</b> SQHYGISN YCQIYPPDVKQIREALTQHTAIAVIIGI KDLRAFQHYDGRITIIQHDNGYQPNYHAVN <b>I VGYGSTQG</b> DDYWIVRNSWD <b>TWGD</b> SGYG YFQAGNNLMMIEQYPYVVIM
<b>Der f2</b> <i>Dermatophagoide pyteronissenus</i>	DQVDVKDCANNEIKKVMVDGCHGSDPCI IHRGKPF TLEALFDANQNTKTAKIEIKA SLDGLEIDVPGIDTNACHFVKCPLVKGQ QYDIKYTWNVPKIAPKSENVVVTVKLI DNGVLACAIATHGKIRD	DQVDVKDCANNEIKKVMVDGCHGSD <b>PCI I</b> <b>HRGKPF TLEALFDANQNTKTAKIEIKASL</b> DGLEIDVPGIDTNACHFVKCPLVKGQQYD IKYT <b>WNVPKIAPKSENVVVTVKLI</b> DNGV LACAIATHGKIRD
<b>Blo t5</b> <i>Blomia tropicalis</i>	GSQEHKPKKDDFRNEFDHLLIEQANHAI EKGEHQLLYLQHQLELLENKSKELQEK IIRELDVVCAMIEGAQ GALERELKRTDL NILERFNYEEAQTLSKILLKDLKETE QK VKDIQTQ	GSQ <b>EHKPKKDDFRNE</b> FDHLLIEQANHAI KGEHQLLYLQHQ <b>LELLENKSKELQEK I I</b> RELDVVCAMIEGAQ GALERELKRTDLNIL ERFNYEEAQTLSKILLKDLKETE QKVKDI QTQ
<b>Bla g4</b> <i>Blattella germânica</i> (alérgeno barata)	ATDTLANEDCFRHESLVPLNDYERFRGS WIIAAGTSEALTQYKCWIDRFSYDDALV SKYTDSQGNRTTIRGR TKFEGNKFTID YNDKGKAFSAPYSVLATDYENYAIVEGC PAAANGHVIIYVQLRMTLRRFHPKLGDK MLQHYTLDQVNQNKKAIEEDLKHFNLKY EDLHSTCH	ATDTLANEDCFRHESLVPLNDYERFRGSW IIAAGTSEALTQYKCWIDRFSYDDALVSK Y <b>TDSQGNRTTIRGR TKFEGNKFT IDYND</b> <b>KG</b> KAFSAPYSVLATDYENYAIVEGC PAAA NGHVIIYVQLRMTLRRFHPKLGDKEMLQHY <b>TLDQVNQNK</b> KAIEEDLKHFNLKYEDLHST CH
<b>Per a4</b>	DDSCQIGTSFTGLDMTKYVGTWYELFRT PNSDEEDFTNCEYDKYTL DENGVIQVTS VAYTNSIRGFITSTGTVP SWTEDTFDIA YGDDETWSSTYFMVGTDYQTY SIVAGCL DNDYSRHLYWIASHETS FDDATKAKVNE VLAPYNLSLDDMEPVDQSYCVQY	DDSCQIGTSFTGLDMTKYVGTWY <b>ELFRTP</b> <b>NSDEEDFTNCEYDKYTL DENGVIQVTSVA</b> YT <b>NSIRGFITSTGTVP SWTEDTFDIA</b> YGD DETWSSTYFMVGTDYQTY SIVAGCLDNDY SRHLYWIASHETS FDDATKAKVNEVLAPY NLSLDDMEPVDQSYCVQY

1 A partir dos dados da tabela V, foi realizado um estudo buscando  
2 similaridades entre os epítomos identificados por estudos in sílico. Alguns  
3 seguimentos estruturais foram selecionados e os epítomos estão marcados em  
4 vermelho. Semelhanças puderam ser facilmente visualizadas entre os alérgenos  
5 Der p1 / Der f1 e entre os alérgenos Der p2/Der p2 e são apresentadas abaixo. Os  
6 epítomos estão destacados em vermelho.

7 **Der p1 YRYVAREQSCRRPN**

8 **Der f1 YPYVAREQRCRRPN**

9 **Der p1 DTNWGDNGY**

10 **Der f1 DTTWGD SGY**

11

12 **Der p2 PGCHGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNTKTA**

13 **Der f2 DGCHGSDPCIIHRGKPF TLEALFDANQNTKTAK**

14 **Der p2 KYTWNVPKIAPKSENV**

15 **Der f2 KYTWNVPKIAPKSENV**

16

17 Buscas de similaridades foram realizadas analisando as sequencias dos  
18 alérgenos de barata (Bla g4 e Per a5) com *Blomia tropicalis* (Blo t5). Neste caso  
19 alinhou-se as sequencias levando em conta a posição dos resíduos de cisteína,  
20 resíduos normalmente conservados. Os epítomos estão destacados em vermelho e  
21 similaridades em realce cinza.

