



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

LORENA MIRANDA DE SOUZA

Avaliação do potencial alergênico do ácaro de poeira doméstica *Glycycometus malaysiensis*

Salvador, BA

2024

LORENA MIRANDA DE SOUZA

**Avaliação do potencial alergênico do ácaro de poeira doméstica
*Glycycometus malaysiensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dra. Carina da Silva Pinheiro

Salvador, BA
2024

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA-SIBI, pela Bibliotecária Maria de Fátima Martinelli CRB5/551, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S719 Souza, Lorena Miranda de
Avaliação do potencial alergênico do ácaro de poeira doméstica
Glycycometus malaysiensis/Lorena Miranda de Souza. – Salvador, 2024.
47 f.: il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carina da Silva Pinheiro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2024.
Inclui referências.

1. *Glycycometus malaysiensis*. 2. Ácaros da poeira doméstica. 3. Alergias.
I. Pinheiro, Carina da Silva. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616-022



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

TERMO DE APROVAÇÃO

A DISSERTAÇÃO:

“Avaliação do potencial alergênico do ácaro de poeira doméstica *Glycycometus malaysiensis*”

Elaborada por:

LORENA MIRANDA DE SOUZA.

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia como requisito parcial à obtenção do título de **MESTRE**.

Salvador, Bahia, 29 de janeiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Drª. Carina Silva Pinheiro (Orientadora)
ICS-Universidade Federal da Bahia

Profª. Dra. Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo
ICS-Universidade Federal da Bahia



Documento assinado digitalmente

BARBARA DE CASTRO PIMENTEL FIGUEIREDO

Data: 13/03/2024 13:58:23-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Natália Gomes de Moraes
ICS- Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, que sempre apoiaram a minha jornada acadêmica e incentivaram os meus estudos, especialmente a Jacqueline, Tia Carmem e Tio Jackson.

À minha mãe, que apesar de todas as adversidades e dificuldades sempre colocou minha educação em primeiro lugar e acreditou no meu potencial.

Ao meu noivo, que ao longo desses dois anos sempre esteve ao meu lado nos momentos felizes e nas dificuldades.

Aos meus amigos, que sempre estiveram comigo e vibraram por todas as minhas conquistas, especialmente Danielle e Rodrigo.

À minha orientadora, Profa Dra. Carina Pinheiro a quem sou extremamente grata, pelo apoio, orientação, conhecimento ao longo desses anos de laboratório.

Aos meus amigos de laboratório que me ajudaram nessa jornada, fazendo todos os momentos ficarem mais alegres. Especialmente a Vítor, Eduardo, Raphael e Carol, que me auxiliaram e ensinaram muito sobre a vida científica.

A Universidade Federal da Bahia (UFBA), ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIM), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por proporcionar essa oportunidade de ensino.

E a todos que fizeram parte dessa jornada e ajudaram na realização desse sonho

RESUMO

Introdução: Os ácaros da poeira doméstica são considerados uma das principais fontes de aeroalérgenos e estão associados ao desenvolvimento de doenças alérgicas. No Brasil, os ácaros mais prevalentes pertencem aos gêneros *Dermatophagoides spp* e *Blomia spp*. Entretanto, em estudo anterior realizado pelo nosso grupo, identificamos pela primeira vez a presença do ácaro *Glycycometus malaysiensis*, que havia sido relatado como agente sensibilizador em países asiáticos. Tanto o ácaro *G. malaysiensis* como o *B. tropicalis* apresentam semelhanças morfológicas, levantando a possibilidade de reatividade cruzada entre os seus alérgenos. No entanto, os alérgenos específicos desta espécie de ácaro ainda não foram completamente caracterizados. **Objetivos:** Isolar e Identificar do ácaro *G. malaysiensis* da poeira doméstica e avaliar da reatividade antigênica no soro de pacientes atópicos. **Material e Métodos:** Os extratos alérgenos foram identificados utilizando a técnica de multiplex PCR e caracterizados através de SDS-PAGE e Western blot. Um total de 57 soros de pacientes atópicos teve sua reatividade à IgE referente a esses extratos avaliados por ELISA indireto **Resultados:** Através Westernblot sem inibição e com inibição ao extrato de *D. pteronyssinus* observamos uma reatividade positiva dos pacientes atópicos às bandas referentes ao ácaro *G. malaysiensis*. Além disso, os pacientes testados apresentaram uma reatividade à IgE maior aos extratos identificados com os ácaros *D. pteronyssinus* e *G. malaysiensis* em comparação com o extrato contendo apenas o ácaro *D. pteronyssinus* **Conclusão:** Neste estudo, foi possível observar o potencial imunogênico de *G. malaysiensis* e a sua importância nos indivíduos avaliados.

