

Antonio José de Pinho Junior *5/638/n.c*

**Purificação Parcial e Identificação de Antígenos dos
Ácaros *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus*.**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima *Zollner†*

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a
obtenção de Título de Doutor em
Medicina (Medicina Interna).**

Campinas - S.P.

1994

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T	Unicamp
P	658p
V	Ex
TUMBO	80/23610
PROC.	433/95
C	☐
D	☒
PNECO	R\$11,00
DATA	08/02/95
N.º CPD	

CM-00065414-9

HA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

P655p Pinho Junior, Antonio José de
Purificação Parcial e Identificação de Antígenos
dos Ácaros *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus*.
- - Campinas, SP : [s.n.], 1994.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ácaro. 2. Antígenos. 3. Alergia. 4. Imunologia.

I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Dedico

A minha esposa Adriana, meus pais
Antonio José e Maria Silvia e ao amigo
Domingos Baggio.

"Os ácaros são animais sem cabeça estudados por um semelhante".

Domingos Baggio

O Dr. Baggio sempre utilizava esta frase no encerramento de suas aulas, promovendo um festival de gargalhadas. Não conheci pessoa mais sábia, e ao mesmo tempo humilde o suficiente para poder brincar consigo mesma. Caro Baggio fique sabendo que para mim você sempre foi uma grande cabeça, assim como um grande coração que sempre me acompanhará.

Um abraço do amigo,

Toninho.

Meus agradecimentos,

Ao Professor Doutor Ricardo de Lima Zollner, membro da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FCM-UNICAMP, meu orientador, pelo apoio, incentivo e dedicação, principalmente nos momentos mais necessários.

Ao Professor Doutor Domingos Baggio, "in memoriam", coordenador do Laboratório de Acarologia Médica ICB-USP, meu mestre, pela amizade, compreensão, colaboração e carinho que sempre me acompanharão.

Ao Dr. Luis Carlos Ambrozio, médico colaborador do Laboratório de Acarologia Médica ICB-USP, amigo e companheiro no estudo dos ácaros, pelo incentivo, auxílio e confiança.

Ao Professor Doutor Sergio Lazzarini, membro da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia FCM-UNICAMP, amigo e colega de especialidade, pelo apoio, incentivo e conversas estimulantes sobre nossa especialidade.

Ao Professor Afonso Aquino, meu mestre da Língua Portuguesa, pelo auxílio na correção desta tese.

Aos colegas de Pós-Graduação da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia - UNICAMP, Dra. Denise Wittmann, Dr. Luís Henrique Boechat, e Dra. Maria Hortencia Barberá, pela amizade, confiança, apoio e estimulantes discussões.

À Conceição Vilella, bióloga do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia e ao Dr. João Rui O. Muniz, membro da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia FCM-UNICAMP pelo auxílio e apoio durante estes anos de convivência.

À Eliene Pinheiro e Margarida Oliveira e demais funcionários do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia pelo auxílio e compreensão durante o convívio diário.

Ao Sr. Alexandre Ribeiro, especialista em computação gráfica e grande amigo, pelo auxílio na captação e processamento de imagens utilizadas nesta tese.

Ao Dr. Paulo Pizão, amigo e colega desde os tempos de Faculdade pelo auxílio na elaboração do Summary.

Aos pacientes do Hospital de Clínicas da UNICAMP, sentido principal de qualquer estudo e sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

SUMÁRIO

SUMÁRIO:

	Página
RESUMO:.....	1
1-INTRODUÇÃO.....	2
1.1-Hipersensibilidade, Alergia e Atopia.....	2
1.2-IgE e Atopia.....	3
1.3-Resposta Imune e Produção de IgE.....	4
1.4-Fatores Predisponentes na Atopia.....	6
1.5-Ácaros da Poeira Doméstica e Atopia.....	6
1.6-Ácaros no Brasil.....	11
1.2-Characterização Imunoquímica dos ácaros.....	13
2-FINALIDADES DO ESTUDO.....	15
3-CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1-Extratos de Ácaros.....	16
3.2-Dosagem de Proteínas	16
3.3-Dosagem de Carbohidratos.....	17
3.4-Casuística.....	18

3.4.1-População de Referência.....	18
3.5-População de Estudo.....	18
3.6-Testes Epicutâneos.....	18
3.5-Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	19
3.6-Eletroforese de Transferência e "Immunoblot".....	20
4-RESULTADOS.....	23
5-DISCUSSÃO.....	44
6-CONCLUSÕES.....	53
7-APÊNDICE.....	54
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
9-SUMMARY.....	70

RESUMO

RESUMO:

A importância dos ácaros da poeira doméstica, principalmente da família *Pyroglyphidae*, como um dos fatores responsáveis pela sensibilização e desencadeamento de crises em pacientes atópicos, está estabelecida na literatura médica internacional.

O objetivo de nosso estudo foi identificar e caracterizar antígenos solúveis dos ácaros *Blomia tropicalis* (Bt), família *Glyciphagidae*, e *Aleuroglyphus ovatus* (Ao), família *Acarinae*, cuja importância epidemiológica em nosso meio tem sido demonstrada.

Através de filtração em gel de SEPHADEX G-100 com extratos totais de Ao e Bt obtivemos três "pools" de frações: A1 (Peso Molecular > 100 kD), A2 (faixa de P.M. de 9 a 80 kD) e A3 (pico de P.M. de 3,6 kD) para o *Aleuroglyphus*; B1 (P.M. com pico intermediário em 63 kD), B2 (faixa de P.M. de 8 a 30 kD) e B3 (P.M. com pico em 3,4 kD) para a *Blomia*.

Na avaliação de pacientes atópicos, através de teste epicutâneos com as frações obtidas, de *Aleuroglyphus*: A1 e A2 foram reativos em 74% dos pacientes testados. Para o *Blomia*, a fração mais reativa foi a B2 (70 % dos pacientes). As frações A3 e B3, de P.M. baixo, foram responsáveis por reações positivas em 22% dos pacientes.

A presença de IgE específica, para cada um dos ácaros estudados, foi verificada através de eletroforese de transferência seguida de "Immunoblot". Este procedimento demonstrou a ligação de anticorpos a antígenos principalmente com os seguintes Pesos Moleculares: 150, 130, 100, 80 e 60 kD, para ambos os ácaros.

Estes resultados reafirmam a importância dos ácaros *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus* em nosso meio, e demonstram a existência de anticorpos reativos a alérgenos de diferentes pesos moleculares, os quais poderão ter significados fisiopatológicos diversos, tanto em relação às propriedades quanto à importância biológica.

INTRODUÇÃO

1:INTRODUÇÃO:

1.1: HIPERSENSIBILIDADE, ALERGIA E ATOPIA

O reconhecimento da existência das "**Reações de Hipersensibilidade**" data do início do século XX. Estas reações pareciam estar envolvidas na fisiopatologia de várias doenças, entre elas a asma brônquica, a rinite alérgica e o choque anafilático, contudo, os verdadeiros mecanismos destas reações não eram conhecidos.

VON PIRQUET em 1906 reconheceu que fatores humorais (**anticorpos**) estavam envolvidos na resposta do organismo às agressões do meio externo, denominando esta resposta de "**Alergia**", cujo termo é proveniente do grego "**Allos**" (que significa **outro**), dando a idéia de mudança do organismo de um estado de **repouso** para outro **ativado**. Os anticorpos, geralmente, pareciam auxiliar o organismo a combater os processos infecciosos, contudo, em alguns casos estes anticorpos poderiam ser danosos para o próprio paciente, e ao invés de ajudar na recuperação do organismo, poderiam lesar órgãos previamente sadios.

Dentro dos conhecimentos existentes hoje, podemos identificar que o organismo pode responder de muitas formas aos estímulos externos, alterando seu equilíbrio dinâmico (não existindo, portanto, estado de repouso verdadeiro). Quando os anticorpos produzidos têm ação protetora que auxiliam no combate as infecções, temos o desenvolvimento de "**Imunidade**" (do latim "**imune**", que significa isento). As células, anticorpos e fatores envolvidos nesta resposta elaborada frente aos estímulos externos são componentes do **Sistema Imune**. Em outros casos o sistema imune pode produzir anticorpos nocivos ao próprio organismo, ocorrendo **Hipersensibilidade**. Com o passar do tempo o termo alergia ficou consagrado apenas para designar as reações de hipersensibilidade, desviando-se da proposição original de **VON PIRQUET**.

COCA & COOKE (1923) descreveram um tipo especial de alergia, onde os pacientes com reatividade a testes epicutâneos para determinado **alérgeno** (ou antígeno), quando expostos a este alérgeno desenvolviam manifestações de hipersensibilidade como tosse, sibilância e dispnéia. Esse tipo especial de alergia foi denominada de "**atopia**" (derivado do grego **Atopos** = A - reação; topos - local).

As manifestações de atopia são comuns e afetam de 25 a 30 % da população geral (WEISS & ZIMMERMAN, 1990 ; VISSCHER & HANIFIN, 1989), e 10% da população infantil (WOOD, 1986), sendo a rinite alérgica, a asma e a dermatite atópica as afecções mais características deste grupo de doenças alérgicas.

1.2: IMUNOGLOBULINA E e ATOPIA

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento de reações de hipersensibilidade e atopia , permaneceram obscuros até que **ISHIZAKA, ISHIZAKA & HORNBROOK (1966a, 1966b, 1967)** estudando moléculas que pudessem atuar como "reaginas" (fator humoral responsável por respostas alérgicas e que podia ser transferido passivamente) definiram uma nova classe de gamaglobulina, denominada de **Imunoglobulina E (IgE)**. Esta imunoglobulina era encontrada em pacientes portadores de doenças como a anafilaxia e asma brônquica, e podia ser transferida para um paciente não sensibilizado e após o estímulo (com alérgeno) induzir o aparecimento de resposta alérgica local (reação de **PRAUNISTZ-KÜNISTER**).

A partir da descoberta da IgE vários pesquisadores puderam demonstrar a predisposição de indivíduos atópicos em produzir níveis elevados e persistentes deste anticorpo, mesmo após estimulação transitória com um determinado alérgeno, sugerindo um distúrbio na modulação da resposta imune destes indivíduos (**WIDE, BENNICH & JOHANSSON, 1967; WALDMAN, 1969; LEVINE & VAZ, 1970 ; VAZ, 1971**).

Os anticorpos da classe IgE, apesar de estarem envolvidos no desencadeamento de algumas das reações de Hipersensibilidade, não explicavam todos os tipos de doenças a elas relacionadas, sugerindo outros mecanismos envolvidos. **GELL & COOMBS** em 1969 propuseram que as doenças incluídas nas Reações de Hipersensibilidade deveriam ser classificadas em quatro tipos, de acordo com os mecanismos responsáveis pelo seu desenvolvimento: **Tipo I** chamada Imediata ou Anafilaxia (mediada pela IgE), **Tipo II** ou Citotóxica, **Tipo III** ou relacionada a Imunocomplexos e **Tipo IV** chamada de Tardia ou resposta mediada por Linfócitos.

Na Hipersensibilidade de Tipo I o organismo, após estimulação alérgica, responderá sintetizando IgE que reage especificamente a este alérgeno. Em nova exposição, ao mesmo alérgeno, este liga-se a moléculas de IgE ancoradas na membrana de Mastócitos (através de receptores de alta afinidade Fc ϵ R). Esta ligação com a IgE altera a permeabilidade da membrana dos Mastócitos induzindo a degranulação destas células e liberação de vários mediadores como a Histamina, Serotonina, Fator Ativador de Plaquetas (PAF), Tromboxanos e Leucotrienos. Estes mediadores vão produzir vasodilatação, broncoconstrição, quimiotaxia de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, importantes para o desenvolvimento da alergia (MIDDLETON et al, 1993).

1.3: RESPOSTA IMUNE E PRODUÇÃO DE IgE

O organismo ao entrar em contato com substâncias estranhas (**antígenos**) pela via inalatória, por exemplo, pode adotar diferentes configurações em resposta a esse estímulo. A não mudança no estado anterior, e nem elaboração de resposta específica por parte do sistema imune define-se o estado de **Tolerância**.

De outra forma, o alérgeno após entrar em contato com organismo, é "**processado**" e apresentado ao Sistema Imune principalmente pelos Macrófagos ou outras células especializadas chamadas Células Apresentadoras de Antígenos (APC).

As APC caracterizam-se por apresentar em sua superfície moléculas do tipo II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (Major Hystocompatible Complex). O antígeno é apresentado aos Linfócitos T (Timo dependentes) do tipo auxiliador (**Helper**) no contexto deste MHC do **tipo II**, sendo este considerado o primeiro sinal para o desenvolvimento da resposta imune específica. O prosseguimento da Resposta Imune depende de um segundo sinal: a APC deve secretar uma Interleucina (IL), a IL-1 que co-estimula os Linfócitos T, dando seguimento a resposta (ROITT, 1988).

Os estudos de **ROMAGNANI (1992)** utilizando culturas de Linfócitos permitiram o descobrimento de rede modulatória através de dois sub-tipos de Linfócitos T auxiliares (TH), os Linfócitos T auxiliares tipo 1 (**TH1**) e os T auxiliares tipo 2 (**TH2**).

A resposta produzida quando o Linfócito TH1 é estimulado antígenoicamente (cápsulas de bactérias, por exemplo), verifica-se a produção de Interferon γ (**Ifn γ**), Interleucina 2 (**IL2**) e Interleucina 3 (**IL3**). Por sua vez, a **IL2** e **IL3** vão estimular os **Linfócitos B** (Bursa dependentes) a se diferenciarem em Plasmócitos e produzir Imunoglobulinas das classes **IgM**, **IgG** e **IgA** específicas aos antígenos, e pela ação de **Ifn γ** inibir a resposta mediada pelos Linfócitos **TH2**.

Foi observado, também, que em indivíduos atópicos, dependendo da natureza do antígeno (extratos de ácaros, por exemplo), o estímulo é preferencialmente dirigido a Linfócitos **TH2**, que estimulados produzem Interleucina 10 (**IL10**), Interleucina 4 (**IL4**) e Interleucina 5 (**IL5**), que direcionam os Linfócitos B a sintetizarem **IgE**, e não **IgG** ou **IgA** (**IgE "switching"**). A Interleucina 5 provoca a proliferação e diferenciação de Eosinófilos (células efetoras fundamentais na inflamação alérgica) e a Interleucina 10 inibe os Linfócitos do tipo **TH1**, este tipo de resposta não ocorre em indivíduos normais mesmo que o antígeno utilizado seja um potente alérgeno (**PARRONCHI, DE CARLI & ROMAGNANI, 1991**).

Devemos destacar que essa sub-divisão em tipos diferentes de Linfócitos T auxiliares (**T Helper**) apenas foi demonstrada do ponto de vista funcional (secreção de Interleucinas, por exemplo) até o momento não existem marcadores que diferenciem um sub-tipo de outro.

Essa resposta alterada do sistema imune ao estímulo antigênico que ocorre em atópicos, têm fatores predisponentes, e desde o início do século acreditava-se na existência de condições especiais para o desenvolvimento de doenças alérgicas. **COOKE & VANDERVEER** em 1916 propuseram que a alergia estaria relacionada a predisposição familiar ou genética, sendo esta hipótese confirmada somente várias décadas depois (**SCHWARTZ, 1952; MARSH, HSU & HUSSAIN, 1975; BLACK & MARSH, 1976**).

1.4: FATORES PREDISPOANTES NA ATOPIA

Além da predisposição genética para o desenvolvimento de doenças alérgicas há a necessidade da presença de outros fatores, principalmente os ambientais, relacionados aos antígenos ou alérgenos, para os quais a IgE é produzida especificamente. Estes fatores são determinantes para que a doença ocorra, entretanto, existe grande variedade de alérgenos potencialmente responsáveis pela sensibilização e desencadeamento de "crises alérgicas" em indivíduos atópicos, tais como: fungos, pólenes, epitélios de animais, **poeira doméstica**, antígenos ocupacionais, poluentes e etc.

FLOYER na publicação "**Tratado de Asma**" (1896) * foi provavelmente o primeiro a relatar que asmáticos, quando expostos a poeira doméstica, podem apresentar piora de sintomas respiratórios: - "**Todos os indivíduos asmáticos ressentem-se grandemente da poeira produzida, por mínima que seja, no ato de varrer a um quarto ou de arrumar a cama**".

Outros autores também relacionaram a exposição a poeira doméstica como fator agravante da asma (**KERN, 1921; SPIVACK & GROVE, 1925; VANNIER & CAMPBELL, 1961**). Contudo, a poeira representa material bastante complexo, podendo conter bactérias, epiderme humana, materiais fibrosos originários de plantas e animais, fungos, debris de insetos e **ácaros**, sendo essencial a identificação de qual ou quais destes componentes é o mais significativo para cada paciente (**BRONSWIJK, 1981**).

1.5: OS ÁCAROS DA POEIRA DOMÉSTICA E A ATOPIA

Os ácaros da poeira doméstica são aracnídeos microscópicos com tamanho de 0,1 a 0,6 mm em média e excretam partículas fecais variando de 10 a 40 µm de diâmetro (tamanho similar ao de grãos de pólen, outro alérgeno potente). Sua alimentação parece ser dependente da ação de fungos sobre a epiderme humana descamada, sendo que fungos do gênero *Pityrosporum* podem estar envolvidos (**SAINT-GEORGES-GRIDELET, 1981; MAUNDER, 1984**). O seu ciclo de vida também está relacionado as condições ambientais, onde a temperatura e umidade relativa do ar, parecem ser os mais importantes para o seu

desenvolvimento com maior ou menor velocidade de crescimento e reprodução (FURUMIZO, 1975). (Tabela 1-página 8)

BOGDANOV (1864) foi pioneiro em descrever a presença de ácaros em peles degradadas, e desta observação tirou sua denominação: *Dermatophagoides* (**Dermato**= pele; **phagoides**= comedor), designando este gênero. Retomando o estudo destes aracnídeos, **TROUSSART (1897)** descreveu uma espécie o *Dermatophagoides pteronyssinus*, que significa literalmente "comedor de pele sem asas".

KERN (1921) e **COOKE (1922)** foram os primeiros a sugerir especificamente que os ácaros encontrados na poeira domiciliar, eram importantes no desencadeamento de "crises" da asma. **DEKKER (1928)** observou que a presença de ácaros nas camas era a principal causa de asma na Alemanha, propondo medidas para o controle de ácaros como forma de tratar esta doença respiratória.

Essas observações ficaram esquecidas cerca de 40 anos e somente foram retomadas a partir dos trabalhos publicados por **VOORHOST et al (1964 e 1967)**, que demonstraram a presença do ácaro *Dermatophagoides sp.* em amostras de poeira doméstica. Além disso, **VOORHOST** associou suas observações ao aparecimento de crises de asma, pois, seus pacientes asmáticos eram reativos a testes epicutâneos com extrato "crude" de *Dermatophagoides*. Esses resultados estabeleceram relação etiológica direta entre a exposição aos ácaros e crises alérgicas sugerindo a presença de resposta imune específica contra antígenos deste aracnídeo.

A partir de então, as muitas espécies de ácaros descritas na poeira domiciliar foram classificadas (**FAIN, 1966 e VAN BRONSWIJK, 1984**), podendo ser divididas em dois Grupos: I - Contaminantes Ambientais; II - Predadores (**BAGGIO, AMBROZIO & ANTILLA, 1989 -Tabela 2- página 9**).

Desta forma, inúmeros pesquisadores em diferentes partes do mundo procuraram caracterizar os ácaros mais prevalentes em amostras de poeira domiciliar. **PLATTS MILLS (1989)**, sugeriu que no hemisfério norte os ácaros mais prevalentes em amostras de poeira são da família *Pyroglyphidae*: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras* e *Euroglyphus maynei*.

