



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA -  
RENORBIO

**JUAN RICARDO URREGO ALVAREZ**

Obtenção, caracterização físico-química, imunológica e hipoalergização  
do alérgeno recombinante Blo t 2 visando o desenvolvimento de  
imunoterapia para alergia ao ácaro *Blomia tropicalis*

Salvador, BA

2017

**JUAN RICARDO URREGO ALVAREZ**

Obtenção, caracterização físico-química, imunológica e hipoalergização  
do alérgeno recombinante Blo t 2 visando o desenvolvimento de  
imunoterapia para alergia ao ácaro *Blomia tropicalis*

Trabalho de tese para o Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Federal da Bahia,  
como requisito final para obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Carina Silva Pinheiro.

Assessora externa: Prof<sup>a</sup>. Dra. Fatima Ferreira (University of  
Salzburg)

Salvador, BA

2017

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

UR81 Urrego Alvarez, Juan Ricardo  
Obtenção, caracterização físico-química, imunológica e hipoalergização do alérgeno recombinante Blo t 2 visando o desenvolvimento de imunoterapia para alergia ao ácaro *Blomia tropicalis* / Juan Ricardo Urrego Alvarez. -- Salvador, 2017.  
100 f. : il

Orientador: Neuza Maria Alcântara Neves.  
Coorientador: Carina Da Silva Pinheiro.  
Tese (Doutorado - Pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO) -  
- Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2017.

1. Alergia. 2. *Blomia tropicalis*. 3. Hipoalergeno. 4. Proteínas recombinantes. I. Alcântara Neves, Neuza Maria. II. Da Silva Pinheiro, Carina. III. Título.



## Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia - UFBA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Av. Reitor Miguel Calmon s/n – Vale do Canela  
40100-000, Salvador-BA



Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: [renorbioba@ufba.br](mailto:renorbioba@ufba.br)

### TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

**“Obtenção, caracterização físico-química, imunológica e hipoalergização do alérgeno recombinante Blo t 2 visando o desenvolvimento de imunoterapia para alergia ao ácaro *Blomiatropicalis*”**

Elaborada por:

**JUAN RICARDO URREGO ALVAREZ.**

Foi aprovado por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de

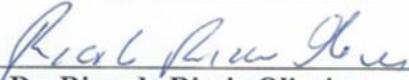
**DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA**

Salvador, Bahia, 20 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Neuza Maria Alcântara Neves** (Orientadora)  
Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ricardo Wagner Dias Portela**  
Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ricardo Riccio Oliveira**  
FIOCRUZ

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Marcia Cristina Aquino Teixeira**  
Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Leonardo Paiva Farias**  
FIOCRUZ

Dedico este trabalho à minha família: a meus pais Jose e Martha e irmão Jose Miguel, e a Velky que me apoiaram em cada passo que tomei nesta importante fase de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A meus pais, **JOSE** e **MARTHA**, e meu irmão **JOSE MIGUEL** por ter me dado os maiores presentes de todos, a vida e a educação, por ter me apoiado em cada um dos passos que tomei na minha vida, pela sua confiança, carinho e por que cada vez que necessite de motivo para não me render eles me deram mais de um.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. NEUZA M. ALCÂNTARA NEVES, Profa. CARINA SILVA PINHEIRO, Profa. FÁTIMA FERREIRA e Prof. LUIS PACHECO** não só pelas suas orientações se não por dar-me a grande oportunidade de formar parte da sua grande equipe de trabalho, por abrir-me as portas dos seus laboratórios.

A todos os membros do **Programa de RENORBIO** do Instituto de Ciências da Saúde, pelo apoio no decorrer do doutorado especialmente a secretaria **CLAUDIA**, porque sem o seu apoio não teria conseguido.

A meus amigos **LORENZ, EDUARDO, MARTIN** e **SARA** que me ajudarem muito na conclusão deste trabalho.

A **COLCIENCIAS** - Colômbia, pelo financiamento fornecido durante o período de duração do doutorado.

Aos meus amigos do LAA, **ALANA, ANA, EMÍLIA, GISELLA, FLÁVIA, FILIPE JOÃO, KELLY, LEONARDO<sup>2</sup>, MARCIA, MARINA, MARIA, SAMARA, E SARA** que chegaram a converter-se em minha segunda família. A **FABIAN** que foi desde muito antes de chegar e conhecer a ele pessoalmente um grande amigo, que me ajudou em mais de uma vez.

Aos meus amigos de Salzburg e Colômbia, **MARKUS, GALBER, OLIVIA, KARINE, ISABEL, e JOSE FERNANDO** pôr o seu apoio e amizade.

A **VELKY**, pôr o seu apoio incondicional e ter me ajudado a conseguir este sonho.

*Sobre esta bela experiência do doutorado, a minha ÍTACA...*

### **Ítaca.**

*Se partires um dia rumo a Ítaca,  
faz votos de que o caminho seja longo,  
repleto de aventuras, repleto de saber.*

*Nem Lestrigões nem os Ciclopes  
nem o colérico Posídon te intimidem;  
eles no teu caminho jamais encontrará  
se altivo for teu pensamento, se sutil  
emoção teu corpo e teu espírito tocar.*

*Nem Lestrigões nem os Ciclopes  
nem o bravio Posídon hás de ver,  
se tu mesmo não os levars dentro da alma,  
se tua alma não os puser diante de ti.*

*Faz votos de que o caminho seja longo.  
Numerosas serão as manhãs de verão  
nas quais, com que prazer, com que alegria,  
tu hás de entrar pela primeira vez um porto  
para correr as lojas dos fenícios  
e belas mercancias adquirir:  
madrepérolas, corais, âmbar, ébanos,  
e perfumes sensuais de toda a espécie,  
quanto houver de aromas deleitosos.  
A muitas cidades do Egito peregrina  
para aprender, para aprender dos doutos.*

*Tem todo o tempo Ítaca na mente.  
Estás predestinado a ali chegar.  
Mas não apresses a viagem nunca.  
Melhor muitos anos levars de jornada  
e fundeares na ilha velho enfim,  
rico de quanto ganhaste no caminho,  
sem esperar riquezas que Ítaca te desse.  
Uma bela viagem deu-te Ítaca.  
Sem ela não te ponhas a caminho.  
Mais do que isso não lhe cumpre dar-te.*

*Ítaca não te iludiu, se a achas pobre.  
Tu te tornaste sábio, um homem de experiência,  
e agora sabes o que significam **Ítacas**.*

**Konstantinos Kaváfis (1863-1933)**

**(Trad. José Paulo Paes)**

## RESUMO

**Introdução:** Nas últimas décadas a prevalência das doenças alérgicas tem aumentando notavelmente a nível mundial. Essas doenças são consideradas um problema de saúde pública devido a sua morbidade e altos custos para os cofres públicos. *Blomia tropicalis* é um ácaro da poeira causador de doenças alérgicas em regiões tropicais e subtropicais onde cerca de 55% a 93% dos pacientes alérgicos destas regiões estão sensibilizados contra o extrato total deste ácaro. Já foi evidenciado que alguns grupos de alérgenos apresentam importância clínica, contudo a relevância do grupo 2 dos alérgenos de *B. tropicalis* ainda está em debate. Até agora existem poucas informações sobre o Blo t 2 assim como sobre a sua reatividade cruzada com outros alérgenos de ácaros da poeira.

**Metodologia:** As sequências recombinantes de duas isoformas de rBlo t 2 (rBlot 2.2 e 2.5) e de um mutante hipoalergênico derivado deste antígeno foram harmonizadas, transformadas e expressas na cepa de *E. coli* SHuffle® T7. As proteínas foram purificadas em condições não desnaturantes, através de cromatografia de troca iônica e exclusão por tamanho no caso do mutante. A caracterização físico-química foi realizada utilizando dicroísmo circular (CD) e espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier (FTIR), assim como espectrometria de massa (sigla em inglês: MS). A alergenicidade foi determinada por *Immunoblot*, ELISA e ensaio de liberação de mediadores inflamatórios usando basófilos humanizados de rato (huRBL). A reatividade cruzada com o homólogo Der p 2 foi realizada utilizando ELISA de inibição

**Resultados:** Os antígenos rBlot 2.2 e 2.5 e o mutante foram expressos como proteínas solúveis e purificadas sem uso de cauda de histidina. O espectro de CD de rBlo t 2.2 e 2.5 foram típicos para proteínas com um conteúdo misturado de folha  $\beta$  e  $\alpha$ .hélices. A interpretação dos espectros FTIR revelou elementos de estrutura secundária, principalmente, na área correspondente as folhas  $\beta$ . Quase 54% (24/44) dos soros dos pacientes alérgicos à *B. tropicalis* continham anticorpos IgE anti - rBlo t 2 nativo e nenhum reagiu com o mutante hipoalergênico; foi também observado que o alérgeno nativo teve a capacidade de induzir a liberação do mediador inflamatório  $\beta$ -hexosaminidase, porém o mutante não demonstrou esta capacidade. Por outro lado, o rBlo t 2 mostrou baixa reatividade cruzada com Der p 2, determinado por ELISA de inibição.

**Conclusão:** Foram expressas, purificadas e caracterizadas com sucesso duas isoformas do alérgeno de *Blomia tropicalis* rBlo t 2, e um mutante hipoalergênico derivado desta molécula denominado de rBlo t 2\_8X. Além disso confirmamos que rBlo t 2 é um alérgeno importante, pois foi capaz de induzir sensibilização na população brasileira, podendo ser utilizado para diagnóstico e para o desenvolvimento de imunoterápicos.

**Palavras-chave:** *Blomia tropicalis*, Blo t 2, Alergia, Alérgeno recombinante, hipoalérgeno, imunoterapia.

## ABSTRACT

**Background:** In recent decades, the prevalence of allergic diseases has remarkably increased worldwide. Asthma is one of the most important diseases and is considered as a public health problem. *Blomia tropicalis* is a common house dust mite that is associated with allergic symptoms in tropical and subtropical regions. Around 55% to 93% of the allergic patients of these regions are sensitized against the total extract of this mite. However, the clinical importance of group 2 allergens from this acarid is still under debate. Until now only scarce information of Blo t 2 is available and its cross-reactivity with others group 2 allergens from house dust mites is unknown.

**Methods:** Two recombinants isoforms of Blo t 2 and a derivative mutant from it were codon-harmonized, transformed and expressed in the *E. coli* strain Shuffle T7. The proteins were purified under non-denaturing conditions via anion exchange chromatography and size-exclusion chromatography. Physico-chemical characterization was performed using circular dichroism (CD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) as well as mass spectrometry (MS). The allergenicity was determined by immunoblot, ELISA and mediator release assays using a humanized rat basophil leukemia (huRBL) cell line and cross-reactivity assay using inhibition ELISA.

**Results:** Both, the rBlo t 2 wild type and the mutant were expressed as soluble proteins in *E. coli*. The CD spectrum of rBlo t 2 was typical for proteins with a mixed  $\alpha/\beta$ -fold with elevated  $\beta$ -sheet content. Interpretation of the FTIR spectra revealed secondary structure elements mainly in the area corresponding to  $\beta$ -sheets. Almost 54 % (24/44) of Brazilian patients allergic to *Blomia tropicalis* reacted with rBlo t 2 and have the capacity to induce beta-hexosaminidase release in RBL cells. Furthermore, rBlo t 2 showed low cross-reactivity with rDer p 2 as determined by inhibition ELISA.

**Conclusion:** We successfully expressed, purified and characterized two isoforms of the allergen of *Blomia tropicalis* rBlo t 2, and a hypoallergenic mutant derived from this molecule, the rBlo t 2.8. In addition, we confirmed that rBlo t 2 is an important allergen

and induces sensitization in the Brazilian population, therefore it should be considered for the diagnosis and development of immunotherapy for *B. tropicalis* allergy.

**Keywords:** *Blomia tropicalis*, Blo t 2, Allergy, Allergen, Hipoallergen-derivative, Immunotherapy.

## Lista de ilustrações

Figura 1. Mecanismo de sensibilização alérgica das vias respiratórias.....	6
Figura 2. Fase inicial da inflamação das vias aéreas induzida pela segunda exposição ao alérgeno.....	7
Figura 3. Classificação taxonômica de <i>Blomia tropicalis</i> e outros ácaros importantes do ponto de vista clínico.....	9
Figura 4. Arvore filogenética dos alérgenos do grupo 2 de ácaros da poeira doméstica associados com doenças alérgicas e alinhamento das sequências entre alguns alérgenos do grupo 2 .....	15
Figura 5. Alinhamento das doze sequências de Blo t 2 reconhecidas no banco de dados do Uniprot.....	17
Figura 6. Conceitos para o desenho de moléculas hipoalérgicas recombinantes .....	22
Figura 7. Alinhamento dos peptídeos específicos na sequência de rBlo t 2.2 depois da digestão com tripsina do extrato de <i>Blomia tropicalis</i> .....	36
Figura 8. Predição teórica e experimental do peptídeo sinal de Blo t 2. ....	38
Figura 9. Reação em cadeia da polimerase (PCR) de colônias de <i>E. coli</i> Shuffle T7, transformadas com os plasmídeos pET30a clonados com as sequências dos genes Blo t 2.2 e Blo t 2.5.....	39
Figura 10. Expressão e pré-purificação do alérgeno Blo t 2.2 na cepa <i>E.coli</i> Shuffle T7 co-transformada com chaperonas pG-KJE8. ....	40
Figura 11. Purificação de rBlo t 2.2 utilizando cromatografia de troca iônica.....	41
Figura 12. Espectro de massa e composição relativa de aminoácidos de rBlo t 2.2 .....	43
Figura 13. Componentes de estrutura secundária do rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5.....	44
Figura 14. Expressão na cepa <i>E. coli</i> Shuffle T7 e purificação do alérgeno rBlo t 2.5.....	46
Figura 15. Espectro de massas e composição relativa de aminoácidos de rBlo t 2.5.....	47
Figura 16. Caracterização das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteínas de rBlo t 2. ....	48
Figura 17. Ensaio de degradação endo-lisossomal dos recombinantes de Blo t 2.2 e Blo t 2.5. ....	50
Figura 18. Immunoblotting de <i>Blomia tropicalis</i> e rBlo t 2.2 .....	51
Figura 19. Ensaio de ELISA usando soros de pacientes alérgicos a <i>Blomia tropicalis</i> . ....	52
Figura 20. Ensaio de ELISA comparando a reatividade IgE entre rBlo t 2.2 e rDer p 2.....	53
Figura 21. Ensaio de medição de degranulação de basófilos humanizados de rato (huRBL). ....	54
Figura 22. Análise da reatividade cruzada entre Blo t 2 e Der p 2.....	56

<i>Figura 23. Expressão e purificação do hipoalergênico de rBlo t 2 na cepa E.coli Shuffle T7.</i>	57
<i>Figura 24. Medição dos componentes de estrutura secundária do mutante de rBlo t 2 (rBlo t 2_8X).</i>	58
<i>Figura 25. Immunoblotting do antígeno hipoalergênico mutante rBlo t 2_8X.</i>	59
<i>Figura 26. Ensaio de ELISA e huRBL utilizando soros de pacientes alérgicos a Blomia tropicalis para avaliar a baixa reatividade IgE ao mutante rBlo t 2_8X.</i>	60

## **LISTA TABELAS**

<i>Tabela 1. Relação dos alérgenos recombinantes de <i>Blomia tropicalis</i> purificados e testados em pacientes alérgicos.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 2. Lista dos alérgenos recombinantes tipo selvagem de ácaros da poeira candidatos para imunoterapia.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 3. Lista dos alérgenos recombinantes modificados de ácaros, candidatos para imunoterapia.....</i>	<i>23</i>

## **Lista de ANEXOS**

<i>Anexo 1. Esquema de análise proteômica, desenho das sequências, clonagem, expressão, purificação e caracterização das duas isoformas de Blo t 2 .....</i>	<i>74</i>
<i>Anexo 2. Desenho esquemático do plasmídeo sintetizado pela empresa ATG:biosynthetics (Alemanha) com a sequência do cDNA Blo t 2.2 e Blo t 2.5 harmonizadas que possuem sítios de reconhecimento por enzimas de restrição.....</i>	<i>75</i>
<i>Anexo 3. Documento submissão da patente .....</i>	<i>77</i>

## LISTA DE ABREVIÇÕES

1. CD - Dicroísmo Circular
2. BCIP- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
3. LC-HPLC MS/MS - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa.
4. ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
5. DNA - deoxyribonucleic acid
6. FcεRI - Receptor I de Fc épsilon
7. FTIR - Fourier transform infrared spectroscopy
8. HPLC - High Performance Liquid Chromatography
9. IgA – Immunoglobulina A
10. IgE - Imunoglobulina E
11. IgG - Imunoglobulina G
12. IgG4 - Imunoglobulina G tipo 4
13. IL-10 - Interleucina 10
14. IL-13 - Interleucina 13
15. IL-17 - Interleucina 17
16. IL-4 - Interleucina 4
17. IL-5 - Interleucina 5
18. ISAAC: International Study of Asthma and Allergies in Childhood
19. IPTG - Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
20. kU/L – quilo unidades internacionais por litro
21. LTD-4 - Leucotrienos D-4
22. MHC II - Complexo maior de histocompatibilidade classe II (major histocompatibility complex class II)
23. NK - Células natural killer
24. NOD - *Nucleotide-binding oligomerization domain receptor*
25. NBT - Nitro blue tetrazolium
26. OD - Densidade ótica.
27. OMS - Organização Mundial da Saúde
28. PBS - Tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
29. PNPP - p-nitrofenil fosfato
30. PCR - Reação em cadeia da polimerase
31. SPT - Skin Prick Test (Testes de puntura cutânea)
32. TGF-β - Fator de crescimento transformante (*Transforming growth factor beta*)
33. Th - T helper
34. TLR - Receptores semelhantes a Toll
35. TNF-α - Fator de necroses tumoral alfa
36. Treg - Células T reguladoras
37. TBS -Tris-buffered saline (Buffer Tris-salino)
38. FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformação de Fourier
39. rBlo t 2\_8X – variante de Blo t 2.2 com 8 modificações de aminoácidos

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	4
2.1. Atopia e patogênese das doenças alérgicas.....	4
2.2. Alérgenos.....	7
2.3. Alergia aos ácaros da poeira.....	8
2.3.1. Ácaro da poeira doméstica <i>Blomia tropicalis</i> .....	8
2.3.2. Grupo 2 dos alérgenos de ácaros da poeira.....	15
2.4. Tratamento das doenças alérgicas.....	17
2.4.1. Imunoterapia das doenças alérgicas.....	18
2.4.1.1. Imunoterapia com moléculas alergênicas recombinantes.....	19
2.4.1.2. Imunoterapia com alérgenos recombinantes mutantes.....	21
3. Objetivos.....	24
3.1. Objetivo geral.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. Materiais e métodos.....	26
4.1. Análise proteômica de Blo t 2 presente no extrato de <i>B. tropicalis</i> .....	26
4.2. Desenho e síntese da sequência harmonizada do rBlo t 2.2. e rBlo t 2.5.....	26
4.3. Transformação, expressão e purificação dos rBlo t 2.2 e 2.5.....	27
4.4. Análise de aminoácidos do rBlo t 2.2. e rBlo t 2.5.....	28
4.5. Caracterização dos elementos de estrutura secundária de rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5... 28	
4.6. Ensaio de avaliação de degradação proteolítica de rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5 com microsomias isolados de células dendríticas JAWII.....	29
4.8. Immunoblotting para avaliação da reatividade de Blo t 2.2 em soros de pacientes alérgicos ao extrato total do ácaro <i>B. tropicalis</i> .....	30
4.9. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliação da reatividade dos antígenos recombinantes rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5 utilizando soros de pacientes alérgicos ao extrato total do ácaro <i>B. tropicalis</i> .....	30

4.10.	Teste da atividade biológica do rBlo t 2.2, rBlo t 2.5 e rDer p 2 – Ensaio de liberação de mediadores inflamatórios em basófilos humanizados de rato.....	31
4.11.	ELISA de inibição para avaliar a reatividade cruzada entre rBlo t 2 e Der p 2.....	31
4.12.	Desenho e síntese da sequência harmonizada do rBlo t 2_8X mutante.....	32
4.13.	Expressão e purificação do mutante rBlo t 2_8X.....	33
4.14.	Caracterização dos elementos de estrutura secundária do mutante rBlo t 2_8X	34
4.15.	Teste dos antígenos recombinantes selvagem e mutante quanto à reatividade para soros de pacientes alérgicos ao ácaro <i>B. tropicalis</i> utilizando Immunoblotting e ELISA.....	34
4.16.	Teste de Atividade biológica do mutante Blo t 2_8X.....	35
4.17.	Análise estatística.....	35
5.	RESULTADOS.....	36
5.1.	Análise proteômica de Blo t 2 presente no extrato de <i>B. tropicalis</i> e determinação do peptídeo sinal.....	36
5.2.	Transformação e seleção dos clones positivos de Blo t 2.2 e 2.5.....	39
5.3.	Expressão, purificação e caracterização físico-química de rBlo t 2.2.....	39
5.4.	Expressão, purificação e caracterização físico-química de rBlo t 2.5.....	44
5.5.	Caracterização das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteínas de rBlo t 2.....	48
5.6.	Ensaio de degradação proteolítica de rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5 com microssomas isolados de células dendríticas JAWII.....	50
5.7.	Immunoblotting para avaliação da reatividade de Blo t 2.2 em soros de pacientes alérgicos ao extrato total do ácaro <i>B. tropicalis</i> .....	51
5.9.	ELISA para avaliar a reatividade entre rBlo t 2 e Der p 2.....	53
5.10.	Ensaio de liberação de mediadores inflamatórios em basófilos humanizados de rato utilizando Blo t 2.2, Blo t 2.5 e Der p 2.....	53
5.11.	ELISA de inibição para avaliar a reatividade cruzada entre rBlo t 2 e Der p 2.....	55
5.12.	Expressão, purificação e caracterização físico-química do mutante rBlo t 2_8X.	57
5.13.	Caracterização imunológica do mutante rBlo t 2_8X.....	59
4.	Discussão.....	61
5.	Conclusão Geral.....	66
6.	Referências Bibliográficas.....	67

7. Anexos .....	74
-----------------	----

## 1. Introdução

As doenças alérgicas são um problema de saúde pública que interferem na qualidade de vida e podem ocasionar a morte dos pacientes (KING; KNIBB; HOURIHANE, 2009). De acordo com diversos trabalhos da literatura, as prevalências destas doenças vêm aumentando progressivamente nas últimas décadas, constituindo-se em uma verdadeira epidemia e representando um problema global de saúde pública (ISOLAURI *et al.*, 2004). Williams e colaboradores estimaram a ocorrência de mais de 200 milhões de casos de asma no mundo, e que 10 a 25% da população geral apresentava rinite e entre 5 a 20% das crianças de todo o mundo são afetadas por dermatite atópica (EDER; EGE; VON MUTIUS, 2006; WILLIAMS *et al.*, 1999). No Brasil, as doenças alérgicas estão em plena ascensão, na medida em que estão diminuindo as doenças infecciosas cujos efeitos imunomoduladores sobre atopia e alergia são conhecidos (ALCANTARA-NEVES *et al.*, 2012; ARAUJO *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2008; VEIGA *et al.*, 2011).

Asher e Weiland, nas primeiras fases do estudo do grupo ISAAC, encontraram altas prevalências de doenças alérgicas em países ocidentais desenvolvidos de língua inglesa (ASHER; WEILAND, 1998). Outros estudos do ISAAC, realizados em capitais de estados do Brasil e de países da América do Sul, demonstraram que as taxas de prevalência de alergia são também altas nessas cidades, apesar de serem cidades de países em desenvolvimento, sendo Salvador uma das cidades com maior prevalência de alergias no mundo (SOLÉ *et al.*, 2010). Em um trabalho desenvolvido por nosso grupo foram encontradas taxas de prevalência de alergias respiratórias de 32,4 % em adultos de classe baixa, e 44,6% em adultos de classe média alta nesta cidade (BAQUEIRO *et al.*, 2007). Em crianças de classe baixa foi encontrada prevalência de 22,5 % de asma (SOUZA DA CUNHA *et al.*, 2010).

O tratamento para este tipo de doença é muito difícil, sendo considerado um desafio médico. A maioria dos tratamentos convencionais é do tipo farmacológico o qual é utilizado para o controle dos sintomas, sem atuar diretamente na causa da doença. No entanto, em 1911, Noon e Freeman desenvolveram uma forma diferente de tratamento destas doenças conhecido como imunoterapia, o qual é o único

tratamento que pode modificar o curso natural da doença com alguma eficácia (LOON, 1911).

A imunoterapia consiste na administração de doses repetidas de um alérgeno (ou extrato alergênico) a um paciente alérgico a fim de induzir uma resposta imunológica tolerogênica, e uma consequente melhoria da sintomatologia (BOUSQUET *et al.*, 1998). Os mecanismos de ação da imunoterapia ainda precisam ser melhor esclarecidos, mas acredita-se que acontece uma modulação da resposta imune do paciente, modificando o perfil predominante Th2 para uma resposta do tipo reguladora com indução das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$ . A IL-10 induz uma mudança de isotipo de IgE para IgG4, que atua como anticorpo bloqueador da IgE, enquanto que TGF- $\beta$  aumenta os níveis de IgA. Um esquema de imunoterapia com sucesso é caracterizado pela diminuição dos níveis de IgE além da produção aumentada de IgG4 (CASALE; STOKES, 2011).

Atualmente, a maioria dos métodos de diagnóstico e esquemas de imunoterapia para as doenças alérgicas são realizados com o extrato proteico total. Entretanto, os extratos alergênicos podem ser de qualidade duvidosa e não ter os alérgenos relevantes para a população de interesse em concentrações eficazes além de conter muitas moléculas irrelevantes.

Recentemente com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível a produção de alérgenos recombinantes que podem resolver alguns desses problemas, pois apresentam a vantagem da produção de moléculas totalmente caracterizadas em termos de propriedades físicas, químicas e imunológicas. Além disso, a tecnologia do DNA recombinante possibilitou a produção de alérgenos mutantes, com variações ou ausências de alguns aminoácidos na estrutura primária, diferenciando-os do alérgeno nativo e diminuindo sua alergenicidade, sendo denominados hipoalergênicos (CHEN *et al.*, 2012). Esta é uma abordagem promissora para a produção de vacinas e imunoterápicos, usando as sequências mais relevantes dos antígenos nativos principais é tornando-os recombinantes e hipoalérgenos (FERREIRA *et al.*, 2006).