Palavras-chave: *G. malaysiensis*, Ácaros da poeira doméstica, Alergias

Abstract

Introduction: Dust mites are considered one of the main sources of aeroallergens and are associated with the development of allergic diseases. In Brazil, the most prevalent mites belong to the genera *Dermatophagoides spp* and *Blomia spp*. However, in a previous study conducted by our group we identified for the first time the presence of the mite *Glycycometus malaysiensis*, which had already been reported as a sensitizing agent in Asian countries. Both *G. malaysiensis* and *B. tropicalis* mites exhibit morphological similarities, raising the possibility of cross-reactivity between their allergens. Nevertheless, specific allergens of this mite species have not been fully characterized. **Objectives:** Identify and isolate the mite *G. malaysiensis* from house dust and evaluate its antigen reactivity in serum from atopic patients. **Material and Methods:** The allergenic extracts were identified using the multiplex PCR technique and characterized using SDS-PAGE and Western Blot. A total of 57 sera from atopic patients had IgE reactivity to these extracts assessed by indirect ELISA. **Results:** Using Western blots without inhibition to the extract of *D. pteronyssinus*, a positive reactivity of the atopic patients to the bands referring to the *G. malaysiensis* mite was observed. In addition, the patients tested showed greater IgE reactivity to the extracts identified with the *D. pteronyssinus* and *G. malaysiensis* mites compared to the extract containing only the *D. pteronyssinus* mite. **Conclusions:** In this study, we could observe the immunogenic potential of *G. malaysiensis* and its possible significance in the evaluated individuals.

Keywords: *G. malaysiensis*, House Dust Mites, Allergies

ABREVIações

AIT- Imunoterapia alérgeno-específica

APCs- Células apresentadoras de antígenos

BT- *Blomia tropicalis*

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DP- *Dermatophagoides pteronyssinus*

ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática

GM- *Glycycometus malaysiensis*

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HDM- Ácaros da poeira doméstica

IgE- Imunoglobulina E

IgG1- Imunoglobulina IgG1

IL-4 -Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-13 - Interleucina 13

IL-25 - Interleucina 25

IL-33 - Interleucina 33

ITS- Espaço transcrito interno

IUIS- União Internacional de Sociedades Imunológicas

OMA- Organização Mundial da Alergia

OMS- Organização Mundial da Sa

PBS – Phosphate buffered saline.

PCR- Reação em cadeia da polimerase

rDNA- DNA ribossomal

SDS-PAGE- sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SFB- Soro fetal bovino

TH2- T auxiliar 2

TP - *Tyrophagus putrescentiae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de sensibilização a alérgenos.....	7
Figura 2. Cluster do rDNA, mostrando a localização dos genes.....	10
Figura 3. Ciclo utilizado para realização de PCR.....	15
Figura 4. Gel de agarose 1% utilizando DNA extraído de amostra de poeiras das diferentes massas de ácaro a ser testadas	20
Figura 5. Gel de agarose 1% utilizando DNA extraído de amostra de poeiras das diferentes massas de ácaro a ser testadas.	20
FIGURA 6. Gel de eletroforese do extrato de <i>B.tropicalis</i> em diferentes concentrações.....	21
Figura 7. Gel de eletroforese mostrando bandas dos extratos das massas de ácaros	22
Figura 8. Western Blot utilizando anticorpo anti-IgE	23
Figura 9. Western Blot utilizando anticorpo anti-IgE	24
Figura 10. A: Gel de eletroforese utilizado para a Espectrometria de Massa mostrando bandas dos extratos das massas de ácaros.	25
Figura 11. Gráfico representativo da reatividade dos soros aos extratos de ácaros	26
Figura 12. Gráfico representativo da reatividade dos soros inibidos	27

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 As doenças alérgicas.....	3
2.2. Os ácaros de poeira doméstica e sua importância no processo de alergenização.	5
2.3 O ácaro <i>Glycycometus malaysiensis</i>	10
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivo específico	13
4- METODOLOGIA.....	14
4.1 Obtenção dos ácaros da poeira doméstica e cultura de ácaros.....	14
4.2 Caracterização molecular das culturas de ácaros através de PCR.....	14
4.3 Produção dos extratos proteicos de ácaros	15
5- RESULTADOS	19
5.1 Obtenção dos ácaros da poeira doméstica e cultura de ácaros.....	19
5.2 Caracterização molecular das culturas de ácaros através de PCR.....	19
5.3 Produção dos extratos proteicos de ácaros	20
5.4 Avaliação protéica dos extratos através de SDS-PAGE	21
DISCUSSÃO	28
6.CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS.....	33

1.INTRODUÇÃO

Reconhecido amplamente por desempenhar um papel importante no desencadeamento de doenças alérgicas, os ácaros são encontrados em grande escala em instalações humanas, como na poeira doméstica e/ou em instalações de armazenamento de grãos. Sua prevalência varia de acordo com a localização geográfica, clima e condições socioeconômicas (ARLIAN; MORGAN, 2003).

Ácaros de poeira doméstica, como *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis* e *Euroglyphus*, são encontrados em tapetes, colchões, tecidos, onde consomem fungos, bactéria e epiderme humana. Por apresentar um potencial alergênico, os ácaros de poeira doméstica são reconhecidos por serem importantes desencadeadores da reação alérgica. Foi relatado que metade das crianças investigadas com rinite alérgica tiveram como principal causa a inalação de alérgenos de ácaros da poeira doméstica. No qual 91% dos indivíduos com rinite alérgica, dermatite atópica ou asma foram sensibilizados pelos ácaros *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* (M.I. et al., 2011; ZAHEDI; GENDEH; HUSAIN, 2011).