Tabela 1

Duração, em dias, dos estágios do ciclo vital do *Dermatophagoides farinae* e sua dependência da Temperatura, a uma umidade relativa constante de 75%.

Estágio	15,6 °C	21,1 °C	26,6 °C	32,2 °C
Ovo	58,5	13,9	7,1	6,5
Larva, ativa	28,3	6,8	3,5	3,0
Larva, ecdise	6,0	4,6	2,6	1,8
Protoninfa, ativa	24,5	15,7	2,5	2,7
Protoninfa, ecdise	143,8	5,0	2,4	1,4
Tritoninfa, ativa	67,3	4,3	2,6	2,1
Tritoninfa, ecdise	50,5	4,2	2,2	1,4
do Ovo até Adulto	388,8	54,5	23,2	18,8

Fonte: FURUMIZO, (California Vector Views , 1975)

FAMÍLIAS		GÊNEROS	ESPÉCIES
GRUPO I CONTAMINANTES AMBIENTAIS	PYROGLIPHIDAE	Euroglyphus	E. longior E. maynei
		Dermatophagoides	D. pteronyssinus D. farinae D. ewansi D. microceras D. alterophilus D. deane
		Hirstia	H. dominicola H. chelodoni
		Malayoglyphus	M. intermedius M. carmelitus
		Pyroglyphus	P. africanus
		Strumophagoides	S. brasiliensis
		Austroglyphus Ctenoglyphus	A. gemiculatus C. intermedius
		Blomia	B. tropicalis B. tighodas
	GLYCIPHAGIDAE	Austroglycyphagus	A. lukoschusi
		Glycyphagus	G. domesticus
		Aeroglyphus	A. robustus
		Gohiera	G. fusca
		Lepidoglyphus	L. destructor
GRUPO II PREDADORES	ACARINAE	Tyrophagus	T. putrescentiae
		Sancassania	S. herfesi
		Rizoglyphus	R. echinopus
		Tiroglyphus	T. farinae
		Chortoglyphus	C. arcuatus
		Suidasia	S. pontificiae
		Acarus	A. siro
		Aleuroglyphus	A. ovatus
		Lardoglyphus	L. knoi
GRUPO II PREDADORES	GAMASIDA		Hipodaspis aculeifer Eulaelaps stabularis Deramysus gallinae Blattisociis tarsalis Klemania plumigena
	ACTINEDIDA		Cheyletus Mallaccensis C. fortis, C. eruditus Tarsonemus granarius Pyemotes herfsi Tydeus molestus Spinibdella lignicola Cunax setirostris

Tabela 2: Classificação dos ácaros em Grupos, sendo Grupo I de Contaminantes Ambientais e II de Predadores .Extraído BAGGIO, AMBRÓZIO & ANTILLA. Rev Bras Alerg Immunopatol 12(2).1989

Estas observações propiciaram inúmeros estudos epidemiológicos de associação entre ácaros, alergia e asma, nos Estados Unidos **VAN BRONSWIJK & SINHA (1971)** e **ARLIAN, BERNSTEIN & GALLAGHER (1982)**, no Japão **MIYAMOTO, OSHIMA & ISHIZAKI (1969)**, em Hong Kong **GASMEL (1982)**, na Inglaterra **SMITH, MONTGOMERY & KNOWLER (1965)**, na Dinamarca **KORSGAARD (1983)**, na França **PAULI, BERRET & HIRTH (1979)**, na Alemanha **BISCHOFF & SCIRMACHER (1987)**, na Austrália **TOVEY (1976)** e em Zimbabwe (África) **MERRETT & COOKSON (1976)**.

Esta associação foi reafirmada em estudos de pacientes atópicos reativos a testes epicutâneos com *Dermatophagoides pteronyssinus* e *farinae*. Estes pacientes ao serem submetidos a provocação brônquica, com inalação direta de ácaros, apresentavam diminuição (mínimo 20 %) do Volume Expiratório Forçado de 1 segundo (VEF1) entre 5 e 15 minutos após a broncoprovocação. Em alguns pacientes era observada uma resposta tardia, isto é, queda mais acentuada da função pulmonar que ocorria de 6 a 8 horas após o estímulo inicial (**BOOJI-NOORD, DE VRIES & SLUITER, 1972; WARNER, 1976; MACINTYRE & BOYD, 1983**).

Através de provocação nasal, em pacientes atópicos, com extratos de ácaros **PELIKAN & DE VRIES (1972)** e **DRUCE & SCHUMACHER (1990)** observaram coriza, espirros, obstrução e prurido nasais, reproduzindo com este teste o quadro clínico de rinite alérgica.

A observação de que testes de contato (**Patch-Test**) com extratos de ácaros em pacientes com dermatite atópica (**MITCHEL, CROW & CHAPMAN, 1982; ELLISTON, HEISE & HUNTLEY, 1982**), induz o aparecimento de lesões similares às observadas nas lesões primárias dessa dermatose crônica, estabelece uma nova relação entre os ácaros e a atopia, e indica a possibilidade de sua participação também em manifestações alérgicas cutâneas.

PLATTS-MILLS, MITCHELL & NOCK (1982) demonstraram, que diminuindo-se a exposição ambiental aos ácaros, os pacientes atópicos apresentavam melhora acentuada dos sintomas da asma (confirmando a proposição original de **DEKKER, 1928**), fato também observado em pacientes com rinite alérgica (**KNIEST, YOUNG & VAN BRONSWIJK, 1991**), reforçando a

importância clínica de medidas que visem controlar a exposição ambiental aos ácaros.

1.6: OS ÁCAROS NO BRASIL

No Brasil, o primeiro registro de ácaros da poeira domiciliar foi realizado por AMARAL (1967 e 1968) que encontrou a espécie *Dermatophagoides pteronyssinus* em amostras de poeira coletadas em residências na cidade de São Paulo.

GRECO, MOREIRA & GRECO (1974) ; ROSA & FLECHTMANN (1979) e JORGE NETO, CROCCE & BAGGIO (1980) , também, encontraram ácaros em amostras de poeira domiciliar, sendo o estudo de JORGE NETO (1984) responsável pela demonstração de variação sazonal de várias espécies de ácaros, onde o *Blomia tropicalis* (BRONSWIJK, COCA & OSHIMA, 1973) e o *Dermatophagoides pteronyssinus* apresentavam dois períodos de maior crescimento populacional durante o ano.

Em 1992 BAGGIO & AMBROZIO, observaram em amostras de poeira domiciliar, prevalência de 51,85 % de *Blomia tropicalis* , 36,05% de *Dermatophagoides pteronyssinus* e 12,1 % de outros ácaros , com destaque para o *Aleuroglyphus ovatus*, *Chortoglyphus arcuatus*, *Tyrophagus putrescentiae* e *Suidasia pontificia*, demonstrando que mais de 80 % da população estudada está exposta a estes ácaros.

Outros trabalhos como os de PINHO, MELLO & BAGGIO (1990a), MORI, AMBROZIO & BAGGIO (1992a, 1992b) e VASCONCELOS, BAGGIO & AMBROZIO (1992) na cidade de São Paulo; ANTILA, BAGGIO & CROCCE (1992) em Sorocaba; ROSÁRIO (1992) em Curitiba; BERND, BAGGIO & AMBROZIO (1992) em Porto Alegre, submetendo população atópica a testes epicutâneos com preparo de extratos totais de ácaros da poeira domiciliar, puderam verificar alta prevalência de sensibilização aos ácaros: *Aleuroglyphus ovatus* , *Blomia tropicalis*, *Tyrophagus putrescentiae* e *Suidasia pontificiae*, além do *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Na região de Campinas, Estado de São Paulo, PINHO, LAZZARINI & ZOLLNER (1992), demonstraram alta prevalência de sensibilização em pacientes asmáticos e riniticos para *Blomia tropicalis* (84,6%), *Dermatophagoides pteronyssinus* (80,8%) e *Aleuroglyphus ovatus* (91%) .

Através de quantificação de IgE específica em 34 pacientes atópicos, com método Imunofluorométrico, ZOLLNER, PINHO & VILELA (1992a) demonstraram que 59 % dos pacientes testados tinham anticorpos para os ácaros *Euroglyphus maynei* e *Dermatophagoides pteronyssinus*, e 26 % apenas ao *Dermatophagoides* , evidenciando alta prevalência de sensibilização na população para estes ácaros.

Em outro estudo ZOLLNER, PINHO & VILELA (1992b), observaram que 41% dos pacientes estavam sensibilizados tanto para o *Dermatophagoides pteronyssinus* como para o *Tyrophagus putrescentiae* e apenas 4% somente ao *Tyrophagus*. Em relação ao *Lepidoglyphus destructor* 58% dos pacientes possuíam IgE para este ácaro e a mesma porcentagem foi observada para o *Dermatophagoides pteronyssinus*, contudo, não foi observada sensibilização apenas para *Lepidoglyphus*. A existência de reatividade cruzada, poderia explicar o elevado número de pacientes sensíveis a várias espécies de ácaros, tanto nos estudos realizados com testes epicutâneos como na quantificação de IgE específica para ácaros domiciliares.

VAN HAGE-HAMSTEN, MACHADO & JOHANSSON (1989) detectaram a existência de reatividade cruzada para dois ácaros de estocagem, *Blomia kulagini* e *Lepidoglyphus destructor*, através de inibição de RAST (rádio imune ensaio para detecção de IgE específica em fase sólida) em soros de pacientes da Suécia e Brasil. Contudo a inibição observada dependia da população estudada, *Blomia kulagini* inibia o RAST para *Lepidoglyphus destructor* de soros brasileiros e não suecos; *L. destructor* inibia RAST para *B. kulagini* em soros suecos e não em brasileiros.

Através da provocação brônquica específica com *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus*, PINHO, AMBROZIO & BAGGIO (1990b), observaram que estes ácaros podem induzir respostas tanto do tipo imediato como tardio, sugerindo sua importância no desencadeamento de asma, e STRAUSS ,

AMBROZIO & BAGGIO(1990) trabalhando com pacientes atópicos em testes de provocação nasal e brônquica com extrato de *Blomia tropicalis*, obtiveram respostas positivas, na cidade de São Paulo.

DUTRA & ALMEIDA (1990), demonstraram que pacientes com dermatite atópica, quando submetidos a testes de contato (**Patch-Test**) com extrato de *Blomia tropicalis*, apresentavam respostas imediatas e tardias, sendo estas últimas semelhantes às lesões primárias do eczema atópico.

PLATTS-MILLS (1989), em revisão sobre o envolvimento dos ácaros nas doenças alérgicas, relaciona antígenos dos ácaros do família *Pyroglyphidae* como os principais responsáveis pelo desencadeamento da Asma Extrínseca, demonstrando que este é um problema mundial, afetando principalmente países da Europa e Américas, dados confirmados no II Simpósio Internacional sobre a importância dos ácaros da poeira domiciliar na asma (**PLATTS-MILLS, 1992**).

Diante de tantos estudos, atualmente não existe na literatura médica especializada discordância quanto a participação dos ácaros como fatores etiológicos para a sensibilização e desenvolvimento de crises alérgicas em indivíduos atópicos.

1.7: CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS ÁCAROS

O estudo dos ácaros progrediu da investigação epidemiológica para o estudo de suas propriedades antigênicas e caracterização de seus antígenos principais. Os primeiros trabalhos de caracterização de antígenos de ácaros utilizavam a técnica de imunoeletroforese cruzada (crossed immunoelectrophoresis-CIE), e demonstraram a presença de mais de 50 proteínas diferentes, em extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (**LIND, 1984**). Através de rádio imunoeletroforese cruzada (crossed radio immunoelectrophoresis-CRIE), 13 proteínas desse ácaro foram identificados como alérgenos, pois possuíam capacidade de ligar-se a IgE (**LIND, 1983**).

CHAPMAN & PLATTS-MILLS (1980), **DANDEU, LeMAS & LUX (1982)**, **HAIDA, OKUDAIRA & MIYAMOTO (1985)**, **LIND (1985 e 1986)** e **HEYMANN, CHAPMAN & PLATTS-MILLS (1989)**, caracterizaram os antígenos principais do *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*, considerados os ácaros mais importantes do família *Pyroglyphidae*, estes antígenos foram definidos, segundo normas de nomenclatura internacional, em dois

Grupos de alérgenos: **Grupo I** contendo antígenos **Der pI** e **Der fI** glicoproteínas excretadas nas fezes dos ácaros, com pesos moleculares próximos a **24 kDa**; **Grupo II** com **Der pII** e **Der fII** proteínas do corpo dos ácaros com peso molecular de **15 kDa**. . Outros grupos menos importantes antígenicamente foram caracterizados por **STEWART (1991)**, sendo denominados **Der p III** (P.M.= **29 kDa**) e **Der p IV** (P.M.= **60 kDa**), ambos possuindo atividade de enzimas digestivas.

Recentemente os antígenos **Der pI** (**CHUA, STEWART & THOMAS, 1988**), **Der pII** (**CHUA, DOYLE & SIMPSON, 1990**), **Der fI** (**DILWORTH, CHUA & THOMAS, 1990**) e **Der fII** (**TRUDINGER, CHUA & THOMAS, 1990**) foram clonados, possibilitando o conhecimento das sequências completas de aminoácidos, e que suas bibliotecas de cDNA fossem produzidas (**GLUBER & HOFFMAN, 1983**).

Apesar desta diversidade de estudos existentes em relação aos ácaros da família *Pyroglyphidae*, outros ácaros, como a *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus*, permanecem pouco estudados, a despeito de sua grande importância como alérgenos.

FINALIDADES DO ESTUDO

2:FINALIDADES DO ESTUDO

Este estudo tem como objetivos:

- 2.1: Verificar a reatividade aos ácaros *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus* em pacientes atópicos, através de testes epicutâneos.
- 2.2: Realizar o fracionamento antigênico parcial dos ácaros *Blomia tropicalis* (Família *Glyciphagidae*) e *Aleuroglyphus ovatus* (Família *Acarinae*), através da Filtração em Gel e Eletroforese Analítica.
- 2.3: A partir das frações obtidas, realizar o monitoramento “in vivo” através de testes epicutâneos e “in vitro” através de “Immunoblot” para IgE, determinando qual(s) a fração(s) mais importante(s) envolvida(s) na sensibilização de indivíduos atópicos.
- 2.4: Analisar a natureza química das frações reativas, utilizando métodos tintoriais e Eletroforese analítica.

CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3: CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1: EXTRATO DE ÁCAROS

Para realizar o fracionamento dos ácaros utilizamos extratos totais ou "**crudes**" de *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus*, preparados e cedidos gentilmente pelo Laboratório de Acarologia Médica, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de São Paulo sob coordenação do Prof. Domingos Baggio, a partir de culturas puras dos dois ácaros e processadas segundo técnica descrita por MIYAMOTO (1969), com modificações.

Resumidamente: Culturas puras de cada espécie de ácaro a ser estudada, eram cultivadas separadamente em estufas BOD individuais, com temperatura ajustada a 28-29°C e 65 a 70 % de umidade relativa ambiente, em substratos espécie específicas à base de ração de ave em pó. Após 45 a 65 dias de cultivo, os substratos eram submetidos a extração de ácaros ainda vivos, utilizando-se funil de Berlese-Tulgren modificado e lâmpada elétrica leitosa de 40 W, a uma distância de 30 cm. Após 24 horas de extração contínua, os frascos de vidro receptores de ácaros vivos, livres de impurezas, eram retirados do aparelho e fechados com tampa hermética e colocados em freezer - 30°C durante 48 horas, e a seguir estocados -80°C até utilização.

3.2: DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Os extratos "**crude**", obtidos a partir de culturas puras dos ácaros, tiveram sua concentração proteica determinada, pelo método de LOWRY (1951) modificado por HARTREE (1972).

3.3: DOSAGEM DE CARBOHIDRATOS

A dosagem do conteúdo de carboidratos presentes nos extratos totais solúveis dos ácaros *Aleuroglyphus* e *Blomia*, foi realizada através do método da Antrona descrito por SCOTT & MELVIN (1953).

3.3: FRACIONAMENTO DO EXTRATO TOTAL DE ÁCAROS

A partir do extrato total solúvel dos ácaros *Aleuroglyphus ovatus* e *Blomia tropicalis*, procedia-se ao fracionamento através de filtração em gel SEPHADEX G-100 (PHARMACIA). O extrato total solúvel dos ácaros foi aplicado à coluna de 216 ml (2,55 cm² de secção X 85 cm de altura) contendo gel de SEPHADEX G-100, equilibrado conforme instruções do fabricante, em solução salina 0,15 M, com fluxo de 18 ml/h mantido através da utilização de bomba peristáltica. A calibração da coluna foi realizada com proteínas de peso molecular conhecido (Albumina Bovina-64kDa , Ovoalbumina-45kDa e Tripsina-24kDa), e o Void Volume (VO - Volume de exclusão da coluna) determinado pela aplicação de Blue-Dextran 2.000.

As frações eluídas foram monitorizadas por registro gráfico pela passagem em absorciômetro (280 nm) (PHARMACIA) e recolhidas em coletor de frações automático (INCIBRAS), sob temperatura ambiente e imediatamente colocadas em refrigeração à 8 °C.

As leituras espectrofotométricas (BECHMAN) foram realizadas no comprimento de onda de 280 nm em temperatura ambiente , e de acordo com o perfil de eluição-filtração, as frações foram recolhidas e separadas em "pools" e concentradas através de Ultrafiltração em membrana YM-3 (AMICON) com capacidade de reter moléculas com P.M. acima de 3 kDa, a concentração proteica era determinada para cada "pool" e estes conservados separadamente à temperatura de - 20 °C até uso.

3.4: CASUÍSTICA

3.4.1: POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA

A população de referência para o presente estudo foi composta de indivíduos procedentes da região de Campinas, atendidos no ambulatório da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Departamento de Clínica Médica, do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP).

3.4.1: POPULAÇÃO DO ESTUDO

3.4.1 a: CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram selecionados 50 pacientes com história clínica compatível com diagnóstico de asma e ou rinite alérgica acompanhados no Ambulatório da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia e 10 pacientes controles, sem história pessoal ou familiar de atopia.

3.4.1b: CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pacientes abaixo de 10 e acima de 65 anos, aqueles que estavam em uso de Antihistamínicos ou outras medicações que pudessem interferir com a resposta a testes epicutâneos, além de pacientes portadores de lesões cutâneas disseminadas.

3.5: TESTES EPICUTÂNEOS

Empregando-se as frações obtidas na filtração em **SEPHADEX G-100** de *Aleurogliphus ovatus* e *Blomia tropicalis* na concentração padronizada de 200µg/ml, foram realizados testes epicutâneos nos 50 pacientes selecionados e 10

controles, com o método de "Prick-Test" descrito por **PEPYS (1975)** e seguindo padronização proposta por **DREBORG (1989)**.

Resumidamente: na face volar do antebraço, após limpeza com algodão embebido em Alcool etílico 90 %, foi depositada uma gota (volume aproximadamente de 20µl) correspondente a cada material a ser testado, introduzida agulha de insulina (30 X 7) em angulação de 30° através da gota e com um leve movimento no sentido de retirar a agulha, criada uma solução de continuidade entre a gota e a pele. Também foram utilizados controles negativo (Solução Salina 0,9%) e positivo (Histamina 10 mg/ml), além de extratos totais não fracionados na concentração de 1:80 Peso/Volume ou 250 µg/ml.

As leituras foram realizadas após 15 a 20 minutos, com delimitação das pápulas formadas com caneta especial para uso em retroprojektor e realizada transferência para fita adesiva (fita mágica **SCOTCH**). O resultado foi medido através da média entre o maior diâmetro da pápula e o diâmetro ortogonal de seu ponto médio . Os resultados foram comparados aos obtidos para os controles sendo considerado positivo quando a área de pápula era maior ou igual a 3mm.