A produção de alérgenos no Brasil ainda é precária quanto a qualidade e a ausência de padronização. Taketomi e colaboradores, ao testarem diversas preparações de extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*, produzidos em diferentes empresas do Brasil, detectaram que em algumas delas o conteúdo proteico era baixo ou ausente e que o antígeno maior deste ácaro o Der p 1 estava ausente da maioria das preparações testadas (TAKETOMI *et al.*, 2011). Por isto, muitos médicos e clínicas de renome do Brasil utilizam alérgenos importados, cujos preços são proibitivos para populações de baixa renda.

O laboratório de Alergologia e Acarologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, já deu este importante passo, produzindo extratos proteicos de várias fontes alergênicas e obtendo dois alérgenos recombinantes do ácaro da poeira *B. tropicalis* (Blo t 5 e Blo t 21) à partir de uma biblioteca de cDNA complementar (CARVALHO *et al.*, 2013).

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Atopia e patogênese das doenças alérgicas

As doenças alérgicas são cada vez mais prevalentes na maioria dos países, em especial nos desenvolvidos (PAWANKAR *et al.*, 2014); é provável que esse aumento esteja mais relacionado com as mudanças ambientais ou do estilo de vida, que por alterações no perfil genético dos indivíduos (DEVEREUX; BARKER; SEATON, 2002). Estas doenças incluem a rinite alérgica (conhecida como febre do feno), a dermatite atópica (conhecida como eczema), a asma alérgica e também as alergias alimentares. Além disso, algumas pessoas podem desenvolver uma potente reação alérgica sistêmica, denominada anafilaxia, que pode levar o indivíduo à morte em segundos ou minutos depois da exposição (KAY, 2001).

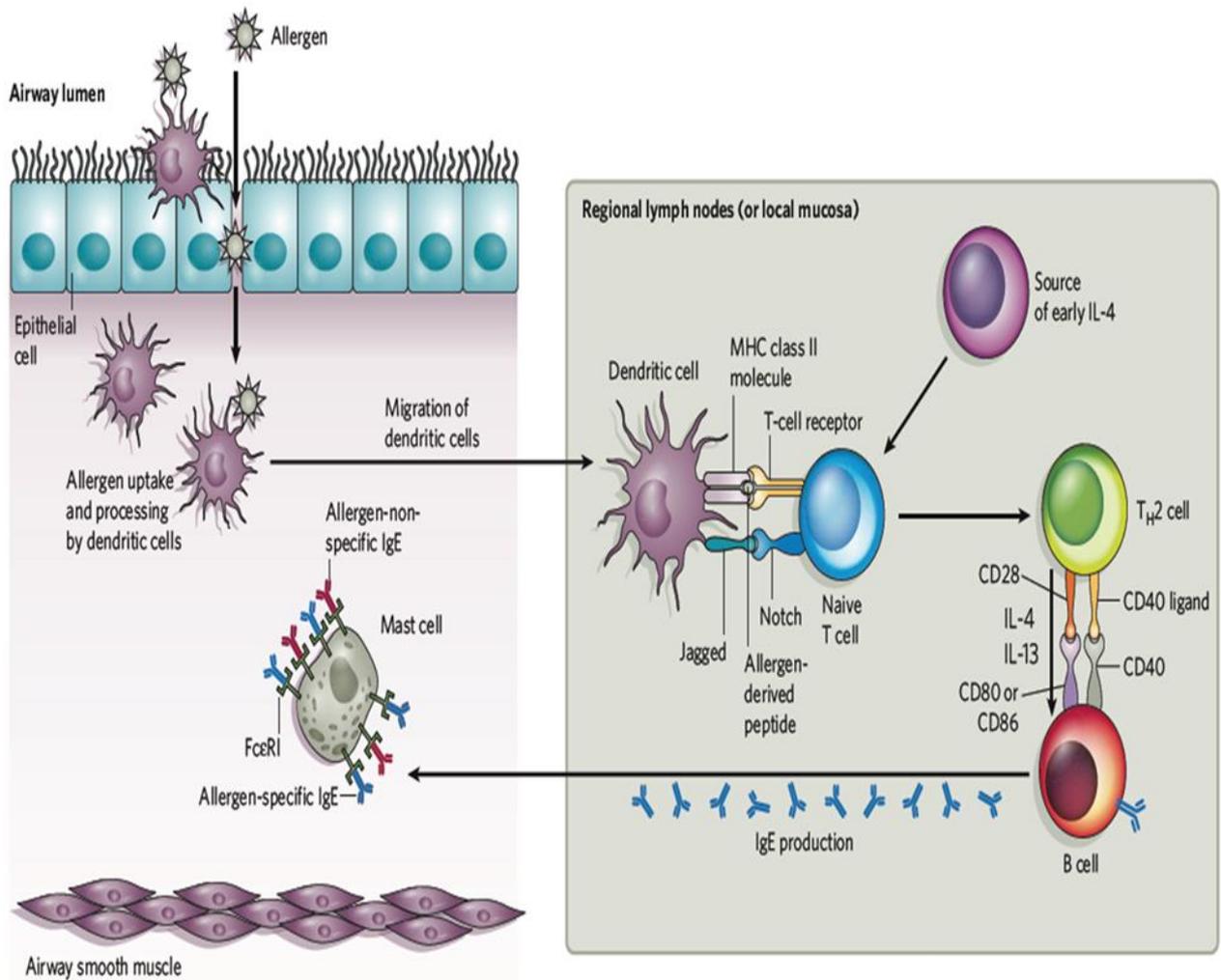
O termo "alergia" foi cunhado por Clemens von Pirquet em 1906 para chamar a atenção para a propensão atípica de alguns indivíduos a desenvolver sinais e sintomas da reatividade, ou as "reações de hipersensibilidade", quando são expostos à certas substâncias. As doenças alérgicas também são conhecidas como atópicas ou desordens atópicas, palavra que vem do grego *Atopos* e significa "fora de lugar" (SILVERSTEIN, 2000). Sabemos nos dias atuais que estas doenças estão relacionadas com uma elevada produção de IgE, e com a expansão de populações de células Th2 específicas contra os alérgenos, os quais normalmente são substâncias inofensivas e não representam perigo a pessoas não susceptíveis (não atópicas).

Todos os indivíduos inalam alérgenos derivados de várias fontes, como: o pólen, ácaros da poeira, epitélio de cães e gatos, dentre outros. Em geral, os adultos e crianças não atópicos tem uma resposta imunológica de baixo grau contra essas substâncias, e produzem anticorpos específicos ao alérgeno do tipo IgG1 e IgG4. No entanto, como já foi mencionado, as pessoas com atopia tem uma resposta exagerada caracterizada pela produção de anticorpos IgE específicos para os alérgenos, além de ter elevados níveis séricos do anticorpo e reações positivas no contato com os extratos em provas cutâneas (skin prick test - SPT). No entanto, existem exceções a

esta regra, e ainda muitos mecanismos moleculares subjacentes deste fenômeno precisam ser esclarecidos (KAY, 2001).

De uma forma breve, a imunopatogênese das doenças alérgicas tem início quando um indivíduo susceptível se expõe pela primeira vez ao alérgeno via mucosa oral ou respiratória. Dessa maneira, o antígeno é captado e fagocitado por células apresentadoras de antígenos (células dendríticas), que o processa e apresenta às células T CD4<sup>+</sup> Th0 (células *naive*) específicas para o alérgeno; logo depois, as células T mudam para um perfil Th2 secretando citocinas, tais como a IL-4, IL-5 e IL-13 e entram em contato com os linfócitos B produtores de anticorpos e induz a mudança de isotipo para IgE. Estes anticorpos se ligam aos receptores de alta afinidade da IgE (FcεRI) e de baixa afinidade (FcεRIII) dos mastócitos, basófilos e eosinófilos (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008)(Figura 1) causando a degranulação destas células.

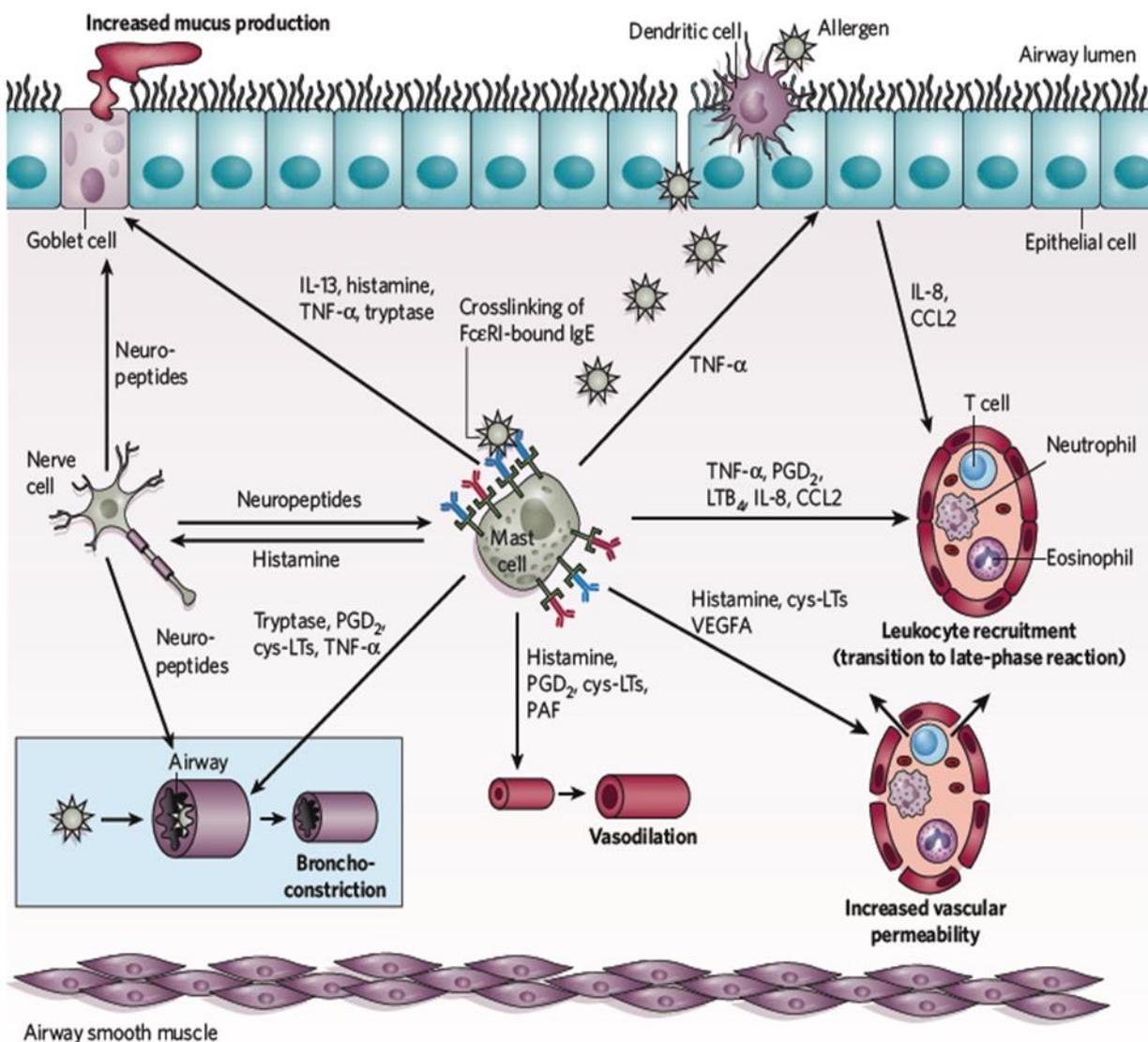
## Figura 1. Mecanismo de sensibilização alérgica das vias respiratórias



Fonte: (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008)

Após repetidas exposições ao alérgeno, este se liga aos anticorpos IgE fixos nas células efectoras iniciando a degranulação, levando-as à liberação de moléculas pró-inflamatórias como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, proteases e citocinas pró-inflamatórias. Estas moléculas causam uma variedade de sintomas, dependendo da parte do corpo onde forem liberadas, por exemplo, na pele e mucosa (eczema, urticaria, angioedema), trato gastrointestinal (náusea, vômito e dor abdominal junto com diarreia), no aparelho respiratório (rinite, tosse, sibilância e asma) e sistêmica (anafilaxia) (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008)(Figura 2).

**Figura 2. Fase inicial da inflamação das vias aéreas induzida pela segunda exposição ao alérgeno**



Fonte: (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008)

## 2.2. Alérgenos

Os alérgenos são moléculas de origem em geral proteica que têm diversas funções fisiológicas e bioquímicas na fonte alergênica onde são expressas. Geralmente estão envolvidos na defesa contra microrganismos e parasitos, transporte e armazenamento de lipídios e açúcares, e também na mobilidade ou movimento do organismo (RADAUER, CHRISTIAN *et al.*, 2008). Na clínica, a principal característica das

moléculas alergênicas é a capacidade de induzir a produção de IgE e provocar uma resposta inflamatória do perfil Th2, em indivíduos susceptíveis. No entanto, ainda não está claro a causa deste fenômeno, que evolutivamente parece ter iniciado em resposta à infecção por parasitos como os helmintos (BANNON, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde e a União Internacional de Sociedades de Imunologia e Alérgenos e a Subcomissão de Nomenclatura (allergen.org), um antígeno é declarado como alérgeno quando provoca uma resposta de IgE específica em vários indivíduos de uma população. Os alérgenos são nomeados de acordo com os seres vivos de onde eles são obtidos e de acordo com a ordem em que eles são caracterizados. Assim, o nome de cada alérgeno contém as 3 primeiras letras do gênero, a primeira letra das espécies e um número que representa a ordem na qual foi descoberto, por exemplo; o Der p 2 (é um alérgeno de *Dermatophagoides pteronyssinus*, ácaro da poeira). Às vezes um alérgeno pode ter duas ou mais isoformas, portanto, um número adicional indicando a isoforma lhe é atribuído (RADAUER, C. *et al.*, 2014).

### **2.3. Alergia aos ácaros da poeira**

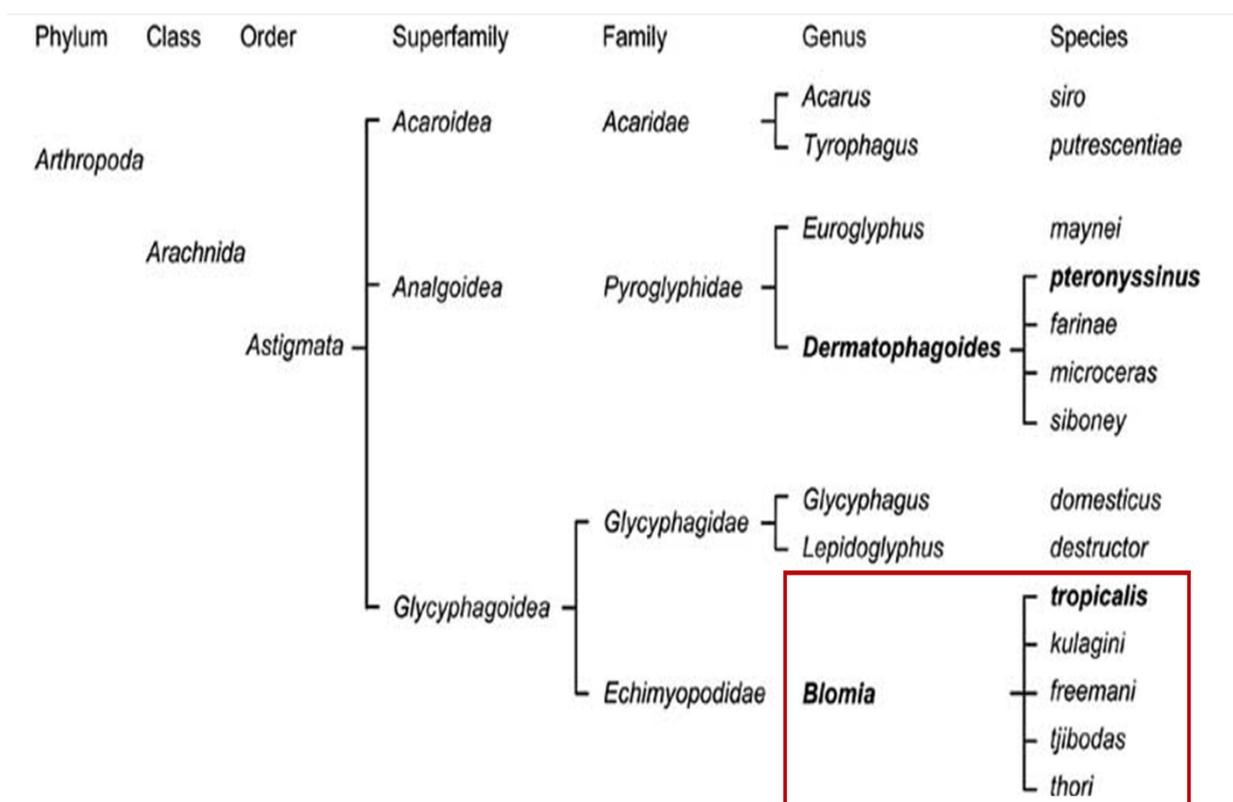
Os ácaros da poeira doméstica são os organismos alergizantes de maior importância clínica mundialmente, mais de 50% dos pacientes alérgicos no mundo sofrem de alergias causadas pelos ácaros. O principal ácaro reconhecido mundialmente é o *Dermatophagoides pteronyssinus*. Além deste, podemos destacar o *Dermatophagoides farinae* nas regiões de clima temperado, e o *Blomia tropicalis* nas regiões de clima tropical e sub-tropical (SADE; ROITMAN; KIVITY, 2010). Em um trabalho realizado por nosso grupo detectamos o *B. tropicalis* como o ácaro mais frequente em poeira, bem como um dos maiores agentes alergizantes (65.0%) em indivíduos com asma ou rinite de Salvador-Bahia (BAQUEIRO *et al.*, 2006)(BAQUEIRO *et al.*, 2007).

#### **2.3.1. Ácaro da poeira doméstica *Blomia tropicalis***

*B. tropicalis* é uma espécie de ácaro da poeira doméstica que está associado a sintomas alérgicos em regiões tropicais e subtropicais, onde cerca de 55% até 93% dos pacientes alérgicos estão sensibilizados contra o extrato total deste ácaro (ARLIAN; VYSZENSKI-MOHER; FERNANDEZ-CALDAS, 1993; SADE; ROITMAN; KIVITY, 2010; STANALAND *et al.*, 1994; TSAI *et al.*, 1998).

Os ácaros do gênero *Blomia* pertencem a família Glycyphagidae, e embora tenham uma semelhança taxonômica com outros ácaros importantes, e do ponto de vista clínico com os *Dermatophagoides* spp. eles são organismos muito diferentes (Figura 3). De fato, as sequências de aminoácidos das proteínas homólogas de ambos ácaros, compartilham em média cerca de 40% de identidade, a qual é considerada como relativamente baixa (FERNÁNDEZ-CALDAS; LOCKEY, 2004).

**Figura 3. Classificação taxonômica de *Blomia tropicalis* e outros ácaros importantes do ponto de vista clínico**



Fonte: (CHUA *et al.*, 2007)

A bifurcação taxonômica nítida das espécies *Blomia spp.* e *Dermatophagoides spp.* das superfamílias de *Glycyphagoidea* e *Analgoidea*, respectivamente contraria à crença da clínica básica nos países tropicais, de que os organismos não são diferentes. Ambos ácaros, *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* coexistem nas regiões tropicais e subtropicais. Portanto, na clínica e em pesquisa é comum observar uma dupla sensibilização de indivíduos aos alérgenos de ambas espécies entre indivíduos atópicos nessas regiões (CHEW *et al.*, 1999; TSAI *et al.*, 1998).

Alguns estudos mostraram que há mais de 20 bandas de ligação à IgE no extrato total de *B. tropicalis*, e varias destas bandas ainda não foram caracterizadas. No entanto, com o auxílio das tecnologias de proteoma e de DNA recombinante, diversos alérgenos de *B. tropicalis* e outros ácaros foram identificados, clonados, expressados e caracterizados a nível molecular (Tabela 1). Nos últimos anos, a combinação de técnicas celulares, moleculares e imunológicas têm desempenhado um papel significativo no sentido de melhorar a compreensão dos imunobiológicos derivados de alérgenos de ácaros e seus papéis nas doenças alérgicas (CHUA *et al.*, 2007).

**Tabela 1. Relação dos alérgenos recombinantes de *Blomia tropicalis* purificados e testados em pacientes alérgicos**

Alérgeno	Família da proteína	Homologia com alérgenos Der p	Ano	País	Pacientes	Reatividade IgE	Ensaio	Referência	Microrganismo utilizado	Vetor de expressão utilizado	Método de Purificação
rBlo t 1	Família da Peptidase C 1	Der p 1: 53 %	2003	Malásia	40 adultos/40 criança	65%/90%	ELISA	Allergy 2003: 58:912–920	1), <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ . Cepa de levedura GS115	pPIC9	O proBlo t 1 recombinante foi isolado por Cromatografia de afinidade com o anticorpo mAb 4C1 Anti-Der p 1
			2003	Puerto Rico	21	62%	Western Blot	Clin Exp Allergy. 2003; 33:28-34	<i>E.coli</i> XL1-Blue (Stratagene)	pDS56/RBSII-E/6XHis-Eco (pDS56)	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de super-fluxo Ni-NTA (Qiagen Inc.)
rBlo t 2	Domínio proteico de ligação aos lipídeos MD-2	Der p 2: 42 %	2010	Singapura	253	19%	Imuno dot blot	Pediatric Allergy and Immunology 22 (2011) 202–210	(Não há dados)	(Não há dados)	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de Ni e Cromatografia de exclusão de tamanho de alta resolução.
rBlo t 3	Protease tipo tripsina	Der p 3: 41 %	2003	Singapura	45	51%	ELISA	Allergy 2003: 58: 352–356	<i>E.coli</i> BL21	pGEX4T-1	A proteína de fusão GST-Blo t3 foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando glutationa-sepharose 4B
rBlo t 4	Glicosil hidrolase da família 13	Der p 4: 68 %	2008	Singapura	45	4%	SPT	Int Arch Allergy Immunol 2009;149:25–32	<i>P. pastoris</i>	pPIC9	(Não há dados)
			2008	China	33	28%	SPT	Int Arch Allergy Immunol 2009;149:25–32	<i>P. pastoris</i>	pPIC9	(Não há dados)
			2010	Singapura	30 (Asma)	53%	ELISA	Pediatr Allergy Immunol 2010: 21: e718–e722	<i>P. pastoris</i>	pPIC9	(Não há dados)
			2010	Singapura	30 (Eczema)	63%	ELISA	Pediatr Allergy Immunol 2010: 21: e718–e722	<i>P. pastoris</i>	pPIC9	(Não há dados)

. Fonte. Autoria própria

Continuação tabela 1.

Alérgeno	Família da proteína	Homologia com alérgenos Der p	Ano	País	Pacientes	Reatividade IgE	Ensaio	Referência	Microrganismo utilizado	Vetor de expressão utilizado	Método de Purificação
rBlo t 5	Família do Grupo 5 dos ácaros da poeira	Der p 5: 40 %	1996	Colômbia	100	47%	Western Blot	J Allergy Clin Immunol. 1996 Sep;98(3):573-9.	<i>E. coli</i> XL1-Blue	pBlueScript	(Não há dados)
			2007	Colômbia	109	42%	RAST	Allergy Clin Immunol Int – J World Allergy Org 2007; 19:233–238	<i>E. coli</i> BL21	pGEX-4T-3	A expressão de BtM foi como uma proteína de fusão com glutathione S-transferase (GST-BtM)
			2003	Taiwan	146	91.8%	ELISA	J Allergy Clin Immunol. 2003 Mar;111(3):603-9.	<i>P. pastoris</i>	(Não há dados)	(Não há dados)
			2003	Malásia	49	73.5%	ELISA	J Allergy Clin Immunol. 2003 Mar;111(3):603-9.	<i>P. pastoris</i>	(Não há dados)	(Não há dados)
			2003	Taiwan	80	43%	RAST	Ann Allergy Asthma Immunol. 2003 Nov;91(5):485-9.	<i>E. coli</i>	(Não há dados)	(Não há dados)
			2013	Brasil	35 crianças/28 adultos	82.9%/92.8%	ELISA	BMC Immunol. 2013 Feb 27;14:11.	<i>E. coli</i> BL21	pRSET	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de Ni
			2010	Singapura	30 (Asma)	96.7%	ELISA	Pediatr Allergy Immunol 2010; 21: e718–e722	<i>P. pastoris</i>	pPIC9	(Não há dados)
			2010	Singapura	30 (Eczema)	86.7%	ELISA	Pediatr Allergy Immunol 2010; 21: e718–e722	<i>P. pastoris</i>	pPIC9	(Não há dados)
			2007	Singapura	43	98%	ELISA	J Allergy Clin Immunol. 2007 Jul;120(1):105-12	<i>E. coli</i>	pET	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de Ni
rBlo t 6	Quimotripsina		2010	Singapura	30 (Asma)	63.3%	ELISA	Pediatr Allergy Immunol 2010; 21: e718–e722	<i>P. pastoris</i>	pPIC9	(Não há dados)
			2010	Singapura	30 (Eczema)	76.7%	ELISA	Pediatr Allergy Immunol 2010; 21: e718–e722	<i>P. pastoris</i>	pPIC9	(Não há dados)
rBlo t 7	Desconhecido		2011	Singapura	235	44%	Immuno-dot blot	Pediatr Allergy Immunol. 2011 Mar;22(2):202-10	(Não há dados)	(Não há dados)	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de Ni e Cromatografia de exclusão por tamanho de alta resolução.