22

23 Blo t5

24 **GSQEHKPKKDDFRNE**FDHLLIEQANHAIEKGEHQLLYLQHQ**LDLNENKSKELQ**

25 **EKII**RELDVVCAMIEGAQGALERELKRTDLNILERFNYYEEAQTL SKILLKDLKETEQ

26 KVKDIQTQ

27

1 Bla g4

2 ATDTLANEDCFRHESLVPNLDYERFRGSWIIAAGTSEALTQYK**C**WIDRFSYDDAL  
3 VSKY**TDSQGKNRTTIRGRTKFEG**NKFT**IDYNDKG**KAFSAPYSVLATDYENYAIVE  
4 GCPAAANGHVIIYVQLRMTLRRFHPKLGDKEMLQHYT**LDQVNQNK**KAIEEDLKHF  
5 NLKYEDLHSTCH

6

7 Per a4

8

9 DDSCQIGTSFTGLDMTKYVGTWY**ELFRTPNSDEEDFTN**CEYDKYTLDENGVIQV  
10 TSVAYT**NSIR**GFITSTGTVPSWTEDTFDIAYGDDTWS  
11 STYFMVGTDYQTYISIVAGCLDNDYSRHLWIASHETSFDDATKAKVNEVLAPYNL  
12 SLDDMEPVDQSY**C**CVQY

13

14 Blo t5 QHQL**DELNENKSK-ELQEKI**IRE

15 Per a4 TWY**ELFRTPNSDEEDFTN**

16

17 Bla g4KY**TDSQGKNRTTIRGRTKFEG**NKF

18 Per a4VIQVTSVAYT**NSIR**GFITST

19

## 5- DISCUSSÃO:

Este trabalho foi realizado a partir de dados clínicos obtidos em hospitais da rede pública em Campos dos Goytacazes, exames laboratoriais da rede particular em Campos com apoio da rede SUS. Contou com a imprescindível colaboração de pacientes com sintomas de doenças respiratórias. Os ensaios de caracterização de alérgenos foi realizado em laboratórios de bioquímica e teve como objetivo central identificar possível correlação entre antígenos presentes no ambiente domiciliar como agentes desencadeantes das alergias respiratórias. Para isso, tentamos associar a presença de IgE específica sérica com antígenos oriundos da filtragem do ar nos respectivos ambientes domiciliares.

Dos pacientes selecionados para fazer a coleta do ar domiciliar, apenas 6 deles apresentaram título de IgE específica aumentada, mostrando que os sintomas nasais não são decorrentes dos efeitos desta imunoglobulina. Uma hipótese é que estes pacientes podem apresentar IgE específica para outros alérgenos ainda não identificados ou terem outras causas de rinite que não a alérgica. Segundo WISE et al outras doenças nasossinusais devem entrar no diagnóstico diferencial dos pacientes portadores de sintomas nasais sejam eles intermitentes ou perenes (Wise et al, 2018). Sabemos também que idosos podem apresentar sintomas nasais devido a alterações neuronais encontradas no processo normal de envelhecimento. A explicação fisiopatológica para isso ainda não está clara (Rodriguez, 2015).

A escolha dos alérgenos para este estudo foi feita baseada na literatura, que descreve que os maiores componentes da resposta alérgica compreendem ácaros da poeira domiciliar, epitélio de cão e gato e antígenos da barata. Além disso, estudamos a presença de IgE para fungos, também relevantes ao se estudar a resposta alérgica (Lombard, 2010). Estudos mostram que a exposição precoce a fungos é um fator de risco para desenvolvimento da rinite alérgica. Isso pode ser devido à presença de uma sensibilização que aumenta as chances de outras sensibilizações ou devido à alta umidade ser um fator para o aumento da proliferação de ácaros. (Lombard, 2010).