3.6:ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As eletroforeses em Gel de Poliacrilamida foram realizadas essencialmente seguindo a técnica descrita por **LAEMMLI (1970)** modificada por **SAUAIA & LACINE (1977)** e com adaptações desenvolvidas no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (**LICA**) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia (**UNICAMP**), ou seja:

A eletroforese foi realizada em placa de vidro vertical, em várias concentrações variando de 8 até 14% para gel de separação (dimensões de 14 cm X 16,8 cm X 2 mm) e 5% no gel de empilhamento. Os extratos totais dos ácaros foram preparados em tampão de amostra, contendo Tris-HCL (pH 6,8), 2% duodecil sulfato de sódio (SDS) , 10% de Glicerol e 0,05% de Azul de Bromofenol, para concentração final de 1,0 mg/ml. Essa mistura foi acrescida de 10% de 2-mercaptoetanol e fervida durante 2 minutos, para a redução do material.

Em cada poço foi adicionado 50 µg de proteínas de cada ácaro, procedia-se a eletroforese aplicando-se 40 mA de corrente constante durante 4 horas, encerrando-se a corrida quando a frente de corante estava a cerca de 1 cm do término do gel. Após a eletroforese, o gel foi submetido a procedimentos tintoriais para a detecção de proteínas (**Coomasie Brilliant Blue R-250**) ou carboidratos (**Azul de Toluidina**), e descorado em mistura de Metanol 45%, ácido acético glacial 10% e água deionizada q.s.p., até obter-se a coloração ideal.

Foram aplicados extratos totais dos ácaros *Blomia tropicalis*, *Aleuroglyphus ovatus* e mistura padrão de Peso Molecular (**MW-SDS 200 SIGMA**). O cálculo dos Pesos Moleculares foram efetuados a partir do Fator de Migração Relativo (RF= distância percorrida no gel pela amostra/ distância percorrida no gel pela frente de corante). A análise gráfica do material foi realizada através de Scanner Computadorizado a 360 dpi*(dots per inch ou pontos por polegada) (**MICROTEC-SCANMAKER II**) e processado através dos programas **PHOTOSTYLER** e **CORELDRAW**, sendo os resultados impressos em papel, através de impressão a Laser (**LASERJET III P**) e documentados fotograficamente.

3.7: ELETROFORESE DE TRANSFERÊNCIA E "IMMUNOBLOT"

Para determinar quais frações correspondentes as Bandas obtidas na Eletroforese em Gel de Poliacrilamida eram alergênicas, realizamos Eletroforese de Transferência seguida de "Immunoblot", seguindo basicamente a técnica descrita por **TOWBIN (1979)** e modificada por **BURNETTE (1981)** e **deBLAS & CHERWINSKI (1983)** e previamente utilizada em extratos alergênicos de ácaros por **BENGTTSSON (1986)**, além de algumas modificações do LICA.

Resumidamente, os alérgenos foram previamente separados através de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida como descrito anteriormente, inclusive utilizando-se as mesmas concentrações. O Gel obtido nesse processo foi colocado em contato com membrana de nitrocelulose 0,45 µm (**Trans-Blot BIORAD**), envolto por Papel de Filtro e esponja (**SCOTCH-BRITE**) e colocado em cuba de transferência contendo Tampão Tris-Glicina e 20% de Metanol, pH=8,4 (Tampão de Transferência).

Esse sistema foi submetido a Eletroforese de Transferência sob corrente contínua de 50 mA e 20 volts, em geladeira a 8 graus Celsius durante 16 horas. Após a Transferência, a membrana de nitrocelulose tinha seus sítios livres bloqueados com solução de Tampão Fosfato pH=7,4 (PBS), contendo 3% de Soro Fetal Bovino, 0,1% de Gelatina e 0,05% de Tween 20 (Solução de Bloqueio) por 1 hora.

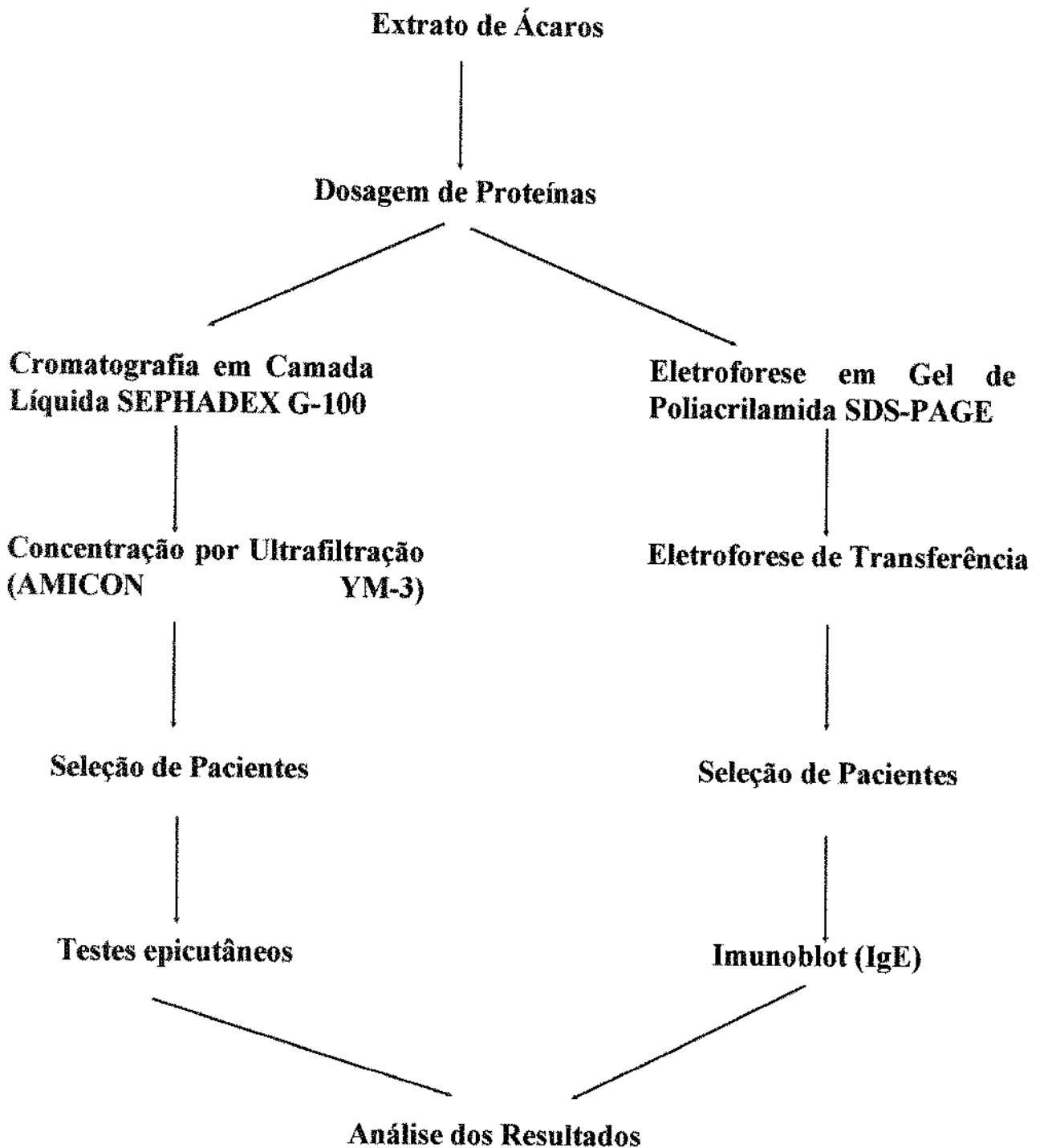
Após 6 lavagens com PBS por 5 minutos, as fitas de nitrocelulose foram incubadas durante uma noite (overnight) com soros de pacientes atópicos (10 amostras) ou controles (3 soros) diluídos 1:4 em PBS acrescido de 1,5 % de Soro Fetal Bovino (Solução de Diluição) e 0,05% de Twen 20. Os soros foram retirado e as fitas lavadas como anteriormente mais 6 vezes, incubadas com conjugado anti-IgE humana ligada a peroxidase (**SIGMA**) 1:250 em solução de diluição "overnight" .

Após a retirada do conjugado as fitas de nitrocelulose foram submetidas a mais 6 lavagens, e então incubadas com Diaminobenzidine (**DAB- SIGMA**) diluído em PBS sem Azida, 50 mg/100 ml (Substrato de Revelação), por 30 minutos em agitador orbital e reveladas com 20 µl de Peróxido de Hidrogênio (**H₂O₂**) 10 volumes, em câmara escura lentamente até obter-se a melhor coloração. A reação foi encerrada adicionando-se Água Deonizada (**stop**) e lavando-se as fitas até a coloração final. As fitas foram então processadas em Scanner Computadorizado (**MICROTEC- SCANMAKER II**) à 360 dpi, e a análise realizada através dos programas **PHOTOSTYLER** e **CORELDRAW**, sendo os resultados impressos em papel (**LASERJET III P**).

3.8: REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram Pro-Análise (PA).

FLUXOGRAMA DE TRABALHO



RESULTADOS

4:RESULTADOS :

Os resultados serão apresentados segundo ordem pré-estabelecida e obedecendo ao Fluxograma de Trabalho (página 22), considerando: 4.1-filtração em gel, com apresentação das curvas obtidas para cada ácaro; 4.2-testes epicutâneos estudo epidemiológico e análise estatística das diferenças encontradas entre as frações; 4.3-eletroforese em gel de poliacrilamida com a determinação da faixa de distribuição de antígenos dos ácaros quanto ao Peso Molecular; 4.4: Imunoblot com caracterização dos alérgenos principais dos ácaros.

4.1:FILTRAÇÃO EM GEL:

4.1.1:- A aplicação do extrato "crude" ou total de *Blomia tropicalis* em coluna de Gel de **SEPHADEX G-100 (PHARMACIA)**, permitiu a determinação do perfil de eluição (Figura 1-página 24) , através do qual pudemos separar o material em três "pools" de frações, para os valores de maior concentração proteica correspondentes aos perfis de eluição os Pesos Moleculares determinados foram de 63 kD que denominamos de B1, uma faixa de 8 kD a 30 kD que chamamos de B2 e a fração B3 com 3,4 kD.

4.1.2:- A cromatografia analítica do ácaro *Aleuroglyphus ovatus* através de filtração em gel de **SEPHADEX G-100 (PHARMACIA)**, permitiu elaborar o perfil de eluição deste e foi possível a sua separação em três "pools" de frações: A1 com Peso Molecular em 100 kD , A2 faixa de 9 kD a 80 kD e A3 em 3,6 kD. (Figura 2-página 25)

4.1.3:- A dosagem de proteínas e rendimento cromatográfico, foi o seguinte:

A figura 3 (página 26), representa graficamente a dosagem de proteínas e o rendimento da filtração em gel do ácaro *Blomia tropicalis*.

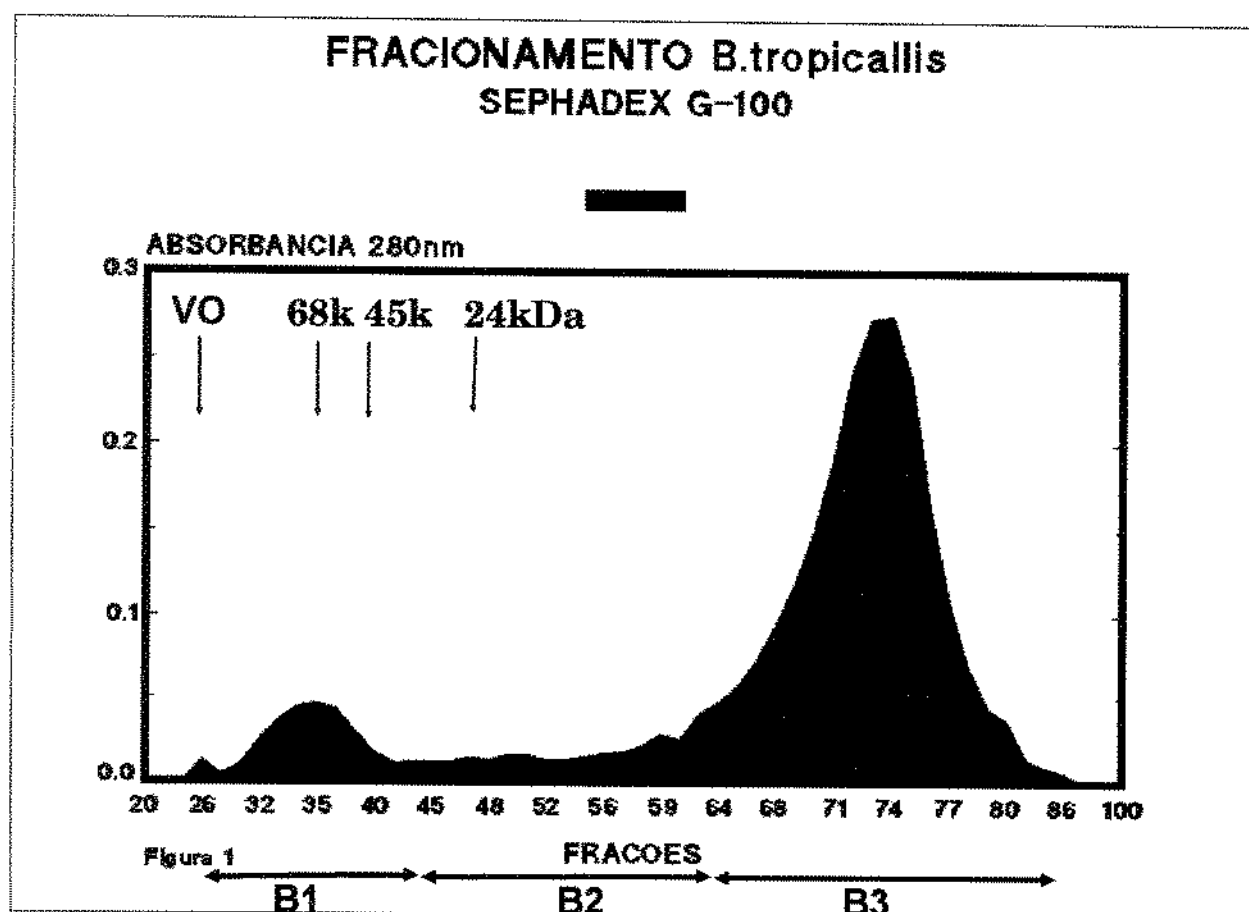


FIGURA 1: Fracionamento do ácaro *Blomia tropicalis* em coluna de cromatografia de 216 ml (2,5 cm² de secção por 85 cm) de SEPHADEX G-100, com volume de fração de 3ml. B1= Fração de peso molecular 63 kDa (frações 25 a 44); B2= Fração na faixa de 30 kDa a 8 kDa (frações 45 a 63); B3= Fração de 3,4 kDa (frações 64 a 85); VO= Void Volume ou volume de exclusão da coluna determinado por Blue Dextran 2.000.

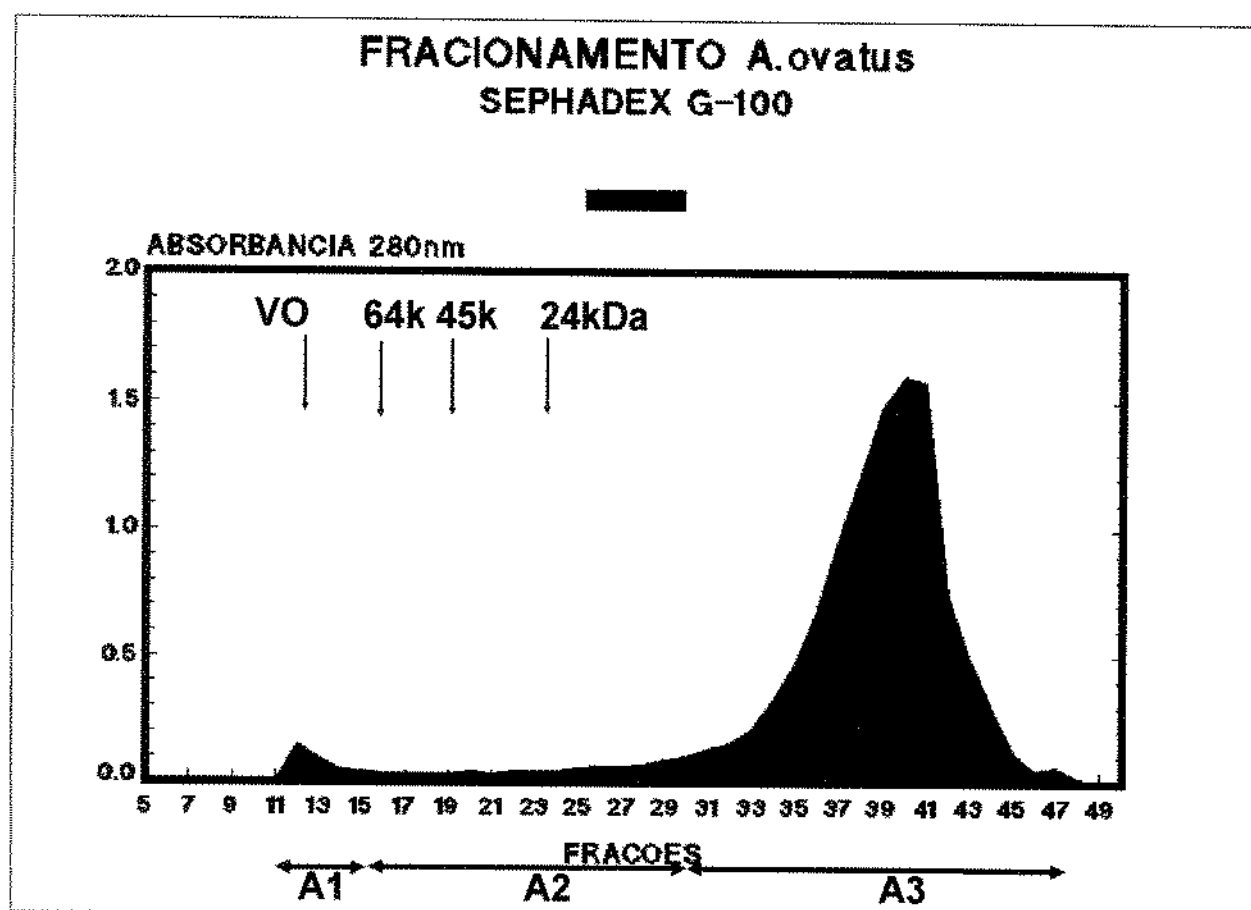


FIGURA 2: Fracionamento do ácaro *Aleuroglyphus ovatus* em coluna de cromatografia de 216 ml (2,5 cm² de secção por 85 cm), em gel de SEPHADEX G-100, com volume de fração de 6 ml. A1=Fração com pico de P.M. em 100 kDa (frações 11 a 15); A2=Fração com faixa de 80 kDa a 9 kDa (frações 16 a 30) ; A3=Fração de 3,6 kDa (frações 31 a 47) e Vo=Voide Volume ou Volume de Exclusão determinado por Blue Dextran 2.000.