Fonte. Autoria própria

**Continuação tabela 1.**

Alérgeno	Família da proteína	Homologia com alérgenos Der p	Ano	País	Pacientes	Reatividade IgE	Ensaio	Referência	Microrganismo utilizado	Vetor de expressão utilizado	Método de Purificação
rBo t 8	Superfamília da GST		2011	Singapura	235	10%	immuno-dot blot	Pediatr Allergy Immunol. 2011 Mar;22(2):202-10	(Não há dados)	(Não há dados)	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de Ni e Cromatografia de exclusão por tamanho de alta resolução.
			2002	Singapura	35	20%	SPT	Clin Exp Allergy. 2002 Aug;32(8):1203-10	<i>E. coli</i> BL21	pGEX-4T1	Purificado com glutatona s-transferase
			2002	Singapura	93	29%	ELISA	Clin Exp Allergy. 2002 Aug;32(8):1203-10	<i>E. coli</i> BL21	pGEX-4T1	Purificado com glutatona s-transferase
rBlo t 10	Tropomiosina	Der p 10: 95 %	2011	Singapura	177	9%	Immuno-dot blot	Pediatr Allergy Immunol. 2011 Mar;22(2):202-10	(Não há dados)	(Não há dados)	A purificação da proteína recombinante com cauda de com histidina foi feita utilizando uma resina de Ni e Cromatografia de exclusão por tamanho de alta resolução.
rBlo t 11	Família da paramiosina	Der p 11: 89 %	2001	Singapura	63	52%	immuno-dot blot	Int Arch Allergy Immunol. 2001 Dec;126(4):286-93.	<i>E. coli</i> BL21	pGEX-4T1	Purificado com glutatona s-transferase
rBlo t 12	Proteína com domínio de ligação à quitina		2010	Singapura	30 (Asthma)	70%	ELISA	Pediatr Allergy Immunol 2010: 21: e718–e722	<i>P. pastoris</i>	pPIC9	(Não há dados)
			2010	Singapura	30 (Eczema)	63.3%	ELISA	Pediatr Allergy Immunol 2010: 21: e718–e722	<i>P. pastoris</i>	pPIC9	(Não há dados)
rBlo t 14	Apolipoporfina		2011	Singapura	235	5%	Immuno-dot blot	Pediatr Allergy Immunol. 2011 Mar;22(2):202-10	(Não há dados)	(Não há dados)	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de Ni e Cromatografia de exclusão por tamanho de alta resolução.
rBlo t 15	Quitinase de 98KDa		2011	Singapura	235	21%	immuno-dot blot	Pediatr Allergy Immunol. 2011 Mar;22(2):202-10	(Não há dados)	(Não há dados)	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de super-fluxo Ni-NTA (Qiagen Inc.)

Fonte. Autoria própria

## Continuação tabela 1.

Alérgeno	Família da proteína	Homologia com alérgenos Der p	Ano	País	Pacientes	Reatividade e IgE	Ensaio	Referência	Microrganismo utilizado	Vetor de expressão utilizado	Método de Purificação
rBlo t 20	Arginina quinase		2011	Singapura	235	13%	immuno-dot blot	Pediatr Allergy Immunol. 2011 Mar;22(2):202-10	(Não há dados)	(Não há dados)	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de Ni e Cromatografia de exclusão por tamanho de alta resolução.
rBlo t 21	Desconhecido		2011	Singapura	235	57%	Immuno-dot blot	Pediatr Allergy Immunol. 2011 Mar;22(2):202-10	(Não há dados)	(Não há dados)	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de Ni e Cromatografia de exclusão por tamanho de alta resolução.
			2013	Brasil	35 crianças /28 adultos	82.9%/92.8%	ELISA	BMC Immunol. 2013 Feb 27;14:11.	<i>E. coli BL21</i>	pRSETA	A purificação da proteína recombinante foi feita utilizando uma resina de Ni

Fonte. Autoria própria

Até então, os principais alérgenos de *Dermatophagoides spp.* pertencem ao grupo 1 de alérgenos (Der p 1 e Der f 1) e ao grupo 2 (Der p 2 e Der f 2). No entanto, no caso de *B. tropicalis*, o Blo t 5 é o alérgeno mais importante identificado e totalmente caracterizado até o momento (NAIK *et al.*, 2008). No entanto, a importância do grupo 1 e 2 de *B. tropicalis* ainda não está clara; no caso de Blo t 1 apesar de sua prevalência ser alta em pacientes alérgicos, seus títulos de anticorpos são muito baixos, em comparação ao Der p 1 (CHEONG *et al.*, 2003). No caso de Blo t 2 até então não há nenhum relatório publicado da caracterização molecular e físico-química deste alérgeno.

### **2.3.2. Grupo 2 dos alérgenos de ácaros da poeira**

Nos ácaros, os alérgenos do Grupo 2 tem domínio proteico de ligação aos lipídeos MD-2, que consiste de duas folhas  $\beta$  planas que se dobram de modo que formam uma grande cavidade interna hidrofóbica. Como foi mencionado previamente, o grupo 2 dos alérgenos de ácaros são alérgenos maiores em *Dermatophagoides spp.* Apesar da homologia ser relativamente baixa entre Blot 2 e Der p 2 (cerca de 42%) (Figura 4), eles tem seis resíduos de cisteínas bastante conservados envolvidos na formação de pontes de dissulfeto. Essas pontes são importantes para a conformação estrutural e a estabilidade do alérgeno Der p 2, Der f 2 e demais proteínas com o motivo MD-2 (MULLEN *et al.*, 2003; NISHIYAMA *et al.*, 1993).



**Figura 5. Alinhamento das doze seqüências de Blo t 2 reconhecidas no banco de dados do Uniprot. A) O alinhamento das seqüências mostra uma grande similitude entre as distintas isoformas, similar ao caso de outros alérgenos do grupo 2.**

```

tr | A6XEP3 | A6XEP3_BLOTA      MFKFFICLALL--VSYAAAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 48
tr | A6XEP4 | A6XEP4_BLOTA      MFKFFICLALL--VSYAAAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 48
tr | A6XEP2 | A6XEP2_BLOTA      MFKFFICLALL--VSYAAAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 48
tr | A6XEP6 | A6XEP6_BLOTA      MFKFFICLALL--VSYAAAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 48
tr | A6XEP1 | A6XEP1_BLOTA      MFKFFICLALL--VSYAAAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 48
tr | A6XEP0 | A6XEP0_BLOTA      MFKFFICLALL--VSYAAAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 48
tr | A6XEP5 | A6XEP5_BLOTA      MFKFFICLALL--VSYATAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 48
tr | A6XEN9 | A6XEN9_BLOTA      MFKFFICLALL--VSYAAAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 48
tr | A6XEN8 | A6XEN8_BLOTA      MFKFFICLALL--VSYAAAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 48
tr | Q1M2P1 | Q1M2P1_BLOTA      MFKFFICLALLPFWSRRAAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 50
tr | Q1M2P2 | Q1M2P2_BLOTA      MFKFFICLALL--VSPAAAGDVKFTDCAHGEVTSLDLSCSGDHCIIHKGK 48
tr | Q1M2P3 | Q1M2P3_BLOTA      MFKFFICLALL--VSSRRQRQCQIYRSCW-EVTSIDLSCSGDHCIIHKGK 47
***** * : * : ***** * : ***

tr | A6XEP3 | A6XEP3_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISAIMNNEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 98
tr | A6XEP4 | A6XEP4_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISAIMNNEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 98
tr | A6XEP2 | A6XEP2_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISAIMNNEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 98
tr | A6XEP6 | A6XEP6_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISAIMNNEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 98
tr | A6XEP1 | A6XEP1_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISAIMNNEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 98
tr | A6XEP0 | A6XEP0_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISAIMNNEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 98
tr | A6XEP5 | A6XEP5_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISATMNGIEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 98
tr | A6XEN9 | A6XEN9_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISATMNGIEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 98
tr | A6XEN8 | A6XEN8_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISATMNGIEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 98
tr | Q1M2P1 | Q1M2P1_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISAIMNNEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 100
tr | Q1M2P2 | Q1M2P2_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISAIMNNEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 98
tr | Q1M2P3 | Q1M2P3_BLOTA      SFTLKTFFIANQDSEKLEIKISAIMNNEVPPVPGVDKDGCKHTTCPLKKG 97
***** * : * : ***** * : ***

tr | A6XEP3 | A6XEP3_BLOTA      QKYELDYSLIIPTILPNLKTITASLVGDHGVVACGKVNTEVVD 142
tr | A6XEP4 | A6XEP4_BLOTA      QKYELDYSLIIPTILPNLKTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVVD 142
tr | A6XEP2 | A6XEP2_BLOTA      QKYELDYSLIIPTILPNLKTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVFD 142
tr | A6XEP6 | A6XEP6_BLOTA      QKYELDYSLIIPTILPNLKTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVID 142
tr | A6XEP1 | A6XEP1_BLOTA      QKYELDYSLIIPTILPNLKTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVVA 142
tr | A6XEP0 | A6XEP0_BLOTA      QKYELDYSLIIPTILPNLKTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVVD 142
tr | A6XEP5 | A6XEP5_BLOTA      QKYELDYSLIIPTVLPNVKVTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVVD 142
tr | A6XEN9 | A6XEN9_BLOTA      QKYELDYSLIIPTVLPNVKVTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVVD 142
tr | A6XEN8 | A6XEN8_BLOTA      QKYELDYSLIIPTILPNLKTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVVD 142
tr | Q1M2P1 | Q1M2P1_BLOTA      QKYELDYSLIIPTILPNLKTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVVD 144
tr | Q1M2P2 | Q1M2P2_BLOTA      QKYELDYSLIIPTILPNLKTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVVD 142
tr | Q1M2P3 | Q1M2P3_BLOTA      QKYELDYSLIIPTILPNLKTVTASLVGDHGVVACGKVNTEVVD 141
***** * : * : ***** * : ***

```

Fonte: Autoria propia utilizando a base de dados da Uniprot (CONSORTIUM, 2015)

O alinhamento das seqüências referidas mostra uma grande semelhança entre as distintas isoformas, similar no caso de outros alérgenos do grupo 2.

## 2.4. Tratamento das doenças alérgicas

Até o momento, para doenças como a asma e demais doenças alérgicas não existe tratamento disponível no mercado que seja 100% eficaz. As drogas atuais estão focadas no controle dos sintomas da doença, como no caso do uso dos glucocorticoides, anti-histamínicos, etc. Uma vez que os sintomas das doenças alérgicas aparecem, estes geralmente são mantidos durante toda a vida. Imunoterapia alérgeno-específica (IEA) é o único tratamento causal das alergias que pode modificar a história natural destas doenças (CALDERÓN, M. A. *et al.*, 2011).

Além disso, as doenças alérgicas representam custos muito elevados para os sistemas de saúde em todo o mundo (SICHERER; LEUNG, 2015). Por exemplo, nos Estados Unidos da América as despesas relacionadas com o tratamento da asma foram ao redor de US \$ 10.748.000.00 em apenas um ano, e para o tratamento da rinite foi aproximadamente US \$ 1.233.000.00 (GERGEN, 2001)

No Brasil, a asma foi a terceira causa de hospitalização no ano 2001 segundo a base de dados DATASUS do governo federal, o custo total para o sistema de saúde público anual é de US \$ 35.000.000 (SANTOS *et al.*, 2007). Na Bahia, os custos direto e indireto totais dos pacientes com asma, antes de 2006, eram de R\$ 181.652,94/ano, ou seja, R\$ 2.838,33/ano por paciente. Atualmente, depois da aplicação do programa de controle de Asma e da Rinite Alérgica na Bahia, os custos foram reduzidos para R\$ 59.345/ano. Mesmo assim, o objetivo a longo prazo é tentar reduzi-lo com novas formulações terapêuticas (FRANCO *et al.*, 2008)

#### **2.4.1. Imunoterapia das doenças alérgicas**

A imunoterapia para o tratamento de alergia teve seu início há um século, porém só a partir de três décadas atrás seus mecanismos de ação vêm sendo esclarecidos (JUTEL; AKDIS, 2011). Um dos mecanismos aceitos é que os Linfócitos T CD4+ CD25+ Forkhead fox P3 (Fox P3+) derivados do timo e células Treg tipo I periféricas produtoras de IL-10, estão aumentados na corrente sanguínea periférica de pacientes em uso de imunoterapia, levando à supressão de eosinófilos, mastócitos e mudando o isotipo de IgE para IgG4 (considerada como bloqueadora de IgE), desta forma imunomodulando a resposta inflamatória alérgica. Embora as células Tregs tipo I possam regular as células Th2 com diferentes especificidades antigênicas, a resposta parece ser mais eficiente quando as células regulatórias tem a mesma especificidade antigênica das células Th2 (AKDIS; BLASER; AKDIS, 2005).

Atualmente a maioria dos esquemas de imunoterapia consistem na administração do extrato total proteico do alérgeno ao qual o indivíduo está sensibilizado; vários

ensaios clínicos têm mostrado os benefícios deste tratamento (BARON-BODO *et al.*, 2012; OLSEN *et al.*, 1997; PHAM-THI *et al.*, 2007; PIFFERI *et al.*, 2002; SHIM *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2006). Entretanto, a resposta terapêutica pode ser demorada (2 a 4 anos), e ainda são escassos os conhecimentos acerca de antígenos candidatos (MORENO BENÍTEZ *et al.*, 2015). Além disto, a imunoterapia com extrato total, tem riscos de anafilaxia e de outros efeitos colaterais (VAN REE *et al.*, 1996).

As vacinas utilizadas são em geral aplicadas via sub-cutânea, o que aumenta as chances de reações indesejáveis. Uma alternativa surgiu mais recentemente é o uso de aplicação sublingual que tem tido resultados promissores, porém ainda está em fase de pesquisa (OKAMOTO *et al.*, 2016).

#### **2.4.1.1. Imunoterapia com moléculas alergênicas recombinantes**

Apesar dos benefícios oferecidos pela imunoterapia com o extrato, podem ocorrer eventos adversos como anafilaxia por serem compostos complexos com antígenos ainda não definidos que podem provocar sintomas alérgicos ou novas sensibilizações (CALDERÓN, M.; CARDONA; DEMOLY, 2012; VAN HAGE-HAMSTEN; VALENTA, 2002)

As vantagens no uso das moléculas recombinantes são muitas, por exemplo, os antígenos recombinantes têm uma sequência de aminoácidos definida, os lotes de produção do alérgeno são derivados do mesmo banco de células, além de evitar contaminação e o risco de conter agentes infecciosos, devido a sua produção em condições controladas (CROMWELL; HÄFNER; NANDY, 2011). Até então, há poucos estudos feitos em seres humanos utilizando moléculas recombinantes ou nativas isoladas de ácaros da poeira. A maioria dos trabalhos foram feitos em modelos animais, em especial camundongos, mostrando resultados promissores (Ver Tabela 2).

**Tabela 2. Lista dos alérgenos recombinantes tipo selvagem de ácaros da poeira candidatos para imunoterapia**

Alérgeno	Fonte alergênica	Ano	País	Modelo Animal/Humano	Via de administração	Resultado principal	Referência	Microorganismo utilizado	Vetor de expressão utilizado
rDer p 1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2009	Bélgica	Animal	Instilação intranasal	Evitou-se a resposta alérgica após a sensibilização com Der p 1 e o desafio das vias aéreas com extratos de ácaros	J Allergy Clin Immunol 2009;123:1150-6.)	<i>E. coli</i>	(Não há dados)
rDer p 2	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2012	França	Animal	Sublingual	Der p 2 diminui eficazmente a hiperreatividade das vias aéreas assim como a resposta Th2.	Int Arch Allergy Immunol 2012;158:157-167	<i>P. Pastoris</i>	pPICZ
rDer f 2	<i>Dermatophagoides farinae</i>	1997	Japão	Animal	(Não há dados)	A inflamação foi significativamente suprimida; Diminuição das concentrações de IL-4 e INF- $\gamma$	Cellular immunology 181, 30-37 (1997)	<i>E. Coli</i>	pUEX1
		1998		Animal	Administração oral	O Der f2 recombinante exibiu as duas respostas sensibilizadoras e hipo-sensibilizantes em ratinhos	Eur Respir J 1998; 11: 144-150	<i>E. Coli</i>	pUEX1
Der p 3	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2014	Bélgica	Animal	Instilação intranasal	ProDer p 3 induziu uma resposta imune polarizada à TH1 que impediu a resposta alérgica em ratinhos mas manteve a reatividade de células T específicas de Der p	Clinical & Experimental Allergy, 45, 823-834	<i>P. pastoris</i>	pPIC9K
Der p 5	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2004	Taiwan	Animal	Administração oral	Extrato contendo o vDer p 5 inibiu a síntese de IgE específica contra Der p 5 e a inflamação das vias aéreas	J Allergy Clin Immunol 2004;113:1079-85	<i>Cucurbita pepo</i> L (Virus de planta)	Zucchini yellow mosaic virus

. Fonte. Autoria própria

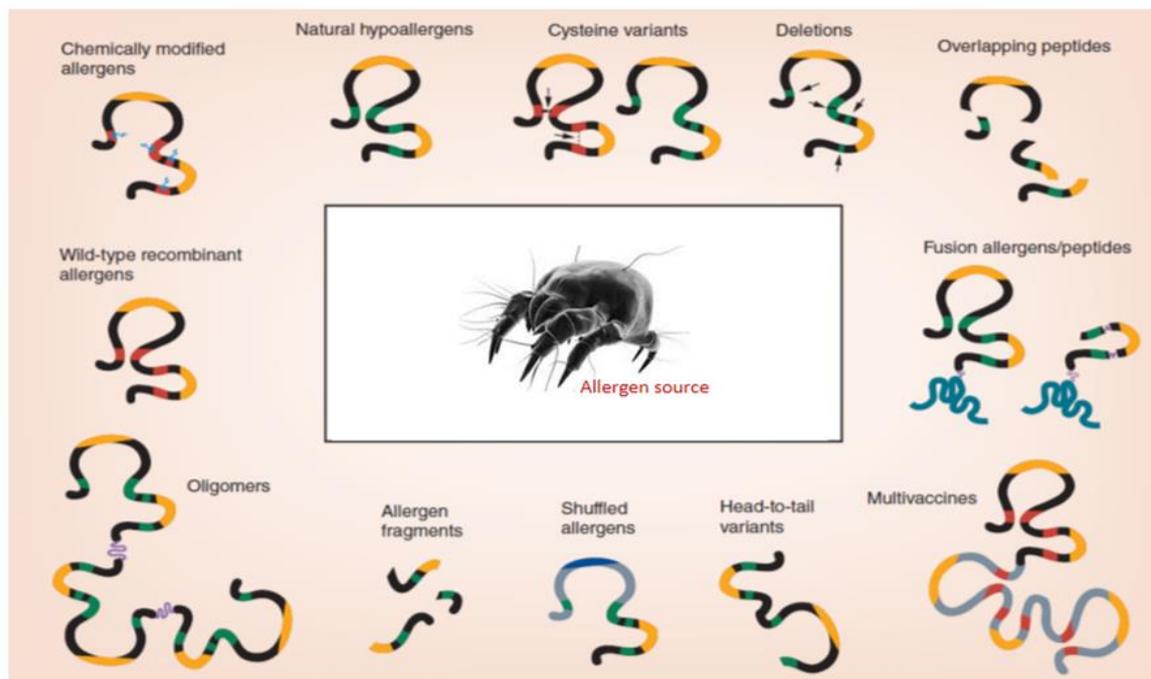
Os poucos estudos utilizando imunoterapia alérgeno-específica com proteínas recombinantes em humanos mostraram uma eficácia igual ao uso do extrato total no tratamento das doenças alérgicas com seres humanos. Em um estudo multicêntrico feito em pacientes alérgicos ao pólen de bétula foram comparados dois esquemas de imunoterapia; em um dos grupos foi utilizado o extrato total do pólen da bétula, e no outro utilizado o principal alérgeno da planta, o Bet v 1 recombinante. Em ambos casos, observa-se uma redução significativa dos sintomas alérgicos; no entanto, os pacientes tratados com o extrato apresentaram efeitos secundários maiores que aqueles tratados com o antígeno recombinante (PAULI *et al.*, 2008)

#### **2.4.1.2. Imunoterapia com alérgenos recombinantes mutantes**

A engenharia genética envolve a modificação dirigida de sequências de aminoácidos de uma proteína, com o objetivo de alterar a sua função ou as propriedades de uma maneira previsível. Portanto, a compreensão da relação entre a estrutura da proteína codificada e a sua função ou propriedades é um pré-requisito para a manipulação precisa e eficaz de um gene. As abordagens para a alteração de um gene incluem a mudança de pares de bases específicas (gene mutante) a introdução de um novo pedaço de DNA à uma molécula de DNA existente (quimérico ou gene híbrido, fusões), e deleções (de genes ou fragmentos truncados) (FERREIRA *et al.*, 2006) (Figura 6). Desta forma, essas moléculas resultantes podem ser hipoalergênicas por terem epítomos de ligação à IgE reduzidos, enquanto preservam motivos/sequências essenciais para o reconhecimento de células T e para indução de resposta humoral e celular protetora.

Até agora existem poucos estudos utilizando antígenos mutantes derivados de ácaros; a maioria está relacionada com os alérgenos do grupo 1 e 2 da espécie *Dermatophagoides spp.* (Ver Tabela 3).

**Figura 6. Conceitos para o desenho de moléculas hipoalergénicas recombinantes.** Os epítomos conformacionais de IgE de elevada afinidade são representados em vermelho, os epítomos de ligação a IgE baixa reatividade em verde, epítomos de células T em amarelo, e as pontes de dissulfeto são simbolizados com traços.



Fonte: Adaptado de (WALLNER; PICHLER; FERREIRA, 2013)

**Tabela 3. Lista dos alérgenos recombinantes modificados de ácaros, candidatos para imunoterapia**

Alérgeno derivado	Tipo de variação	Fonte alergênica	Ano	País	Modelo Animal/Humano	Via de administração	Resultado principal	Referência	Microrganismo utilizado	Vetor de expressão utilizado
Der p 1	Moléculas híbridas	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2009	Espanha	Animal	Intraperitoneal	Os híbridos exibiram baixa ligação IgE mas a imunogenicidade foi preservada	Clinical & Experimental Allergy, 39, 1088–1098	<i>E. coli</i>	pKN172
	Moléculas híbridas	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2012	Áustria	Animal/Humano ( <i>in vitro</i> )	(Não há dados)	Os hipoalérgenos possuíam uma baixa reatividade IgE e tinham uma capacidade reduzida de indução de respostas alérgica, mas induziram a proliferação de células T igual aos alérgenos do tipo selvagem	J Allergy Clin Immunol 2012;130:435-43.	<i>E. coli</i>	pET17b
Der p 2	Molécula Portadora (Fusão)		2012	Áustria	Animal	Subcutaneamente	Induziram-se anticorpos IgG específicos de Der p 2 em animais, os quais inibiram a ligação de IgE de pacientes alérgicos ao alérgeno e a ativação de basófilos induzida por alérgenos	Allergy. 2012 May; 67(5): 609–621.	<i>E. coli</i>	(Não há dados)
	Moléculas híbridas	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2012	Áustria	Animal/Humano ( <i>in vitro</i> )	(Não há dados)	Os hipoalérgenos possuíam uma baixa reatividade IgE e tinham uma capacidade reduzida de indução de respostas alérgicas, mas induziram a proliferação de células T igual aos alérgenos do tipo selvagem	J Allergy Clin Immunol 2012;130:435-43.	<i>E. coli</i>	pET17b
	Moléculas híbridas		2008	Áustria	Animal/Humano ( <i>in vitro</i> )	Subcutaneamente	A atividade alérgica dos derivados de Der p 2 foi reduzida aproximadamente dez vezes mediante uma avaliação <i>in vitro</i> num ensaio de ativação de basófilos e <i>in vivo</i> mediante provas cutâneas	Molecular Immunology 45 (2008) 2486–2498	<i>E. coli</i>	pET17b
	Moléculas híbridas		2009	Espanha	Animal	Intraperitoneal	Os híbridos exibiram baixa ligação IgE mas a imunogenicidade foi preservada	Clinical & Experimental Allergy, 39, 1088–1098	<i>E. coli</i>	pKN172
Der f 2	Mutação	<i>Dermatophagoides farinae</i>	2000	Japão	Humano ( <i>in vitro</i> )	(Não há dados)	Aumento da imunogenicidade das células T e indução da diferenciação de células Th1 exclusiva em pacientes atópicos	The Journal of Immunology, 2000, 165: 2895–2902	<i>E. coli</i>	(Não há dados)
	Mutação		2000	Japão	Humano ( <i>in vitro</i> )	(Não há dados)	O mutante mostrou uma ligação de IgE reduzida	Eur. J. Biochem, 200, 26: 6650 -6656	<i>E. coli</i>	(Não há dados)
Der p 23	Mutação	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	2014	Áustria	Animal/Humano ( <i>in vitro</i> )	(Não há dados)	Induziu uma baixa proliferação de células T, no entanto níveis elevados da citosina tolerogênica IL-10 e da citosina IFN- $\gamma$ Th1 em PBMCs	The Journal of Immunology, 2014, 192: 4867–4875.	<i>E. coli</i>	pET-17b

Fonte. Autoria própria

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

*Obtenção de antígenos recombinantes tipo selvagem e hipoalergênicos de *Blomia tropicalis*, com potencial para utilização no diagnóstico e desenvolvimento de vacinas/imunoterápicos para alergia à este ácaro.*

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Caracterização proteômica do Blo t 2 presente em extrato de *Blomia tropicalis* isolado da poeira doméstica de casas de pacientes alérgicos residentes em Salvador-Bahia;
- Construção das sequências harmonizadas de rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5;
- Construção de rBlo t 2\_8X hipoalergênico através da troca de aminoácidos na superfície da molécula para diminuir a alergenicidade;
- Caracterização físico-química dos alérgenos recombinantes e seu derivado hipoalergênico;
- Avaliação da resposta de anticorpos de indivíduos alérgicos aos antígenos recombinantes rBlo t 2.2, rBlo t 2.5 e rBlo t 2\_8X, utilizando as técnicas de ELISA e *Immunoblotting*;
- Testar os antígenos recombinantes hipoalergênicos ou não em basófilos humanizados de camundongo *in vitro*

-Avaliação da reatividade cruzada entre o rBlo t 2 e sua proteína homóloga Der p 2 utilizando a técnica de ELISA de inibição.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Análise proteômica de Blo t 2 presente no extrato de *B. tropicalis*

O extrato de *Blomia tropicalis* foi preparado a partir de diferentes culturas de ácaros da poeira coletados em Salvador-Bahia, utilizando tampão fosfato salino, pH 7.4 (PBS). Os extratos de 20 clones de *B. tropicalis*, foram digeridos *in-solution*, procedendo conforme orientação contida no kit de precipitação da ProteoExtract® trypsin digestion do kit (Calbiochem, San Diego, USA). Em resumo, a 50 µl de cada extrato de *Blomia tropicalis* (4µg/mL) foram adicionados 15 µl do tampão de digestão (8M ureia in 0.1M Tris-HCl (pH: 8.5), seguido da adição de 1 µl do agente redutor e incubação por mais 10 minutos a 37°C. Após esse período, adicionou-se 1 µl do agente de bloqueio e incubou-se novamente por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado às amostras 1 µl das proteases tripsina ou Glu C, ou a combinação de ambas e incubado por 1 hora a 37°C; após a incubação, as amostras foram estocadas a -20°C e os peptídeos analisados posteriormente por espectrometria de massa acoplado à cromatografia líquida (LC/MS/MS) utilizando o Q-Exactive™ mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA ). Os dados foram analisados com o software Proteome Discoverer 1.4® e Peaks Studio 7®e e comparados com o banco de dados de proteínas UniProt (Ver anexo 1).