1 Neste trabalho procuramos estabelecer protocolos para o isolamento e  
2 coleta do ar em dormitórios de pacientes alérgicos, entendendo que esta poderia  
3 ser a principal fonte dos agentes desencadeantes de alergia nestes pacientes, É  
4 seguro que o trabalho deve prosseguir investigando a natureza do ar em outros  
5 ambientes frequentados por estes pacientes, além da coleta de material particulado  
6 para a caracterização dos agentes como ácaro, fungos e tipos de pólen presentes  
7 no ar, como investigado por Brito et al (2010). Iniciamos este projeto empregando  
8 como agente extrator, o tampão bicarbonato/ carbonato pH 9,6 de modo que o  
9 material extraído estaria adequado para os ensaios de imunodeteção por ELISA.  
10 A quantidade de material extraída dos filtros não foi suficiente para visualização em  
11 géis de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12,5 %) e também para detecção por ensaios  
12 de western blotting. Diversos fatores podem ter contribuído para estes resultados  
13 negativos: uma baixa concentração de alérgenos nos dormitórios, uso de tampão  
14 inadequado, tempo de filtragem insuficiente. Resultados negativos para a  
15 imunorreatividade nos ensaios de western blotting podem também ser atribuídos à  
16 prevalência de epítomos conformacionais, ligantes de IgE nestes alérgenos, que  
17 podem ter sido destruídos durante a separação eletroforética na presença de SDS.

18 LUCZYNSKA e col, descreveram em 1998 a coleta de material domiciliar  
19 com o uso de aspirador de pó a forma mais fácil de coletar material para análise da  
20 poeira. O uso de filtros de ar, além de mais caros, não existe padronização com  
21 relação ao tamanho dos poros. Além disso, a coleta do ar pode ser alterada por  
22 vários fatores, como meteorológicos, presença de fábrica ou obra aos arredores e  
23 forma de limpeza da casa (LUCZYNSKA, 1998). Neste trabalho foram utilizados  
24 dois filtros mimetizando estágios das vias respiratória, filtro para reter partículas  
25 entre 9 e 10  $\mu\text{M}$  (FG), material em contato com as vias superiores como narinas e  
26 filtros (FF) com poros menores 0,4 a 1,6  $\mu\text{M}$ , material que pode chegar até os  
27 alvéolos. Foi possível extrair, em baixa quantidade, material retido nos FF.

28 Em geral, os testes que compõem o sistema Immunocap, normalmente usados  
29 em laboratórios clínicos para dosagem de IgE específica, empregam extratos de  
30 proteínas das diferentes fontes, como extratos de *Dermatophagoides farinae* (DF)  
31 que, segundo Miller et al, é uma mistura contendo pelo menos 31 proteínas,  
32 *Dermatophagoide pyteronissenus*, 20 proteínas e *Blomia tropicalis*, 14  
33 proteínas.(Miller, 2019). Como estes testes não são realizados para componentes

1 isolados, os resultados são imprecisos para a identificação do componente  
2 específico, responsável para disparar o processo alérgico em cada indivíduo.

3 Do mesmo modo, os componentes empregados em tratamentos  
4 imunoterápicos são constituídos de mistura de alérgenos podendo desenvolver  
5 sensibilizações adicionais desnecessárias e ou indesejáveis. Por isto, extrair,  
6 fracionar e avaliar a imunorreatividade empregando, em princípio, ensaios de  
7 fracionamento destes alérgenos por SDS-PAGE seguido de imunodeteção por  
8 western blotting, usando o soro do paciente como anticorpo primário, poderia ser  
9 uma estratégia adequada para identificar o agente causador da doença e, assim,  
10 propor um tratamento personalizado para o paciente alérgico. A OMS identificou  
11 mais de 40 grupos de proteínas com potencial de desencadear processos alérgicos  
12 e PANG e colaboradores defendem a ideia de que a identificação de novas  
13 proteínas e suas IgEs específicas é importante para processos terapêuticos.  
14 (PANG, 2019)

15 Atualmente, o diagnóstico de novas sensibilizações é feito utilizando  
16 moléculas recombinantes, para tentar diminuir a reatividade cruzada das IgEs.  
17 Além disto, uma vez determinando com precisão os alérgenos, a identificação dos  
18 epítopos, tanto de célula T, célula B e ligante de IgE destes componentes se torna  
19 possível e contribui para que novas modalidades terapêuticas possam surgir.  
20 Atualmente, o único medicamento liberado no Brasil para o tratamento de alergias,  
21 envolvendo IgE, é um Ac monoclonal anti IgE total (AC Omalizumab), que se liga  
22 ao receptor de IgE em mastócito. É um anticorpo de alto custo, passível de  
23 degradação no organismo, e não é, um medicamento específico para os alérgenos  
24 (PANG et al, 2019). Estudos realizados por DEUS DE OLIVEIRA, 2013 e CAMPOS-  
25 MESQUITA, 2020, propõem uma metodologia alternativa para o tratamento da  
26 alergia por bloqueio de IgE (DEUS DE OLIVEIRA, 2013; MESQUITA, 2020). Estes  
27 estudos são baseados no conhecimento da estrutura dos alérgenos de *Ricinus*  
28 *communis*, *Jatropha curcas* e pela evidente reação cruzada com alérgenos de  
29 milho, camarão, soja e antígenos do ar. Para todos estes componentes alergênicos,  
30 foram identificados epítopos ligantes de IgE contendo pelo menos dois resíduos de  
31 ácido glutâmico, envolvidos diretamente no reconhecimento das IgE, associadas  
32 ao mastócito, com os alérgenos e posterior deflagração da alergia. O bloqueio

1 proposto por CAMPOS- MESQUITA, 2020 propõe o uso de ácido glutâmico livre e  
2 ou compostos derivados deste aminoácido, para o bloqueio da IgE.