Segundo a organização mundial da saúde (OMS) e a organização mundial de alergia (OMA), estima-se que a prevalência da asma mundialmente é cerca de 300 milhões de pessoas, a mortalidade aproximadamente de 250 mil pessoas, no qual do número total de óbitos, 80% ocorrem em países emergentes. Portanto, devido as consequências ocasionadas pela asma e outras doenças alérgicas, é necessário um melhor desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento de doenças alérgicas (ASHER; PEARCE, 2014;FORNO; ORTEGA; CELEDÓN, 2023; PAWANKAR, 2014).

Os ácaros de armazenamento como *Lycyphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Blomia kulagini*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Glycycometus malaysiensis* e *Aleuroglyphus Ovatus*, são habitualmente encontrados em instalações de grãos, podendo facilmente contaminar alimentos processados como trigo, cevada e cereais (ARLIAN; MORGAN, 2003; COLLOFF, 2009; NADCHATRAM, 2005a). O *Glycycometus malaysiensis* pode ser encontrado em insetos, pequenos mamíferos e locais de armazenamento de grãos. Devido às semelhanças morfológicas que

apresenta com o ácaro *Blomia tropicalis*, amplamente encontrados na poeira doméstica e pertencentes à mesma família (glycyphagidae), a identificação e diferenciação do *G. malaysiensis* apresenta desafios. Embora esse ácaro seja prevalente em alguns países, como Malásia e Singapura, onde está presente em 40% e 35% das residências, respectivamente, e em áreas urbanas no Panamá, até então não havia sido relatada sua prevalência no Brasil. É interessante notar que esses países compartilham algumas características em comum, como clima, localização geográfica e economia (COLLOFF, 2009; COLLOFF; SPIEKSMAN, 1992; LING et al., 2019).

A identificação precisa do ácaro é fundamental tanto para o tratamento quanto para o diagnóstico das doenças alérgicas. No tratamento algumas abordagens para evitar o desenvolvimento das doenças alérgicas envolvem evitar o contato com o alérgeno, terapia medicamentosa e imunoterapia. A imunoterapia implica na exposição do paciente a determinados alérgenos, visando aumentar a tolerância imunológica reduzindo a sensibilidade do paciente aos alérgenos. O diagnóstico pode ser realizado por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ou por testes cutâneos, nos quais são utilizados extratos dos alérgenos. (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998).

O uso dos extratos alérgicos é amplamente utilizado na pesquisa científica, diagnóstico e tratamento de alergias, e para garantir a qualidade desses extratos é necessário que o cultivo das culturas seja espécie-específicas. A identificação dos ácaros de poeira é realizada principalmente mediante a identificação morfológica através de chaves biológicas, dados ecológicos e comportamentais, tornando-se um trabalho laborioso ao qual se faz necessário a obtenção dos ácaros em amostras de poeira doméstica, além da separação individual de cada ácaro utilizando lupas, o cultivo em garrafas suplementadas e a espera do crescimento da cultura para apenas posteriormente a identificação morfológica seja realizada (COLLOFF, 2009).

Portanto, com o presente trabalho temos o intuito de identificar, caracterizar e avaliar os alérgenos de *G. malaysiensis*, realizar a avaliação de reatividade do seu extrato em pacientes atópicos, além de compreender melhor o seu potencial imunogênico e aumentar o levantamento da prevalência dessa espécie na cidade de Salvador (BA), Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As doenças alérgicas

As doenças alérgicas afetam em média uma em cada três pessoas no mundo. (DURHAM; SHAMJI, 2023). A incidência das doenças alérgicas principalmente em crianças apresentou aumento considerável nas últimas décadas, em que as interações gene-ambiente são um dos principais fatores para o desenvolvimento e crescimento do número dessas doenças (GAFFIN; PHIPATANAKUL, 2009; HUANG; CHIE; WANG, 2021).

Os ácaros da poeira doméstica são amplamente aceitos como uma das principais fontes de alérgenos ocasionadores das doenças alérgicas, resultando em manifestações clínicas que afetam os epitélios dos olhos, vias aéreas superiores e inferiores, pele e circulação sistêmica (YANG; ZHU, 2017a).

As manifestações clínicas resultantes de reações alérgicas têm importantes consequências para os indivíduos, tais como anafilaxia, distúrbios gastrointestinais e conjuntivite. Portanto, é essencial que haja um acompanhamento clínico para proporcionar melhor qualidade de vida a essas pessoas. Como as alergias não têm cura, o tratamento dos sintomas é uma das abordagens para melhorar a qualidade de vida desses pacientes, acarretando custos tanto para o sistema de saúde pública quanto para os indivíduos afetados (NADCHATRAM, 2005a).

Foi observado, que indivíduos expostos a alérgenos da poeira doméstica durante a infância obtiveram uma maior associação à polissensibilização de ácaros e um maior risco em desenvolver doenças como asma e rinite (POSA et al., 2017). Além disso, (RESCH et al., 2015) observou-se que os níveis de IgE para alérgenos foram maiores em crianças asmáticas do que não asmáticas sensibilizadas para ácaros de poeira doméstica.