### 4.2. Desenho e síntese da sequência harmonizada do rBlo t 2.2. e rBlo t 2.5.

As sequências dos rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5 foram recodificadas para uma ótima expressão em *E. coli*. Nesta estratégia, a frequência dos códons do microrganismo hospedeiro são estreitamente alinhados com as frequências de utilização de códons do organismo contendo o gene alvo. A harmonização das isoformas dos rBlo t 2 foram feitas utilizando tabelas de frequência de códons espécie-específicas na página web <http://www.kazusa.or.jp/codon/> tendo *B. tropicalis* como “organismo alvo” e a cepa de *E. coli* B como organismo hospedeiro.

As sequências harmonizadas dos rBlo t 2 forem sintetizadas pela ATG: biosynthetics (Merzhausen, Alemanha) no vetor de clonagem e expressão pET 30a (+). **Ver Anexo 2.**

### 4.3. Transformação, expressão e purificação dos rBlo t 2.2 e 2.5.

Os vetores de clonagem/expressão contendo as sequências dos rBlo t 2.2. e rBlo t 2.5 foram transformados numa cepa de *E.coli Shuffle T7* (New England Biolans, USA). A transformação foi feita adicionando 5 µL contendo 50ng de DNA do plasmídeo com Blo t 2.2 e Blo t 2.5 na mistura de bactérias Shuffle T7, seguido de agitação do tubo 5 vezes para misturar as células com o DNA. Em seguida, colocou-se a mistura em gelo durante 30 minutos e feito o choque térmico a 42 °C durante 30 segundos e em gelo, durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 950µL de SOC à temperatura ambiente na mistura que foi mantida a 30 °C durante 60 minutos sob agitação vigorosa (250 rpm). A mistura foi plaqueada e incubada para posterior seleção por PCR de colônias.

A expressão das proteínas foi feita em meio de cultura LB, pela indução com 0,4mM de isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside no momento em que a cultura celular obteve uma OD<sub>600</sub>: 0,6. No entanto, no caso de rBlo t 2.2 a proteína foi co-transformada e co-expressada com um set de chaperonas pG-KJE8® (Takara Bio Inc, Japan); as chaperonas foram induzidas com 0,5 mg/mL de arabinosa e 5ng/mL de tetraciclina no momento em que a cultura celular obteve uma OD<sub>600</sub>: 0,3.

Após a indução, as culturas foram mantidas por 4 horas a 37°C com agitação continua à 220 rpm. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas à 4.000 g por 20 minutos à 4°C; os sedimentos obtidos foram ressuspensos numa solução de 50mM Tris/Cl pH:8,5 e 0,5 M ureia. As bactérias foram lisadas por 4 ciclos de congelamento e descongelamento com nitrogênio líquido e homogeneizadas por 3 minutos com o aparelho Ultra-Turrax T25® (IKA, Germany) na velocidade máxima. Posteriormente, as amostras foram incubadas com DNase I (1:1000) por 2 horas à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi coletado e centrifugado à 13.000 g por 20 minutos à 4°C. As proteínas constitutivas da bactéria foram precipitadas acrescentando ácido acético até

o preparado alcançar pH 4.0. O rBlo t 2 foi coletado do sobrenadante após centrifugação a 13.000 g por 20 min a 4°C e pré-purificado em condições não redutoras, numa coluna de troca iônica HiTrap SPFF (GE Healthcare, Sweden). O produto da pré-purificação foi concentrado e purificado mediante exclusão por tamanho numa coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Sweden). Foi utilizado como tampão de corrida e lavagem uma solução contendo 50 mMol Tris/Cl, 0,5 M de ureia, pH 4 e como solução de eluição 50 mMol Tris/Cl, 0,5M de Ureia, 1 M de NaCl, pH 4.

#### **4.4. Análise de aminoácidos do rBlo t 2.2. e rBlo t 2.5**

A composição relativa de aminoácidos e a concentração das proteínas recombinantes foram avaliadas por HPLC (HP 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) usando uma coluna 3.9 X 159 mm Novapak C18 (Waters Corporation, Milford, USA). As proteínas foram hidrolisadas e os picos dos aminoácidos quantificados à 254 nm e comparados com os picos de aminoácidos padrão H (Pierce, Rockford, IL, USA).

#### **4.5. Caracterização dos elementos de estrutura secundária de rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5**

Para determinação dos elementos de estrutura secundária e estabilidade térmicas das proteínas, foram utilizadas as técnicas de dicroísmo circular e espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier (Em inglês: *Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR)). Desta forma, as amostras foram analisadas por estas técnicas na presença de PBS, usando o espectrofotopolarímetro JASCO J-810 (Jasco, Tokyo, Japan). A desnaturação térmica foi realizada variando a temperatura de 20°C a 95°C e o renovelamento térmico avaliado de 95°C a 20°C, com uma velocidade de 1°C/minuto. Além disto, os elementos da estrutura secundária do rBlo t 2.2 e Blo t 2.5 foram determinados por FTIR. Os espectros foram analisados na derivada de segundo ordem na região da amida I.

#### **4.6. Ensaio de avaliação de degradação proteolítica de rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5 com microssomas isolados de células dendríticas JAWII**

O ensaio de degradação endolisosomal foi feito pela incubação das proteínas recombinantes com proteases microssomais isoladas de células dendrítica JAWS II com diferentes tempos de incubação; esta técnica foi desenvolvida pelo grupo da Profa. Fátima Ferrreira, no Departamento de Biologia molecular da Universidade de Salzburg na Áustria (EGGER *et al.*, 2011).

Para o ensaio foram utilizados 0,25 mg/mL das proteínas recombinantes (rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5) e 0,4 mg/mL das proteínas microssomais diluídas numa solução com volume final de 20uL contendo 100 mmol/L de tampão citrato pH: 4,8 e 2mmol/L de ditioneitol (DTT). Os tempos de incubação testados foram: 0h, 0.5h, 1h, 3h, 5h, 12h, 24h, 36h e 48h a 37°C. Após esse período, a reação foi parada com choque térmico à 95°C por 5 minutos. As amostras foram quantificadas e avaliadas em gel SDS-PAGE, em condições redutoras e o gel corado com GelCode® Blue Reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA).

#### **4.7. Obtenção de soros pacientes alérgicos à *Blomia tropicalis***

As amostras de soros foram obtidas de crianças alérgicas inscritas no programa SCAALA e pacientes adultos com asma moderada a grave do Programa de Estudos em Alergias Respiratórias (ProAR), Salvador, Brasil. O diagnóstico de atopia foi determinado quantitativamente utilizando níveis séricos elevados de IgE (>0,35kU/L) específicos para o extrato de *Blomia tropicalis* usando o sistema ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Suécia). A aprovação ética do estudo foi obtida pelo Comitê Nacional de Ética do Brasil e possui o registro na plataforma Brasil com o Certificado de Apresentação para apreciação Ética/CAAE de número: 45376814.0.0000.5577. Os consentimentos informados por escrito foram obtidos dos pacientes adultos com asma ou pelo tutor legal de cada criança.

#### **4.8. Immunoblotting para avaliação da reatividade de Blo t 2.2 com soros de pacientes alérgicos ao extrato total do ácaro *B. tropicalis***

O antígeno recombinante rBlo t 2.2 foi submetido ao ensaio de SDS – PAGE em gel de acrilamida, e a seguir transferido para membranas de nitrocelulose (Whatman, Brentford, UK). As membranas foram bloqueadas com uma solução de 20% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, Misuri, USA) e incubadas com uma mistura de 10 soros de pacientes alérgicos à *Blomia tropicalis*, diluídos à 1:10, overnight à 4°C. Após 3 lavagens, a membrana foi incubada com um anticorpo de camundongo/ anti – IgE humana conjugado à fosfatase alcalina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) diluído à 1:10.000 por duas horas à temperatura ambiente. A banda correspondente ao tamanho molecular da proteína foi visualizada usando NBT e BCIP como substratos da reação de fosfatase alcalina.

#### **4.9. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliação da reatividade dos antígenos recombinantes rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5 utilizando soros de pacientes alérgicos ao extrato total do ácaro *B. tropicalis***

Para a realização do ELISA foram analisados 44 soros de pacientes alérgicos à *Blomia tropicalis* (com níveis maiores de IgE > 0.7 kU/L). Inicialmente, as placas de alta ligação (Nunc MaxiSorp®, Rochester, NY) foram sensibilizadas com 5µg/mL (quantidade padronizada para o alérgeno homólogo Der p 2 no departamento de Biologia Molecular da Universidade de Salzburg) dos antígenos recombinantes Blo t 2.2, Blo t 2.5 em tampão fosfato salino (1X PBS), pH: 7,4 overnight. Após lavagem com PBS contendo 0,05% tween-20 (PBS-T), as placas foram bloqueadas com 200 µL de tampão Tris-Salino contendo 0,5 % BSA e 0,05% tween-20 (TBS/T/BSA) e incubadas à 4°C por 16 horas. Os soros humanos foram diluídos à 1:10 em TBS/T/BSA e incubados à 4°C overnight; após 4 lavagens com PBS contendo 0,05% tween-20 (PBS-T), as placas foram incubadas com o anticorpo de camundongo/ anti-IgE humana conjugado com fosfatase alcalina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) (1:4000). Após lavagens com TBS-T, as placas foram incubadas com uma solução de 100 µL de 10mM p-nitrofenil fosfato (PNPP). A absorbância foi determinada à 405 nm, usando um leitor de placas (Ges mBH, Tecan, Salzburg, Áustria).

O ponto de corte foi calculado utilizando 10 amostras de soro de indivíduos negativos para IgE específica anti-*Blomia tropicalis*; o ponto de corte foi a média da absorbância da OD dos soros ensaiados mais três desvios padrão (OD: 0,11).

#### **4.10. Teste da atividade biológica do rBlo t 2.2, rBlo t 2.5 e rDer p 2 – Ensaio de liberação de mediadores inflamatórios em basófilos humanizados de rato**

A capacidade das proteínas recombinantes de degranular basófilos foi monitorada utilizando uma linhagem celular de basófilos leucêmicos de rato (RBL) que expressa o receptor humano de alta afinidade para IgE (Fc $\epsilon$ RI) que já foi testada e padronizada para determinar a atividade biológica *in-vitro* de moléculas alergênicas (VOGEL *et al.*, 2005). As células foram sensibilizadas com 5 soros humanos ricos em IgE sérica (> 3.5 kU/L, diluição 1:10) de pacientes alérgicos ao *B. tropicalis* e estimuladas com diluições seriadas dos alérgenos recombinantes rBlo t 2.2, rBlo t 2.5 e Der p 2. A liberação de  $\beta$ -hexosaminidase foi determinada através de sua função enzimática na clivagem do substrato fluorogênico metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida e calculada como porcentagem do conteúdo total da enzima em células solubilizadas com triton X-100.

#### **4.11. ELISA de inibição para avaliar a reatividade cruzada entre rBlo t 2 e Der p 2.**

As curvas de inibição foram obtidas usando diluições seriadas dos inibidores solúveis, para qualquer dos alérgenos (rBlo t 2 ou rDer p 2) em competição com os alérgenos fixados nas placas de alta ligação (Nunc MaxiSorp®, Rochester, NY). Inicialmente, as placas foram sensibilizadas com 5 $\mu$ g/mL dos antígenos recombinantes Blo t 2.2 ou Der p 2 em PBS, overnight. Simultaneamente, numa placa de baixa ligação, cinco soros individuais de pacientes alérgicos à *Blomia tropicalis* diluídos 1:10 foram incubados com diluições seriadas do inibidor (100 $\mu$ g/mL, 10 $\mu$ g/mL,

1µg/mL, 0.1µg/mL, 0.01µg/mL e 0.001 µg/mL) overnight. As placas sensibilizadas foram lavadas com PBS contendo 0,05% tween-20 (PBS-T) e bloqueadas com 200µL de tampão tris-salino contendo 0,5 % BSA e 0,05% tween-20 (TBS/T/BSA) e incubadas à 4°C por 2 horas. Os soros previamente inibidos foram diluídos à 1:10 em TBS/T/BSA e incubados à 4°C overnight; após 4 lavagens com PBS contendo 0,05% tween-20 (PBS-T), as placas foram incubadas com o anticorpo de camundongo/anti-IgE humana conjugado com fosfatase alcalina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) (1:4000). Após lavagens com TBS-T, as placas foram incubadas com uma solução de 100 µL de 10mM p-nitrofenil fosfato (PNPP). A absorbância foi determinada a 405 nm usando um leitor de placas (Ges mBH, Tecan, Salzburg, Áustria). A porcentagem de inibição foi calculada comparando o soro não inibido com os soros inibidos aplicando a seguinte formula:

$$I\% = (OD \text{ soro sem inibição} - OD \text{ soro inibido}) / OD \text{ soro sem inibição} \times 100\%$$

Onde “I%” corresponde à porcentagem de inibição e “OD”, à densidade ótica.

#### **4.12. Desenho e síntese da sequência harmonizada do rBlo t 2\_8X mutante**

Desenho do mutante com a introdução de 8 mutações (8X) pontuais nos aminoácidos presentes na superfície do alérgeno nativo, sendo que a troca foi realizada por mudanças nos resíduos de aminoácidos polares ou carregados com o objetivo de mudar as cargas da proteína. Os aminoácidos selecionados foram os seguintes: T35K K48T H74E K81D S90E I92D T95E N99Q. Gerando a sequência da reivindicação 001: SEQ ID NO:1 (ANEXO patente). A Predição da estrutura tridimensional do alérgeno nativo de Blo t 2, tendo como modelo a estrutura de uma proteína homóloga com estrutura tridimensional conhecida. O template ou modelo foi o Der p 2 (PDB: 1KTJ), alérgeno do ácaro da poeira. *D. pteronyssinus*.

Cálculo do score ou pontuação Z, do mutante com as oito trocas de aminoácidos na superfície do mutante de Blo t 2 usando o programa ProSa2003 desenvolvido pelo grupo C.A.M.E. (Center of Applied Molecular Engineering) da Universidade de

Salzburg na Áustria. O software é uma ferramenta para a análise das estruturas proteicas em 3D, sejam elas preditas teoricamente ou produto de modelagem *in-silico*.

A sequência de Blo t 2 com as oito mutações foi recodificada para uma ótima expressão em *E. coli*. A harmonização de rBlo t 2 mutante foi feita usando tabelas de frequência de códons espécie-específicas na página web <http://www.kazusa.or.jp/codon/> para *Blomia tropicalis* como “Organismo alvo” e a cepa de *E.coli* B como organismo hospedeiro. A sequência harmonizada de rBlo t 2 SEQ ID NO:2 mutante (Anexo patente) foi sintetizada pela ATG: biosynthetics (Merzhausen, Alemanha) no vetor de clonagem e expressão pET 30a (+)

#### **4.13. Expressão e purificação do mutante rBlo t 2\_8X**

O vetor de clonagem contendo a sequência de rBlo t 2\_8X mutante foi transformado numa cepa de *E.coli* Shuffle T7 (New England Biolabs, USA). A expressão da proteína foi feita em meio de cultura LB pela indução com 0,4mM de Isopropyl-b-D-thio-Galactopyranoside no momento em que a cultura celular obteve uma OD<sub>600</sub>:0,6. A cultura foi mantida por 16 horas a 16°C e com agitação contínua a 200 g. Posteriormente, a bactéria foi colhida por centrifugação a 4.000 g por 20 minutos a 4°C; o pellet obtido foi ressuspenso numa solução de 50mM Tris/Cl pH:8,5 e 0,5 M Urea. As bactérias foram lisadas por 3 ciclos de congelamento e descongelamento com nitrogênio líquido e homogeneizadas por 3 minutos com o aparelho Ultra-Turrax T25® (IKA, Germany) na máxima velocidade. Além disso, a amostra foi incubada com DNase I (1:1000) por 2 horas a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 13.000 g por 20 minutos a 4°C. As proteínas constitutivas da bactéria foram precipitadas com Ácido acético, até se alcançar o pH:4.0. O rBlo t 2 mutante foi coletado do sobrenadante após centrifugação a 13.000 g por 20 min a 4°C e pré-purificado em condições não redutoras, numa coluna de troca iônica HiTrap SPFF (GE Healthcare, Sweden). O flow-throw foi concentrado e purificado mediante exclusão por tamanho numa coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Sweden).

#### **4.14. Caracterização dos elementos de estrutura secundária do mutante rBlo t 2\_8X**

A técnica do dicroísmo circular é comumente utilizada para a determinação da estrutura secundária de proteínas e da determinação da estabilidade térmica. Desta forma, as amostras foram analisadas por esta técnica utilizando o espectrofotopolarímetro JASCO J-810 (Jasco, Tokyo, Japan). A proteína foi diluída em 10mM de PBS, pH 7,2 a uma concentração final de 0,1 mg/mL. Foram feitas 5 medições do espectro a uma velocidade de 10nm/min. Em seguida, a média dos espectros foi calculada e corrigida pela contribuição do tampão. A desnaturação térmica foi realizada variando a temperatura de 20°C a 95°C e o renovelamento térmico avaliado de 95°C a 20°C, com uma velocidade de 1°C/minuto. Além disso, os elementos da estrutura secundária do rBlo t 2 mutante foram determinados por espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier (Em inglês FTIR).

#### **4.15. Teste dos antígenos recombinantes selvagem e mutante quanto à reatividade para soros de pacientes alérgicos ao ácaro *B. tropicalis* utilizando Immunoblotting e ELISA**

Os antígenos recombinantes de rBlot 2 e o rBlo t 2 mutante Blo t 2\_8X hipoalérgico foram submetidos ao ensaio de SDS – PAGE em gel de acrilamida e a seguir transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Whatman, Brentford, UK) mediante electrotransferência. As membranas foram bloqueadas com uma solução de 20% de BSA e incubadas com uma mistura de 6 soros de pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis* diluídos a 1:10, overnight a 4°C. Após 3 lavagens, a membrana foi incubada com um anticorpo de camundongo/ Anti – IgE humana conjugado a fosfatase alcalina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) diluído a 1:10.000 por duas horas a temperatura ambiente

Para o ensaio de ELISA, as placas de alta ligação (Nunc MaxiSorp®, Rochester, NY) foram sensibilizadas com 5µg/mL do recombinante Blo t 2 nativo ou rBlo t 2 mutante em tampão fosfato salino (1X PBS), pH: 7,4 over night. Após lavagem com PBS contendo 0,05% Tween-20 (PBS-T), as placas forem bloqueadas com 200 µL

de tampão Tris-Salino contendo 0,5 % BSA e 0,05% Tween-20 (TBS/T/BSA) e incubadas com os alérgenos à 4°C por 16 horas. Os soros humanos foram diluídos a 1:10 em TBS/T/BSA e incubados com o anticorpo de camundongo/ anti-IgE humana conjugado com fosfatase alcalina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) (1:4000). Após lavagens com TBS-T, as placas foram incubadas com uma solução de 100 µL de 10mM p-nitrofenil fosfato (PNPP). A absorbância foi determinada a 405 nm usando um leitor de placas (Ges mBH, Tecan, Salzburg, Áustria).

#### **4.16. Teste de Atividade biológica do mutante Blo t 2\_8X**

A atividade biológica das proteínas recombinantes foi monitorada utilizando uma linhagem celular de basófilos leucêmicos de rato (RBL) que expressa o receptor humano de alta afinidade para IgE (FcεRI). As células foram sensibilizadas com soros ricos em IgE sérica de pacientes alérgicos ao *B. tropicalis* e estimuladas com diluições seriadas dos alérgenos recombinantes. A liberação de β-hexosaminidase foi ensaiada através de sua função enzimática na clivagem do substrato fluorogênico metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida e calculada como porcentagem do conteúdo total da enzima em células solubilizadas com Triton X-100

#### **4.17. Análise estatística**

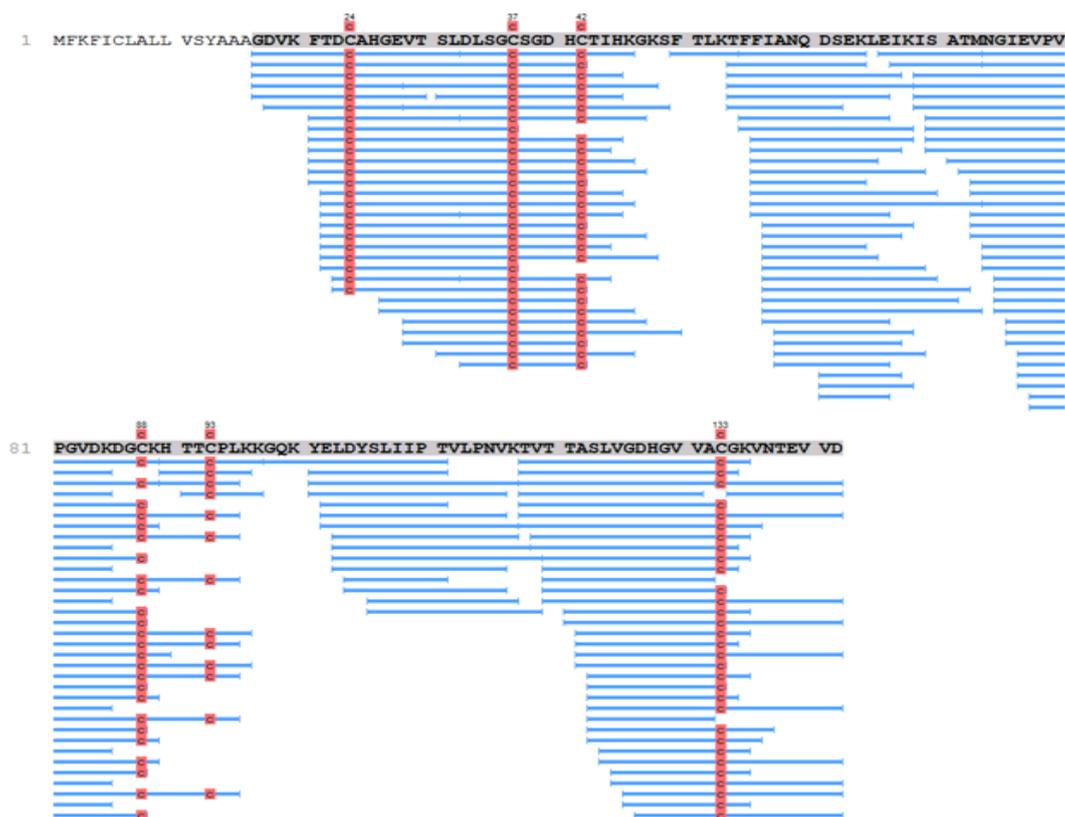
As normalidades dos dados foram determinadas pelo teste de D'Agostino e Pearson. A análise estatística para comparar o ensaio em desenvolvimento com o ELISA foi com o teste t- de Student.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise proteômica de Blo t 2 presente no extrato de *B. tropicalis* e determinação do peptídeo sinal

O rBlo t 2.2 estava presente em todos os clones isolados do ácaro. Pelo menos 8 peptídeos originais foram identificados com uma gama de cobertura de 88,5%, com valores muito altos de scores na sequência não madura da proteína (Figura 7).

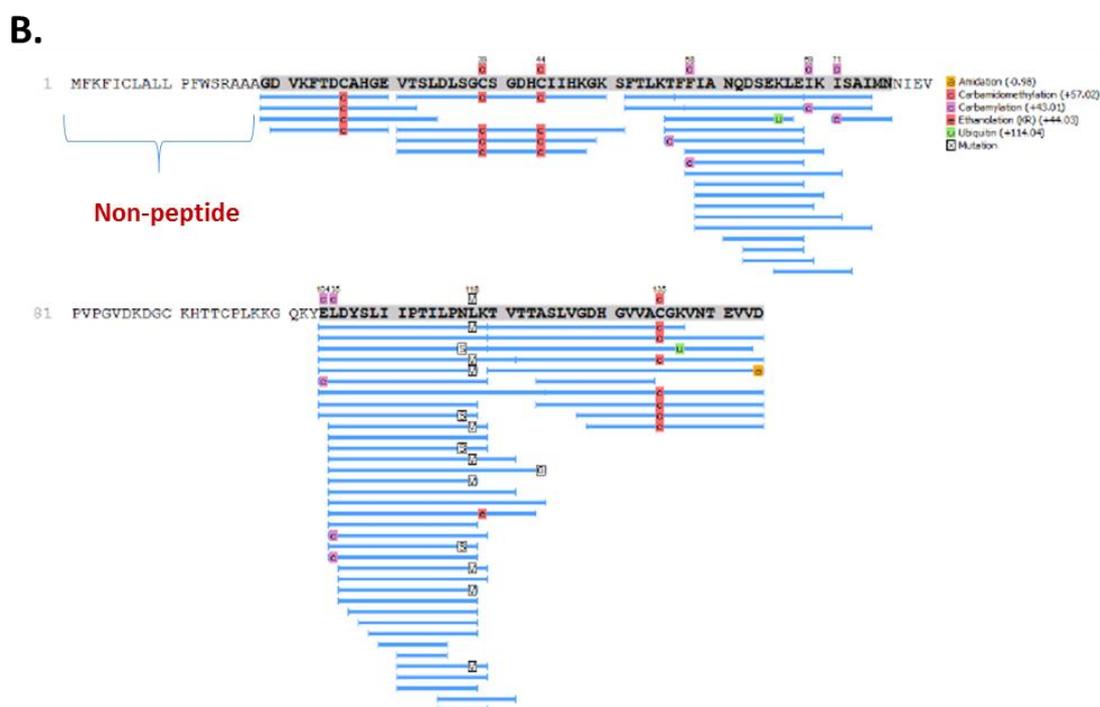
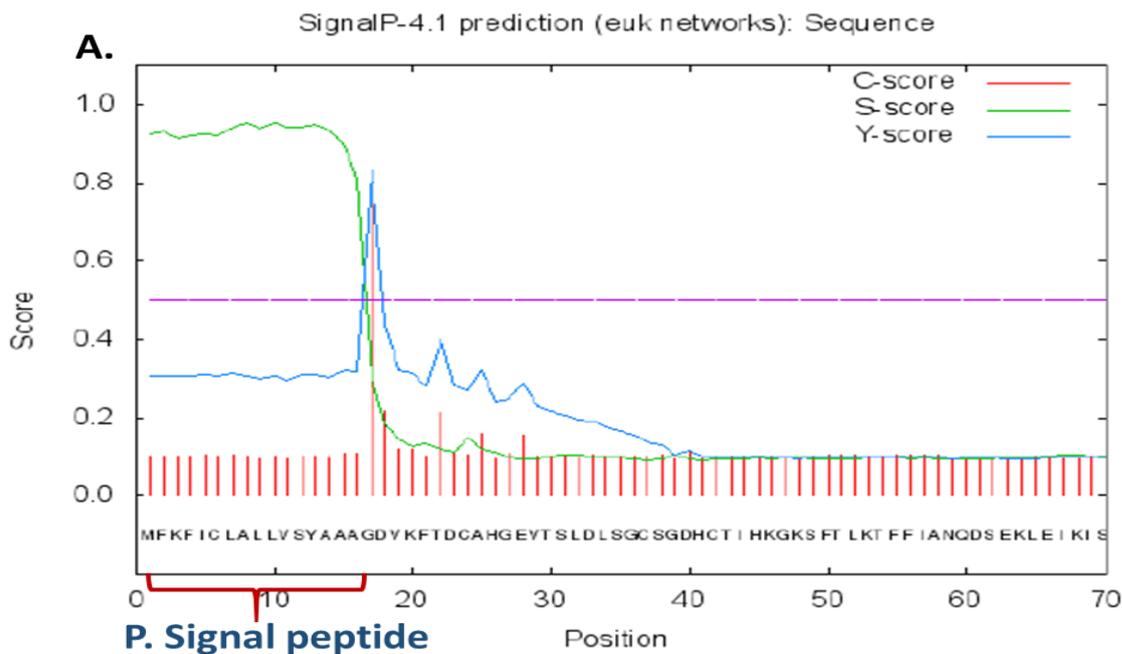
**Figura 7. Alinhamento dos peptídeos específicos na sequência de rBlo t 2.2 depois da digestão com tripsina do extrato de *Blomia tropicalis*.** Em azul: alinhamento dos peptídeos específicos de Blo t 2.2 depois da digestão.