RENDIMENTO DA CROMATOGRAFIA G-100 *Blomia tropicalis*

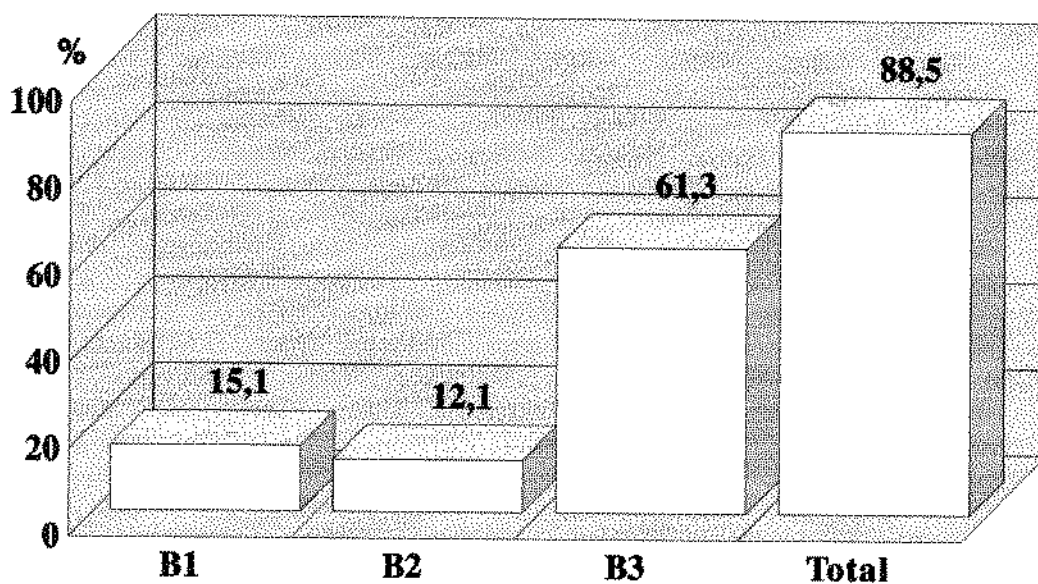


Figura 3: Rendimento da Filtração em Gel de SEPHADEX G-100 para o açúcar *Blomia tropicalis*, frações B1 (1.135 μg / 15,1%), B2 (910 μg / 12,1 %) e B3 (4.599 μg / 61,3 %) do total aplicado de 7,5 mg obtivemos um rendimento final de 88,5 %.

A figura 4 (página 28) representa graficamente a dosagem de proteínas das frações e rendimento da cromatografia em gel do ácaro *Aleuroglyphus ovatus*.

4.1.4:- A dosagem de Carbohidratos (**Antrona**) nas frações de *Blomia* e *Aleuroglyphus*, somente puderam ser realizadas após a concentração em Ultrafiltração. Assim, não podemos afirmar com segurança a proporção de carbohidratos pela possibilidade de exclusão durante o processo de filtração, contudo, foram dosados carbohidaratos tanto nos extratos "**crude**", como nas frações.

Tabela 3: Dosagem de carbohidratos pelo método da Antrona em extratos totais de ácaros e proporção em relação a dosagem de proteínas.

Dosagem	<i>Blomia tropicalis</i>	<i>Aleuroglyphus ovatus</i>
Proteínas (Pt)	1,25 mg	3,5 mg
Carbohidratos (Ch)	350 µg	500 µg
Pt/Ch	0,28	0,15

4.2:TESTES EPICUTÂNEOS : (Apêndice 1)

4.2.1- Os resultados dos Prick-Test para *Aleuroglyphus ovatus* foram: 45 (90%) pacientes reativos ao extrato "**crude**"; para as frações A1 e A2 37 (74%) pacientes

RENDIMENTO DA CROMATOGRAFIA
G-100 *Aleuroglyphus ovatus*

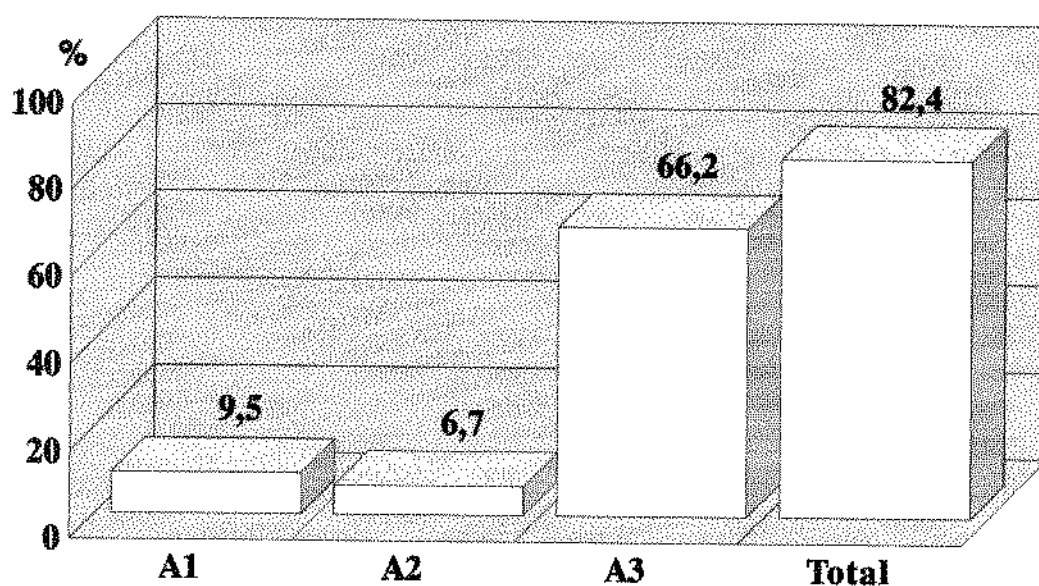


Figura 4: Rendimento da Filtração em Gel de SEPHADEX G-100 para o ácaro *Aleuroglyphus ovatus*, frações A1 (1.429 μg / 9,5%), A2 (1.000 μg / 6,7 %) e A3 (9.936 μg / 66,2 %) do total aplicado de 15 mg obtivemos um rendimento final de 82,4 %.

sensíveis e para a fração A3 em 11 (22%). (Figura 5- página 30)

4.2.2- Os testes epicutâneos com *Blomia tropicalis* revelaram elevada porcentagem de pacientes sensibilizados, os resultados obtidos foram: 49 (98%) pacientes reativos ao extrato "crude", para a fração B2 35 (70%) dos pacientes testados, e para as frações B1 e B3, 8 (16%) e 11 (22%) dos indivíduos testados foram sensíveis, respectivamente. (Figura 6 - página 31)

4.2.3- Ao compararmos a média das áreas de pápulas obtidas para cada uma das frações, a B2 foi a que obteve o tamanho médio maior com 3,95 mm e a de menor média foi a B1 com 0,88 mm (Tabela 4 - página 32). A análise estatística, através de teste T de **STUDENTS**, não mostrou diferença significativa entre os resultados obtidos para a média das pápulas obtidas com o extrato "crude" de *Aleuroglyphus ovatus* e *Blomia tropicalis* ($p=0,99$), contudo, observamos diferença altamente significativa entre o resultado da fração B2 quando comparada a B1 ($p<0,00001$) e B3 ($p<0,0001$).

Por outro lado, a reatividade aos testes epicutâneos com frações de *Aleuroglyphus* A1 e A2 não tiveram diferença significativa quando comparadas ($p=0,35$), contudo, ocorreram diferenças significantes quando comparamos a média das pápulas obtidas tanto em relação às frações A1 e A3 ($p<0,0001$) como A2 e A3 ($p<0,001$) (Tabela 5 - página 32).

4.2.4- Não observamos respostas aos Testes Epicutâneos, dentro de valores considerados positivos (pápula maior ou igual a 3 mm de diâmetro) no grupo controle de 10 pacientes, tanto em relação aos extratos "crude" de *Aleuroglyphus ovatus* e *Blomia tropicalis*, quanto a suas frações demonstrando que não ocorreu reação irritativa ou inespecífica neste experimento.

4.3: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE):

4.3.1- A eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % do extrato total do ácaro *Aleuroglyphus ovatus* coradas através de Azul de Toluidina e Coomassie Brilliant-Blue, demonstra pelo menos 8 Bandas evidentes, com Pesos Moleculares (PM) variando de 24 a 150 kD. Destas, duas foram as mais nítidas, uma com 30 kDa e outra com 60 kDa (Figura 7 e 8 - páginas 33 e 35). Na coloração do Gel com Azul de Toluidina observamos coincidência entre Bandas obtidas com esse método

Resultados de Prick-Test
Aleuroglyphus ovatus

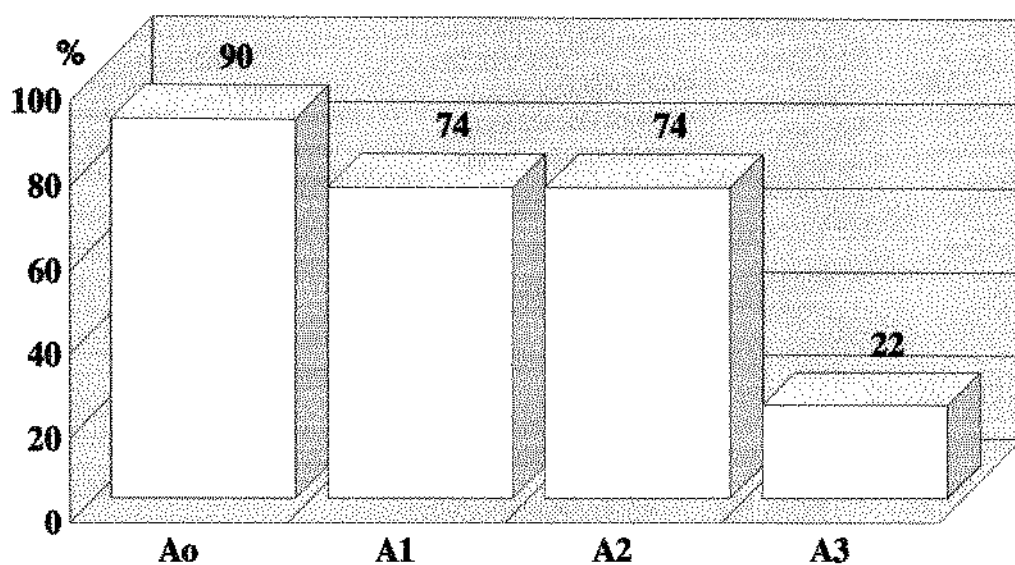


Figura 5 : Porcentagem de pacientes positivos aos Teste Epicutâneos (Prick-Test) para o ácaro *Aleuroglyphus ovatus* (Ao) "crude" 1:80 - 90% e suas frações (A1 - 100 kDa-74%, A2 - 79 a 9 kD - 74% e A3 - 3,6 kDa - 22%) obtidas na Filtração em Gel de SEPHADEX G-100.

Resultados de Prick-Test
Blomia tropicalis

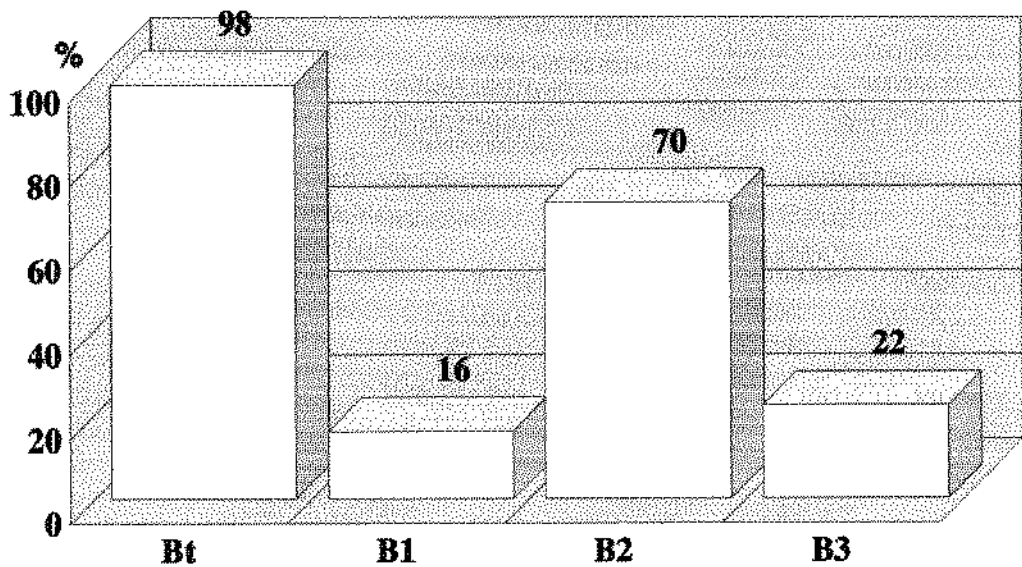


Figura 6: Porcentagem de pacientes positivos aos Teste Epicutâneos (Prick-Test) com o ácaro *Blomia tropicalis* (Bt) "crude" 1:80 e suas frações (B1- 63 kD - 16%, B2 - 30 a 8 kD - 70% e B3 - 3,4 kD - 22%) obtidas em Filtração em Gel de SEPHADEX G-100.

Fração	Média	Desvio Padrão
Ao	5,41	2,79
Bt	6,95	3,52
A1	3,91	2,88
A2	3,79	2,90
A3	2,44	2,77
B1	0,88	1,82
B2	3,95	2,99
B3	1,14	1,82

Tabela 4: Ao e Bt representam os resultados dos extratos "crude" de *Aleuroglyphus ovatus* e *Blomia tropicalis* respectivamente; A1, A2, A3, B1, B2 e B3 os resultados de cada uma das frações. (médias das pápulas)

Frações		
Ao-Bt	p=0,99	ñ significativa
B2-B1	p<0,0001	significativa
B2-B3	p<0,001	significativa
A1-A2	p=0,35	ñ significativa
A1-A3	P<0,0001	significativa
A2-A3	P<0,001	significativa

Tabela 5: Comparação entre as diferenças entre médias do Prick-Test de frações G-100 dos ácaros *Blomia tropicalis* (Bt-crude, B1, B2 e B3) e *Aleuroglyphus ovatus* (Ao-crude, A1, A2 e A3) pelo t de Students.

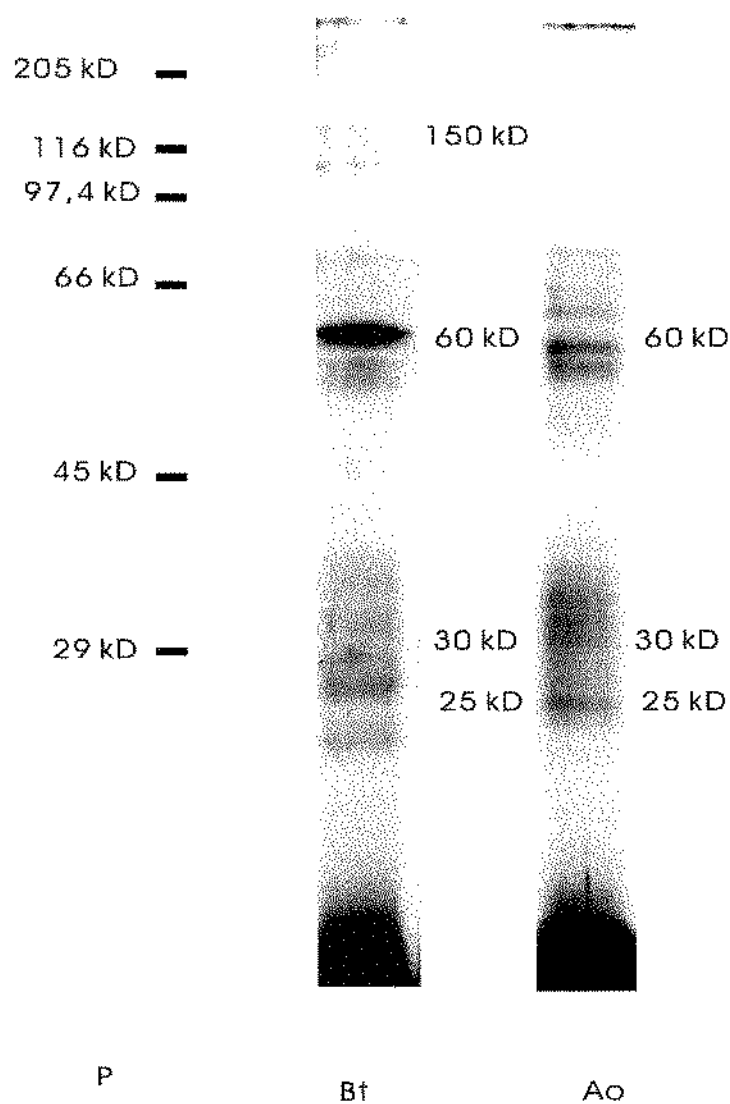


Figura 7: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14 % P=Padrões de Peso Molecular, Bt=*Blomia tropicalis*, Ao=*Aleuroglyphus ovatus*. (corados Azul de Toluidina)

e o anterior, demonstrando presença de carboidratos no material analisado (Figura 7, 8 e 9 - páginas 33, 35 e 36).