Huang e colaboradores em 2021 demonstrou em um estudo realizado com 3192 crianças, que a exposição ambiental influenciava diretamente no desenvolvimento de doenças alérgicas e a sensibilização a ácaros de poeira doméstica obteve uma maior prevalência em relação a outros alérgenos sendo associado com o risco de asma, rinite alérgica e dermatite atópica (HUANG; CHIE; WANG, 2021).

Cada uma das doenças alérgicas possui suas particularidades fisiopatológicas, que afetam diretamente a qualidade de vida desses indivíduos, como custo a saúde pública, faltas a escola e estresse causado por sintomas e ida ao hospital. A asma é uma doença multifatorial, caracterizada por uma inflamação crônica das vias aéreas, derivada de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais que impacta diretamente a qualidade de vida desses pacientes em diferentes faixas etárias. Resultando em restrições no seu cotidiano em cerca de 50% dos indivíduos asmáticos, devido manifestações clínicas como chiado, falta de ar e tosse (ALITH et al., 2020).

Mais comum em homens do que em mulheres, a asma normalmente tem início na infância, considerando que mais de 50% dos casos de asma ocorrem em adultos e 80% dos casos durante a infância, sendo diretamente correlacionados com a sensibilização a aeroalérgenos e com os sintomas da inflamação das vias aéreas (LEMANSKE; BUSSE, 2010; MIRANDA et al., 2004; ROMANET-MANENT et al., 2002).

Considerada a primeira manifestação da marcha atópica, a dermatite atópica é uma doença inflamatória cutânea que afeta em média 20% da população infantil e 4% dos adultos, em que a ruptura da barreira epitelial leva a uma resposta imunológica, devido ao contato do epitélio com alérgenos presente no exoesqueleto e pellet fecais dos ácaros da poeira doméstica desencadeando lesões na pele e prurido intenso (GAFFIN; PHIPATANAKUL, 2009; HUANG; SARZSINSZKY; VRTALA, 2023).

Estima-se que 7% da população brasileira possui dermatite atópica, afetando em média 25% das crianças e 85% dos casos surgem antes dos 5 anos de idade. Por ser uma doença crônica que acomete a pele, alguns fatores como genética e gatilhos ambientais acabam exacerbando a manifestação clínica da doença, principalmente para os adultos que possuem sintomas crônicos, que envolve prurido intenso com lesões afetando diferente partes do corpo, dessa forma interferindo e prejudicando o cotidiano dos indivíduos (FACHERIS et al., 2023; MESQUITA, 2019)

Com um difícil diagnóstico a rinite alérgica, possui características fisiopatológicas em que sintomas como obstrução nasal apresentam exarcebações a depender da sazonalidade e proliferação dos alérgenos. Histórico clínico do paciente

e exames como teste cutâneo são fundamentais para triagem e diagnóstico assertivo. (BOUSQUET et al., 2020; VENTER et al., 2021)

Segundo a Organização mundial da saúde (OMS) 600 milhões de pessoas possuem rinite alérgica e 200 milhões desses indivíduos possuem sintomas clínicos para asma (YANG; ZHU, 2017b). A rinite alérgica afeta em média 40% das crianças e 30% dos adultos e normalmente está associada a outras doenças alérgicas como asma, por desencadear sintomas clínicos estima-se que o efeito da rinite alérgica afeta a produtividade e causa prejuízo econômico de mais de 50 bilhões de euros na Europa (BERGMANN et al., 2014; Bousquet et al., 2020; SÁNCHEZ-BORGES et al., 2017a).

2.2. Os ácaros de poeira doméstica e sua importância no processo de alergenização.

Medindo em torno de 250 a 350 µm de comprimento, os ácaros de poeira doméstica pertencem ao filo *Artrópodes*, ordem *Astigmata* e subclasse *Acari* possuindo uma expectativa de vida que varia de 7 a 10 semanas. Aproximadamente 30.000 espécies de ácaros foram descritas, dentro desses encontram-se os ácaros de poeira doméstica e de armazenamento, responsáveis por desencadear reações alérgicas nos humanos, se alimentam de epiderme humana e outros micronutrientes (COLLOFF, 1998).

Com a capacidade de contaminar alimentos processados e consumir subnutrientes os ácaros e seus alérgenos conseguem permanecer presentes mesmo em ambientes inóspitos. Assim, possibilitando um contato mesmo que de forma ocupacional desencadeiam doenças alérgicas como asma, rinite e dermatite atópica (COLLOFF, 2009; COLLOFF; SPIEKSMAN, 1992).

Os ácaros são amplamente encontrados ao redor do mundo, conseguindo mudar sua prevalência a depender das razões socioeconômicas e geográficas, ocasionando doenças alérgicas como asma, dermatite atópica e conjuntivite (NADCHATRAM, 2005a). Os ácaros de poeira doméstica mais prevalentes e com maior importância no desencadeamento de doenças alérgicas no Brasil, são *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus*. Através da identificação morfológica,

avaliou-se na cidade de Salvador, Brasil, uma frequência para *B. tropicalis* de 71,8% e *D. pteronyssinus* 39.9% (BAQUEIRO et al., 2006; MARIANA et al., 2000; MIRANDA et al., 2004).