A análise com espectrometria de massa, mostrou a presença da forma isoforma no extrato do ácaro, obtendo uma cobertura na sequência de peptídeos de 100% (Figura 7).

Para identificar se a sequência de rBlo t 2.2 reportada na UNIPROT tinha um peptídeo sinal, o extrato foi digerido com várias proteases (tripsina, quimiotripsina e Glu C). Em todos os casos, não houve peptídeo na região entre os aminoácidos 1-17, demonstrando que foi removido no processamento pós-traducional da proteína, dados que foram corroborados através de análise com o software SignalP 4.1® (Figura 8)

**Figura 8. Predição teórica e experimental do peptídeo sinal de Blo t 2. A).** Predição teórica do peptídeo sinal com o software Signal P-4.1 **B).** Alinhamento dos peptídeos específicos depois da digestão com GluC (protease) do extrato de *Blomia tropicalis* e a análise com espectrometria de massa



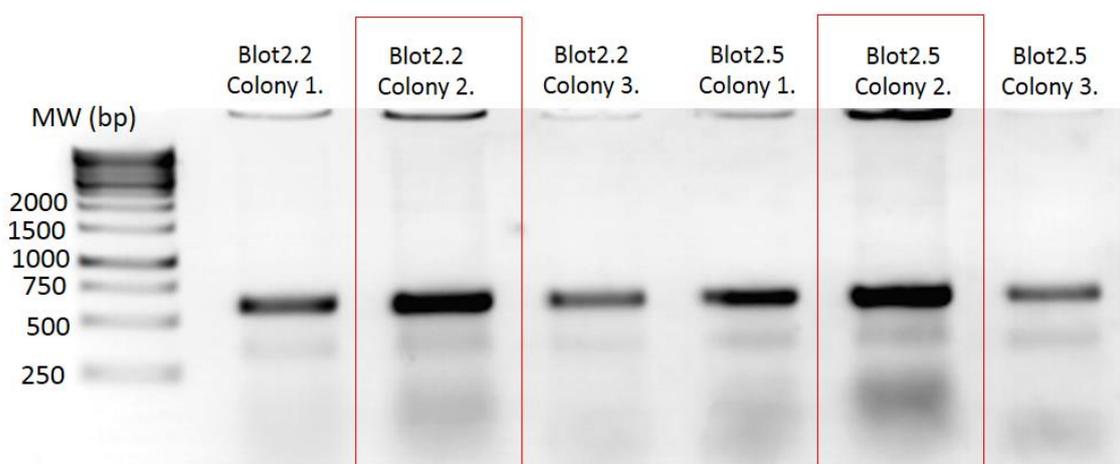
Predição teórica do peptídeo sinal com o software Signal P- 4.1 mostrou a presença de um possível peptídeo sinal na região de aminoácidos 1 a 17 aa; O alinhamento dos peptídeos específicos depois da digestão com GluC (protease) do extrato de *Blomia tropicalis* e a análise através de espectrometria de massa, mostrou

que não tinha um peptídeo específico nesta região, comprovando assim experimentalmente a predição teórica. A determinação do peptídeo sinal é importante para estabelecer a sequência madura da proteína (Figura 8).

## 5.2. Transformação e seleção dos clones positivos de Blo t 2.2 e 2.5

As sequências dos genes de Blo t 2.2 e Blo t 2.5 (construídas e clonadas no vetor de expressão pET 30a+) foram transformadas em bactérias competentes da cepa *E. coli Shuffle T7*. Posteriormente, as bactérias que receberam o vetor foram selecionadas pela reação em cadeia da polimerase. Pode-se observar que todas as colônias selecionadas, tinham um fragmento amplificado com tamanho do inserto (aproximadamente 600 bp) (Figura 9).

**Figura 9. Reação em cadeia da polimerase (PCR) de colônias de *E. coli Shuffle T7*, transformadas com os plasmídeos pET30a clonados com as sequências dos genes Blo t 2.2 e Blo t 2.5.** Primers universais T7 foram usados para a amplificação dos insertos. Todas as colônias analisadas foram positivas.

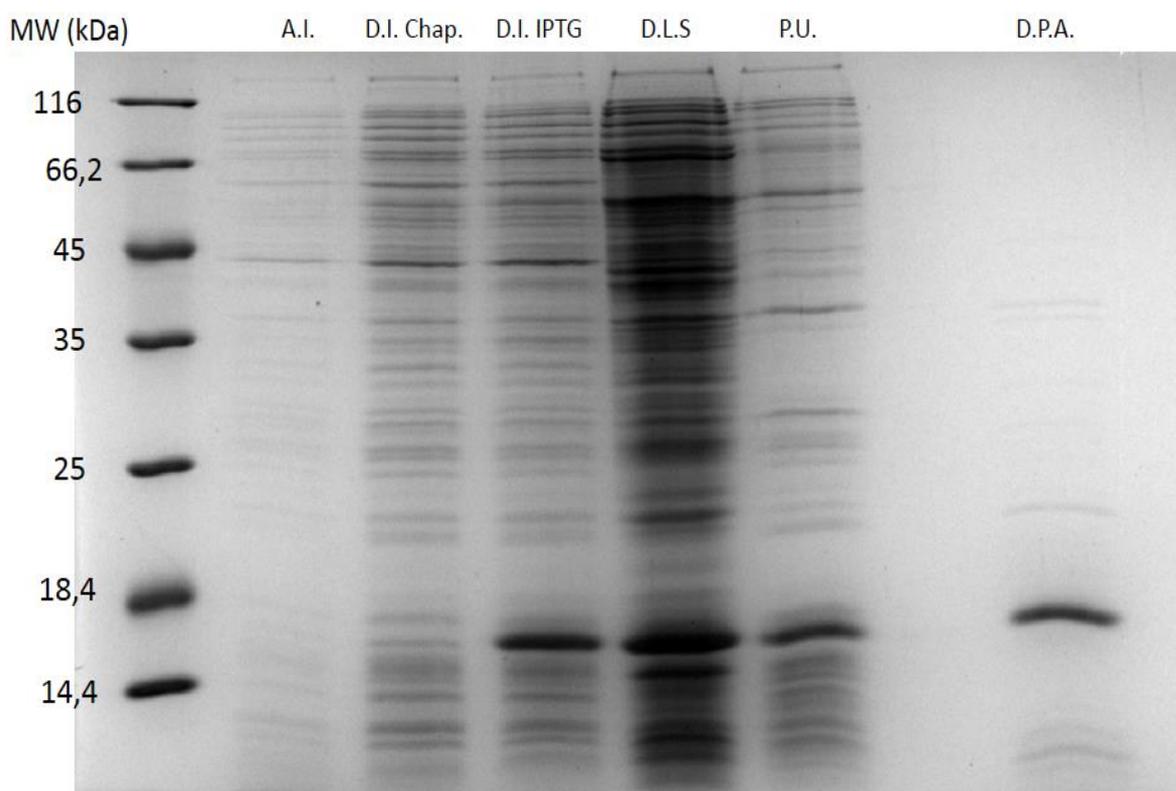


## 5.3. Expressão, purificação e caracterização físico-química de rBlo t 2.2

A proteína Blo t 2.2 foi expressa sob condições não desnaturantes e sem presença de cauda de histidina. Após realização de vários testes, para a padronização

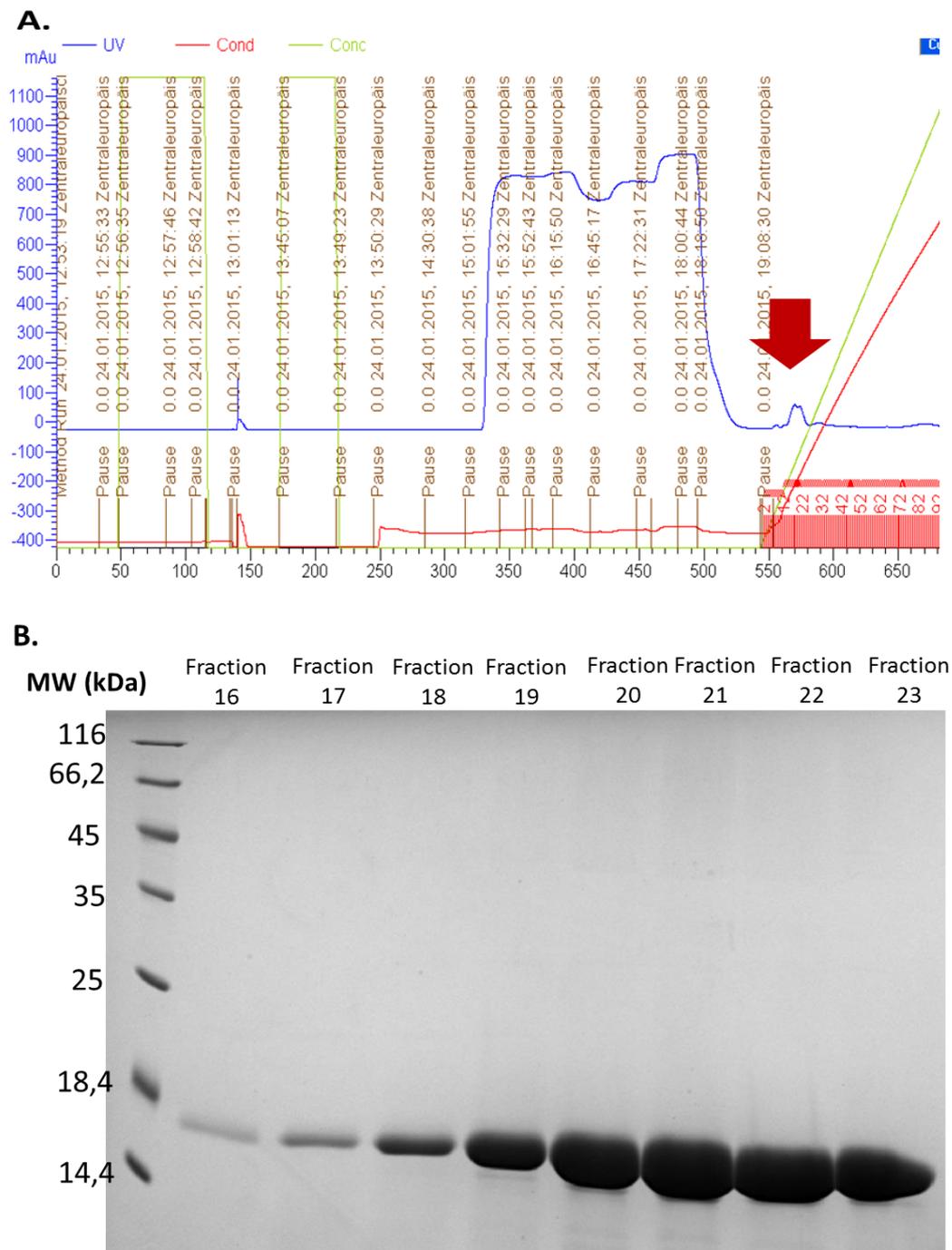
das melhores condições de expressão, os resultados foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, onde foi possível visualizar a existência da banda de interesse no peso molecular aproximado de 14 kDa, nos diferentes estágios da expressão proteica (Figura 10).

**Figura 10. Expressão e pré-purificação do alérgeno Blo t 2.2 na cepa *E.coli* Shuffle T7 co-transformada com chaperonas pG-KJE8.** Linhas: A.I.- Antes da indução; D.I. Chap. - Depois da indução das chaperonas pG-KJE8; D.I. IPTG - Depois da indução com IPTG 0,4mM; D.L.S- Depois da lise da bactéria (sobrenadante) com 50mM Tris/Cl pH:8,5; P.U. – sedimento bacteriano diluído em ureia 8M; D.P.A. - Depois da precipitação ácida com ácido acético (pré-purificação).



A proteína foi purificada por cromatografia de troca iônica, conforme observado em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, destacando a presença da proteína presente em várias frações do cromatograma (Figura 11).

**Figura 11. Purificação de rBlo t 2.2 utilizando cromatografia de troca iônica. A).** Cromatograma da purificação de rBlo t 2.2, em azul encontra-se a absorbância de UV 280mAU, em rosa a condutividade da amostra, em verde o gradiente de eluição da solução B. Na seta vermelha está indicado o pico de eluição de rBlo t 2. **B).** Frações do pico de eluição de rBlo t 2.2 analisadas em um gel de poliácridamida



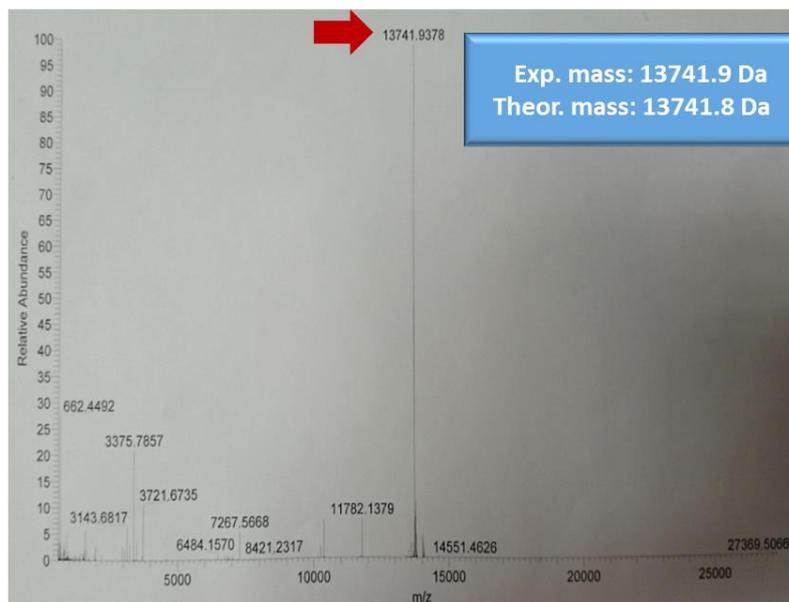
A purificação de Blo t 2 foi feita com o extrato pré-purificado (D.P.A), com o purificador de proteínas ÄKTA prime plus® e uma coluna HiTrapSephacrose FF (HiTrap SP FF) ® com um gradiente de 70% de NaCl 1M e volume final de 150 mL . A pós o analise com

SDS PAGE, observou-se as frações puras da proteína com bandas nos 14kDa (Figura 11).

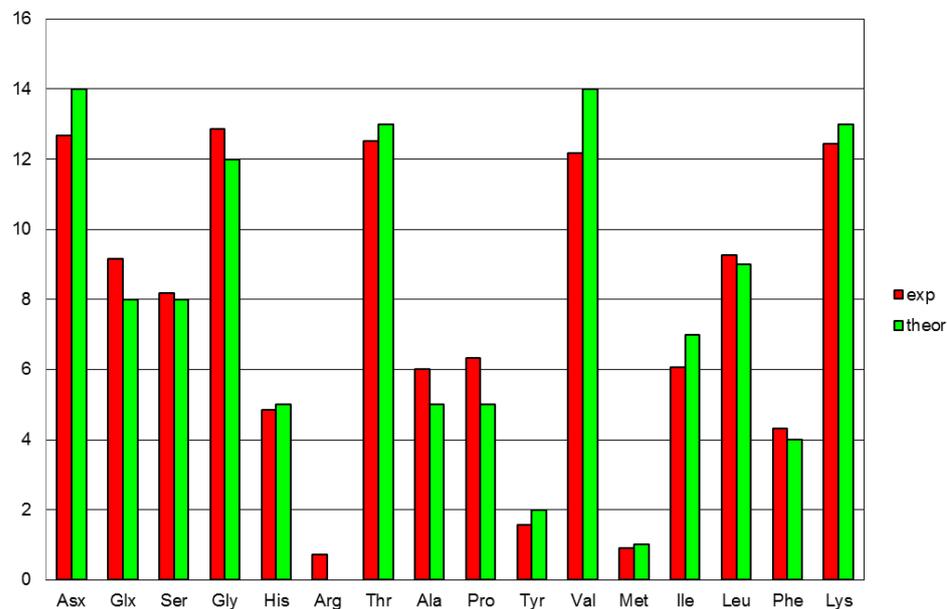
Os parâmetros físico-químicos importantes para a caracterização de proteínas estão bem estabelecidos na literatura. Para confirmar o peso molecular experimental e a pureza do recombinante Blo t 2.2 foi realizado o análise por LC-HPLC MS/MS das frações purificadas da proteína recombinante. A purificação da proteína foi eficiente, visto que na avaliação com MS/MS foi possível visualizar um pico na região de 13741.9 Da, resultado condizente com a predição teórica (13741.8 Da). Além disto foi avaliada a composição experimental de aminoácidos da proteína recombinante por HPLC, mostrando correlação com os dados teóricos (Figura 12).

**Figura 12. Espectro de massa e composição relativa de aminoácidos de rBlo t 2.2. A).** O espectro de massa obtido por HPLC MS/MS mostrou um pico de massa de 13741.9 **B).** Composição relativa de aminoácidos e concentração do rBlo t 2.5 analisado por HLPC.

**A.**



**B.**

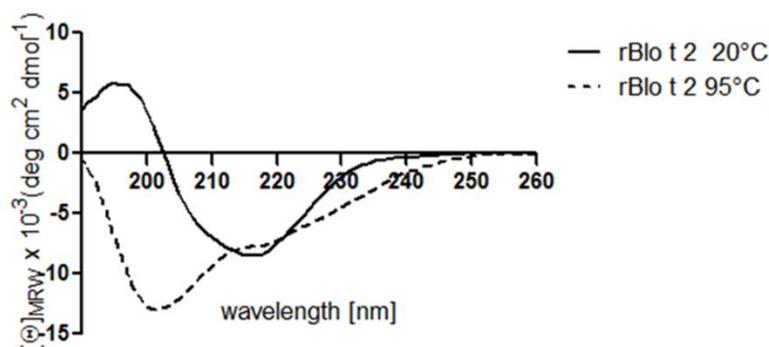


Os elementos da estrutura secundária e a determinação da estabilidade térmica de rBlo t 2.2 foram medidos por CD e FTIR. No caso da medição do CD, obtive-se um espectro típico para proteínas com conteúdo misturado de folha  $\beta$ /hélices  $\alpha$  (com bandas negativas a 218 nm e bandas positivas a 195 nm). No caso do espectro

de FTIR, revelou-se uma absorção de amida I perto de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , característico das estruturas de folha beta anti- paralela (Figura 13).

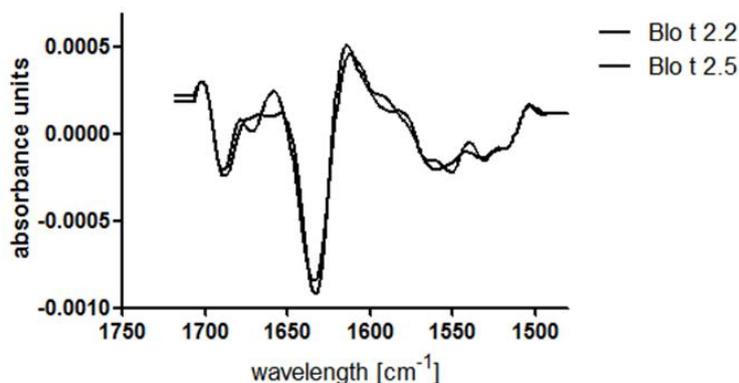
**Figura 13. Componentes de estrutura secundária do rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5** **A).** Dicroísmo circular (CD). **B).** A porcentagem de elementos de estrutura secundária por espectrometria infravermelha após transformação de Fourier (em inglês: FTIR).

**A.**



**B.**

Amide I and II at 25 °C vector normalized 2nd derivative



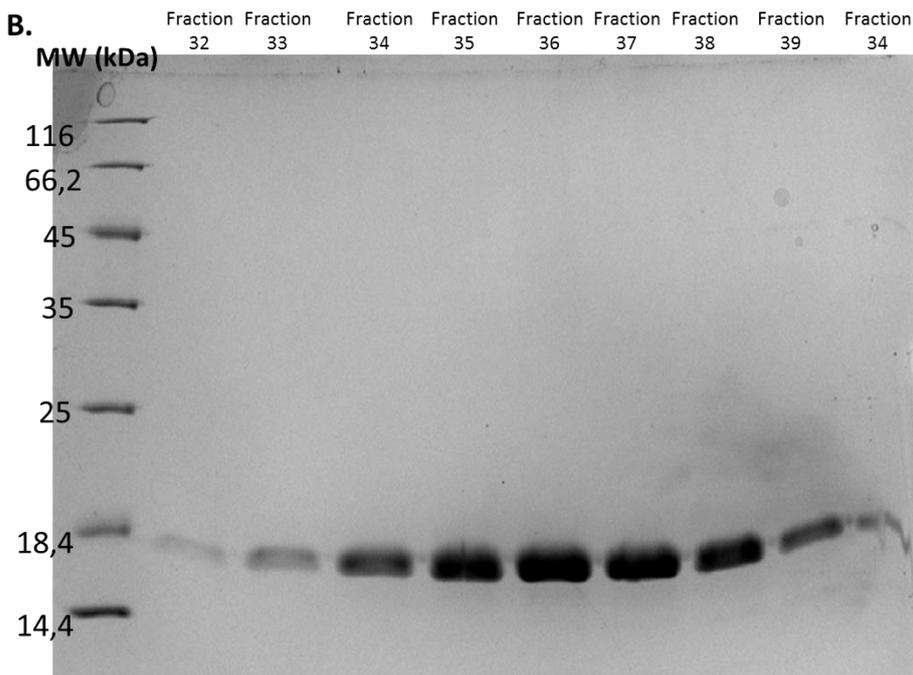
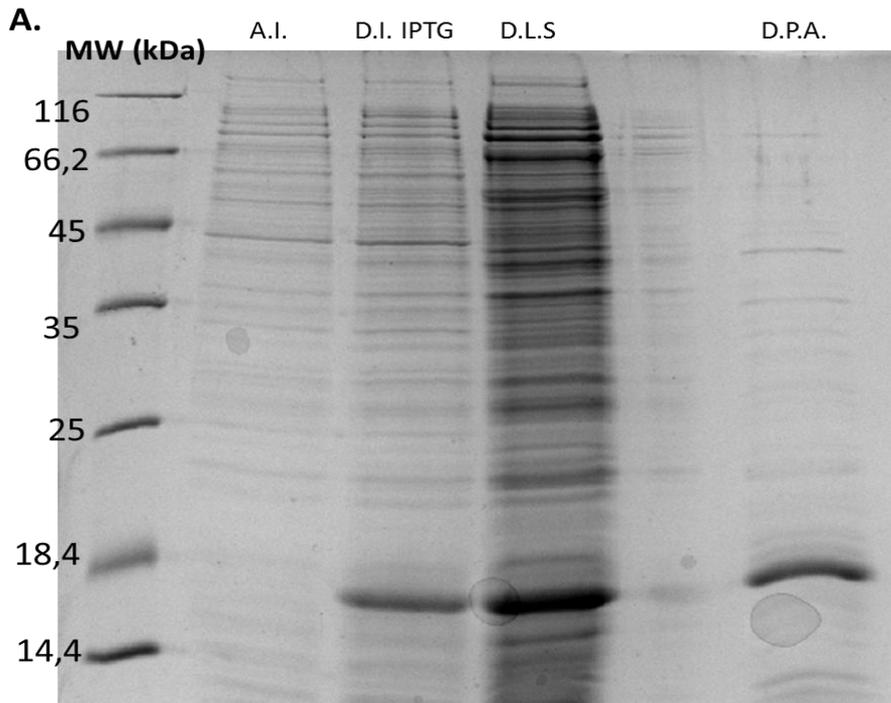
Blo t 2.2 sample	Blo t 2.2 sample	beta-sheet-4c	beta-sheet	50.944	%
Blo t 2.5 sample	Blo t 2.5 buffer	beta-sheet-4c	beta-sheet	54.516	%

O espectro de rBlo t 2 foi típico para proteínas com um conteúdo misturado de folhas  $\beta$  e  $\alpha$  hélices. A porcentagem de elementos de estrutura secundária foram determinados por espectrometria infravermelha após transformação de Fourier (em inglês: FTIR). Os sinais do espectro foram principalmente em regiões correspondentes a elementos em folhas  $\beta$  com 50,9 % para rBlo t 2.2 e 54,5% para rBlo t 2.5 (Figura 13).

#### **5.4. Expressão, purificação e caracterização físico-química de rBlo t 2.5**

Similar ao caso de rBlo t 2.2., o recombinante Blo t 2.5 foi expresso sob condições não desnaturantes e sem presença de cauda de histidina. No entanto, após realização de vários testes, foi possível expressar a proteína recombinante sem presença de chaperonas. Os resultados foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% (Figura 14).