A eletroforese , do extrato "crude" de *Dermatophagoides pteronyssinus*, revelou algumas proteínas na mesma faixa de P.M. em comparação com a *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus*, contudo, foram observadas várias proteínas de Pesos Moleculares distintos, ficando evidente que cada um dos ácaros possui um perfil próprio na eletroforese.(Figura 10 - página 37)

4.3.2- Para a *Blomia tropicalis* a eletroforese em gel de poliacrilamida a 14 % corada em Coomassie Brilliant-Blue revelou pelo menos 10 Bandas com PM variando entre 10 a 150 kD. Foram observadas pelo menos duas Bandas mais visíveis uma em 30 kD e outra ao redor de 60 kD (Figura 8 - pág. 34). Através da coloração do gel com Azul de Toluidina, realizada em condições semelhantes, foi demonstrado que os resultados para os dois métodos tintorias eram coincidentes, não sendo observadas diferenças significativas entre as colorações obtidas para Coomassie e Toluidina. (Figura 7, 8 e 9)

4.4:IMUNOBLOT:

4.4.1- A determinação "in vitro" de IgE específica aos antígenos de *Blomia tropicalis* presente em soro de pacientes atópicos, através de Immunoblot, demonstrou presença de IgE ligando em pelo menos 11 antígenos de Pesos Moleculares distintos: 150, 140, 130, 100, 95, 80, 65, 60, 50, e 40 kDa. (Figuras 11, 12 e 13 - páginas 38, 39 e 40)

4.4.2- A pesquisa de IgE específica ou Immunoblot do ácaro *Aleuglyphus ovatus*, demonstrou presença de IgE para 8 antígenos destacando-se: 150, 130, 95, 80, 60, 40, 35 e 25 kDa. (Figuras 11, 12 e 13)

4.4.3- Em relação à porcentagem dos pacientes que demonstraram reatividade para a *Blomia tropicalis*, os antígenos principais foram as de 150 e 80 kD com 90% dos pacientes expressando IgE específica a esses dois alérgenos, sendo que ocorreram outros com porcentagem significativa de pacientes sensibilizados como os de 100 , 60 e 50 kD, com 60% dos pacientes. (Tabela 6 - página 41)

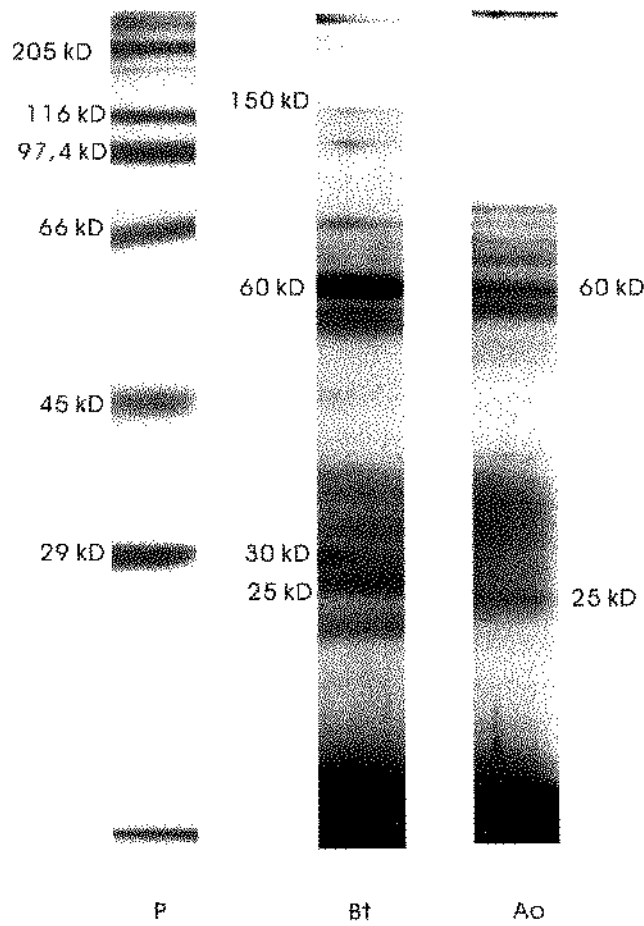


Figura 8: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14 % sendo: P=Padrões de Peso Molecular, Bt=*Blomia tropicalis*, Ao=*Aleuroglyphus ovatus*. (corados Coomassie Brilliant Blue)

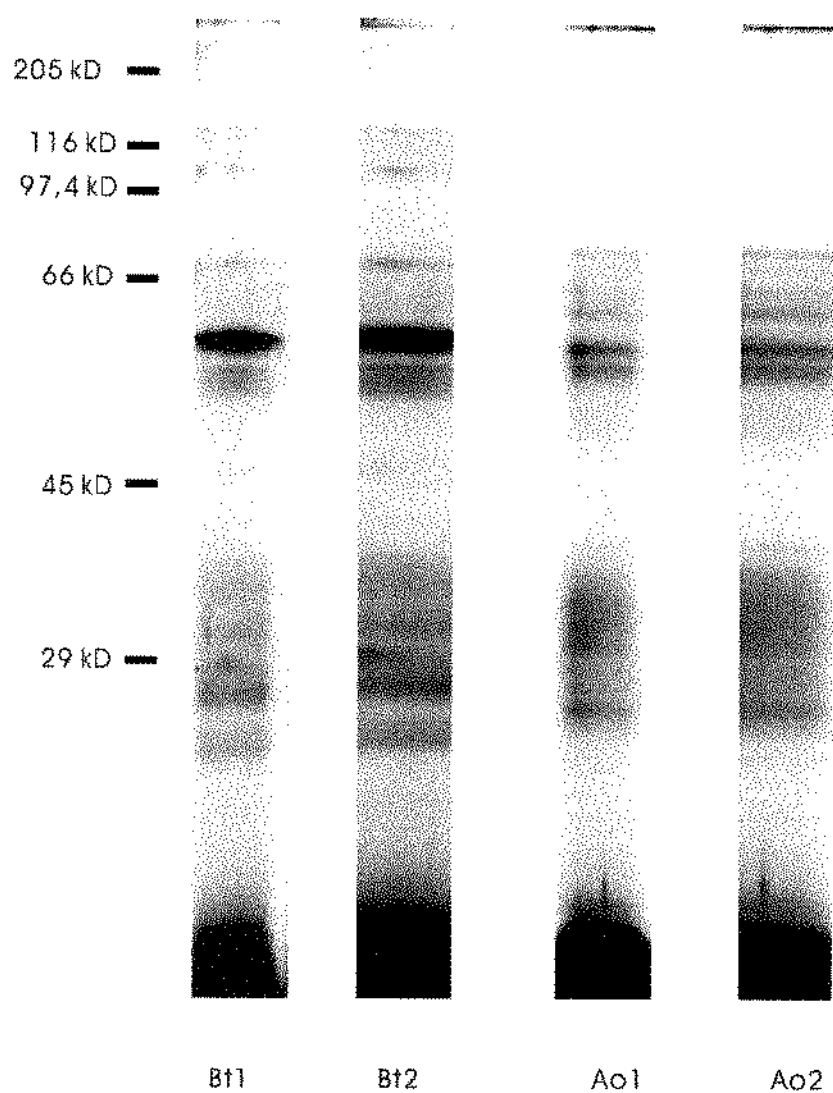


Figura 9: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14 % para comparação de colorações , Bt=*Blomia tropicalis* e Ao=*Aleuroglyphus ovatus*; quando seguido de 1 o gel foi corado por Azul de Toluidina e 2 por Coomassie Brilliant-Blue.

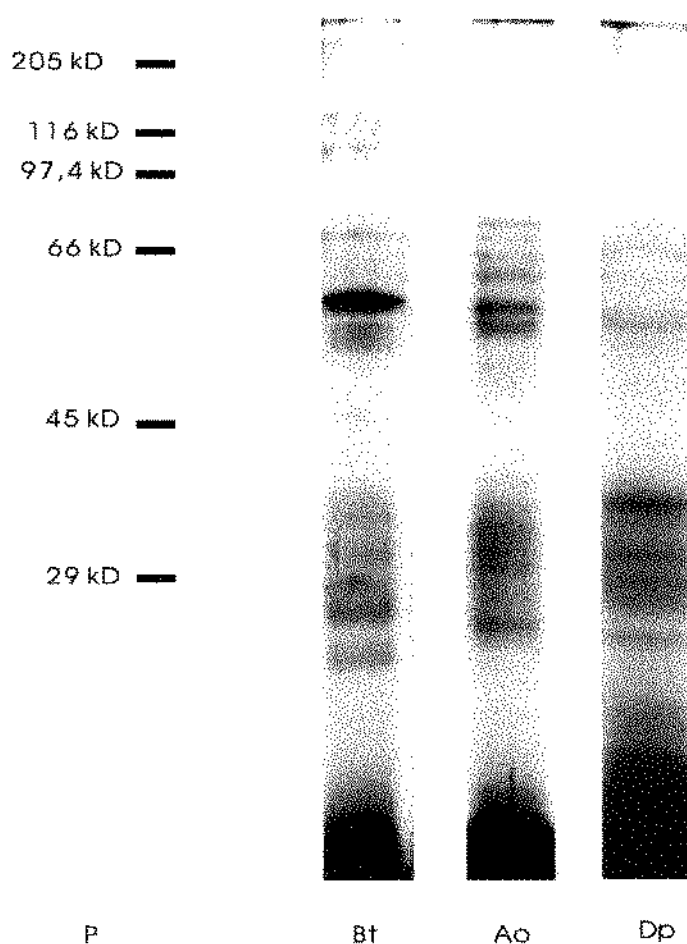


Figura 10: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14 %, P=Padrões de Peso Molecular, Bt=*Blomia tropicalis*, Ao=*Aleuroglyphus ovatus* e Dp=*Dermatophagoides pteronyssinus*. (corados Coomassie Brilliant-Blue)

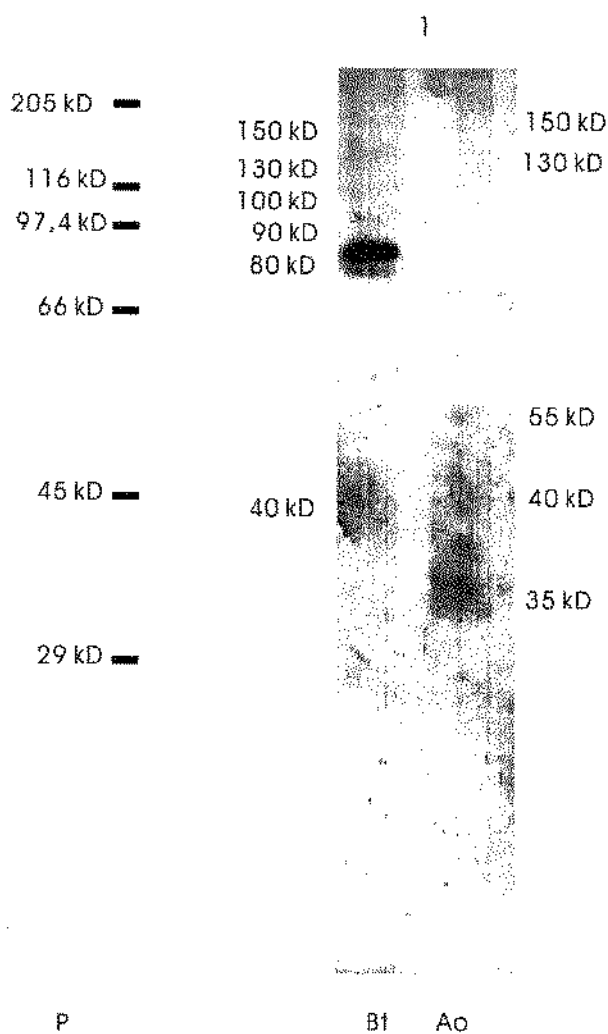


Figura 11: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14 % e Immunoblot para IgE, P=Padrões de Peso Molecular, Ao= *Aleuroglyphus ovatus*, Bt= *Blomia tropicalis*, 1=Blot de paciente E.R.B, valores de P.M. em kiloDaltons.

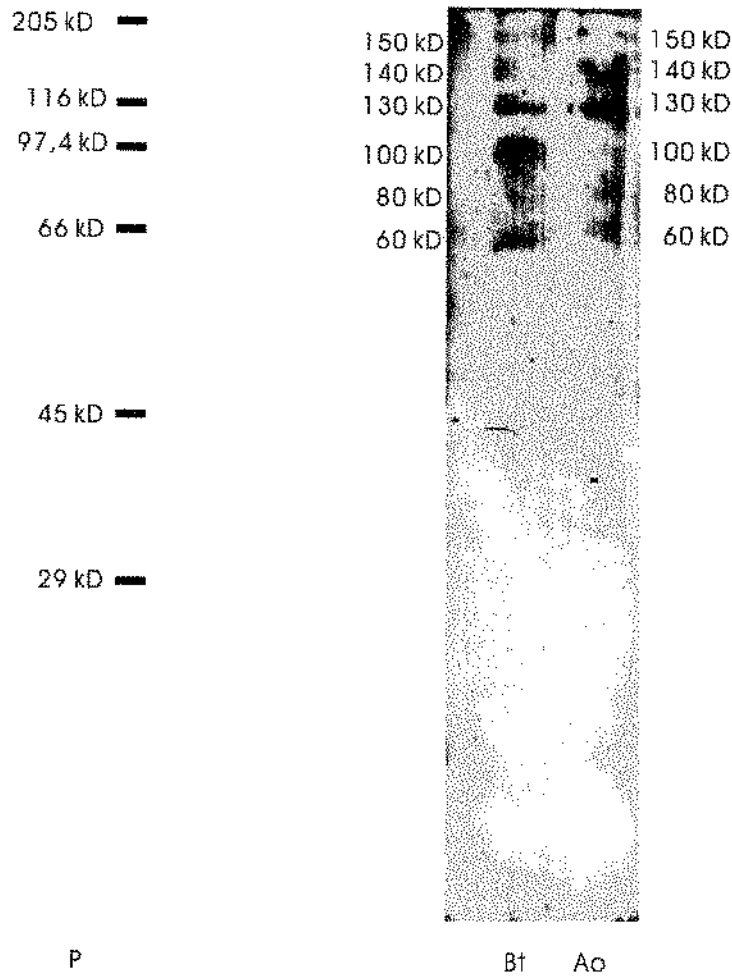


Figura 12: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14 % e Immunoblot para IgE, P= Padrões de Peso Molecular, Bt=*Blomia tropicalis*, Ao=*Aleuroglyphus ovatus*, 2=Blot paciente M.A.R, valores de P.M. expressos em kilo-Daltons.

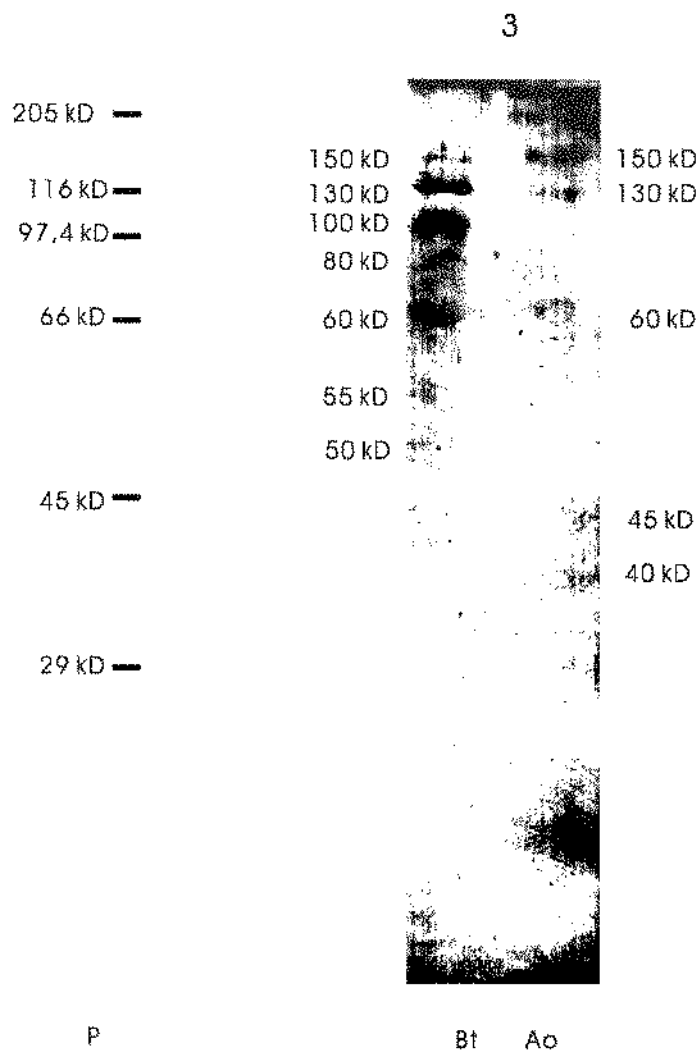


Figura 13: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14 % e Immunoblot para IgE, P=Padrões de Peso Molecular, Bt=*Blomia tropicalis*, Ao=*Aleuroglyphus ovatus*, 3=Blot paciente J.M.P, valores de P.M. expressos em kilo-Daltons.

TABELA 6: Resultados dos "Immunoblots" para IgE de pacientes atópicos para *A.ovatus* (Ao) e *B.tropicalis* (Bt), em porcentagem.

Pesos Moleculares (kD)	Porcentagem de pacientes positivos	
	Ao	Bt
150	90%	90%
140	30%	30%
130	60%	60%
100	30%	60%
80	60%	90%
65	0%	30%
60	30%	30%
50	0%	30%
45	0%	30%
40	30%	30%
35	30%	0%
25	30%	0%

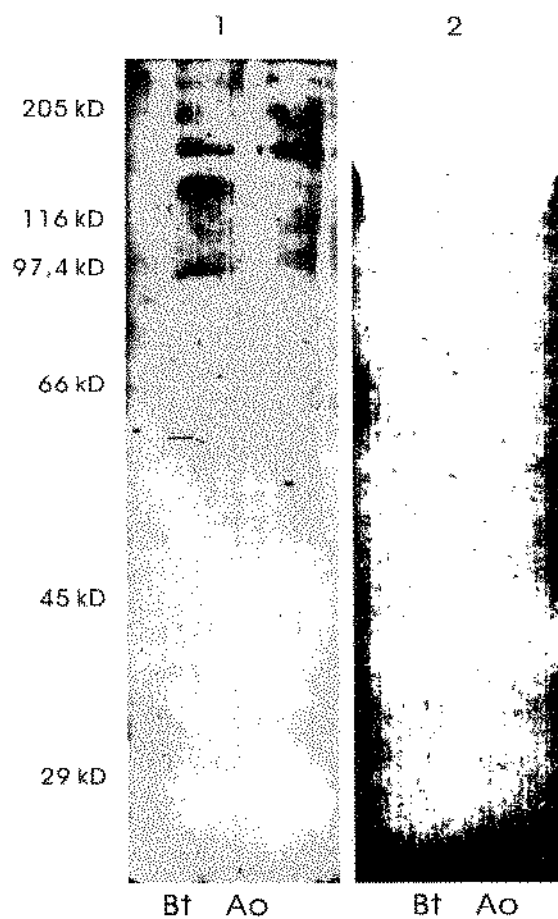


Figura 14: Imunoblots para IgE, sendo 1 = Blot paciente M.A.R., 2 = Blot paciente controle (-); Ao corresponde a *Aleuroglyphus ovatus* e Bt a *Blomia tropicalis*.

4.4.4- Para o *Aleuroglyphus ovatus* o antígeno com maior porcentagem de pacientes sensibilizados foi o de 150 kD (90%) , seguido dos antígenos de 130 e 80 kD com 60% dos pacientes sensíveis. Outros alergênos tiveram porcentual menor de pacientes com expressão na pesquisa de IgE específica. (Tabela 6 - página 41)

4.4.5- Nos soros controles (normais) não houve expressão de IgE específica aos ácaros testados (*Aleuroglyphus* e *Blomia*), pois, não obtivemos Bandas visíveis descartando ligação inespecífica de anticorpos tipo IgE a nitrocelulose neste experimento (Figura 14 - página 42).

DISCUSSÃO

5:DISCUSSÃO :

Entre os aeroalérgenos, os ácaros são considerados os principais responsáveis pelas alergias respiratórias, sendo portanto alvo prioritário de estudos que levem à purificação de antígenos. A identificação, caracterização e purificação de aeroalérgenos é fundamental para o desenvolvimento de métodos diagnósticos com maior especificidade e sensibilidade e antígenos purificados (por exemplo: Der pI do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*) estão sendo empregados em procedimentos terapêuticos, como a imunoterapia (PLATTS-MILLS, 1992).

Nosso estudo procurou identificar e caracterizar antígenos de ácaros ainda pouco estudados, como o *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus*. Inicialmente realizamos a filtração em gel de SEPHADEX G-100 e ao analisar o Fracionamento do *Blomia* e *Aleuroglyphus*, observamos, pelo perfil de eluição desses ácaros, que suas frações cromatográficas são complexas, não sendo observadas frações homogêneas. No *Aleuroglyphus ovatus* a faixa de P.M. intermediária (fração A2) é maior variando de 9 a 80 kD, no *Blomia* a faixa intermediária (fração B2) varia entre 8 e 30 kD. Este resultado revelou que o *Aleuroglyphus* contém material mais complexo que o *Blomia tropicalis*.

Os componentes estruturais dos antígenos de ácaros podem ter características específicas, dependentes das famílias, gêneros e espécies relacionadas. LIND em 1986 observou que ácaros, de um mesmo gênero (no caso *Dermatophagoides*), podem ter composição proteica diferente. VAN HAGE-HAMSTEN, JOHANSON & JOHANSON (1987) estudando ácaros de várias espécies, observaram que a composição proteica destes é diferente de uma espécie para outra. A filtração em gel em nosso estudo mostrou frações não homogêneas para o *Blomia* e *Aleuroglyphus*, e os valores de Pesos Moleculares destas foram diversos, resultado esperado, pois era pouco provável que ácaros de famílias diferentes (família *Glyciphagidae* para o *Blomia* e família *Acarinae* para o *Aleuroglyphus*), pudessem ter sua composição proteica idêntica.

Através do Fracionamento Cromatográfico nosso estudo, também, pode revelar outras frações não homogêneas, A1 e B1 (com 100 kD e 63 kD respectivamente) proteínas de P.M. elevados e distintos. As frações A3 e B3 (3,4 kD e 3,6 kD), contudo, possuem P.M. próximos.