Os alérgenos presentes nos ácaros de poeira doméstica são amplamente aceitos pela sua imunogenicidade, considerado um dos principais antígenos que desencadeiam respostas de células T perfil Th2, induzindo a produção de IgE. Em um estudo realizado com 548 pacientes alérgicos na China, foi observado que as múltiplas sensibilizações a alérgenos estão correlacionadas com o desenvolvimento de doenças alérgicas e com aumento significativo para asma alérgica (LIU et al., 2023).

Atualmente, o WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee inclui 14 alérgenos de *B. tropicalis* e 32 de *D. pteronyssinus*, esses alérgenos possuem características moleculares e alergênicas individuais, como os grupo 1 de *Dermatophagoides spp.* Der p 1 e Der f 1 são cisteíno proteases, proteínas que influenciam na permeabilidade do epitélio respiratório, induzindo uma resposta inflamatória Th2. Em contrapartida outros alérgenos como Der p 7 e 21 facilitam a formação de lipopolissacarídeos, através desses mecanismos conseguem ativar o sistema imunológico e induzir uma resposta alergênica (CHUA et al., 1988; SHAKIB; GHAEMMAGHAMI; SEWELL, 2008; THOMAS, 2015; TROMPETTE et al., 2009).

A alergia é considerada uma hipersensibilidade do tipo I, ocorre devido a uma série de eventos que desencadeiam uma manifestação clínica, em virtude a uma resposta imune contra moléculas exógenas que são reconhecidas pelas células apresentadoras de antígenos, como por exemplo, células dendríticas que no final do processo resultam na produção de anticorpos IgE. Tanto o exoesqueleto como os pellets fecais encontrado no intestino dos ácaros contém proteínas que induzem a sensibilização e sintomas alergênicos em indivíduos com predisposição genética ou sensibilizados por seus alérgenos (MILLER, 2019).

Ao serem inalados, os pellets fecais ou corpos dos ácaros entram em contato com o epitélio das vias respiratórias, as células T CD4+ naive são ativadas através dos fragmentos desses alérgenos por células apresentadoras de antígeno (APCs). Após o rompimento da barreira epitelial os alérgenos são apresentados para as células dendríticas e as lesões causadas no tecido induzem a liberação de padrões

moleculares associados a patógenos e ocasionando a liberação de mediadores como IL-25, IL-33 e GM-CSF, para o recrutamento, ativação e diferenciação para o perfil Th2. (SÁNCHEZ-BORGES et al., 2017b; WANG, 2013).

As citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 atuam na regulação e produção de IgE, agindo nas células B que produzem anticorpos IgE específico contra os alérgenos, esses anticorpos se ligam a receptores de FcεRI, em células como mastócitos ou basófilos, desencadeiam degranulação dessas células liberando histamina e mediadores químicos como citocinas e quimiocinas responsável pela resposta inflamatórias e as consequências clínicas a longo prazo (SÁNCHEZ-BORGES et al., 2017b; WANG, 2013).

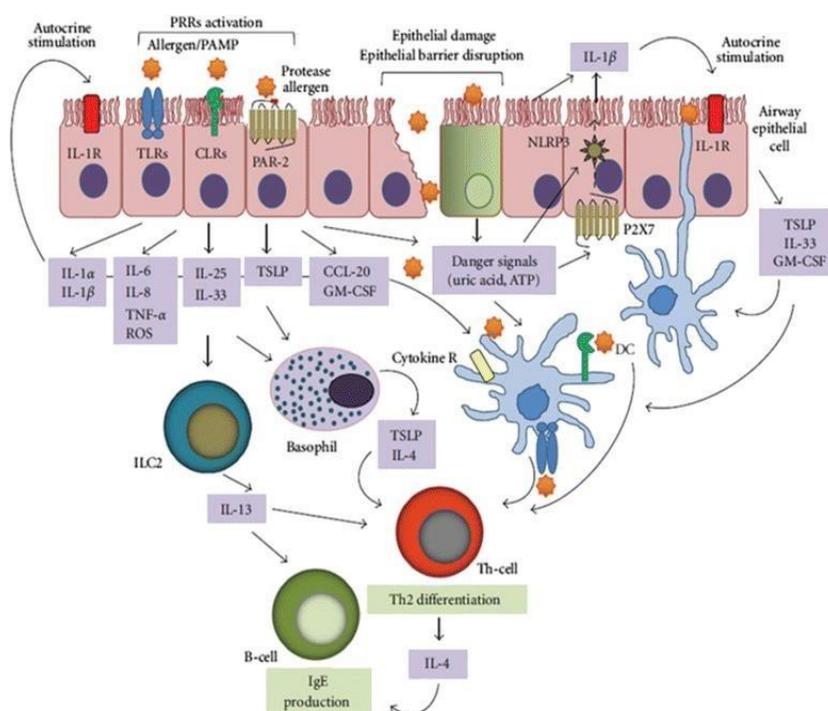


Figura 1. Mecanismos de sensibilização a alérgenos. FONTE: (Sánchez-Borges et al.,2017)

Uma das principais estratégias para o tratamento das doenças alérgicas inclui evitar contato ambiental com os alérgenos, farmacoterapia e imunoterapia com alérgenos (AIT). Evitar o contato com HDM pode ser uma tarefa árdua e penosa, além disso, estudos recentes evidenciaram que o controle ambiental sobre ácaros não se mostrou eficiente na redução de sintomas da rinite e nem da asma (YANG; ZHU, 2017b).