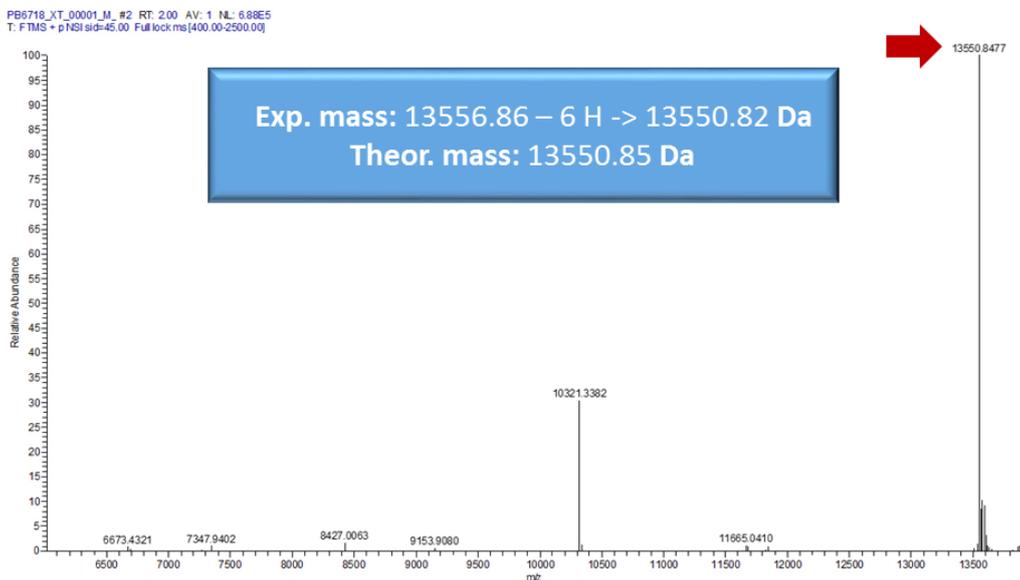
**Figura 14. Expressão na cepa E. coli Shuffle T7 e purificação do alérgeno rBlo t 2.5** **A).** Expressão e pré-purificação do alérgeno rBlo t 2.5; Linhas: A.I. - Antes da indução; D.I. IPTG - Depois da indução com IPTG 0,4mM; D.L.S. - Depois da lise da bactéria (sobrenadante) com 50mM Tris/Cl pH:8,5; D.P.A. - Depois da precipitação ácida com ácido acético (pré-purificação). **B).** Purificação de rBlo t 2.5 usando cromatografia de troca iônica. Frações do pico de eluição de rBlo t 2.2 analisadas em um gel de poliacrilamida



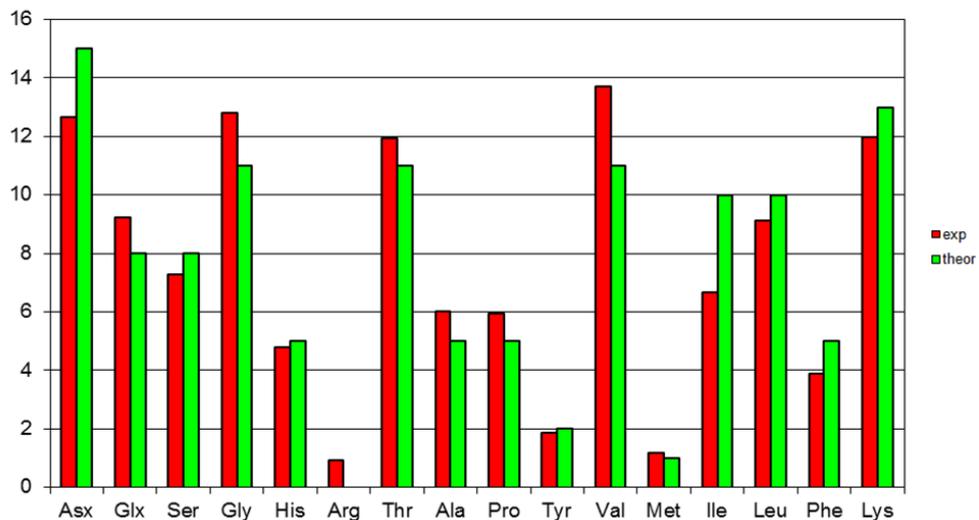
O espectro de massa experimental da molécula rBlo t 2.5 das frações purificadas do recombinante mostrou uma purificação da proteína eficiente, visto que na avaliação com MS/MS foi possível visualizar um pico na região de 13550.82 Da, similar com o peso molecular teórico da proteína sem os 6 hidrogênios das cisteínas (13550.85 Da) (Figura 15).

**Figura 15. Espectro de massas e composição relativa de aminoácidos de rBlo t 2.5** **A).** O espectro de massa obtido por HPLC MS/MS mostrou um pico de massa de 13550.82 Da. **B).** Composição relativa de aminoácidos e concentração do rBlo t 2.5 foram analisadas por HLPC.

**A.**



**B.**



### **5.5. Caracterização das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteínas de rBlt 2.**

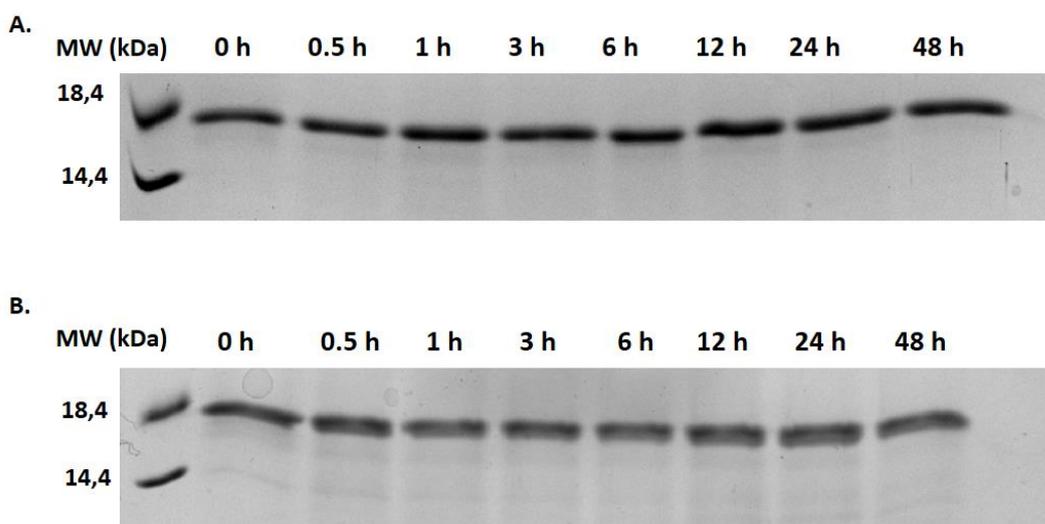
Como foi previamente dito, as pontes dissulfeto são importantes para manter a estrutura da proteína no caso dos alérgenos do grupo 2. Portanto, foi realizada a caracterização dessas pontes, utilizando espectrometria de massa; após a análise sem tratamento redutor, não observou-se peptídeo linear nas regiões onde as cisteínas estão envolvidas na formação das pontes dissulfeto. Logo depois, os peptídeos não lineares, foram avaliados por MS/MS confirmando-se o peso molecular teórico predito (13550.82 Da) (Figura 16, B e C)



## 5.6. Ensaio de degradação proteolítica de rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5 com microssomas isolados de células dendríticas JAWII

Também foi feito um ensaio de estabilidade proteolítica de Blo t 2.2 e Blo t 2.5 incubando as proteínas recombinantes com proteases isoladas dos microssomas de uma linhagem de células dendríticas de camundongos em diferentes tempos. Ambas proteínas mostraram uma boa estabilidade depois de 48 horas de incubação (Figura 17).

**Figura 17. Ensaio de degradação endo-lisossomal dos recombinantes de Blo t 2.2 e Blo t 2.5.** O ensaio de estabilidade determinado pela incubação das proteínas recombinantes com proteases isoladas dos microssomas de uma linhagem de células dendríticas de camundongos (linhagem JAWII) em diferentes tempos. A). Ensaio usando o recombinante rBlo t 2.2. B). Ensaio usando o recombinante rBlo t 2.5.

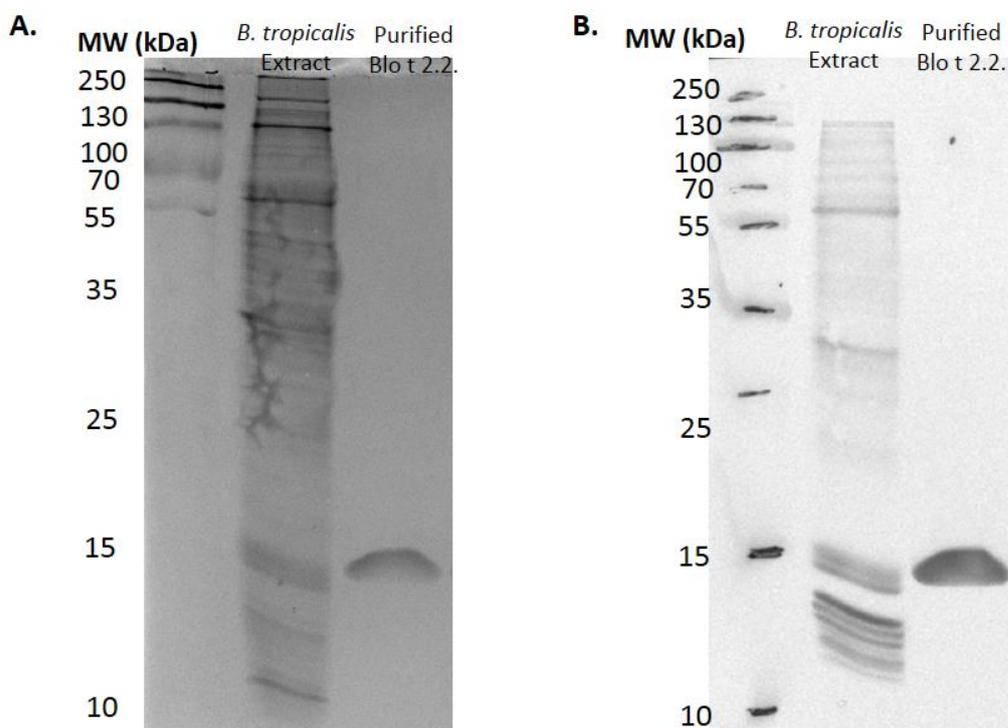


**A).** Ensaio usando o recombinante rBlo t 2.2. **B).** Ensaio usando o recombinante rBlo t 2.5.

### 5.7. Immunoblotting para avaliação da reatividade de Blo t 2.2 em soros de pacientes alérgicos ao extrato total do ácaro *B. tropicalis*

Com a finalidade de testar o alérgeno recombinante quanto à imunorreatividade com soros de pacientes alérgicos ao ácaro *B. tropicalis* foram feitos vários testes. Primeiramente, alíquotas da proteína rBlo t 2.2, bem como o extrato total de *B. tropicalis* foram imobilizados em membrana de nitrocelulose por eletrotransferência a partir de um gel SDS-PAGE 15% e incubados com uma mistura de 10 soros de pacientes alérgicos à *B. tropicalis* diluídos a 1:10. Observou-se, que a banda de interesse foi reconhecida pela IgE presente nos soros (Figura 18).

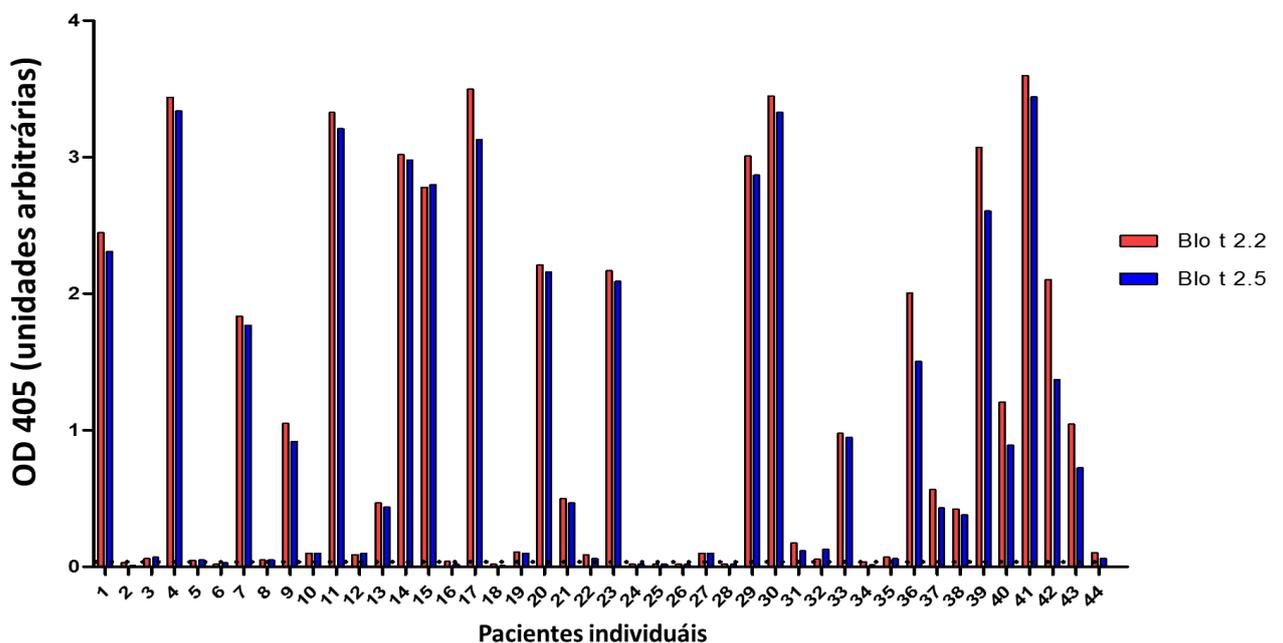
**Figura 18. Immunoblotting de *Blomia tropicalis* e rBlo t 2.2 A).** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de transferência revelado com Coomassie-blue **B).** Immunoblotting de *Blomia tropicalis* e rBlo t 2 usando um pool de 10 soros (1:10).



## 5.8. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliação da reatividade dos antígenos recombinantes rBlo t 2.2 e rBlo t 2.5

Posteriormente, analisou-se a reatividade IgE específica de 44 soros de pacientes alérgicos a *B. tropicalis* (com títulos de IgE >0.35 kUA/L determinado pelo sistema ImmunoCAP®). Observou-se que Blo t 2.2 e Blo t 2.5 apresentam uma boa reatividade de IgE nos pacientes, e pelo menos 24 dos soros analisados foram IgE positivos aos alérgenos (54 %). No entanto, mesmo que as duas isoformas diferem na suas sequencias por 6 aminoácidos, os dados mostram uma semelhança muito alta na reatividade IgE entre ambas proteínas (Figura 19).

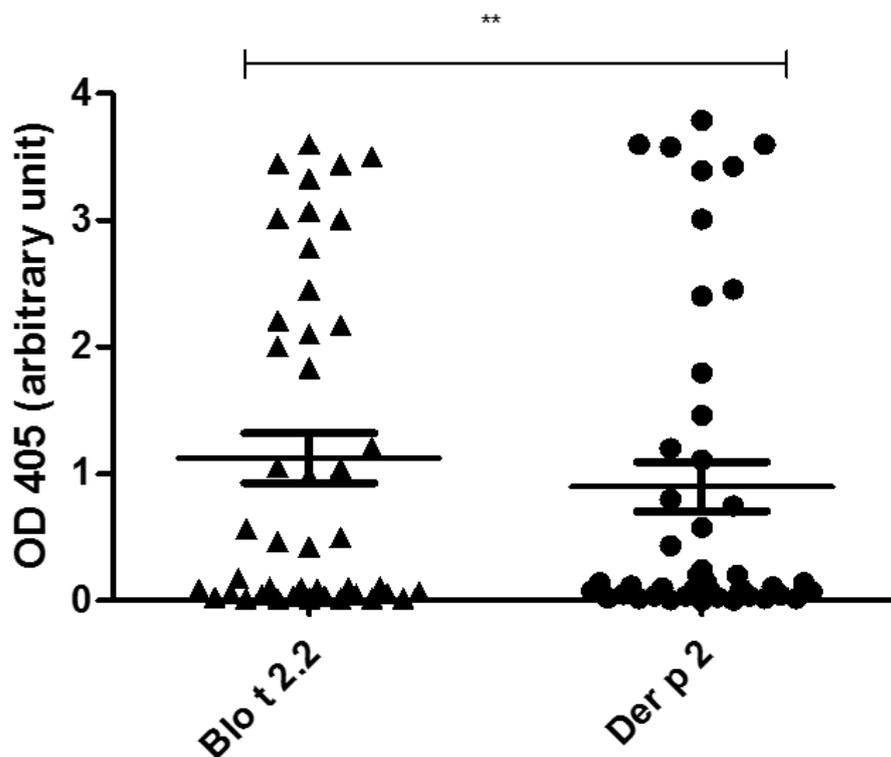
**Figura 19. Ensaio de ELISA usando soros de pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis*.** Os soros de 44 pacientes alérgicos ao extrato de *Blomia tropicalis* foram usados para avaliar a resposta IgE específica aos alérgenos recombinantes Blo t 2.2 e Blo t 2.5



### 5.9. ELISA para avaliar a reatividade entre rBlo t 2 e Der p 2.

Após a análise da imunoreatividade de Blo t 2.2 e Blo t 2.5 foi comparada a reatividade IgE entre os alérgenos Blo t 2 e Der p 2, observando-se uma maior reatividade de IgE para o primeiro, no entanto, os pacientes foram selecionados baseados na soropositividade para *Blomia tropicalis*. (Figura 20).

**Figura 20. Ensaio de ELISA comparando a reatividade IgE entre rBlo t 2.2 e rDer p 2.** Os soros de 44 pacientes sensibilizados ao extrato total de *Blomia tropicalis* foram usados para comparar a resposta IgE específica aos alérgenos recombinantes Blo t 2.2 e seu homólogo Der p 2. \*\*  $p < 0.005$

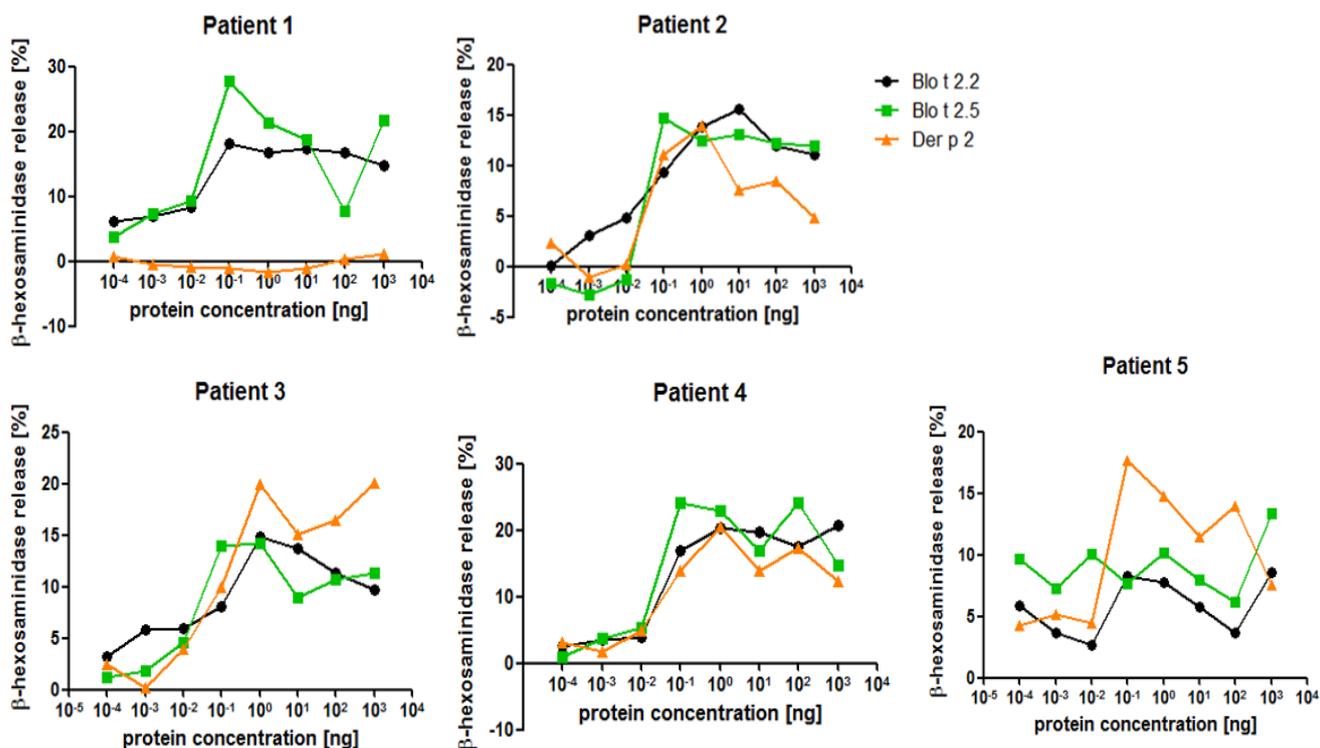


### 5.10. Ensaio de liberação de mediadores inflamatórios em basófilos humanizados de rato utilizando Blo t 2.2, Blo t 2.5 e Der p 2.

A fim de testar a funcionalidade biológica das proteínas alergênicas num sistema *in-vitro* celular, os recombinantes foram incubados com basófilos

humanizados de rato (huRBL) e soros de pacientes alérgicos a *B. tropicalis*. Observou-se que os alérgenos induziram a liberação de mediadores inflamatórios em diferentes concentrações da proteína (Figura 21).

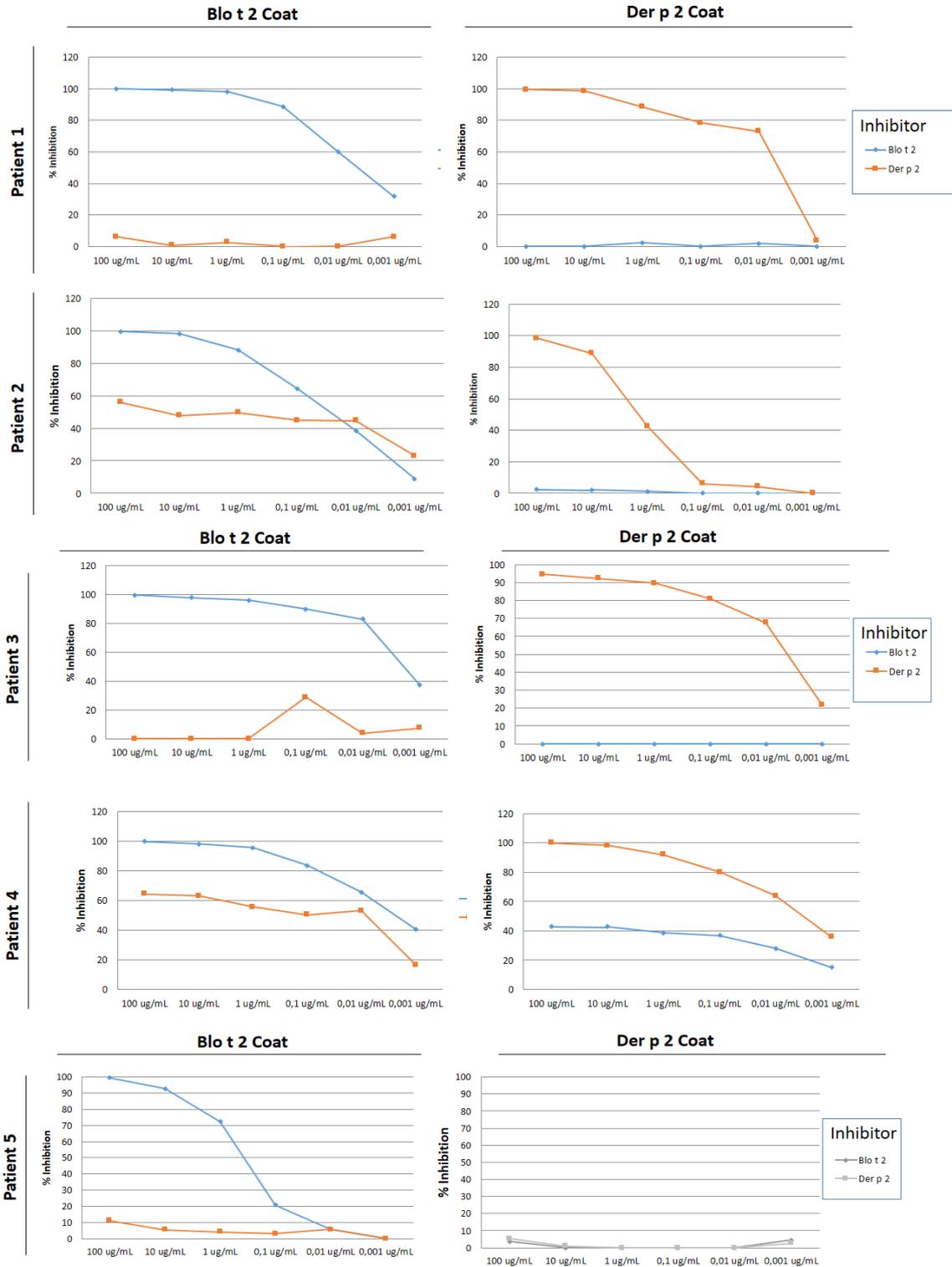
**Figura 21. Ensaio de medição de degranulação de basófilos humanizados de rato (huRBL).** O ensaio de medição de liberação de mediadores inflamatórios usando basófilos de rato humanizados (huRBL) foi realizado com o soro de 5 pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis* (Classe 3 no sistema ImmunoCAP (>3,5 kUI/L).