3 Os resultados dos testes ELISA, neste trabalho denominado “ELISA 3”  
4 demonstram que o soro do paciente 1 reconheceu alérgenos presentes em DP, DF,  
5 BT e barata. Este soro foi também imunorreativo com proteínas do extrato do filtro  
6 fino FF. Uma resposta cruzada entre alérgenos de DP e DF pode ser em parte  
7 explicada pela semelhança estrutural entre as proteínas Der p1/Der f1 e Der p2/Der  
8 f2, alérgenos majoritário de cada um destes *Dermatophagoides*. Os estudos in  
9 sílico mostram similaridades estruturais próxima a 80% entre estes alérgenos.  
10 Verificamos 100 % de homologia nas sequencia “**YVAREQRCRR**” presente em  
11 um dos epítomos Der p1/Der f1 e na sequencia “**KYTWNVPKIAPKSE**” de um dos  
12 epítomos de Der p2/Der f2. Dois outros epítomos destes alérgenos também  
13 apresentaram 100% de homologia estrutural.

14 Os soros dos pct 2 e pct 4 apresentaram imunorreatividade com os alérgenos  
15 DP, DF, BT e com alérgenos de barata. Por isto investigamos também possíveis  
16 homologias entre os alérgenos de BT (Blo t5) com alérgenos de barata (Bla g4 e  
17 Per a5). A sequência “**HQLDELNENKSKELQEKIIRE**” contendo um dos epítomos de  
18 Blo t5 e a sequência **KYTDSQGKNRTTIRGR TKFEGNKF** de Bla g4 apresentam  
19 similaridades com epítomos de Per a4.

20 Como já foi amplamente dito neste trabalho, existe a necessidade do  
21 desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para tratamento das alergias  
22 respiratórias. Uma forma de controle da doença seria o bloqueio da IgE específica  
23 com aminoácidos específicos. Por isso, a identificação dos epítomos é de extrema  
24 importância na escolha do aminoácido que poderá, segundo a proposta de Deus  
25 de Oliveira et al (2011) ser usado para tal bloqueio. Neste estudo conseguimos  
26 identificar após análise computacional epítomos das proteínas conhecidas como  
27 “epítomos majoritários”, no entanto, faz se necessário identificar quais aminoácidos  
28 estariam realmente envolvidos na interação com IgE. Com esta identificação,  
29 poder-se-á tentar o bloqueio inicialmente em ensaios *in vitro* e posteriormente *in*  
30 *vivo*.

31



## 6- CONCLUSÕES:

- Estabelecemos um protocolo para coleta e extração de material disperso no ar em ambientes domiciliares
- Não detectamos imunorreatividade entre soros de pacientes alérgicos, com IgE específica, para alérgenos de DP, DF e BT por western blotting. Epitopo conformacional desfeito por fracionamento em gel desnaturante? Baixa quantidade de antígeno extraído?
- O soro de pacientes alérgicos reconheceram, por testes “ELISA” alérgenos extraídos de filtros de coleta em ambientes familiares. Há homologias estruturais entre os epítopos ligantes de IgE para os pares de alérgenos Der p1 com Der f1 e Der p2 com Der f2.

## 1                    **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

2    ABBAS, Abul K; Lichtman, A; Imunologia Molecular e Celular; 9ª edição, Editora  
3    Elsevir, 2019

4  
5    Al- Muhsen, S; Johnson, J; Remodeling in astha; J Allergy Clin Immunol, Volume  
6    128, Number 3, September, 2011

7  
8    ALVARO-LOZANO, M. et al. EAACI Allergen Immunotherapy User's Guide.  
9    Pediatric Allergy and Immunology, v. 31, n. S25, p. 1–101, 1 maio 2020.

10  
11    ARAUJO, L; ROSÁRIO FILHO, N; Inhalant Allergy to insects. Arq. Asma Alergy  
12    Imunology, 2018, DOI 10.5935/2526-5393.20180036

13    Bl, C. et al. Phthalates and organophosphates in settled dust and HVAC filter dust  
14    of U.S. low-income homes: Association with season, building characteristics, and  
15    childhood asthma. Environment International, v. 121, n. July, p. 916–930, 2018.