Enquanto medidas de controle ambiental para evitar os alérgenos não sejam tão eficazes, o uso da farmacoterapia através de anti-histamínicos e corticosteroides, fornece uma regulação da inflamação das vias inferiores e superiores ajudando no alívio dos sintomas. No entanto, os efeitos não se estendem além do fim do tratamento, no qual se faz necessário um uso contínuo dos fármacos que a longo prazo ocasionam consequências clínicas ao paciente e prejudicar a sua qualidade de vida (BOUSQUET et al., 2008).

A imunoterapia ocorre através de administrações de pequenas doses de alérgenos a pacientes com doenças alérgicas para que eles consigam atingir a tolerância clínica. A AIT é eficaz em aliviar sintomas e minimizar o uso de medicamentos mesmo após o tratamento, além de reduzir a sensibilização a novos alérgenos, sendo usado como tratamento em doenças alérgicas mediadas por IgE (INAL et al., 2007; JACOBSEN et al., 2007).

Devido a importância do uso extrato alergênico não só para o tratamento de doenças alérgicas, mas para o diagnóstico e pesquisa científica, a qualidade desse extrato é de suma importância. As massas de ácaros passam por controles de qualidade e são cultivadas em culturas espécie-específicas, essas culturas obtidas de amostras de poeira domésticas ou ambientais, em seguida são separadas com o uso de lupa e cultivadas em garrafas suplementadas com alimento, e armazenadas em estufas e posteriormente sua identificação morfológica é realizada utilizando chaves biológicas para produção de alérgicos (COLLOFF, 1998; COLLOFF; SPIEKSMAN, 1992).

A falta de padronização desses alérgenos principalmente em países em desenvolvimento, como na Índia são pouco caracterizados, além disso diferentes técnicas para o mesmo diagnóstico e tratamento são aplicadas. Um estudo de revisão prospectiva, observou que 58% dos pacientes que foram tratados com a AIT com uma mistura de 5-8 alérgenos da poeira doméstica não apresentaram uma melhora, e essa relação de baixa efetividade ao tratamento se deve ao fato de receberam uma combinação de extratos alergênicos incorretos (DEY; SAHA; PODDER, 2019)

Em um estudo foram analisados 10 fabricantes comerciais europeus diferentes de extratos para estudar a composição e a variação desses alérgenos, no qual perceberam uma variabilidade considerável na composição desses alérgenos, em que

8 extratos não possuíam alérgenos como Der p 5, 7,10 e 21, deste modo, indivíduos sensibilizados a esses alérgenos podem ter um diagnóstico ou tratamento ineficiente (CASSET et al., 2012).

Devido à falta de padronização e alguns países não seguirem diretrizes de controle de qualidade desses extratos, HUBER e colaboradores (2021) relataram por análise proteômica uma grande variabilidade na composição alérgênica dos extratos na Índia, no qual foram testados 5 extratos de *D.pteronyssinus* e nenhuma das amostras continha proteínas do ácaro apenas 1 amostra continha *D.farinae* e os outros 4 extratos continham alérgenos de ácaros de armazenamento, e os extratos que deveriam conter *B.tropicalis*, em todas as amostras testadas nenhuma continha alérgenos de *Blomia*, as amostras continham exclusivamente proteínas de levedura e de ácaros de armazenamento.

No entanto, manter a qualidade desses extratos se torna uma tarefa difícil devido à falta de especificidade, como a presença ou não de determinado antígeno específico para aquela amostra de extrato, como também na identificação e precisão desses ácaros, visto que, os mesmos são identificados com base em observações morfológicas, dados ecológicos, biológicos e comportamentais que exigem um responsável técnico muito experiente para sua identificação, além de necessitar de amostras bem conservadas e a presença de ácaros em estágio adulto, tornando assim um trabalho laborioso. E essa identificação se torna ainda mais desafiante quando se trata de espécies morfológicamente parecida como *D. farinae* e *D. microceras*, *B. tropicalis* e *G. malaysiensis*, que podem ocasionar em uma identificação e cultivo errôneos (COLLOFF, 2009).

Algumas alternativas têm sido utilizadas para melhorar a qualidade desses extratos, como a produção de alérgenos recombinantes purificados para uma imunoterapia específica e a identificação molecular dos ácaros por ser mais precisa e rápida do que a identificação morfológica. (SANTOS DA SILVA et al., 2017). Muitas dessas técnicas de identificação molecular em estudos filogenéticos e identificação de espécie se baseiam no DNA ribossômico (rDNA), utilizando as regiões ribossomais espaçadoras transcritas internas (*internal transcribed spacer* - ITS), presente em eucariontes a ITS 1 e ITS2 são regiões ribossomais altamente conservadas,

facilitando assim a criação de iniciadores específicos para sua espécie (HILLIS; DIXON, 1991; YANG; CAI; CHENG, 2011).