### **5.11. ELISA de inibição para avaliar a reatividade cruzada entre rBlo t 2 e Der p 2.**

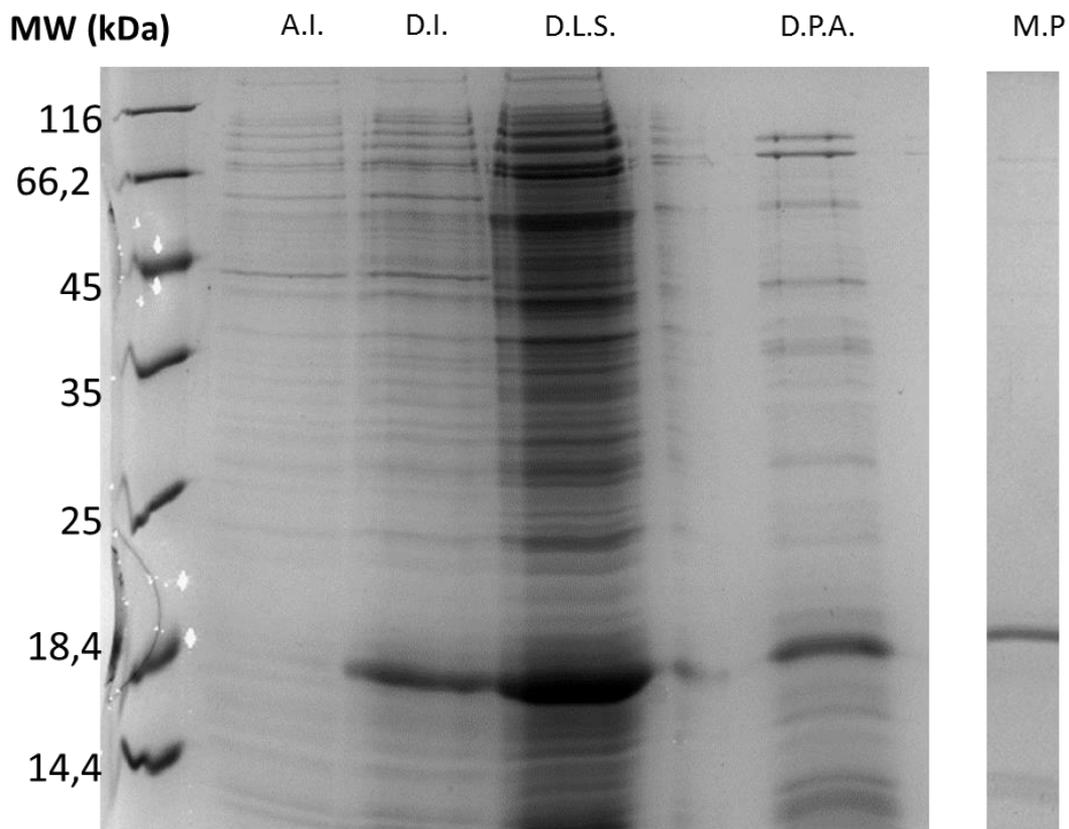
Foi também avaliada mediante ELISA de inibição, a reatividade cruzada entre os alérgenos Der p 2 e Blo t 2 utilizando soros individuais de pacientes alérgicos para ambas proteínas. Os nossos dados mostram uma baixa reatividade entre ambas proteínas (Figura 22).

**Figura 22. Análise da reatividade cruzada entre Blo t 2 e Der p 2.** Ensaio de ELISA de inibição entre Blo t 2.2 e Der p 2 usando o soro de 5 pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis* e positivos a Blo t 2.

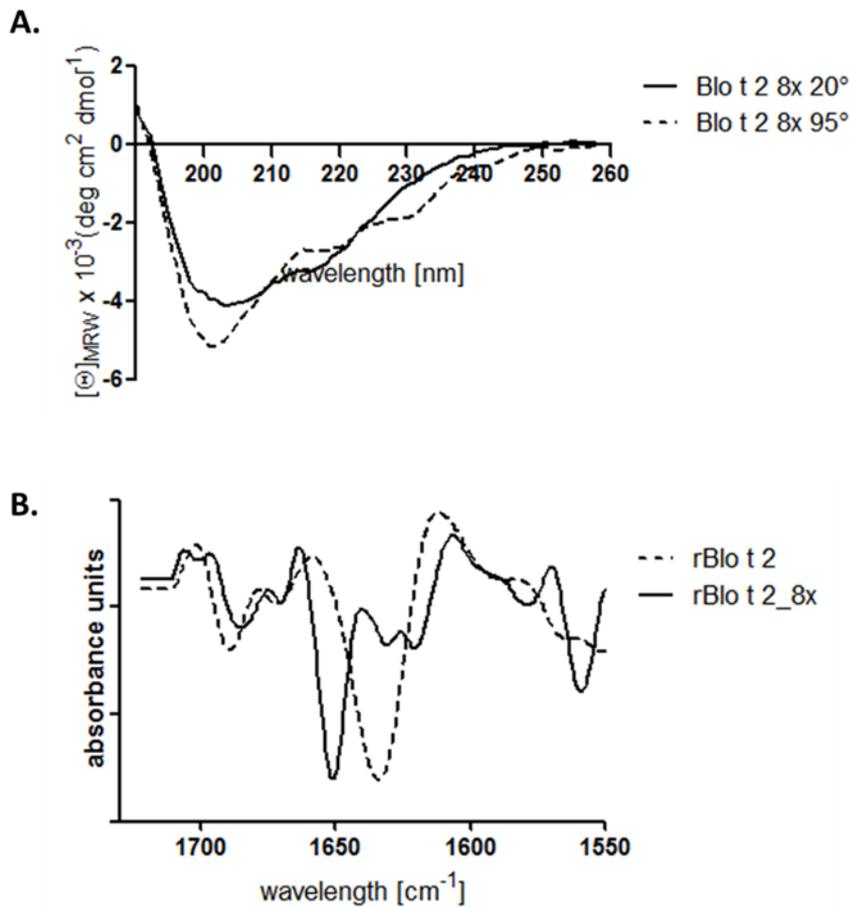


## 5.12. Expressão, purificação e caracterização físico-química do mutante rBlo t 2\_8X

**Figura 23. Expressão e purificação do hipovalgênico de rBlo t 2 na cepa E.coli Shuffle T7.** A proteína foi purificada em condições não redutoras e sem uso de calda de Histidina. Linhas: A.I., Antes da indução com IPTG 0,4mM; D.I., Depois da indução com IPTG 0,4mM; D.L.S, Depois da lise da bactéria (sobrenadante) com 50mM Tris/Cl pH:8,5 e 0,5 M UREA; D.P.A, Depois da precipitação ácida com Ácido acético 100%; M.P. mutante purificado através de cromatografia de troca iônica e exclusão por tamanho



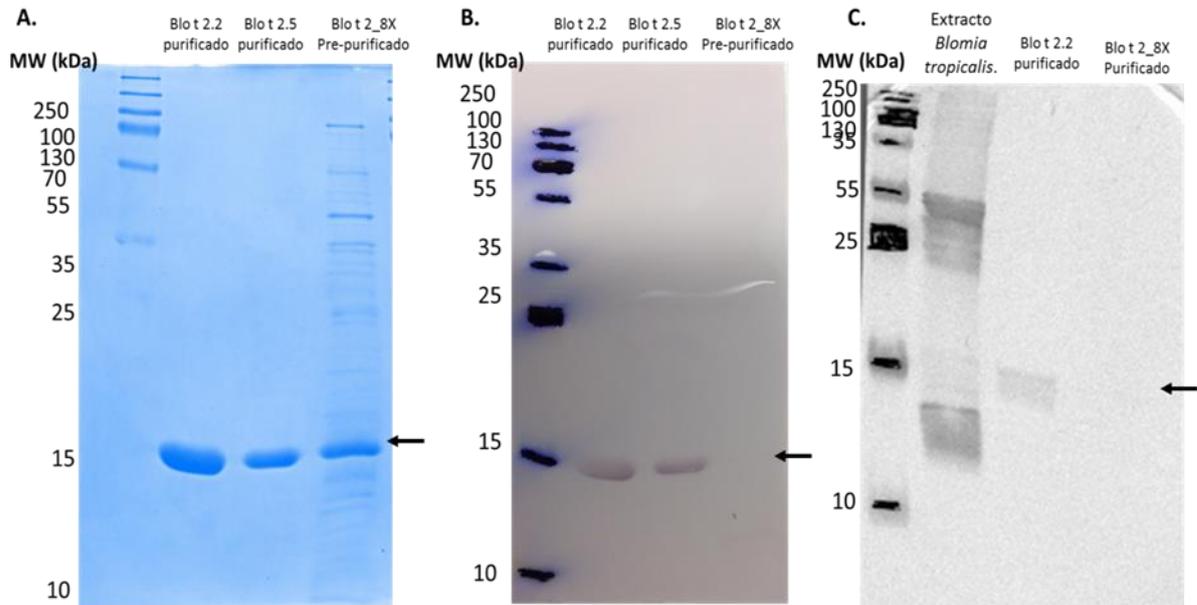
**Figura 24. Medição dos componentes de estrutura secundária do mutante de rBlo t 2 (rBlo t 2\_8X). A).** Dicroísmo circular (CD): O espectro foi medido a 20°C e 95°C numa cuba de 10 mm.. **B).** As porcentagens de elementos de estrutura secundária foram determinados por espectrometria infravermelha após transformação de Fourier (Em inglês: FTIR)



A proteína recombinante mutante exibiu uma conformação mais desordenada do que o recombinante selvagem; Os sinais do espectro foram principalmente em regiões correspondentes a elementos sem ordem e em folhas-β com 25,4% (Figura 24).

### 5.13. Caracterização imunológica do mutante rBlo t 2\_8X

**Figura 25. Immunoblotting do antígeno hipoaergênico mutante rBlo t 2\_8X** utilizando uma mistura de 6 soros de pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis* **A)** O SDS-PAGE de transferência revelado com Coomassie blue. **B) e C)** Membranas de nitrocelulose transferidas, bloqueadas, incubadas com soros e com um anticorpo de camundongo Anti-IgE humana (1:1000) conjugado com fosfatase alcalina.

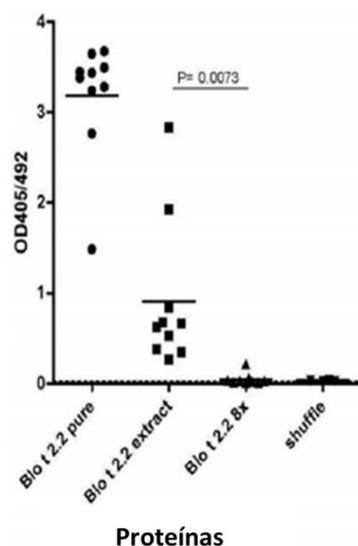


A banda do alérgeno selvagem (rBlo t 2.2) foi visualizada usando os substratos de revelação NBT e BCIP, mostrando uma forte reação. O alérgeno mutante de rBlo t 2\_8X não mostrou uma reatividade a IgE tanto no extrato, como o purificado em comparação com as duas isoformas do alérgeno selvagem (Blo t 2.2 e Blo t 2.5)

**Figura 26. Ensaio de ELISA e huRBL utilizando soros de pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis* para avaliar a baixa reatividade IgE ao mutante rBlo t 2\_8X. A). ELISA usando soros de pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis* B). Ensaio de medição de liberação de mediadores inflamatório usando basófilos de rato humanizados (huRBL).**

**A.**

n=10  
Concentração  
proteína: 2µg/mL



**Media absorbância (OD<sub>405</sub>):**

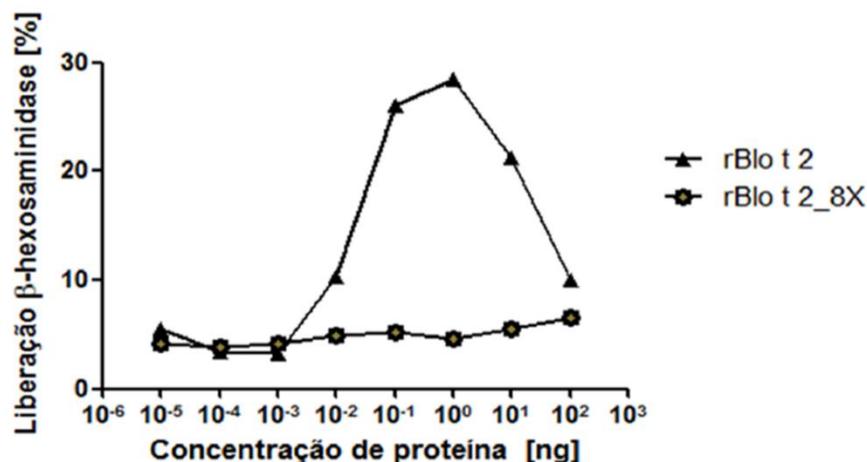
rBlo t 2 puro: 3.18  
rBlo t 2 extrato: 0.83  
rBlo t 2\_8X: 0.041  
Shuffle extrato  
(bacteria): 0.034

**Pacientes não alérgicos**

**(Dados não mostrados):**

rBlo t 2 puro: 0.012  
rBlo t 2 extrato: 0.021  
rBlo t 2\_8X: 0.002

**B.**



No ELISA observou-se a reatividade de IgE do rBlo t 2 nativo e rBlo t 2 mutante, mostrando diferenças estatisticamente significativas entre o alérgeno selvagem (rBlo t 2) e o mutante (rBlo t 2\_8X). No Ensaio de medição de liberação de mediadores inflamatório usando basófilos de rato humanizados (huRBL). O mutante de Blo t 2 (rBlo t 2\_8X) não teve a capacidade de degranular os basófilos em comparação com o alérgeno nativo (rBlo t 2) (Figura 25).

#### 4. Discussão

Os alérgenos do grupo 2 são descritos como alérgenos importantes em várias espécies de ácaros da poeira, uma vez que representam quase 70 % da reatividade de IgE dos extratos de *Dermatophagoides* spp (WEGHOFER *et al.*, 2008). O grupo 2 dos alérgenos de *B. tropicalis* têm várias isoformas descritas a nível de transcriptoma, porém, até o presente momento, apenas uma delas foi testada, no entanto, esta proteína foi obtida insolúvel e com baixa reatividade de IgE (CHRISTOPHEL *et al.*, 2002). Neste trabalho, obtivemos duas formas isoformas recombinantes do Blo t 2, analisamos a reatividade IgE e alergenicidade *in vitro* das mesmas. Além disso, avaliamos pela primeira vez, a reatividade cruzada do Blo t 2 com o alérgeno Der p 2 de *D. pteronyssinus*.

A baixa reatividade (19%) de IgE reportada por Kidon e colaboradores (KIDON *et al.*, 2011) pode ser devido a duas possibilidades. Em primeiro lugar, as proteínas foram obtidas neste estudo como corpos de inclusão e purificadas com condições redutoras, de modo que, o alérgeno pode perder sua conformação estrutural e diminuir o reconhecimento da IgE pelos epítomos conformacionais da proteína. Em segundo lugar, talvez nessa população não exista um grau alto de sensibilização pelo alérgeno como no caso da população de Salvador-Bahia. De tal forma que é necessário estabelecer contatos com outros grupos de pesquisa da área, para tentar replicar estes resultados em outras populações

Um enovelamento correto das proteínas é importante para a estabilidade estrutural e função das proteínas recombinantes utilizadas nos métodos diagnósticos ou terapêuticos. No caso dos alérgenos, a estabilidade é crucial para o reconhecimento dos epítomos de tipo conformacionais pela IgE (SEN *et al.*, 2002); esses epítomos são formados pelas estruturas secundária, terciária ou quaternária das proteínas, que por sua vez estão unidos mediante forças ou interações que ajudam na criação das mesmas como os pontes de hidrogênio, interações iônicas, pontes dissulfeto etc. O Blo t 2 tem seis resíduos de cisteínas bastante conservadas envolvidos na formação de pontes de dissulfeto, importantes para a conformação estrutural e a estabilidade

do alérgeno Der p 2, Der f 2 e demais proteínas com o motivo MD-2 (GAFVELIN *et al.*, 2001). Portanto a expressão utilizando sistemas heterólogos, como é o caso do presente estudo, deve garantir que as propriedades da proteína selvagem sejam conservadas. Neste sentido, no presente estudo, utilizamos uma cepa de *E. coli* Shuffle T7<sup>®</sup> que permite a formação de pontes dissulfeto os quais, evolutivamente, não são produzidos em sistemas procariotos como a *E. coli*; além disso no caso de Blo t 2.2, o clone foi co-transformado com um set de plasmídeos que codificam para proteínas chaperones pG-KJE8<sup>®</sup> que ajudam no enovelamento correto das proteínas (NISHIHARA *et al.*, 1998). Neste estudo, a formação das pontes dissulfeto no alérgeno rBlo t 2 foi corroborada por espectrometria de massas, utilizando um sistema para a detecção por digestão planejada com tripsina e condições redutoras e não redutoras (NA *et al.*, 2015). O mesmo sistema de detecção das pontes foi utilizado por Bordas-Le Floch e cols. para o alérgeno homólogo Der p 2 produzido em *Pichia pastoris*, observando-se os três pontes dissulfeto formados por ligações covalentes entre os resíduos 21 e 27, 73 e 78, e 8 e 119 (BORDAS-LE FLOCH *et al.*, 2012), dados similares aos reportado por Derewenda y cols utilizando ressonância magnética nuclear (NRM) que é o método padrão de detecção de estrutura terciária nas proteínas (DEREWENDA *et al.*, 2002). Também foi observado, que o Blo t 2 apresenta espectro de CD de proteína estável, com uma conformação preferente de folhas  $\beta$ -antiparalelas (hélices  $\beta$ ) com bandas negativas a 218 nm e bandas positivas a 195 nm (GREENFIELD, 2006), resultados similares ao obtido com outras proteínas homologas como o Der p 2 (BORDAS-LE FLOCH *et al.*, 2012).

Neste estudo foi testada a susceptibilidade à degradação proteolítica do alérgeno Blo t 2, baseado num estudo feito por Ferreira e cols. que mostrou como a degradação proteolítica pode ser um marcador *in vitro* para conhecer a imunogenicidade de uma proteína. Segundo os autores, os antígenos que exibem uma fraca capacidade de ativação de células T *in vivo* foram altamente susceptíveis às proteases endolisossômicas *in vitro* isoladas de células dendríticas murinas da linha celular JAW II. Este estudo constitui assim, um rápido e simples ensaio que pode ajudar a substituir, reduzir e refinar experimentos com animais na investigação de alergias e desenvolvimento de vacinas em geral. (EGGER *et al.*, 2011). O rBlo t 2 produzido neste trabalho mostrou uma alta resistência a degradação proteolítica inclusive depois

de 48 horas de incubação com proteases isoladas da mesma linha celular JAW II, mostrando um ser um bom candidato imunogênico.

Neste estudo também avaliou-se a alergenicidade funcional dos recombinantes de Blo t 2,2 e t 2,5 num sistema celular *in vitro*, utilizando uma linhagem celular de basófilos humanizados de ratos (huRBL), que foram transfectadas com o receptor de elevada afinidade da IgE humana. O sistema celular huRBL é um método de medição biológico funcional, validado e padronizado, que permite medir objetivamente a alergenicidade dos antígenos *in vitro* utilizando o soro dos pacientes. Tal ensaio torna-se uma alternativa aos métodos imunológicos (ELISA ou Immunoblotting) que não fornecem a informação necessária sobre a capacidade de uma proteína para induzir reações alérgicas tipo I (FALCONE *et al.*, 2015). As duas isoformas de rBlo t 2 tiveram a capacidade de induzir o crosslinking das IgE ligadas aos receptores com os alérgenos, e a subsequente liberação de mediadores inflamatórios. A maior liberação de mediadores estava na gama de concentrações de 0,1 µg/ml a 1 µg/mL do alérgeno Blo t 2 com uma percentagem de liberação do 10% a 30% de β-hexoaminidase, mostrando assim, a sua capacidade biológica funcional de degranular células pro-inflamatórias. Até então não há dados na literatura de estudos similares utilizando huRBL com alérgenos de ácaros da poeira; no entanto, tem outros estudos com extratos alergênicos de baratas (<10% liberação de β-hexoaminidase), e alérgenos recombinantes purificado como os pólen de abedul ou bétula (<40% liberação de β-hexoaminidase) (NOWAK-WEGRZYN; BENCHARITIWONG; SCHWARZ, 2009; WALLNER *et al.*, 2009)

Neste estudo observamos uma reatividade cruzada limitada (>40%) entre rDer p 2 e rBlo t 2, o qual corrobora outro estudo utilizando alérgenos do grupo 2 (GAFVELIN *et al.*, 2001); neste estudo comparou-se a reatividade cruzada de Der p 2 e outros alérgenos como Gly d 2 e Lep d 2 mostrando uma reatividade cruzada baixa. Este resultado pode ser devido ao fato de alérgenos virem de diferentes famílias de ácaros, *Pyroglyphidae* (*Dermatophagoides spp*) e *Glyciphagoide* (*Lepidoglyphus destructor* e *Glyciphagus domesticus*). Embora a homologia na sequência de aminoácidos entre o Der p 2 e os alérgenos das outras famílias de ácaros seja de apenas 40%, os

modelos de estrutura 3-D preditos e experimentais, são idênticos dentre os membros do grupo 2, (pelas pontes dissulfeto conservadas). A maioria das diferenças na sequência de aminoácidos destes alérgenos correspondem às cadeias laterais que se encontram na área da superfície acessível ao solvente. Portanto, as diferenças na reatividade de IgE, entre os alérgenos podem ser atribuídas a mudanças na topologia da superfície das moléculas por causa dessas substituições. Desta forma, a baixa reatividade cruzada entre Der p 2 e Blo t 2 tem uma importante relevância clínica, sobretudo no desenho de novos métodos diagnósticos baseados em alérgenos recombinantes. Desta forma, Blo t 2 deve ser considerado para obter novos *kits* diagnóstico resolvido por componentes (Em inglês: Component Resolved Diagnosis – CRD) (LUENGO *et al.*, 2014) e para o tratamento da alergia à *B. tropicalis*.

A busca por novos métodos terapêuticos para o tratamento das doenças alérgicas tem se justificado pela necessidade de encontrar novas substâncias para substituir o esquema de tratamento atual o qual é focado somente no controle dos sintomas (SICHERER; LEUNG, 2015). Com o advento de imunoterapia, que envolve a administração de doses repetidas de um alérgeno nos indivíduos alérgicos para induzir tolerância imunológica, torna-se o único tratamento causal que pode modificar o curso natural da doença. Nessa linha de pesquisa, a utilização crescente de proteínas recombinantes como vacinas, surge como uma alternativa ao uso de extratos totais para evitar seus efeitos adversos (CALDERÓN; CARDONA; DEMOLY, 2012). Neste trabalho, desenhou-se e produziu uma proteína recombinante hipoalergênica derivada da sequência do alérgeno Blo t 2 presentes no ácaro da poeira *B. tropicalis*. Com base na caracterização *in vitro* do alérgeno mutante rBlo t 2\_8X, prevemos que a proteína é uma boa candidata para imunoterapia contra alergia à este ácaro.

O desenho do mutante rBlo t 2\_8X foi baseado num método de mutação *in-silico* de uma molécula alérgênica (Blo t 2) presente no ácaro da poeira *B. tropicalis*. À mutação do alérgeno Blo t 2 para "convertê-lo em hipoalérgeno, foi através da troca dos aminoácidos polares ou carregados que são acessíveis na sua superfície, com o objetivo de trocar as cargas e diminuir a ligação à IgE (PAWANKAR; HOLGATE;

ROSENWASSER, 2010) A invenção tem várias vantagens, porque é baseada em novas análises de bioinformática para predição de estabilidade proteica, pois há troca de aminoácidos na superfície da molécula, utilizando o programa ProSa2003 desenvolvido pelo grupo C.A.M.E. (Center of Applied Molecular Engineering) da Universidade de Salzburg na Áustria ([https://www.came.sbg.ac.at/prosa\\_details.php](https://www.came.sbg.ac.at/prosa_details.php)). O software é uma ferramenta para a análise das estruturas proteicas em 3D, sejam elas preditas teoricamente ou produto de modelagem *in-silico*. O programa gera pontuações que refletem a qualidade das estruturas de proteínas. Estes potenciais são derivados a partir de estruturas proteicas conhecidas, capturando as propriedades mais comuns das proteínas nativas globulares em termos de átomo par, e interações proteína-solvente. ProSa 2003 vem com potenciais baseados no conhecimento atualizado, um analisador PDB reforçado, uma história de linha de comando, e com um conjunto de novos comandos que suportam em mutagênese originada *in-silico*. O software já foi utilizado com sucesso no desenho de mutantes para o pólen de abedul ou bétula (THALHAMER *et al.*, 2010)

## 5. Conclusão Geral

De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho foi identificada com sucesso a sequência madura de Blo t 2.2 nos extratos proteicos de *Blomia tropicalis* isolados no Brasil. Além disso, verificou-se, pela primeira vez que Blo t 2 é iniciada por um peptídeo sinal, o qual é processado e clivado depois da expressão da proteína.

Duas isoformas de rBlo t 2 foram expressas, purificadas e caracterizadas com sucesso. Confirmou-se a importância do alérgeno Blo t 2 na sensibilização induzida pela ácaro *Blomia tropicalis*, através da alta prevalência de sensibilização na população brasileira. Além disso, rBlo t 2 mostrou uma baixa reatividade cruzada com rDer p 2 determinado pelo ELISA de inibição.

Finalmente foi engenheirado *in-silico* um mutante hipoalérgico do Blo t 2 o qual foi expresso e sua hipolargenicidade foi comprovada em ensaios sorológicos.

## 6. Referências Bibliográficas

AKDIS, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. *T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases*. The Journal of allergy and clinical immunology, v. 116, n. 5, p. 961–8; quiz 969, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16275361>>. Acesso em: 3 out. 2016.

ALCANTARA-NEVES, N. M. et al. *The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children*. The Journal of allergy and clinical immunology, v. 129, n. 2, p. 359–67, 367–3, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22035877>>. Acesso em: 3 out. 2016.

ARAUJO, M. I. et al. *Inverse association between skin response to aeroallergens and Schistosoma mansoni infection*. International archives of allergy and immunology, v. 123, n. 2, p. 145–8, out. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060486>>. Acesso em: 3 out. 2016.

ARLIAN, L. G.; VYSZENSKI-MOHER, D. L.; FERNANDEZ-CALDAS, E. *Allergenicity of the mite , Blomia tropicalis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 91, p. 1042–1050, 1993.

ASHER, M. I.; WEILAND, S. K. *The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*. ISAAC Steering Committee. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, v. 28 Suppl 5, p. 52–66–1, nov. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988448>>. Acesso em: 30 set. 2016.

BANNON, G. A. *What makes a food protein an allergen?* Current allergy and asthma reports, v. 4, n. 1, p. 43–46, 2004.

BAQUEIRO, T. et al. *Asthma and rhinitis symptoms in individuals from different socioeconomic levels in a Brazilian city*. Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies, v. 28, n. 3, p. 362–7, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17619568>>. Acesso em: 30 set. 2016.

BAQUEIRO, T. et al. *Dust mite species and allergen concentrations in beds of individuals belonging to different urban socioeconomic groups in Brazil*. The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma, v. 43, n. 2, p. 101–105, 2006.

BARON-BODO, V. et al. *Absence of IgE neosensitization in house dust mite allergic patients following sublingual immunotherapy*. Clinical and Experimental Allergy, v. 42, n. 10, p. 1510–1518, 2012.

BORDAS-LE FLOCH, V. et al. *Expression and characterization of natural-like recombinant Der p 2 for sublingual immunotherapy*. International Archives of Allergy

and Immunology, v. 158, n. 2, p. 157–167, 2012.

BOUSQUET, J. et al. *Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 102, n. 4 I, p. 558–562, 1998.