16  
17    BISGAARD, H; Nan, Li, Reduded diversity of intestinal microbiota during infancy is  
18    associated with increased risk of allergic disease at school age, Journal of Allergy  
19    and Clinical Immunology, September, 2011, vol 128, Issue 3.

20  
21    BOUSQUET, J. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008\* \*in  
22    collaboration with the World Health Organization, GA 2 LEN\*\* and AllerGen\*\*\*.  
23    \*\*Global Allergy and Asthma European Network (GA 2 LEN)Allergy. [s.l: s.n].

24  
25    BRITO, F; MUR GIMENO, P; Grass polle, aeroallergens, and clinical symptoms in  
26    Ciudad Real, Spain, J Investing Allergol Clin Immunol, 2010; 20(4): 295-302

- 1 CAI, Z. L. et al. Identification of immunodominant IgE epitopes of the major house  
2 dust mite allergen Der f 24. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 44, n. 5,  
3 p. 1888–1898, 2019.
- 4
- 5 CALDERÓN, M. A. et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do  
6 we really know? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 136, n. 1, p. 38–48,  
7 2015.
- 8
- 9 CAMPBELL-LENDRUM, D.; PRÜSS-USTÜN, A. Climate change, air pollution and  
10 noncommunicable diseases. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 97, n. 2,  
11 p. 160–161, 2019.
- 12
- 13 CAMPOS-MESQUITA, D. M; Avaliação do Bloqueio de IgE com ácido L-glutâmico  
14 como abordagem alternativa para o tratamento de doenças alérgicas, Tese (  
15 Doutorado em Biociências e Biotecnologia) Universidade Estadual do Norte  
16 Fluminense-UENF, 2020
- 17
- 18 CHONG NETO, H. J. et al. Diretrizes da Associação Brasileira de Alergia e  
19 Imunologia e Sociedade Brasileira de Pediatria para sibilância e asma no pré-  
20 escolar. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*, v. 2, n. 2, p. 163–208, 2018.
- 21
- 22 COLLOFF, M. J. Distribution and abundance of dust mites within homes. *Allergy:*  
23 *European Journal of Allergy and Clinical Immunology, Supplement*, v. 53, n. 48, p.  
24 24–27, 1998a.
- 25
- 26 COLLOFF, M. J. Taxonomy and identification of dust mites. *Allergy: European*  
27 *Journal of Allergy and Clinical Immunology, Supplement*, v. 53, n. 48, p. 7–12,  
28 1998b.

1

2 CUI, Y. et al. Sequential epitopes of *Dermatophagoides farinae* allergens identified  
3 using peptide microarray-based immunoassay. *IUBMB Life*, p. 792–798, 2016.

4

5 DENG, Q. et al. Early life exposure to traffic-related air pollution and allergic rhinitis  
6 in preschool children. *Respiratory Medicine*, v. 121, n. 2016, p. 67–73, 2016.

7

8 DEUS DE OLIVEIRA, N, Alérgenos de oleaginosas: tratamento químico para  
9 redução da alergenicidade, detecção no ar e resposta imune, Tese (Doutorado em  
10 Biociências e Biotecnologia) Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF,  
11 2013

12

13 DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; Felix, S. P.; Carrielo-Gama, C.; Fernandes, K. V.;  
14 Damatta, R. A.; Machado, O. L. T. Identification of critical Amino acids in the IgE  
15 epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and the application of Glutamic acid as an IgE  
16 blocker. *PLoS ONE*, v. 6, n. 6, 2011.

17

18 DO, D. C.; ZHAO, Y.; GAO, P. Cockroach allergen exposure and risk of asthma.  
19 *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 71, n. 4, p. 463–  
20 474, 2016a.

21

22 EGGLESTON, P. A. Cockroach allergy and urban asthma. *Journal of Allergy and*  
23 *Clinical Immunology*, v. 140, n. 2, p. 389–390, 2017.

24

25 FAROOQI, S; Hopkin, J; Early childhood infection and atopic disorder, *Thorax*, 1998

26

1 GAUTHIER, M.; RAY, A.; WENZEL, S. E. Evolving concepts of asthma. American  
2 Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 192, n. 6, p. 660–668, 15 set.  
3 2015.

4

5 GINA - GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. Global Strategy for Asthma  
6 Management and Prevention, 2021. Available from: [WWW.ginasthma.org](http://WWW.ginasthma.org)

7

8 GRUZIEVA, O. et al. Meta-analysis of air pollution exposure association with allergic  
9 sensitization in European birth cohorts. Journal of Allergy and Clinical Immunology,  
10 v. 133, n. 3, 2014.