Dessa forma, visando uma melhor identificação dessas culturas de ácaros de maneira mais rápida e precisa em relação a análises morfológicas, ALVES e colaboradores (2022) utilizou abordagens moleculares para identificação desses ácaros através do Multiplex PCR espécie-específica baseado na região ITS-rDNA ,figura 2, capaz de identificar espécies de ácaros *D.pteronyssinus*, *B. tropicalis* e *G.malaysiensis*, na qual foi possível observar uma incidência de *Glycycometus* em 70% das residências da cidade de Salvador



Figura 2. Cluster do rDNA, mostrando a localização dos genes 18s, 5.8s,28s e regiões intergênicas ITS1 e ITS2 (ALVEZ et al., 2022)

2.3 O ácaro *Glycycometus malaysiensis*

O gênero *Glycycometus* tem sido negligenciado ao longo dos anos sobre seu potencial alergênico. Descrito pela primeira vez em 1957, pertence à família Aeroglyphidae e podem ser encontrados em instalações de armazenamento, insetos, mamíferos e habitações humana, seu tamanho varia entre 320-440 µm x 225 µm, apesar de ser considerado um ácaro de armazenamento, o gênero *Glycycometus* foi descrito em instalações humanas nos trópicos, até o momento 14 espécies de *Glycycometus* foram identificadas, mas apenas o *G. malaysiensis* apresentou um potencial alergênico. Acredita-se que aos longos dos anos devido a sua semelhança morfológica com *B. tropicalis*, o ácaro *G. malaysiensis* tenha sido identificado erroneamente, ocasionando uma subnotificação, e que sua prevalência seja mais comum do que os relatos descritos (LING et al., 2019).

Apesar do seu gênero ter sido identificado e descrito anteriormente, o *G.*

malaysiensis foi isolado e identificado apenas 3 décadas depois na Malásia, e apenas algumas décadas depois foi observado sua prevalência em 40% das amostras de poeira das residências e em Singapura foi encontrada em quase 50% das amostras de poeira, além de ser relatado sua ocorrência também no Panamá (LING et al., 2019). Além disso, CHEW e colaboradores (1999a) mostraram que 78,2% dos pacientes com asma e / ou rinite alérgica em Singapura eram positivos através do teste cutâneo de punctura para *G. malaysiensis*.

Ao longo das últimas décadas a significância clínica dos ácaros de armazenamento como um potencial indutor das doenças alérgicas, se tornou mais evidentes até ser consideradas um dos principais alérgenos presentes na poeira. Uma das espécies de ácaro de armazenamento mais importantes são os *Lepidoglyphus destructor*, no qual mais de 20 proteínas alergênicas foram caracterizadas (JOHANSSON et al., 1997).

Além disso, em um estudo de avaliação de reatividade de *Tyrophagus putrescentiae* e *D. pteronysissus* foi observado que 83% dos pacientes que eram alérgicos ao ácaro de poeira doméstica também eram sensibilizados aos ácaros de armazenamento e quando observados em pacientes acima de 70 anos, esses indivíduos tiveram uma maior sensibilização a *Tyrophagus putrescentiae* do que a *D. pteronysissus*, além de ser relacionada com o aumento de nível de IgE e IgG1 e citocinas de perfil Th2 como IL-4, IL5, IL-13 (LIAO; HO; TSAI, 2010 LIAO et al., 2013).

O fato dos ácaros de armazenamento e de poeira doméstica possuírem proteínas homólogas por pertencerem à mesma família glycyphagidae, propicia para que esse grupo de ácaros possuam uma alta reatividade cruzada o que pode desencadear um falso positivo (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2022). Apesar de seu potencial alergênico ser mencionado na literatura, existem poucos resultados de pesquisas relacionados ao *G. malaysiensis* e até o momento nenhuma caracterização molecular dos seus alérgenos. (CHONG et al., 2015)

Os países onde esse ácaro foi identificado foi observado que em média 85% dos pacientes com asma ou rinite alérgica apresentaram reatividade positiva ao teste cutâneo contra *G. malaysiensis* e 69% apresentaram IgE específica (Chong, 2005). Em um estudo de soro prevalência a resposta de IgE a alérgenos da poeira doméstica e ácaros de armazenamento, 37% dos pacientes testados foram sensibilizados para

G. malaysiensis, como também em um estudo realizado na Malásia 55,6 % dos pacientes com rinite apresentaram sensibilização ao ácaro (CHONG et al., 2015; NADCHATRAM, 2005b).

Apesar do seu potencial alergênico, e apresentar uma prevalência na região de Salvador-BA e ter um potencial significativo em desencadear reações alérgicas, até o presente momento não foi caracterizado alérgenos importantes para essa espécie de ácaro de armazenamento, fazendo se assim necessário uma maior investigação sobre esses alérgenos para melhor compreensão do potencial alergênico da espécie. (CHONG, 2005)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar e identificar o ácaro *Glycycometus malaysiensis* da poeira doméstica e avaliar a reatividade dos antígenos em soro de pacientes alérgicos.