Entre essas frações, as de Pesos Moleculares baixos (**A3** e **B3**) foram reativas em 22% dos pacientes testados (**Prick**). A semelhança do porcentual de reatividade populacional, mais os seus valores de P.M. bastante próximos, sugere que estas frações possam ter identidade antigenica parcial ou reatividade cruzada. Contudo, será importante o estudo completo incluindo o sequenciamento de amino-ácidos, para que se determine a relação estrutural e de composição entre as frações **A3** e **B3**.

A observação de reatividade, nos testes epicutâneos, em frações de baixo Peso Molecular indica a manutenção de atividade alergênica mesmo em polipeptídeos pequenos, com P.M. abaixo da faixa usualmente observada como alergênica para outros ácaros. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por TAMURA (1991), que observou atividade antigênica em dialisado de extrato de *Dermatophagoides farinae*, onde os P.M. das frações testadas eram de 5,3 e 2,9 kDa, muito próximos aos encontrados em nosso estudo. Estes dados sugerem a manutenção de alergenicidade, em antígenos de ácaros, mesmos após degradação parcial.

A possibilidade da existência de proteínas de Peso Molecular baixo, no material, também está inserida no estudo da atividade de proteinases, demonstradas no extrato "crude" de *Aleuroglyphus ovatus* (EDWARDS, FERNANDEZ-CALDAS & LOCKEY 1992). Os resultados obtidos em nosso perfil de eluição, sugerem a presença de auto-digestão do material proteico fato que poderia explicar a grande concentração de proteínas na faixa de baixo P.M., obtida na filtração em gel (Fração **A3**: 3,6 kDa).

Entre as frações estudadas a **A3** talvez esteja relacionada à auto-digestão do material e consequente liberação de alérgenos com Pesos Moleculares menores, mas ainda antigênicos. Contudo, as características desta proteinase ainda não foram completamente determinadas, sendo no momento impossível afirmar sua relação a atividade cisteíno protease demonstrada para Der fl, considerado o antígeno principal do *Dermatophagoides farinae* (INO, ANDO & MIYAMOTO, 1989).

Para o ácaro *Blomia tropicalis* ainda não foram descritos antígenos com atividade de proteinases como no *Aleuroglyphus*, contudo, devemos destacar que o *Blomia* apresenta comportamento semelhante ao *Aleuroglyphus* no perfil de eluição da filtração em gel. Portanto, a grande concentração encontrada na fração de menor

P.M. (Fração **B3**: 3,4 kDa), poderia representar a presença de auto-digestão no extrato deste ácaro.

Todavia, a importância da auto-digestão de antígenos de ácaros não é clara e sua ocorrência no ambiente natural (não apenas em extratos alergênicos), ainda não foi demonstrada. Portanto, a possibilidade de proteínas degradadas de ácaros manterem atividade alergênica, e terem participação na sensibilização de pacientes atópicos, deve ser considerada.

Ainda em relação a Filtração em Gel, devemos destacar que apesar dos perfis de eluição do *Aleuroglyphus* e *Blomia* em nosso estudo serem diferentes, observamos algumas características semelhantes:

1- Obtivemos nas diversas filtrações, para ambos os ácaros, três "pools" de frações não homogêneas, sugerindo que tanto *Aleuroglyphus* como *Blomia* têm composições proteicas complexas.

2- A filtração em gel tanto no *Blomia* como no *Aleuroglyphus* evidenciou perfil de eluição com dois picos nos extremos da filtração e "platou" na faixa de Peso Molecular intermediário.

3- Foi observada para ambos os ácaros maior concentração proteica na faixa de baixo P.M., correspondente à terceira fração.

Através dos testes epicutâneos, utilizando frações cromatográficas, pudemos verificar resultados diversos, quanto a reatividade destes alérgenos na população do estudo. A fração B2 do *Blomia tropicalis* foi significativamente mais reativa que as frações B1 e B3 deste ácaro. Estes resultados sugerem que a atividade antigênica mais importante do *Blomia* está na faixa de P.M. entre 30 a 8 kD.

Embora a análise dos resultados observados nos testes epicutâneos de frações de *Blomia*, possa sugerir uma possível correlação entre os antígenos deste ácaro (fração **B2**) com os principais do *Dermatophagoides pteronyssinus*, já que esta fração de *Blomia* e estes antígenos encontram-se na mesma variação de Peso Molecular (Der pI 14 kD e Der p II 24 kD) (PLATTS-MILLS, 1989), outros estudos devem ser realizados para definir esta relação.

A possibilidade da existência de reatividade antigênica cruzada, poderia explicar o grande número de pacientes que apresenta sensibilização tanto ao *Dermatophagoides pteronyssinus* como ao *Blomia tropicalis*, previamente demonstrada em nosso meio (PINHO, LAZZARINI & ZOLLNER, 1992). Contudo se este fato representa reatividade cruzada ou sensibilização a múltiplos antígenos (polissensibilização), somente estudos posteriores poderão definir.

Os testes epicutâneos com as frações **B1** e **B3** mostraram uma sensibilização populacional de 16 e 22 %, respectivamente, sugerindo que os antígenos do *Blomia* relacionados a sensibilização de pacientes atópicos podem ocorrer tanto em proteínas de alto como baixo Peso Molecular, resultado que amplia a faixa de P.M. com importância antigênica deste ácaro domiciliar.

Em relação aos testes epicutâneos, as frações do *Aleuroglyphus ovatus* mais reativas foram a **A1** e **A2** (74% dos pacientes testados, para ambas), e a fração **A3** teve menor porcentagem de pacientes sensíveis (apenas 22 %), mostrando que a atividade antigênica principal do *Aleuroglyphus* encontra-se em faixa mais ampla e com proteínas de P.M. maior que a observada para *Blomia*.

Estes dados demonstram que o "pool" com pico de P.M. de 100 kD, (**A1**) do *Aleuroglyphus ovatus*, é tão importante para a sensibilização de pacientes atópicos quanto o "pool" de P.M. intermediário (**A2** de 9 a 80 kD). Este resultado é relevante por demonstrar que este ácaro tem antígenos com valores de Pesos Moleculares elevados.

Na família *Pyroglyphidae* os antígenos principais estão situados em faixa de peso molecular entre 14 e 22 kDa (PLATTS-MILLS, 1990), antígenos de P.M. maiores como o Der p IV de 60 kDa (STEWART, 1991) têm menor importância alergênica, sendo que no *Aleuroglyphus* esta atigenicidade foi demonstrada para antígenos principais (responsáveis por sensibilização em mais de 60 % da população estudada).

Nosso estudo, também, procurou avaliar a reatividade no Prick-Test dos pacientes aos extratos "crude", e 90% dos pacientes testados foram sensíveis para o *Aleuroglyphus ovatus* e 98% ao *Blomia tropicalis*, reafirmando a alta prevalência de sensibilização da população atópica a esses ácaros em nossa região, demonstrada anteriormente por PINHO, LAZZARINI & ZOLLNER (1992).

Uma possível explicação, para este fato, poderia estar relacionada ao clima da região de Campinas, onde a umidade anual média é de 71% , com temperatura média anual de 20°C (CEPAGRI-UNICAMP), pois, estes valores de temperatura e umidade são extremamente favoráveis à proliferação de ácaros da poeira domiciliar (FURUMIZO, 1975).

Devemos destacar a necessidade de avaliação mais aprofundada de macro e micro-sistemas ambientais, na região de estudo, pois, a proliferação de ácaros está relacionada, principalmente, a condições micro-ambientais, onde fatores como a presença de ar condicionado, por exemplo, pode alterar os valores de temperatura e umidade. Contudo, a comprovação da existência de condições climáticas favoráveis, para uma maior proliferação e contaminação de ácaros no ambiente doméstico, pode explicar um consequente aumento da população sensibilizada.

A partir dos extratos totais obtivemos, com a filtração em gel, frações cromatográficas com rendimento de 88 % para o ácaro *Blomia* e 82% para o *Aleuroglyphus*, sendo que as frações de maior concentração proteica foram as de menor Peso Molecular (A3 e B3), resultado concordante com o perfil de eluição.

Ao compararmos os perfis obtidos no presente estudo com a eluição do ácaro *Dermatophagoides farinae*, realizada por MIYAMOTO, OSHIMA & ISHIZAKI (1969), utilizando SEPHADEX G-200, observamos que para esse ácaro, também, foram obtidas frações não homogêneas, sendo que nesse estudo as frações mais antigênicas estavam entre 40 e 50 kDa e eram compostas de carboidratos. Para investigar a natureza bioquímica das frações obtidas em nosso estudo, realizamos dosagens de carboidratos, utilizando o método da Antrona, sendo observada concentração elevada tanto nos extratos totais como nas frações, sugerindo a presença de glicoproteínas nos extratos de *Blomia* e *Aleuroglyphus*.

Coincidente a este resultado as colorações, das eletroforeses em gel de poliacrilamida, com dois métodos, Coomassie Brilliant-Blue e Azul de Toluidina, demonstraram a presença de proteínas e carboidratos, tanto no extrato de *Blomia* como no de *Aleuroglyphus*. Esse resultado sugere natureza glicoproteica para os antígenos de *Blomia* e *Aleuroglyphus*, correlacionando estes com os antígenos encontrados nos ácaros da família *Pyroglyphidae*, que também são em sua maioria glicoproteínas (PLATTS-MILLS, 1992).

Por outro lado, as eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) com extratos totais de *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus*, indicam que estes representam material de natureza heterogênea na sua composição. Observamos várias bandas (revelando proteínas), em faixa ampla de peso molecular, para os dois ácaros.

Também foram observadas, na eletroforese em gel de poliacrilamida, proteínas coincidentes para *Blomia* e o *Aleuroglyphus*, com a demonstração de três faixas de concentração de proteínas (alto P.M., intermediário e baixo P.M.). Apesar destas semelhanças, observadas empregando esta metodologia, nota-se claramente que seus extratos são diferentes, verificando-se proteínas para o *Blomia* que não são observadas no *Aleuroglyphus* e vice-versa. Além disso, as diferenças quanto a distribuição de concentração de proteínas e ou glicoproteínas, evidenciadas pelos métodos tintoriais, sugerem composição antigênica distinta.

Analizando os resultados obtidos através de "Immunoblot" para pesquisa de IgE específica, pudemos observar que os antígenos principais do *Blomia tropicalis* encontram-se em Pesos Moleculares próximos aos valores obtidos com o Prick-Test das Frações Cromatográficas, ocorrendo o mesmo para o *Aleuroglyphus ovatus*.

Foi possível constatar a presença de vários alérgenos com P.M. similares no *Aleuroglyphus* e *Blomia* (150, 130, 100, 80, 50 e 40 kD), podendo ser esta mais uma evidência de reatividade cruzada entre antígenos destes ácaros de famílias diferentes.

Essa hipótese é suportada por estudos onde a existência de reatividade cruzada entre ácaros de famílias diferentes foi demonstrada. O *Acarus siro* (ácaro de estocagem) e o *Dermatophagoides pteronyssinus* (LUCZYNSKA, GRIFFIN & TOPPING, 1990) apresentam reatividade cruzada, assim como o *Lepidoglyphus destructor* e *Dermatophagoides pteronyssinus* (HARFAST, 1992).

LLERENA, FERNANDEZ-CALDAS & LOCKEY (1992) demonstraram reatividade cruzada entre o *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Lepidoglyphus destructor*, em soros de pacientes colombianos, esse estudo além de ampliar a importância antigênica do *Blomia*, poderia explicar a alta porcentagem de pacientes sensibilizados concomitantemente ao *Blomia* e ao *Dermatophagoides*

(PINHO, MELLO & BAGGIO, 1990a e PINHO, LAZZARINI & ZOLLNER, 1992). ZOLLNER, PINHO & VILELA (1992) observaram através de pesquisa de IgE específica, por ensaio imunoenzimático, para antígenos de *Euroglyphus maynei* e *Dermatophagoides pteronyssinus*, que a maioria dos pacientes têm IgE para estes dois ácaros, sugerindo a existência de reatividade antigênica cruzada entre estes ácaros da família *Pyroglyphidae*.

No presente estudo demonstramos que os alérgenos mais importantes do *Blomia tropicalis*, (fração B2), e *Aleuroglyphus ovatus*, (frações A1 e A2), encontram-se tanto na faixa de Peso Molecular dos antígenos principais dos ácaros da família *Pyroglyphidae*, quanto em P.M. mais elevado, ampliando as proteínas que poderiam estar envolvidas na sensibilização de população atópica e indicando a presença de antígenos espécie-específicos (PINHO, AMBROZIO, BAGGIO & ZOLLNER, 1994).

Através da detecção de IgE específica pelo "Immunoblot", observamos que proteínas de P.M. alto (150 kD, 100, 80, 60 e etc), também, são importantes para a sensibilização ao *Aleuroglyphus ovatus* e *Blomia tropicalis* na população estudada. Este resultado também foi observado no Prick-Test das frações (A1 de 100 kD, e B1 de 63 kD). A análise da frequência de pacientes sensibilizados, ao material de P.M. alto, mostrou a ocorrência de fato inédito na literatura médica especializada: a presença de antígenos principais de ácaros com Pesos Moleculares em valores acima do observado em estudos anteriores, resultado corroborado pelos testes epicutâneos de frações.

Com a utilização da técnica de "Immunoblot" não encontramos sensibilização populacional para proteínas de P.M. menores que 25 kD, aos ácaros *Blomia* e *Aleuroglyphus*. A ausência nos soros testados de respostas positivas para antígenos de baixo peso não exclui essa possibilidade, pois, o número de pacientes estudados foi limitado. Contudo, os resultados sugerem maior importância para alérgenos de P.M. mais elevado, na população estudada. É pertinente lembrar que os estudos envolvendo antígenos importantes para a sensibilização de pacientes atópicos, devem considerar a especificidade da população estudada, fato nem sempre reforçado em estudo anterior. (CHAPMAN et al, 1980)

Todavia a importância epidemiológica, para a sensibilização de pacientes atópicos, do *Blomia* e *Aleuroglyphus* não está limitada ao Brasil, recente estudo

multicêntrico nos Estados Unidos, revelou que além do *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Euroglyphus maynei*, que o *Blomia tropicalis* é encontrado frequentemente em domicílios americanos, sugerindo sua importância para sensibilização de pacientes naquele país.(ARLIAN, 1992)

SILTON, FERNANDEZ-CALDAS & LOCKEY (1991) observaram sensibilização populacional (através de RAST) para o *Aleuroglyphus ovatus* na cidade de Tampa, Estados Unidos, sugerindo que também este ácaro é um agente etiológico relacionado com alergias respiratórias naquele país. Estes resultados correlacionam-se com os obtidos em nosso estudo bem como o de BAGGIO & AMBROZIO (1992), que reforçam a importância deste ácaro como aeroalérgeno.

ARRUDA, FERNANDEZ-CALDAS & CHAPMAN (1994) trabalhando com proteínas de *Blomia* obtidas através de cDNA descreveram um antígeno, Blo t V, de 16 kDa. Através de imunoperoxidase em placa, para IgE, eles observaram que mais de 60% dos pacientes estudados expressavam anticorpos para este antígeno do *Blomia tropicalis*, sugerindo que o Blo t V pudesse ser um dos antígenos principais deste ácaro.

Este resultado é concordante com o apresentado por ZOLLNER, PINHO & BAGGIO (1994) , que realizaram testes epicutâneos com frações obtidas em filtração de SEPHADEX G-100, onde foi observada que a maior atividade antigênica do *Blomia* encontra-se na fração B2 (com P.M. entre 8 a 30 kDa). Todavia, devemos considerar que a denominação de antígeno principal deve ter como um dos parametros que população foi estudada não podendo ser transportada para outras populações, sem que estudos regionais sejam realizados.

As informações colhidas nas histórias clínicas dos pacientes, em nosso estudo, sugerem que a sensibilização ocorreu em ambiente domiciliar, estando descartada exposição ocupacional, reforçando a importância do *Aleuroglyphus* e *Blomia* como ácaros domiciliares.

O argumento de que a *Blomia* e o *Aleuroglyphus*, migraram recentemente do ambiente de estocagem de grãos para o ambiente doméstico, não é baseado em estudos controlados que tenham determinado a cronologia exata destes fatos, e nem se este processo de domicialização foi concomitante do *Dermatophagoides*. Existe apenas a hipótese de que o *Aleuroglyphus* e *Blomia* apareceram posteriormente, no

ambiente doméstico, em relação ao *Dermatophagoides pteronyssinus*, e que ainda estariam em processo de domicialização. Contudo, isto não é o suficiente para denominar o *Aleuroglyphus* e *Blomia* como exclusivamente de estocagem, já que eles são igualmente encontrados em ambientes domiciliar e nele causam doença.

Considerando todos esses resultados, tanto o *Blomia tropicalis* como *Aleuroglyphus ovatus* poderiam ser transferidos para uma categoria diferente, da em que atualmente são incluídos. Manter estes ácaros classificados como ácaros de estocagem (storage mites), não parece apropriado, pois, sua prevalência na poeira doméstica é elevada e sua importância epidemiológica para sensibilização de pacientes atópicos supera a do *Dermatophagoides pteronyssinus* em nosso meio.

A manutenção da classificação atual, rótula de forma equivocada os ácaros *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus* como ácaros de estocagem, uma condição que além de não ser exclusiva (estes ácaros não são encontrados apenas em ambientes de estocagem de grãos), não contempla a sua importância como antígenos domiciliares significativos para sensibilização dos pacientes atópicos.

Portanto, a classificação "ácaros da poeira domiciliar" não deve ser única e exclusiva para os ácaros da família *Pyroglyphidae*, tal fato corre o risco de ser uma determinação arbitrária, de valor histórico a ser reavaliado, para que o *Blomia*, o *Aleuroglyphus* e outros ácaros que porventura venham a ser descobertos em amostras de poeira domiciliar, não sejam classificados como ácaros de estocagem.

Consideramos necessária uma nova classificação que contemple os resultados aqui apresentados, a qual deverá incluir o *Blomia tropicalis* e o *Aleuroglyphus ovatus* junto aos outros ácaros da poeira domiciliar ou "house dust mites" (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Euroglyphus maynei*) ou que estes ácaros tenham apenas a denominação de genérica aeroalérgenos.

Este trabalho reveste-se de importância ao indicar a necessidade da caracterização antigênica, tanto analítica como estruturalmente, para melhor compreendermos as propriedades biológicas destes alérgenos, do *Aleuroglyphus* e *Blomia*, bem como para a utilização mais racional em procedimentos diagnósticos e terapêuticos nas doenças alérgicas das vias respiratórias.

CONCLUSÕES

6: CONCLUSÕES

Os ácaros, *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus* são aeroalérgenos importantes para a sensibilização de pacientes atópicos em nosso meio, e esta importância pode superar em determinadas localidades o *Dermatophagoides pteronyssinus*.

No *Blomia tropicalis* encontram-se antígenos em ampla faixa de Peso Molecular, ocorrendo o mesmo para o *Aleuroglyphus ovatus*, esse fato foi demonstrado através do Prick-Test com as frações obtidas na filtração em gel, sendo as frações B2 (7 a 30 kD), para *Blomia*, e A1 e A2 (100 e 7 a 80 kD, respectivamente), para o *Aleuroglyphus*, as mais antigênicas. Contudo, não foi possível com a filtração em gel estabelecer uma faixa mais restrita de P.M. para estes antígenos.

Através de "Immunoblot", para pesquisa de IgE específica, pudemos observar vários antígenos importantes tanto para a *Blomia* como para o *Aleuroglyphus*, contudo podemos destacar os de P.M. elevado: 150, 130, 100 e 80 kD, que além de poderem ser classificados como antígenos principais (positivos em mais de 60% dos pacientes testados), ocorreram em faixa não habitual da descrição de alérgenos relacionados a outros ácaros encontrados no ambiente doméstico.