11

12 HALWANI, R; Al-Mulsen, S; Airway remodeling in asthma, Current Opinion in  
13 Pharmacology, vol 10, Issue3, June 2021, pages 236-245

14

15

16 HART, B. J. Life cycle and reproduction of house-dust mites: Environmental factors  
17 influencing mite populations. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical  
18 Immunology, Supplement, v. 53, n. 48, p. 13–17, 1998.

19

20 HASPEFLAGH, E. et al. The hygiene hypothesis: immunological mechanisms of  
21 airway tolerance. Current Opinion in Immunology, v. 54, p. 102–108, 2018.

22

23 HENDRIX, ABERNETHY, SLOANE, MISURACA, & M. TLR2-Mediated activation of  
24 Neutrophils in response to german cockroach frass1. Bone, v. 23, n. 1, p. 1–7,  
25 2013.

26

27

1 JOHNSON, N. et al. A Review of Respiratory Biologic Agents in Severe Asthma.  
2 *Cureus*, v. 11, n. 9, 2019.

3

4 KAPLAN, A.; SZEFLER, S. J.; HALPIN, D. M. G. Impact of comorbid conditions on  
5 asthmatic adults and childrennpj Primary Care Respiratory MedicineNature  
6 Research, , 1 dez. 2020.

7

8 LAHIANI, S. et al. Immunodominant IgE Epitopes of Der p 5 Allergen. *Protein &*  
9 *Peptide Letters*, v. 25, n. 11, p. 1024–1034, 2018.

10

11 LÁZARO-GORINES, R. et al. Der p 1-based immunotoxin as potential tool for the  
12 treatment of dust mite respiratory allergy. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–14,  
13 2020.

14

15 LEE, K. E. et al. German cockroach extract induces matrix metalloproteinase-1  
16 expression, leading to tight junction disruption in human airway epithelial cells.  
17 *Yonsei Medical Journal*, v. 59, n. 10, p. 1222–1231, 2018.

18

19 LOMBARD, E; Simoni, M; Effects of pet exposure in the first year of life on  
20 respiratory and allergic symptoms in 7-yr-old children. The SIDRIA-2 study,  
21 *Pediatric Allergy and Immunology*, 2010

22

23 LOGAN, P. G. B. AND G. D. 基因的改变NIH Public Access. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1–  
24 7, 2014.

25

1 LUCZYNSKA, C. M. (1998). Identification and quantification of mite allergens.  
2 Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, Supplement, 53(48),  
3 54–57. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb04998.x>

4

5 MARTÍNEZ, D. et al. An engineered hybrid protein from dermatophagoides  
6 pteronyssinus allergens shows hypoallergenicity. International Journal of Molecular  
7 Sciences, v. 20, n. 12, 2019.

8

9

10 MILLER, J. D. The Role of Dust Mites in Allergy. Clinical Reviews in Allergy and  
11 Immunology, v. 57, n. 3, p. 312–329, 2019.

12

13 NICHOLAS DIAS, YUNG PENG, R. K. Relationships of Dog and cat-specific IgE  
14 and IgG4 levels to allergic symptoms on Pet exposure. Physiology & behavior, v.  
15 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

16

17 PANG, S. L., Ho, K. L., Waterman, J., Rambo, R. P., Teh, A. H., Mathavan, I., Harris,  
18 G., Beis, K., Say, Y. H., Anusha, M. S., Sio, Y. Y., Chew, F. T., & Ng, C. L. (2019).  
19 Crystal structure and epitope analysis of house dust mite allergen Der f 21. *Scientific*  
20 *Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40879-x>

21

22 POMÉS, A.; ARRUDA, L. K. Investigating cockroach allergens: Aiming to improve  
23 diagnosis and treatment of cockroach allergic patients. *Methods*, v. 66, n. 1, p. 75–  
24 85, 2014.

25

26

27

1 PROKOPAKIS, E; VARDOUNIOTIS, A; KAWAUCHI, H; SCADDING, G;  
2 GEORGALAS, C; HELLINGS, P; VELEGRAKIS, G; KALOGJERA, L. (2013). The  
3 pathophysiology of the hygiene hypothesis. *International journal of pediatric*  
4 *otorhinolaryngology*. 77. 10.1016/j.ijporl.2013.04.036.

5

6 RABITO, F. A. et al. A single intervention for cockroach control reduces cockroach  
7 exposure and asthma morbidity in children. *Journal of Allergy and Clinical*  
8 *Immunology*, v. 140, n. 2, p. 565–570, 2017.

9

10 RESCH, Y. et al. Molecular, structural and immunological characterization of Der p  
11 18, a chitinase-like house dust mite allergen. *PLoS ONE*, v. 11, n. 8, p. 1–19, 2016.