CALDERÓN, M. A. et al. *Allergen-specific immunotherapy for respiratory allergies: From meta-analysis to registration and beyond*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 127, n. 1, p. 30–38, 2011.

CALDERÓN, M.; CARDONA, V.; DEMOLY, P. *One hundred years of allergen immunotherapy European Academy of Allergy and Clinical Immunology celebration: Review of unanswered questions*. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 67, n. 4, p. 462–476, 2012.

CARVALHO, K. D. A. et al. *Blomia tropicalis Blo t 5 and Blo t 21 recombinant allergens might confer higher specificity to serodiagnostic assays than whole mite extract*. BMC immunology, v. 14, p. 11, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3605308&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CASALE, T. B.; STOKES, J. R. *Future forms of immunotherapy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 127, n. 1, p. 8–15, 2011.

CHEN, K. W. et al. *Hypoallergenic der p 1/Der p 2 combination vaccines for immunotherapy of house dust mite allergy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 130, n. 2, 2012.

CHEONG, N. et al. *Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blo t 1 and Der p 1*. Allergy, v. 58, p. 912–920, 2003.

CHEW, F. T. et al. *Sensitization to local dust-mite fauna in Singapore*. Allergy, v. 54, n. 11, p. 1150–9, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604550>>.

CHRISTOPHEL, J. J. et al. *Expression of the recombinant group 2 allergen from Blomia tropicalis: Comparison of the immunoreactivity of Blo t 2 and Blo t 5*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 109, n. 1, p. S135–S135, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674902815299>>.

CHUA, K. Y. et al. *The Blomia tropicalis allergens*. Protein and peptide letters, v. 14, p. 325–333, 2007.

CONSORTIUM, T. U. *UniProt: a hub for protein information*. Nucleic Acids Research, v. 43, n. October 2014, p. 204–212, 2015.

CROMWELL, O.; HÄFNER, D.; NANDY, A. *Recombinant allergens for specific immunotherapy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 127, n. 4, p. 865–872, 2011.

DEREWENDA, U. et al. *The crystal structure of a major dust mite allergen Der p 2*,

and its biological implications. *J Mol Biol*, v. 318, n. 1, p. 189–197, 2002. Disponível em:

<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12054778](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12054778)>.

DEVEREUX, G.; BARKER, R. N.; SEATON, A. Antenatal determinants of neonatal immune responses to allergens. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 32, n. 1, p. 43–50, 2002.

EDER, W.; EGE, M. J.; VON MUTIUS, E. The Asthma Epidemic. *N Engl J Med*, n. 355, p. 2226–2235, 2006.

EGGER, M. et al. Assessing protein immunogenicity with a dendritic cell line-derived endolysosomal degradome. *PLoS ONE*, v. 6, n. 2, 2011.

FALCONE, F. H. et al. Use of Humanized Rat Basophilic Leukemia Reporter Cell Lines as a Diagnostic Tool for Detection of Allergen-Specific IgE in Allergic Patients: Time for a Reappraisal? *Current Allergy and Asthma Reports*, v. 15, n. 11, 2015.

FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; LOCKEY, R. F. *Blomia tropicalis*, a mite whose time has come. *Allergy*, v. 59, n. 11, p. 1161–1164, 2004.

FERREIRA, F. et al. Modified recombinant allergens for safer immunotherapy. *Inflammation & allergy drug targets*, v. 5, n. 1, p. 5–14, 2006.

FRANCO, R. et al. O Custo Da Asma Gra Ve P Ara O Sistema Público De Saúde E P Ara As F Amílias Grave Famílias. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 78, n. 2, p. 45–51, 2008.

GAFVELIN, G. et al. Cross-reactivity studies of a new group 2 allergen from the dust mite *Glycyphagus domesticus*, *Gly d 2*, and group 2 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lepidoglyphus destructor*, and *Tyrophagus putrescentiae* with recombinant allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 107, n. 3, p. 511–518, 2001.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature*, v. 454, p. 445–454, 2008.

GERGEN, P. J. Understanding the economic burden of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 107, n. 5, p. S445–S448, 2001.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n6/abs/nprot.2006.202.html>>.

ISOLAURI, E. et al. The allergy epidemic extends beyond the past few decades. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 34, n. 7, p. 1007–1010, 2004.

JUTEL, M.; AKDIS, C. A. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, v. 66, n. 6, p. 725–32, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466562>>. Acesso em: 3 out. 2016.

KAY, A. B. *Allergy and allergic diseases. First of two parts.* The New England journal of medicine, v. 344, n. 1, p. 30–7, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136958>>.

KIDON, M. I. et al. *Mite component-specific IgE repertoire and phenotypes of allergic disease in childhood: The tropical perspective.* Pediatric Allergy and Immunology, v. 22, n. 2, p. 202–210, 2011.

KING, R. M.; KNIBB, R. C.; HOURIHANE, J. O. *Impact of peanut allergy on quality of life, stress and anxiety in the family.* Allergy, v. 64, n. 3, p. 461–8, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076542>>. Acesso em: 3 out. 2016.

LOON, L. *Prophylactic Inoculation against Hay Fever.* The lancet, p. 1572–1573, 1911.  
LUENGO, O. et al. *Component resolved diagnosis: when should it be used?* Clinical and Translational Allergy, v. 4, n. 1, p. 28, 2014. Disponível em: <<http://ctajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-7022-4-28>>.

MORENO BENÍTEZ, F. et al. *Variation in allergen content in sublingual allergen immunotherapy with house dust mites.* Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 70, n. 11, p. 1413–1420, 2015.

MULLEN, G. E. D. et al. *The role of disulfide bonds in the assembly and function of MD-2.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. 100, n. 7, p. 3919–3924, 2003. Disponível em: <<Go to ISI>://000182058400071>.

NA, S. et al. *Characterization of disulfide bonds by planned digestion and tandem mass spectrometry.* Mol Biosyst, v. 11, n. 4, p. 1156–1164, 2015. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2015/mb/c4mb00688g>>.

NAIK, M. T. et al. *Roles of Structure and Structural Dynamics in the Antibody Recognition of the Allergen Proteins: An NMR Study on Blomia tropicalis Major Allergen.* Structure, v. 16, n. 1, p. 125–136, 2008.

NISHIHARA, K. et al. *Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in Escherichia coli.* Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n. 5, p. 1694–1699, 1998.

NISHIYAMA, C. et al. *Determination of three disulfide bonds in a major house dust mite allergen, Der f 2.* International archives of allergy and immunology, v. 101, p. 159–166, 1993.

NOWAK-WĘGRZYN, A.; BENCHARITIWONG, R.; SCHWARZ, J. *Mediator Release Assay for Assessment of Biological Potency of German Cockroach Allergen Extracts.* J Allergy Clin Immunol, v. 123, n. 4, p. 949–955, 2009.

OKAMOTO, Y. et al. *House dust mite sublingual tablet is effective and safe in patients with allergic rhinitis.* Allergy, 29 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27471838>>. Acesso em: 3 out. 2016.

OLSEN, O. T. et al. *A 1-year, placebo-controlled, double-blind house-dust-mite immunotherapy study in asthmatic adults*. *Allergy*, v. 52, n. 8, p. 853–859, 1997.

PAULI, G. et al. *Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 122, n. 5, p. 951–960, 2008.

PAWANKAR, R. et al. *Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action*. *World Allergy Organization Journal*, v. 7, n. 1, p. 12, 2014. Disponível em: <<http://waojournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1939-4551-7-12>>.

PAWANKAR, R.; HOLGATE, S. T.; ROSENWASSER, L. J. *Allergy Frontiers: Future Perspectives*. Volume 6 ed. [S.l.]: Springer, 2010.

PHAM-THI, N. et al. *Assessment of sublingual immunotherapy efficacy in children with house dust mite-induced allergic asthma optimally controlled by pharmacologic treatment and mite-avoidance measures*. *Pediatric Allergy and Immunology*, v. 18, n. 1, p. 47–57, 2007.

PIFFERI, M. et al. *Benefits of immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract in asthmatic children: a three-year prospective study*. *Allergy*, v. 57, p. 785–790, 2002.

RADAUER, C. et al. *Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 121, n. 4, p. 847–852, 2008.

RADAUER, C. et al. *Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences*. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 69, n. 4, p. 413–419, 2014.

RODRIGUES, L. C. et al. *Early infection with Trichuris trichiura and allergen skin test reactivity in later childhood*. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, v. 38, n. 11, p. 1769–77, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18547322>>. Acesso em: 3 out. 2016.

SADE, K.; ROITMAN, D.; KIVITY, S. *Sensitization to Dermatophagoides, Blomia tropicalis, and other mites in atopic patients*. *Journal of Asthma*, v. 47, p. 849–852, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/02770903.2010.506683>>.

SANTOS, L. A. et al. *Direct costs of asthma in Brazil: A comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 40, n. 7, p. 943–948, 2007.

SEN, M. et al. *Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes*. *The Journal of Immunology*, v. 169, n. 2, p. 882–887, 2002. Disponível em: <<http://jimmunol.org/content/169/2/882.abstract>>  
<<http://www.jimmunol.org/content/169/2/882.abstract>>

9/2/882.full.pdf>.

SHIM, J. Y. et al. *Allergen-specific conventional immunotherapy decreases immunoglobulin e-mediated basophil histamine releasability*. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 33, n. 1, p. 52–57, 2003.

SICHERER, S. H.; LEUNG, D. Y. M. *Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2014*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 135, n. 2, p. 357–367, 2015.

SILVERSTEIN, A M. *Clemens Freiherr von Pirquet: explaining immune complex disease in 1906*. *Nature immunology*, v. 1, n. 6, p. 453–455, 2000. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com.ezproxy.liv.ac.uk/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=11101860&site=eds-live&scope=site>>.

SOLE, D. et al. *Prevalence of rhinitis-related symptoms in Latin American children - results of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase three*. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, v. 21, n. 1 Pt 2, p. e127-36, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19788538>>. Acesso em: 30 set. 2016.

SOUZA DA CUNHA, S. et al. *Asthma cases in childhood attributed to atopy in tropical area in Brazil*. *Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health*, v. 28, n. 6, p. 405–11, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21308166>>. Acesso em: 30 set. 2016.

STANALAND, B. E. et al. *Sensitization to *Blomia tropicalis*: Skin test and cross-reactivity studies*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 94, n. 3 PART 1, p. 452–457, 1994.

TAKETOMI, E. A. et al. *Perfil imunológico das vacinas comerciais de *D. pteronyssinus* para imunoterapia \**. *Revista Brasileira de alergia e imunopatologia*, v. 245, p. 1–8, 2011.

THALHAMER, T. et al. *Designing hypoallergenic derivatives for allergy treatment by means of in silico mutation and screening*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 4, 2010.

TSAI, J. J. et al. *Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan*. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 115, n. 2, p. 144–149, 1998.

VAN HAGE-HAMSTEN, M.; VALENTA, R. *Specific immunotherapy – the induction of new IgE-specificities ?* *Allergy*, v. 57, p. 375–378, 2002.

VAN REE, R. et al. *Possible induction of food allergy during mite immunotherapy*. *Allergy*, v. 51, n. 2, p. 108–13, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8738516>>.

VEIGA, R. V et al. *Chronic virus infections suppress atopy but not asthma in a set of children from a large Latin American city: a cross-section study*. *BMC pulmonary*

medicine, v. 11, n. 1, p. 24, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2466/11/24>>.

VOGEL, L. et al. *Development of a functional in vitro assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system*. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 60, n. 8, p. 1021–1028, 2005.

WALLNER, M. et al. *The influence of recombinant production on the immunologic behavior of birch pollen isoallergens*. PLoS ONE, v. 4, n. 12, p. 1–8, 2009.

WALLNER, M.; PICHLER, U.; FERREIRA, F. *Recombinant allergens for pollen immunotherapy*. Immunotherapy, v. 5, n. 12, p. 1323–38, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283843>>.

WANG, H. et al. *A double-blind, placebo-controlled study of house dust mite immunotherapy in Chinese asthmatic patients*. Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 61, n. 2, p. 191–197, 2006.

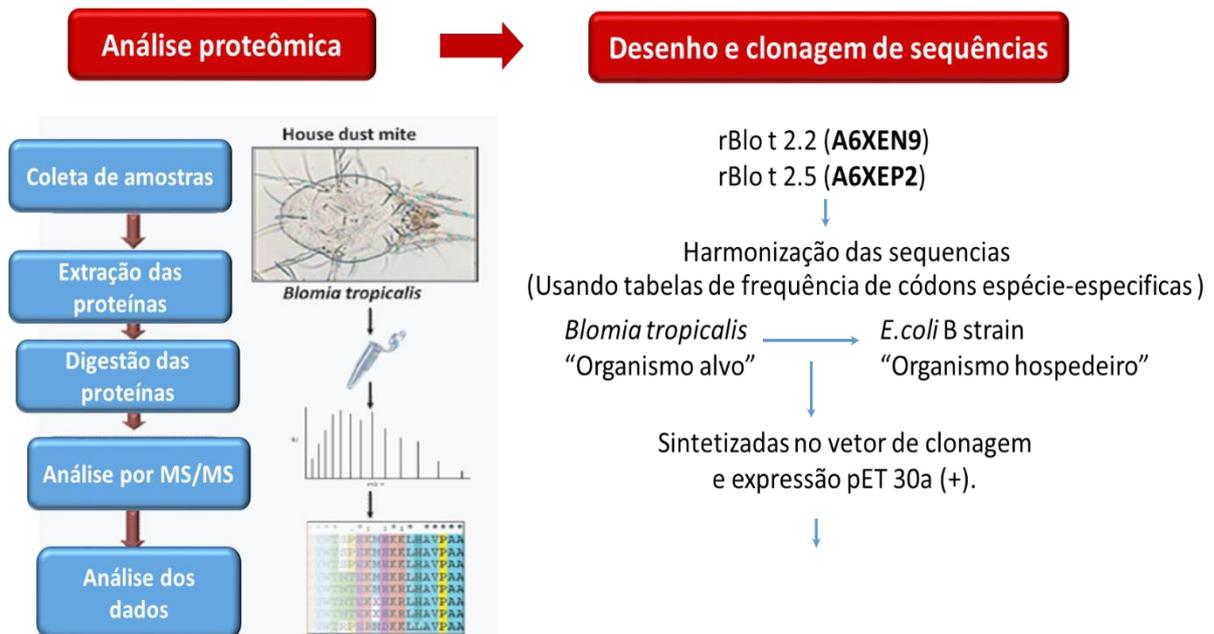
WEGHOFER, M. et al. *Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients*. European Journal of Clinical Investigation, v. 38, n. 12, p. 959–965, 2008.

WILLIAMS, H. et al. *Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood*. The Journal of allergy and clinical immunology, v. 103, n. 1 Pt 1, p. 125–38, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9893196>>. Acesso em: 30 set. 2016.

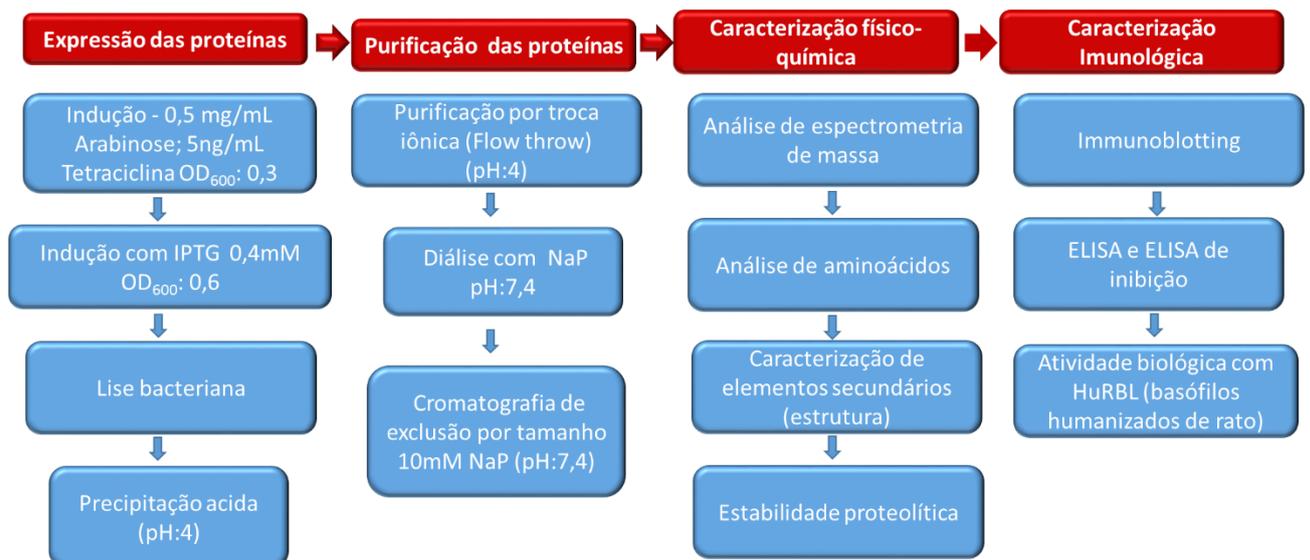
## 7. Anexos

**Anexo 1.** Esquema de análise proteômica, desenho das sequências, clonagem, expressão, purificação e caracterização das duas isoformas de Blo t 2

A).



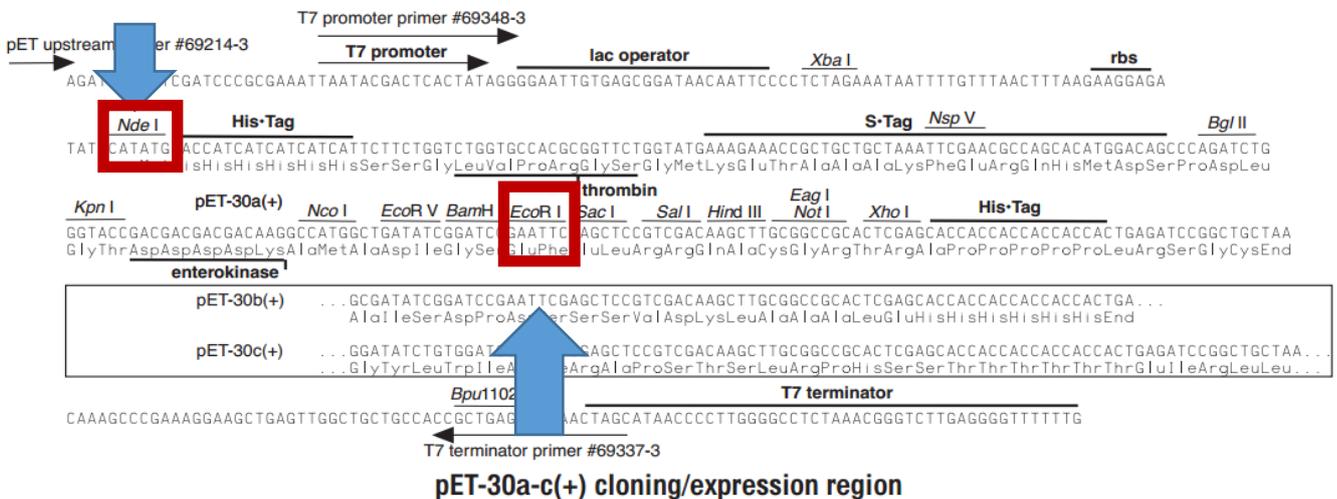
B).



O extrato de *Blomia tropicalis* foi preparado a partir de diferentes culturas de ácaros da poeira coletados em Salvador-Bahia, utilizando tampão fosfato salino (PBS). A). O

extrato total de *B. tropicalis* foi digerido com várias proteases e os peptídeos foram avaliados por espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida (em inglês: LC-MS/MS). As sequências de Blo t 2 (A6XEP2) e (A6XEN9), esta última presente no proteoma, foram selecionadas da base de dados do Uniprot e Genbank para serem expressas em um sistema de expressão procarioto (*Escherichia coli*). As sequências foram harmonizadas usando tabelas de frequência de códons de *B. tropicalis* e *E. coli*, para em seguida serem clonadas em um vetor de expressão pET 30a (+). B). Esquema de Expressão, purificação, caracterização físico-química e imunológica da Blo t 2.

**Anexo 2.** Desenho esquemático do plasmídeo sintetizado pela empresa ATG:biosynthetics (Alemanha) com a sequência do cDNA Blo t 2.2 e Blo t 2.5 harmonizadas que possuem sítios de reconhecimento por enzimas de restrição



### Blo t 2\_A6XEN9\_Iso2



CAT ATG <sup>1</sup> GGT <sup>2</sup> GAT <sup>3</sup> GTT <sup>4....</sup> AAA TTC ACC GAT TGC GCA CAT GGT GAG GTG ACC TCG CTG GAC  
CTG TCT GGT TGC TCT GGA GAC CAT TGC ACT ATC CAT AAA GGT AAA TCA TTC ACC CTG  
AAA ACC TTC TTC ATT GCC AAC CAG GAC TCT GAA AAA CTG GAG ATC AAA ATC TCA GCC  
ACC ATG AAT GGT ATT GAG GTG CCG GTG CCG GGT GTT GAC AAA GAC GGT TGC AAA CAT  
ACC ACC TGC CCG CTG AAA AAA GGT CAG AAA TAC GAA CTT GAC TAC AGT CTG ATC ATC  
CCG ACC GTT CTG CCG AAC GTA AAA ACC GTT ACC ACC GCA TCG CTG GTG GGA GAT CAT  
GGT GTT GTG GCC TGC GGT AAA GTC AAT ACC GAG GTG GTT GAT TAA GAA TTC

Stop



### Blo t 2\_A6XEP2\_Iso5



CAT ATG <sup>1</sup> GGT <sup>2</sup> GAT <sup>3</sup> GTT <sup>4....</sup> AAA TTC ACC GAT TGC GCA CAT GGT GAG GTG ACC TCG CTG GAC  
CTG TCT GGT TGC TCT GGA GAC CAT TGC ATA ATC CAT AAA GGT AAA TCA TTC ACC CTG  
AAA ACC TTC TTC ATT GCC AAC CAG GAC TCT GAA AAA CTG GAG ATC AAA ATC TCA GCC  
ATC ATG AAT AAT ATT GAG GTG CCG GTG CCG GGT GTT GAC AAA GAC GGT TGC AAA CAT  
ACC ACC TGC CCG CTG AAA AAA GGT CAG AAA TAC GAA CTT GAC TAC AGT CTG ATC ATC  
CCG ACC ATC CTG CCG AAC CTG AAA ACC GTT ACC ACC GCA TCG CTG GTG GGA GAT CAT  
GGT GTT GTG GCC TGC GGT AAA GTC AAT ACC GAG GTG TTC GAT TAA GAA TTC

Stop





## Dados do Pedido

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** "Processo de produção de um antígeno recombinante hipoalergênico para o uso profilático e tratamento das doenças alérgicas causadas pelo ácaro da poeira *Blomia tropicalis*, antígeno, formulações contendo o antígeno"

**Resumo:** A presente invenção refere-se ao desenho e produção de um antígeno recombinante derivado de um alérgeno de *Blomia tropicalis* tendo potencial para uso em formulações de vacinas para doenças alérgicas causadas por este ácaro da poeira. Mais particularmente a invenção se refere ao campo da imunoterapia alérgica específica para as doenças alérgicas mediadas pela imunoglobulina E (IgE) e causadas pelo ácaro da poeira *Blomia tropicalis*.

Mais especificamente trata-se de um polipeptídeo mutante derivado da molécula de Blo t 2 cujas sequências de aminoácidos estão apresentadas em SEQ ID NO:1 caracterizado por uma redução na reatividade IgE em soros de pacientes alérgicos, além de não ter a capacidade de ativar basófilos humanizados de rato sensibilizados com soros de pacientes alérgicos.

005. Também se refere aos métodos de produção e purificação do antígeno recombinante mutante apresentado na SEQ ID No:1 num sistema de expressão procariótico em *E. coli*.

**Figura a publicar:** 1

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 5**

**Nome:** NEUZA MARIA ALCÂNTARA NEVES

**CPF:** 07064829568

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Médico

**Endereço:** Rua Quixaba, 563, Colina E, Patamares

**Cidade:** Salvador

**Estado:** BA

**CEP:** 41680-020

**País:** BRASIL

**Telefone:** (71) 336 70098

**Fax:**

**Email:** neuzalcantara@gmail.com

**Inventor 2 de 5**

**Nome:** JUAN RICARDO URREGO ALVAREZ

**CPF:** 86161405571

**Nacionalidade:** Colombiana

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Rua Sabino Silva, 320

**Cidade:** Salvador

**Estado:** BA

**CEP:** 40155-250

**País:** BRASIL

**Telefone:** (71) 992 510309

**Fax:**

**Email:** ricardo\_urrego@hotmail.com

**Inventor 3 de 5**

**Nome:** EDUARDO SANTOS DA SILVA

**CPF:** 00821874527

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Primeira Travessa Pirani, n3E, Plataforma

**Cidade:** Salvador

**Estado:** BA

**CEP:** 40717-546

**País:** BRASIL

**Telefone:** (71) 321 82533

**Fax:**

**Email:** eduardossilva06@gmail.com

**Inventor 4 de 5**

**Nome:** LUIS GUSTAVO CARVALHO PACHECO

**CPF:** 01226612652

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** Rua Pedro Milton de Brito, 77, Apt.402, Barra

**Cidade:** Salvador

**Estado:** BA

**CEP:** 40140-630

**País:** BRASIL

**Telefone:** (71) 982 541659

**Fax:**

**Email:** luis.pacheco@ufba.br

**Inventor 5 de 5**

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/09/2016 às 11:30. Petição 870160054800

**Nome:** CARINA DA SILVA PINHEIRO

**CPF:** 04699216684

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** Rua Dr. Chrysippo de Aguiar n 10, Apto 402, Bairro Vitória

**Cidade:** Salvador

**Estado:** BA

**CEP:** 40081-310

**País:** BRASIL

**Telefone:** (71) 992 440108

**Fax:**

**Email:** carina.pinheiro@ufba.br

#### Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	Relatório descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicacoes.pdf
Resumo	resumo.pdf
Desenho	FIGURAS.pdf
Procuração	Procuração.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante de pagamento.PDF

#### Sequências Biológicas

- Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	Listagem de Sequências_Patente_hipoalergeno_Blot2 (1).txt
Código de barras do código de controle em formato PDF	Listagem de Sequências_Patente_hipoalergeno_Blot2 (1).txt.pdf
Código de controle em formato XML	Listagem de Sequências_Patente_hipoalergeno_Blot2 (1).txt.xml

#### PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/09/2016 às 11:30, Petição 870160054809

### **Acesso ao Patrimônio Genético**

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

### **Declaração de veracidade**

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/09/2016 às 11:30. Referência: 870160051000