Além disso, os antígenos do *Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus* foram caracterizados como proteínas e glicoproteínas, o que deve estimular seu estudo com outras metodologias: sequenciamento de amino-ácidos, produção de antígenos recombinantes, etc.

Concluimos, a partir da população estudada, pacientes sem exposição ocupacional relacionada a ácaros de estocagem, que a sensibilização destes ocorre em domicílios. Como a presença destes ácaros em amostras de poeira doméstica já foi demonstrada em estudos anteriores, sugerimos uma mudança na classificação, não considerando a *Blomia* e o *Aleuroglyphus* apenas como ácaros de estocagem, mas como ácaros da poeira domiciliar, também.

APÊNDICE

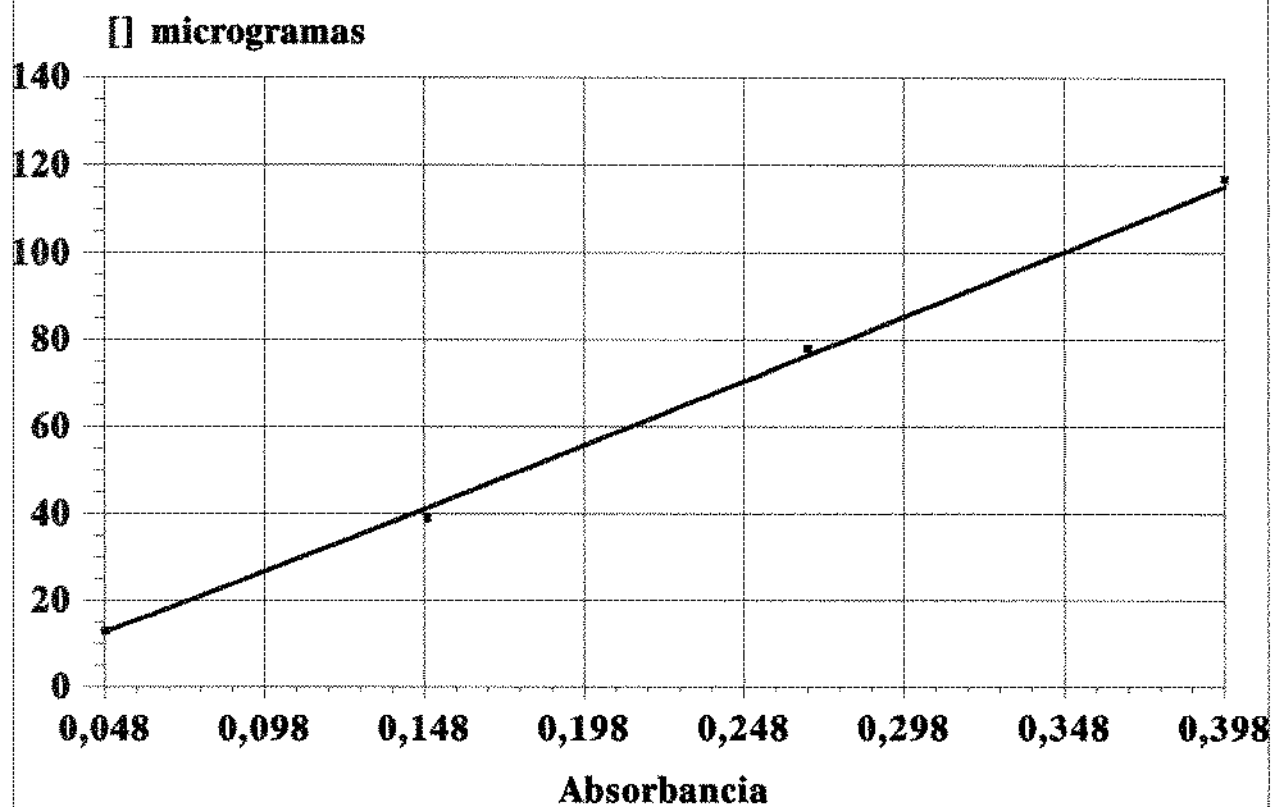
NOME	IDADE	SEXO	HD	AO	BT	A1	A2	A3	B1	B2	B3	HISTA
AJML	17	M	ASM	7	13	5,5	6,5	0	0	4	0	8
ALCY	34	F	RI ASM	5	7	3,5	4	0	3	0	0	8
VPL	37	M	RI	7,5	10,5	10,0	11,5	17	0	8,5	0	10
MAHC	30	M	RI	0	10	7	8,5	3,5	0	5,5	0	8,5
MO	43	F	RI	3,5	3	0	2,5	0	0	0	0	8
LAL	29	M	RI	5	8	5,5	5,5	0	0	0	0	6,5
MA	43	M	RI ASM	7,5	12	6,5	13	11	0	0	5	10
CAV	32	F	RI ASM	9	8	5,5	4	4,5	0	5	0	10
AJF	29	M	RI	7	10,5	9,5	0	6,5	7	9	6,5	8,5
MPR	30	F	RI	3	6	4	0	0	0	0	0	7,5
ENRL	31	F	RI	3	5	2,5	3	3	0	3	0	8
ROSA	13	M	RI ASM	13	11	8	4	3	0	0	0	5,5
JBW	20	M	RI	0,5	8	4,5	6,5	0	2	2	0	7,5
RRP	17	M	RI ASM	7,5	29	6,5	4	4	0	0	3,5	8,5
NFCGS	33	F	RI ASM	4	9,5	4	4	0	4	7,5	3,5	8,5
ARJ	24	M	RI	4,5	10	4	0	2,5	3	3	0	6,5
CDRM	15	M	RI	6,5	8,5	6,5	5,5	4,5	0	7,5	4,5	8
AA	57	M	FA	3,5	4	0	3,5	0	0	0	0	12
VAS	41	F	RI	4	4,5	4,5	4,5	2	0	0	0	5
RCS	30	F	RI FA	3,5	12,5	4,5	4,5	3,5	0	0	0	7
RMB	28	F	RI ASM	6,5	7,5	7	5	6	2,5	6,5	0	7
GSR	46	F	RI ASM	5	8	5	6,5	6	4	6,5	6	9,5
SRMF	14	F	RI ASM	7	6,5	3	4	3	0	0	3,5	7,5
LAF	18	M	RI	4,5	11	0,5	8	6	4,5	8,5	0	7,5
LR	20	F	RI	8	9,5	5,5	4	0	0	8,5	0	10,5
BEFB	41	F	RI	5	5,5	4	5,5	0	0	4	0	6,5
IDM	44	F	RI	4	4	5	5	0	0	4	0	6,5
ERB	33	M	RI	4	4,5	0	3,5	0	0	4	0	10,5
MHB	30	F	RI ASM	4	3,5	3,5	3	0	0	6,5	0	7
AAS	20	F	RI ASM	4,5	5	5	4,5	3	4	3,5	0	6,5
RCP	26	F	RI	0	3,5	3,5	0	3	2	0	0	11
MAL	12	M	RI	0	0	0	0	0	0	0	0	7,5
MRSR	35	F	RI ASM	3	3	0	0	0	0	0	5,5	7
RO	25	F	RI	6	5	0	3,5	0	0	3	0	6,5
ESS	42	F	RI ASM	7	7,5	6,5	0	4,5	0	5	6	11,5
TF	10	F	RI	8,5	8,5	0	0	5	0	6	0	7,5
CAP	24	F	RI	6	6,5	7	5	0	0	8	0	7
APC	20	F	RI ASM	12	7	0	5,5	4,5	0	7	0	8
JMP	30	M	RI ASM	7,5	11,5	8	5	4,5	0	5,5	0	12
AGA	35	F	RI ASM	4	4	4	3	2	4	5	0	7
WPS	28	F	RI	5	5	3	3	2	0	4	0	7
CMC	27	F	RI	0	4	0	0	0	0	4	0	7,5
MAR	49	F	RI	0	4	0	0	0	0	0	0	7,5
OAS	34	F	RI ASM	2,5	3	0	0	0	0	0	0	8
CAVC	23	M	RI	7,5	6,5	5	3,5	3,5	0	4	0	8
CPA	26	F	RI ASM	4	3,5	3	0	3	0	0	0	8,5
AAO	13	F	RI	6	7	0	0	0	0	5,5	3,5	8,5
ICVB	23	F	RI	5,5	7,5	5	4	3	0	5,5	0	10
MP	30	M	RI	3,5	3,5	3	3	0	2	3,5	0	10
LLR	40	F	RI ASM	4	5	4	3,5	2,5	0	3	2,5	6

AO	BT	A1	A2	A3	B1	B2	B3
>=3	>=3	>=3	>=3	>=3	>=3	>=3	>=3
45	40	37	37	11	8	35	11

Apêndice 1: Testes epicutâneos de 50 pacientes atópicos , sendo o resultado expresso em milímetros, Ao=A. ovatus, Bt=B. tropicallis, A1,A2,A3, B1, B2, B3 frações G-100 dos ácaros

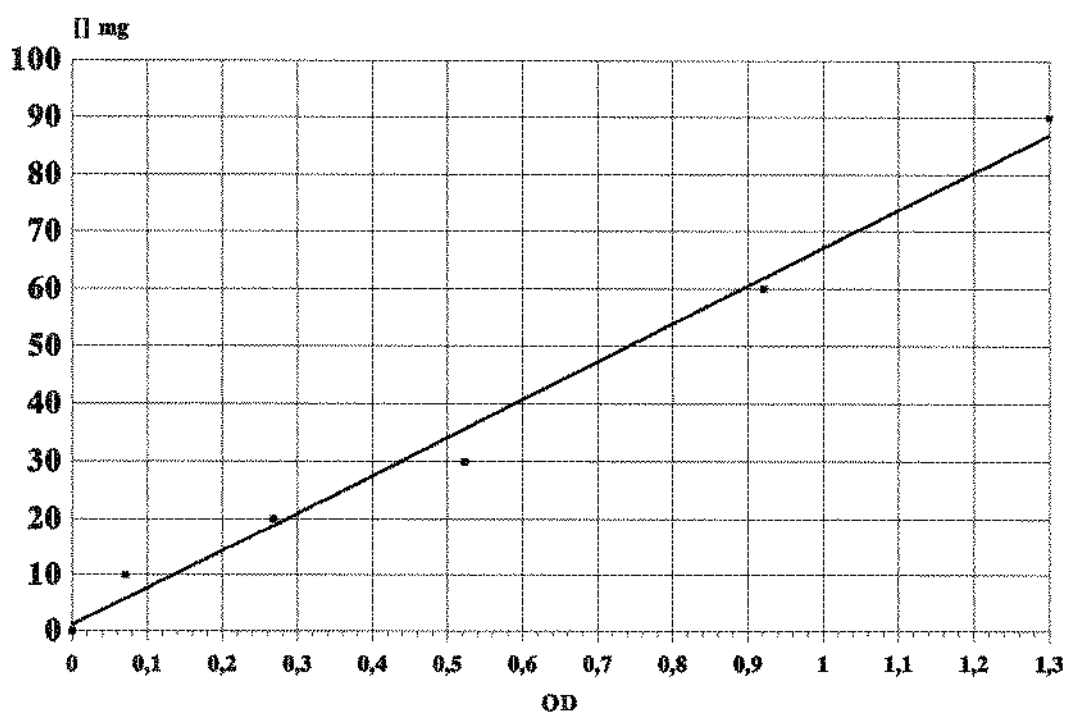
DOSAGEM DE PROTEINAS

Aleuroglyphus o. e Blomia t. (HARTREE)



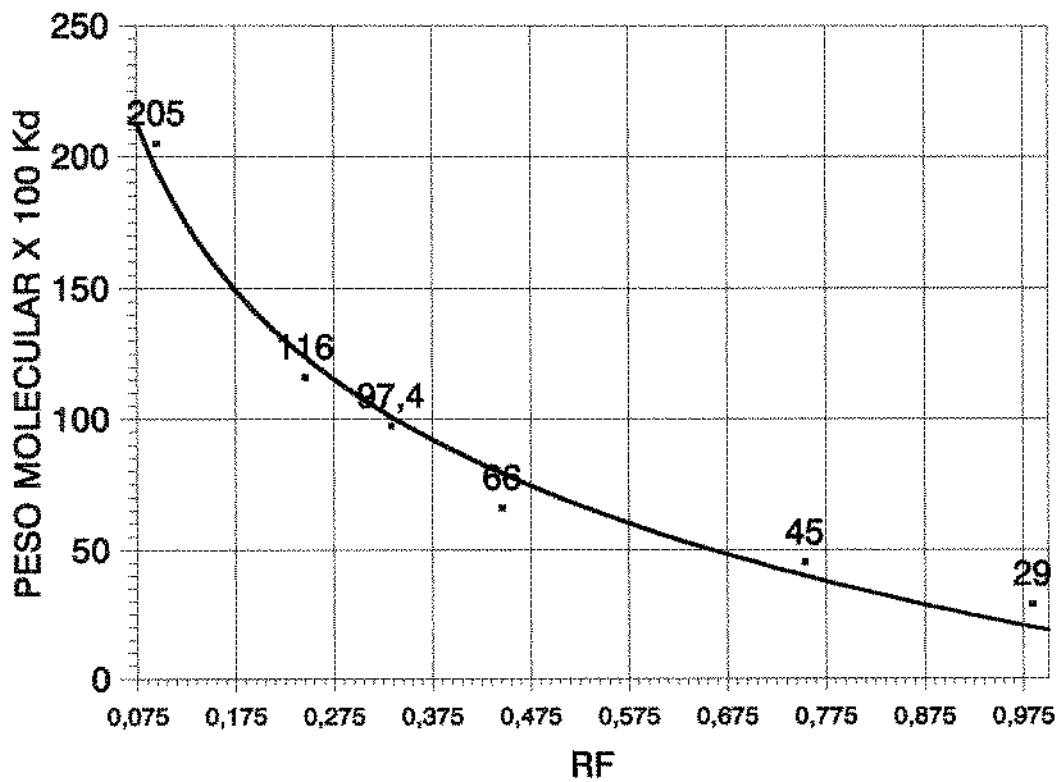
Apêndice 2: Dosagem de Proteínas pelo método de HARTREE, com curva padrão de regressão linear.

Dosagem de Carbohidratos (Antrona)
Blomia tropicalis* e *Aleuroglyphus ovatus



Apêndice 3: Dosagem de Carbohidratos pelo método de Antrona, com curva padrão de regressão linear.

CURVA PADRÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10%



Apêndice 4: Curva padrão de RF (Fator de Migração em gel de Poliacrilamida) , no exemplo gel a 10 %.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8:REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Antila, M.A.; Baggio, D.; Croce, J. et al - Estudo da hipersensibilidade imediata aos ácaros da poeira domiciliar. Temas Livres. Rev Bras Alerg Immunopatol 15 (5), 1992.
- Amaral, V. - Nota prévia sobre ocorrência de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart 1897) em São Paulo (Psoroptidae; Sarcoptiformes) - Sessão Científica Mensal da Soc. Paulista de Med. Veterinária, São Paulo, 26 de maio de 1967.
- Amaral, V. - Sobre a ocorrência do Ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart 1897) no Brasil (Psoroptidae; Sarcoptiformes) - Rev Med Vet (São Paulo) 3:296, 1968.
- Ambrozio, L.C.; Baggio, D.; Mello, J.F. - *Suidasia pontificia*: Alergizante de vias aéreas?. Apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Alergia e Immunopatologia, 1988-Florianópolis S.C.- Prêmio Oswaldo Seabra.
- Ambrozio, L.C. ; Baggio, D.; Mori, J.C. ; Mello, J.F. - Avaliação de Antígenos de *Blomia tropicalis* em Comparação com outros ácaros do pó domiciliar. Abstract. "International Symposium on Paediatric Allergy and Clinical Immunology" 7th to 10th June 1989, Ponta Delgada Açores, Portugal
- Arlan, L.G.; Bernstein, I.L.; Gallagher, J.S. - The prevalence of house dust mites, *Dermatophagoides* spp, and associated environmental conditions in homes in Ohio. J Allergy Clin Immunol 69:527, 1982.
- Arruda, L.K.; Fernandez-Caldas, E.; Naspitz, C.K.; Montealegre, F.; Chapman, M.D.- Molecular cloning of *Blomia tropicalis* allergen Blo t5 and its sequence homology to *D. pteronyssinus* Der p5. (Abstract). J Allergy Clin Immunol 93(1): 205, 1994.
- Baggio, D.; Croce J. : Ácaros encontrados associados a dermatites atópicas no homem. Resumos do 1o Seminário sobre vetores urbanos e animais sinantrópicos, São Paulo, USP 2 a 4 de Julho de 1983-pag.32

- Baggio, D.; Ambrozio, L.C.; Antilla M.A. - Ácaros Ambientais e as Manifestações Alérgicas. Rev Bras Alerg Immunopatol 12(2), 56-68, 1989.
- Baggio, D.; Ambrozio, L.C. - Household mites from Brazil summary and annual seasonal variation. Temas Livres. Rev Bras Alerg Immunopatol 15 (5), 1992.
- Bengtsson, A.; Karlsson, A.; Rolfsen, W.; Einarsson, R. - Detection of Allergens in Mould and Mite Preparation by a Nitrocellulose Electroblotting Technique. Int Arch Allergy Appl Immunol 80:383, 1986.
- Bernd, L.A.G.; Baggio, D.; Ambrozio, L.C. et al : Avaliação da sensibilização a ácaros de estocagem (AE) em atopicos e normais. Temas Livres. Rev Bras Alerg Immunopatol 15 (5), 1992.
- Bischoff, E.; Schirmacher, W. - Investigations of allergen-containing dust samples from the interior of the house . In Advances in aerobiology, Basel: Berkhauser Verlqag 189-96, 1987.
- Black, P.L.; Marsh, D.G. - The genetic basis for atopic allergy in man. In Segal MS, Weiss EB, editors: Bronchial asthma: mechanisms and terapeutics, Boston, 1976, Little, Brown, p 53-64.
- Booij-Noord, H.; De Vries, H.J.; Sluiter, H.J.; Orie, N.G.M. - Late bronchial obstructive reactions to experimental inhalation of house dust extract. Clin Allergy 2:43, 1972.
- Bronswijk, J.E.M.H. van : House dust biology for allergists, acarologists and mycologists, NIB Publishers, the Netherlands, p 316 , 1981.
- Bronswijk, J.E.M.H. van; Sinha, R.N. - Pyroglyphidae mites (Acari) and house dust allergy: A review, J Allergy 47:31-52, 1971.
- Burr, M.L.; Dean, B.V.; Merret, T.G. et al - Effects of anti-mite measures on children with mite-sensitive asthma : A controlled trial , Thorax 35:506 ,1980.