12

13 RESENDE, R. D. O. et al. IgE, IgG1, and IgG4 Reactivity to *Dermatophagoides*  
14 *pteronyssinus* Glycosylated Extract in Allergic Patients. *BioMed Research*  
15 *International*, v. 2019, 2019.

16

17 RODRIGUEZ, K; Ribinstein, E; Clear anterior rhinorrhea in the population;  
18 *International Forum of Allergy e Rhinology*, november, 2015

19

20 SAKANO, E. et al. IV Consenso Brasileiro sobre Rinites 2017. Documento conjunto  
21 da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia, Associação Brasileira de  
22 Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial e Sociedade Brasileira de Pediatria.,  
23 p. 1–43, 2017.

24

25 SAKANO, E. et al. IV Brazilian Consensus on Rhinitis – an update on allergic rhinitis.  
26 *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 84, n. 1, p. 3–14, 1 jan. 2018.

27



1 SALO, P. M.; COHN, R. D.; ZELDIN, D. C. Bedroom Allergen Exposure Beyond  
2 House Dust Mites. *Current Allergy and Asthma Reports*, v. 18, n. 10, 2018.

3

4 SÁNCHEZ-BORGES, M. et al. International consensus (ICON) on: Clinical  
5 consequences of mite hypersensitivity, a global problem. *World Allergy  
6 Organization Journal*, v. 10, n. 1, p. 1–26, 2017a.

7

8 SÁNCHEZ-BORGES, M. et al. International consensus (ICON) on: Clinical  
9 consequences of mite hypersensitivity, a global problem. *World Allergy  
10 Organization Journal*, v. 10, n. 1, 18 abr. 2017b.

11

12 Schatz, M; Rosenwasser, L; The Allergic Asthma Phenotype, *The Journal of Allergy  
13 and Clinical Immunology: in Practice*, vol 2, Issue 6, November-December 2014;

14

15 SCHRAUFNAGEL, D. E. et al. Air Pollution and Noncommunicable Diseases: A  
16 Review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental  
17 Committee, Part 2: Air Pollution and Organ Systems. *Chest*, v. 155, n. 2, p. 417–  
18 426, 2019.

19

20 SEIDMAN, M. D. et al. Clinical practice guideline: Allergic rhinitis executive  
21 summary. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*, v. 152, n. 2, p.  
22 197–206, 2015.

23

24 SCHATZ, M; Rosenwasser, L; The Allergic Asthma Phenotype, *The Journal of  
25 Allergy and Clinical Immunology: in Practice*, vol 2, Issue 6, November-December  
26 2014;

27

1 SHARQUIE, I. K. et al. An investigation into IgE-facilitated allergen recognition and  
2 presentation by human dendritic cells. [s.l: s.n.]. Disponível em:  
3 <<http://www.biomedcentral.com/1471-2172/14/54>>.

4

5 SHUSTERMAN, D. Occupational irritant and allergic rhinitis. *Current Allergy and*  
6 *Asthma Reports*, v. 14, n. 4, 2014.

7

8 SUTTON, B. et al. IgE Antibodies: From Structure to Function and Clinical  
9 Translation. *Antibodies*, v. 8, n. 1, p. 19, 2019.

10 TOWBIN, H. STAEHELIN, T. AND GORDON, J. Electrophoretic Transfer of  
11 Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some  
12 Applications *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 76, 1979.

13 VITIELLO, G.; MALTAGLIATI, L.; ROSSI, O. New perspectives in allergen specific  
14 immunotherapy driven by big trials with house dust mite sublingual  
15 SQ®tablets *Clinical and Molecular Allergy* BioMed Central Ltd., , 11 jun. 2020.

16

17 WISE AT AL, International Consensus Statement on Allergy and Rhinology Allergic  
18 Rhinitis, *Int. Forum Allergy Rhinol*, 2018 February.

19

20 WHEATLEY, LM; TOGIAS, A. Clinical practice. Allergic rhinitis. *The New England*  
21 *Journal of Medicine.* 2015 Jan;372(5):456-463. DOI: 10.1056/nejmcp1412282.  
22 PMID: 25629743; PMCID: PMC4324099.

23

24 WOOD, R. A. Air filtration devices in the control of indoor allergens. *Current allergy*  
25 *and asthma reports*, v. 2, n. 5, p. 397–400, 2002.

26

27 WU, C. H.; LEE, M. F. Molecular characteristics of cockroach allergens. *Cellular &*  
28 *molecular immunology*, v. 2, n. 3, p. 177–180, 2005.

1

2 YANG, L.; ZHU, R. Immunotherapy of house dust mite allergy. *Human Vaccines*  
3 *and Immunotherapeutics*, v. 13, n. 10, p. 2390–2396, 2017a.