- Chapman, M.D. ; Platts-Mills, T.A.E. - Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* - antigen P1, *J. Immunol*, 125:587, 1980
- Chua, K.Y.; Stewart, G.A.; Thomas, W.R. et al - Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der pI. Homology with cysteine proteases, *J Exp Med* 167:175-82, 1988.
- Chua, K.Y.; Doyle, C.R.; Simpson, R.J.; Turner, K.J.; Stewart, G.A.; Thomas, W.R. - Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der pII by IgE plaque immunoassay. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 91:118-23, 1990.
- Coca, A.F. & Cooke, R.A. - On the classification of the phenomena of hypersensitization. *J Immunol* 8:163, 1923.
- Cooke, R.A. & VanderVeer, A. - Human sensitization. *J Immunol* 1:201, 1916
- Cooke, R.A. - Studies in specific hypersensitiveness: IV New Etiologic factors in bronchial asthma. *J. Immunol*, 7:142, 1922
- Dandeu, J.P.; LeMas, J.; Lux, M.; Rabillon, J.; David, B. - Antigens and allergens in *Dermatophagoides farinae* mite : Purification of Ag 11 , a major allergen in *Dermatophagoides farinae*, *Immunology* 46: 679-87, 1982.
- deBlas, A.L. & Cherwinski, H.M. - Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal Biochem* 133:214, 1983.
- Dekker, A. - Asthma und Milben, *Munch, Med. Wochenschr.* 75:515, 1928 (traduzido para Ingles *J. Allergy Clin. Immunol* 64:526, 1979) .
- Dilworth, R.J.; Chua, K.Y.; Thomas, W.R. - Sequence analysis of cDNA coding for the major house dust mite allergen Der fI. *Clin Exp Allergy* 21:25-32, 1990.
- Dreborg, S.; Backman, A.; Basomba, A.; Bousquet, J. - Skin Tests used in type I allergy skin testing. *Position Paper Allergy* 44 (suppl.10): 1-59, 1989.

- Druce, H.M. & Schumacher, M.J. - Nasal provocation challenge, *J Allergy Clin Immunol* 86:261, 1990.
- Dutra, C.S. & Almeida, L.N. - Dermatite Atópica : Estudo da reatividade cutânea imediata e tardia. *Temas Livres. Rev Bras Alerg Imunopatol* 13 (4), 1990.
- Edwards, T.B.; Trudeau, W.L.; Fernandez-Caldas, E.; Lee, D.K.; Seleznick, M.J.; Lockey, R.F. - Proteinases in extracts of the storage mite , *Aleuroglyphus ovatus*. *J Allergy Clin Immunol* 90(1), 1992. (abstract)
- Elliston, W.L.; Heise, E.A.; Huntley, C.C. - Cell-mediated hypersensitivity to mite antigens in atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 118:26, 1982.
- Ehnert, B.; Lau, S.; Weber, A. et al - Reduction of mite allergen exposure and bronchial hyper-reactivity . *J Allergy Clin Immunol* 87:320, 1991.
- Floyer (1698), Apud Fletctmann 1980.
- Furumizo, R.T. - Laboratory observations on the life history and biology of the American house dust mite *Dermatophagoides farinae* (Acarina: Pyroglyphidae). *California Vector Views* 22,49-60, 1975.
- Gabriel, M.; Cunningham, W.G.L.; Allan, C.A.C. et al - Mite allergy in Hong Kong. *Clin Allergy* 12:157, 1982.
- Gell, P.G.H. & Coombs, R.R.A. - *Clinical Aspects of Immunology* , (3rd ed.) Oxford: Blackwell, 1977.
- Gluber, U. & Hoffman, B.J. - A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-9, 1983.
- Greco, D.B.; Moreira, N.S.; Greco, J.B. et al - Demonstração da presença de ácaros em pó domiciliar de Belo Horizonte e outras cidades de Minas Gerais. *Temas Livres. Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia*, 14, Recife, 1974.

- Haida, M.; Okudaira, M.D. ; Miyamoto, T. - Allergens of the house dust mite *Dermatophagoides farinae*:Immunochemical studies of four allergenic fractions. *J. Allergy Clin. Immunol*, 75:6 686-92,1985.
- Harfast, B.; Van Hage-Hamsten, M.; Ansotegui, I.J.; Johansson, E.; Jeddi-Tehrani, M.; Johansson, S.G.O. - Monoclonal antibodies to *Lepidoglyphus destructor*: Delineation of crossreactivity between storage mites and house dust mites. *Clin Exp Allergy* 22(11), 1992.
- Hartree, E.F. - Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. *Anal. Biochem* 48, 422-27,1972 .
- Heymann, P.W.; Chapman, M.D.; Aalberse, R.C.; Fox, J.W.; Platts-Mills, T.A.E. - Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der fII and Der pII) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). *J Allergy Clin Immunol* 83: 1055-67, 1989.
- Ino, Y.; Ando, T.; Haida, M.; Nakamura, K.; Iwaki, M.; Okudaira, H.; Miyamoto, T. - Characterization of the Proteases in the Crude Mite Extract. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 89:321-26, 1989.
- Ishizaka, K.; Ishizaka, T.; Hornbrook, M.M. - Phsicochemical properties of human reaginic antibody . I . Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 97:75, 1966 a.
- Ishizaka, K.; Ishizaka, T.; Hornbrook, M.M. - Phsicochemical properties of reaginic antibody. II .Correlation of reaginic activity with g E globulin antibody. *J Immunol* 97:840, 1966 b.
- Ishizaka, K.; Ishizaka, T.; Hornbrook, M.M. - Allergen-binding activity of g E , g G and g A antibodies in sera from atopic patients: in vitro measurements of reaginic antibody. *J Immunol* 98:490,1967.
- Jorge Neto, J.; Croce, J.; Baggio, D. - Ácaros da poeira domiciliar em habitações na cidade de São Paulo, *Rev. Bras. Alerg. e Imunopatologia* 2(3):140,1980 .

- Jorge Neto, J. : Contribuição ao estudo da fauna acarina da poeira domiciliar em habitações na cidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1984.
- Laemmli, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T . *Nature* 277:680, 1970.
- Levine, B.B. & Vaz, N.M. - Effect of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse: a potential model for immune aspects of human atopic allergy. *Int Arch Allergy* 39:156, 1970.
- Lind, P. & Lowenstein, H. - Identification of allergens in *Dermatophagoides pteronyssinus* mite body extract by crossed radioimmuno-electrophoresis with two different antibody pools . *Scand J Immunol* 17:263-73, 1983.
- Lind, P.; Week, B.; Lowenstein, H. - A reference allergen preparation of the house dust mite *D. pteronyssinus*, produce from whole mite culture. A part of the DAS 76 study. Comparison with allergen preparations from other raw materials. *Allergy* 39:259-74, 1984.
- Lind, P. - Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 76: 753-761, 1985.
- Lind, P. - Demonstration of close physicochemical similarity and partial immunochemical identity between the major allergen Dp42, of the house dust mite *D. pteronyssinus* and corresponding antigens of *D. farinae* (Df6) and *D. microceras* (Dm6). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 79:60-5, 1986.
- Llerena, L.P.; Fernandez-Caldas, E.; Gracia, L.R.C.; Lockey, R.F. - Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides* spp-allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 88:943-50, 1991.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. - *J Biol Chem* 193:265, 1951.

- Luczynska, C.M.; Griffin, P.; Davies, R.J.; Topping, M.D. - Prevalence of specific IgE to storage mites (*A.siro*, *L. destructor* and *T. longior*) in urban population and crossreactivity with the house dust mite(*D. pteronyssinus*). Clin Exp Allergy 20(4), 1990.
- Macintyre, D. & Boyd, G. - Site of airflow obstruction in immediate and late reactions to bronchial challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus*. Clin Allergy 13:213, 1983.
- Marsh, D.G.; Hsu, S.H.; Hussain, R. et al - Genetics of human immune response to allergens. J Allergy Clin Immunol 65:322,1980.
- Maunder, J.W. - Atopic dermatites: A problem in applied entomology. Skin Forum 3, 38-40, 1984.
- Maunsell, K.; Wraith, D.G.; Cunnington, A.M. - Mites and house dust allergy in bronchial asthma. Lancet 1:1267, 1968.
- Merrett, T.G.; Merrett, J.; Cookson, J.B. - Measurament of total and specific IgE levels in urban and rural communities in Rhodesia. Clinn Allergy 6 (2) 131-4, 1976.
- Miyamoto, T.; Oshima, S.; Ishizaki, T.; Sano, S. - Allergenic identity between the common floor mite (*Dermatophagoides farinae*, Hughes 1961) and house dust as a causative agent in bronchial asthma. J Allergy 42: 14-28, 1968.
- Miyamoto, T.; Oshima, S.; Ishizaki, T. - Antigenic realation between house dust and a house dust mite, *Dermatophagoides farinae* by a fractionation method. J. Allergy ,44:282,1969
- Mitchell, E.B.; Crow, J.; Chapman, M.D. et al - Basophils in allergen-induced patch-test sites in atopic dermatitis. Lancet 1:127, 1982.
- Mori, J.C.; Baggio, D.; Mello, J.F. et al - *Aleuroglyphus ovatus* : Importancia antigenica.Temas Livres. Rev Bras Alerg Imunop atol 15 (5), 1992.

- Mori, J.C.; Ambrozio, L.C.; Mello, J.F. et al - *Blomia tropicalis*: Reavaliação da reatividade das provas cutaneas de leitura imediata. Temas Livres. Rev Bras Alerg Immunopatol 15 (5) , 1992.
- Pauli, G.; Berret, J.C.; Hirth, C.; Thiorey, R.- Dissociation of house dust allergens . A comparison between skin tests, inhalations tests, specific IgE and basophil histamine release measurements. J Allergy Clin Immunol 63 (4) 52, 1979
- Parronchi, P.; De Carli, M.; Manetti, R.; Romagnani, S. et al - IL-4 and IFNs exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by TH1 or TH2 human T cell clones. J Immunol, in press, 1992.
- Pelikan, Z., DeVries, K. - Comparison of nasal mucosa response on challenge of house dust and mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. Acta Allergol 27:167, 1972.
- Pepys, J. - Skin testing. Br. J. Hosp. Med. 14:412, 1975
- Pinho Jr, A.J.; Mello, J.F. ; Baggio, D. et al - Analise da reatividade cutânea imediata aos Ácaros da Poeira Domiciliar. Temas Livres. I. Rev. Bras. Alerg. e Immunopatol 13(4):153, 1990a.
- Pinho Jr, A.J. ; Giosa, J.T.; Vasconcelos, D.M.; Pereira, C.A.; Mello, J.F.; Ambrozio, L.C.; Baggio, D. - Provocação Bronquica Específica com Extratos de Ácaros da Poeira Domiciliar. Temas Livres. II. Rev Bras Alerg Immunopatol 13(4):141, 1990b.
- Pinho Jr, A.J.; Lazzarini, S. ; Leão, R.W.; Ambrozio, L.C.; Baggio, D.; Zollner, R.L. - Prevalência de Sensibilização a Ácaros da Poeira Domestica em pacientes atópicos, na Região de Campinas , São Paulo. Temas Livres. Rev Bras Alerg e Immunopatol 15(5): 82, 1992

- Pinho Jr, A. J.; Ambrozio, L.C.; Baggio, D.; Zollner, R.L.- Partial Purification of allergenic fractions in the storage mite *Aleuroglyphus ovatus*. (Abstract). *J Allergy Clin Immunol* 93(1): 189, 1994.
- Platts-Mills, T.A.E.; Mitchell, E.B.; Nock, P. et al - Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. *Lancet* 2,8300, 1982.
- Platts-Mills, T.A.E. - Dust mite allergens and asthma: A worldwide problem. *J. Allergy Clin Immunol* 83(2): 416-27, 1989 .
- Platts-Mills, T.A.E. - Dust mite allergens and asthma: Report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 89(5): 1046, 1992.
- Kern, R.A. - Dust sensitization in bronchial asthma. *Med. Clin. N. Amer*, 5:751, 1921.
- Kniest, F.M.; Young, E.; Van Bronswijk, J.E.M.H. et al - Clinical evaluation of double-blind dust-mite avoidance trial with mite-allergic rhinitic patients. *Clin Exp Allergy* 21:39-47, 1991.
- Korsgaard, J. - Mite asthma and residency: a case-control study on the impact of exposure to house dust mites in dwellings. *Am Rev Respir Dis* 128:231-5, 1983.
- Rosa, A.E. & Flechtmann, C.H.W. - Mites in house dust from Brazil. *Int J Acarol* 5 : 195-8, 1979.
- Rosario, N. - Sensibilização ao ácaro tropical *Blomia*. *Temas Livres. Rev Bras Immunop* 15 (5), 1992.
- Sanda, T.; Yasue, T.; Ohashi, M.; Yasue, A.- Effectiveness of dust-mite allergen avoidance through clean room therapy in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 89 (3):653, 1992.

- Saint-Georges-Grèdelet, D. de - Mise au point d'une stratégie de contrôle de L'acarien des poussières (*Dermatophagoides pteronyssinus*) par utilisation d'un fongicide. *Acta Oecol/Oecol Appl* 2, 117-126, 1981.
- Sarsfield, J.K.; Gowland, G.; Toy, R. et al - Mite sensitive asthma of childhood: trial of avoidance measures. *Arch Dis Child* 49:711, 1974.
- Schwartz, M. - Heredity in bronchial asthma. *Acta Allergologica* 5 (suppl .2), 1952
- Scott, F.A. & Melvin, E.H. - Determination of Dextran with Antrone. *Anal Chem*, 25:1656, 1953.
- Silton, R.P.; Fernandez-Caldas, E.; Trudeau, W.L.; Swanson, M.C.; Lockey, R.F. - Prevalence of specific IgE to the storage mite, *Aleuroglyphus ovatus*. *J Allergy Clin Immunol* 88(4) , 1991
- Smith, J.M.; Montgomery, J.; Knowler, L.A. - Epidemiology of asthma and allergic rhinitis. I. In a rural area. II. In a university-centered community. *Am Rev Respir Dis* 92:16-31, 1965.
- Spivacke, C.A. & Grove, E.F. - Studies in hypersensitiveness XIV: a study of the atopen in house dust. *J Immunol* 10:465, 1925.
- Stewart, G.A.; Thompson, P.J.; Simpson, R.J. - Protease antigens from house dust mite. *Lancet* 2:154, 1989 (letter).
- Stewart, G.A.; Lake, F.R.; Thompson, P.J. - Faecally derived hydrolytic enzymes from *Dermatophagoides pteronyssinus*: Physicochemical Characterisation of potential allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 95:248-256, 1991.
- Strauss, A.; Leão, R.; Ambrozio, L.C.; Baggio, D. - *Blomia tropicalis*: Importância antigênica comparável ao *Dermatophagoides* ssp. em São Paulo Brasil ?. *Temas Livres. Rev Bras Alerg Imunopatol* 13(4) : 141, 1990.

- Stott, D.I. - Immunoblotting and dot blotting. *Journal of Immunological Methods* 119,153-87,1989
- Tamura, H.; Mochizuki, H.; Shigeta, M.; Arakawa, H.; Kuroume, T. - Studies from *Dermatophagoides farinae*: Partial Purification and Haptenic Properties of Dialyzates from *Dermatophagoides farinae*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 96:322-330, 1991.
- Tovey, E.R. et al- Mite populations in Sidney household bedding with particular reference to nursery sheepskins. *Med J Aust* 1(15):549, 1976.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. - Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocelulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9), 1979
- Trudinger, M.; Chua, K.Y.; Thomas, W.R. - cDNA encoding the major mite allergen Der fII. *Clin Exp Allergy* 21:33-7, 1991.
- Van Hage-Hamsten, M. ; Johansson, S.G.O. ; Johansson, E. - Lack of allergenic cross-reactivity between storage mites and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clinn. Allergy* 17,23-31,1987.
- Vannier, W.E. & Campbell, D.H. - A starch block electrophoresis study of aqueous house extracts. *J Allergy* 32:36, 1961.
- Vasconcelos, D.M.; Baggio, D.; Ambrozio, L.C.; Mello, J.F. - Avaliação da resposta imediata e tardia a ácaros domiciliares e de estocagem regionais. *Temas Livres. Rev Bras Alerg Imunopatol* 15 (5), 1992.
- Vaz, E.M.; Vaz, N.M.; Levine, B.B. - Persistent formation of reagins in mice injected with low doses of ovoalbumin. *Immunology* 21:11, 1971.
- Visscher, M.O.; Hanifin, J.M. et al - Atopic dermatitis and atopy in nonclinical populations. *Acta Derm Venereol* 144 (suppl):34,1989

- Voorhorst, R.; Spieksma-Boezeman, M.I.A. - Is a mite (*Dermatophagoides* sp.) the producer of house dust allergen ?. *Allergie U. Asthma*, 10:329-34,1964
- Voorhorst, R.; Spieksma, F.Th.M.; Varekamp, H. - The house dust mite(*Dermatophagoides pteronyssinus*) and allergens it producess: Identity with the house dust allergen. *J. Allergy*, 39:325-93,1967
- Waldman, T.A. - Disorders of immunoglobulin metabolism. *N Engl J Med* 281:1170, 1969.
- Warner, J.D. - Significance of late reactions after bronchial challenge with house dust mite. *Arch Dis Child* 51:905, 1976.
- Weiss, K.B.; Zimmerman, E.M. - Report of the NIAID Task Force on Immunology and Allergy, Washington, DC: National Institute of Health, 1990, US Dept of Helth and Human Services publication 91-2114.
- Wide, L. ; Bennich, H.; Johansson, S.G.O. - Diagnosis of alergy by an in vitro test for allergens antibodies. *Lancet* 2:1105, 1967.
- Wood, C.B.S. - How common is food allergy?. *Acta Paediatr Scand* 323(suppl):76, 1986.
- Zollner, R.L. ; Pinho Jr, A.J.; Vilela, C.A. ; Lazzarini, S. - Expressão de Isotipos IgE específicos a Ácaros Ambientais, em População atópica.Temas Livres. I. *Rev Bras Alerg e Imunopatol* 15(5): 81, 1992a.
- Zollner,R.L.; Pinho Jr, A.J.; Vilela, C.A.; Lazzarini, S. - Estudo do grau de sensibilização de poupulação atópica ao ácaro *Euroglyphus maynei*. Temas Livres. II. *Rev Bras Alerg e Imunopatol* 15(5): 81, 1992b.
- Zollner, R.L.; Pinho Jr,A.J.; Ambrozio, L.C.; Baggio, D.- Partial Purification of the allergenic fractions in the storage mite *Blomia tropicalis*. (Abstract). *J Allergy Clin Immunol* 93(1): 191, 1994.

SUMMARY

9: SUMMARY

The importance of the house dust mites in the sensitization of atopic patients, and as a trigger factor for the development of allergic diseases, has been well documented by several investigators. Most of these reports indicated the involvement of mites belonging to the genus *Pyroglyphidae* (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *farinae*). In Brazil, several studies have shown that mites known as "storage mites" and that belong to other genera (e.g., *Acarinae* and *Glyciphagidae*) also play an important role in the pathophysiology of such processes.

The objective of the present study was to identify and characterize the major allergens of two species of storage mites: *Aleuroglyphus ovatus* and *Blomia tropicalis*.

Using gel filtration in SEPHADEX G 100, we have demonstrated that *Aleuroglyphus* and *Blomia* contain distinguishable fractions, showing different Molecular Weights: A1 (100 kD), A2 (9 to 79 kD) , A3 (3.6 kD) for *Aleuroglyphus*; B1 (63 kD), B2 (8 to 30 kD), B3 (3.4 kD) for *Blomia*.

The Skin Prick-Test has established that A1 and A2 are the most important fractions for allergenic sensitization induced by *Aleuroglyphus* (both were positive in 74 % of patients tested). For *Blomia*, the most important fraction was B2 (positive in 70% of patients). Our results have also demonstrated that other fractions were less important for allergenic sensitization, namely: two fractions of low M.W, A3 and B3 (both positive in 22% of the patients).

Using SDS-PAGE and Immunoblot for IgE, we have confirmed that these mites are important for sensitization of atopic patients and the most important allergens presented M.W. of 150, 130, 100, 80 and 60 kD.

Our study has pointed out the importance of *Aleuroglyphus ovatus* and *Blomia tropicalis* for sensitization of atopic patients that have not undergone occupational exposure to storage mites. We conclude that these mites should not be classified as storage mites only, due to their role in the development of allergic disease at the house environment. Therefore, *Aleuroglyphus ovatus* and *Blomia tropicalis* should also be classified as house dust mites.