4

5 YANG, L.; ZHU, R. Rinite. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, v. 13, n. 10,  
6 p. 2390–2396, 2017b.

7

8 ZANOBETTI, A. et al. Associations of PM10 with sleep and sleep-disordered  
9 breathing in adults from seven U.S. urban areas. *American Journal of Respiratory*  
10 *and Critical Care Medicine*, v. 182, n. 6, p. 819–825, 2010.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

2 **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

3 O senhor está sendo convidado a participar da pesquisa **IDENTIFICAÇÃO**  
4 **DE PROTEÍNAS ALERGÊNICAS E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS**  
5 **ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA ALERGIA** que tem  
6 por objetivo a identificação de alérgenos em ambiente domiciliar e correlação  
7 destes em exames de sangue.

8 Esta pesquisa será realizada com até 20 pacientes atendidos no ambulatório  
9 de alergia no município de Campos dos Goytacazes, selecionados de forma  
10 aleatória. Para inclusão na pesquisa é necessário estar em tratamento regular, não  
11 ter apresentado melhora clínica com o tratamento medicamentoso proposto ou  
12 retorno dos sintomas com a suspensão dos medicamentos. Não participarão da  
13 pesquisa crianças menores de 5 anos e idosos maiores de 60, ou pacientes que  
14 não tenham adesão ao tratamento.

15 Sua participação será manter um filtro de ar em ambiente domiciliar por 8 a  
16 12 horas, de preferência em ambiente onde o paciente da pesquisa durma. Esta  
17 filtragem será feita em dois períodos do ano, no inverno de 2019 e verão de 2020.  
18 Além disso, será feita uma coleta de sangue para realização de dosagem de  
19 imunoglobulinas no sangue para os alérgenos mais frequentes no ar e será  
20 necessário responder a um questionário.

21 Se houver algum problema relacionado com a pesquisa o senhor deverá  
22 entrar em contato com os membros da pesquisa e será encaminhado para uma  
23 unidade de atendimento emergencial próximo ao domicílio.

24 Os riscos desta pesquisa são mínimos, uma vez que será apenas uma  
25 filtragem do ar e coleta de sangue, sendo que o senhor pode se sentir  
26 desconfortável com a coleta do sangue. Mas o senhor tem a liberdade de parar a  
27 qualquer momento a pesquisa, sem nenhum prejuízo do seu atendimento.

28 O senhor tem a liberdade de não participar da pesquisa ou retirar seu  
29 consentimento a qualquer momento, mesmo após o início da coleta de dados, sem  
30 qualquer prejuízo. Está assegurada a garantia do sigilo das suas informações. O

1 senhor não terá nenhuma despesa e não há compensação financeira relacionada  
2 à sua participação na pesquisa.

3 Caso tenha alguma dúvida sobre a pesquisa o senhor poderá entrar em  
4 contato com o coordenador responsável pelo estudo: Olga Lima Tavares Machado,  
5 que pode ser localizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense, sala 219,  
6 Bloco P6 das 8 às 17h ou pelo email [olga@uenf.br](mailto:olga@uenf.br), ou com Luciana Stohler  
7 Nogueira, telefone (22) 988077460 ou por email [lucianastohler@gmail.com](mailto:lucianastohler@gmail.com) . O  
8 Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde – CEPIS, também poderá ser  
9 consultado caso o Sr. tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ÉTICA da  
10 pesquisa pelo telefone 11-3116-8597 ou pelo email [cepis@isaude.sp.gov.br](mailto:cepis@isaude.sp.gov.br).

11 Sua participação é importante e voluntária e vai gerar informações que serão  
12 úteis para identificação de proteínas no ar que podem ser potenciais causadores  
13 de alergia. Este termo será assinado em duas vias, pelo senhor e pelo responsável  
14 pela pesquisa, ficando uma via em seu poder.

15 Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do que li ou foi lido  
16 para mim, sobre a pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ALERGÊNICAS  
17 E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O  
18 TRATAMENTO DA ALERGIA. Discuti com o pesquisador LUCIANA STOHLER  
19 NOGUEIRA, responsável pela pesquisa, sobre minha decisão em participar do  
20 estudo. Ficaram claros para mim os propósitos do estudo, os procedimentos,  
21 garantias de sigilo, de esclarecimentos permanentes e isenção de despesas.  
22 Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

23

24 \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

25 Assinatura do entrevistado

26 Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de  
27 Consentimento Livre e Esclarecido deste entrevistado OU REPRESENTANTE  
28 LEGAL (se for o caso) para a sua participação neste estudo.

29 \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

30 Assinatura do responsável pelo estudo.