3.2 Objetivo específico

1. Isolar o ácaro *Glycycometus malaysiensis* de poeira doméstica de domicílios da cidade de Salvador e identificá-lo através do ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
2. Cultivar o ácaro *Glycycometus malaysiensis* em laboratório.
3. Extrair os antígenos para produção de um extrato alergênico.
4. Avaliar a reatividade do extrato alergênico utilizando soro de pacientes atópicos através de ELISA.
5. Analisar as proteínas do ácaro *Glycycometus malaysiensis* por eletroforese unidimensional e imunoblotting.
6. Identificar as proteínas mais antigênicas através de espectrometria de massa

4- METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos ácaros da poeira doméstica e cultura de ácaros

Foram coletadas 29 amostras de poeira de camas nas residências da cidade de Salvador, Bahia. Sendo a coleta realizada de acordo com o protocolo de coleta descrito por Baqueiro (2006), usando um aspirador de pó (Eletrolux Professional, 1220watts; Electrolux do Brasil, São Paulo, Brasil), durante 5 minutos em uma área de 1m² na cama principal da residência. Posteriormente, a coleta as culturas foram mantidas em sala especial em recipientes adequados, foram alimentados com spirulina e leveduras, mantidos em ambiente com temperatura (25°C) e umidade controladas (75%).

4.2 Caracterização molecular das culturas de ácaros através de PCR

As extrações do DNA foram realizadas de acordo com o kit NucleoSpin® DNA Insect (MN), utilizando 40mg de massa de ácaros armazenados a -20°C no laboratório, após extração as amostras foram incubadas a 70°C por 5 minutos. Posteriormente o DNA obtido foi quantificado usando μ Drop™ (Thermo Scientific™) para avaliar a pureza e concentração e foi armazenado em -20°C.

Para a identificação molecular das culturas de ácaro foi realizado PCR, foram utilizados o volume final 10 μ l, contendo 10ng de DNA, tampão 10x, 0,5 μ M de iniciadores direto e reverso, 0,8 U de Taq DNA Polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e 200 μ M de dNTPs.

<i>Passo</i>	<i>Número de ciclos</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Duração</i>
<i>Desnaturação Inicial</i>	<i>1</i>	<i>94° C</i>	<i>2m</i>
<i>Desnaturação</i>		<i>94°C</i>	<i>30s</i>

<i>Anelamento</i>	30	49°C /51°C	30 s
<i>Extensão</i>		72° C	30s/60s ³
<i>Extensão final</i>	1	72° C	5m

Figura 3. Ciclo utilizado para realização de PCR

O produto da amplificação da PCR foi corrido em gel de agarose 1%, corado com SYBR (Applied Biosystems™) e visualizados em fotodocumentador.

4.3 Produção dos extratos proteicos de ácaros

As massas de ácaros foram obtidas de culturas mantidas em laboratório acondicionadas a -20 °C. Foram utilizados 23g de massa dos ácaros, para 70mL de solução salina tamponada com fosfato 0,15 M, pH 7,4 (PBS) e 25µl do inibidor de protease PMSF, o processo de lise dos extratos, aconteceu no misturador (Waring Commercial, Torrington, Connecticut, EUA em 12 ciclos de sonificação e descanso a 60 Hertz por um minuto, no banho de gelo.

Logo após o processo de lise foi centrifugado a 13.000g a 4°C por 40 minutos, posteriormente foi coletado o sobrenadante e alíquotado. Em seguida, foram determinadas as concentrações proteicas pelo método de Bradford e as amostras armazenadas a -70 ° C até o uso.

4.4 Seleção do Soro de pacientes Atópicos

Os 57 soros avaliados nesse trabalho foram obtidos de pacientes atópicos da soroteca do Laboratório. Como critério de inclusão para alergia foi baseado em história clínica e sintomas presentes no momento da coleta de sangue e teste de punção cutânea positivo para *B. tropicalis* e/ou *D. pteronyssinus*.

Nos ensaios de inibição presentes no estudo, os soros utilizados foram submetidos ao extrato de *D. pteronyssinus*. no ensaio de Western blot sendo utilizado

300µg/ml e no ELISA indireto 550µg/ml. Nos dois ensaios os soros ficaram por aproximadamente 16 horas a 4°C em rotação constante. CAAE45376814.0.0000.5577 pela Faculdade de Medicina da UFBA.

4.5 Avaliação protéica dos extratos através de SDS-PAGE

Para o SDS-PAGE foi utilizado gel de 15% com espessura de 0,75mm, mix de acrilamida a 30%, TRIS (1,5M) HCL; ph:8.8, TRIS (1M) HCL; ph:6.8, SDS (Docecil sulfato de sódio) 10%. APS (Persulfato de amônio) 10%, TEMED (tetrametiletenodiamina) e Butanol, as amostras foram diluídas em tampão de amostra 1x utilizando 35µg/ml de cada extrato, posteriormente as amostras foram incubadas no banho seco por 5 minutos a 100 C°, e o gel foi submetido a voltagem constante utilizando 60V por 30 minutos e posteriormente 120v até a finalização da corrida.

4.6 Avaliação dos extratos utilizando soro de pacientes alérgicos através de ELISA e Western blot

Para realizar o Elisa foi utilizado soro de 57 pacientes atópicos que testaram positivo no teste cutâneo para *B. tropicalis* e/ou *D. pteronyssinus*.

Foram utilizados placas de poliestireno de microtitulação, 96 poços fundo chato de alta ligação, em que foram sensibilizadas com 100 µL/poço do antígeno de *B. tropicalis*, *G. malaysiensis* com *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *G. malaysiensis* com *D. pteronyssinus* a 100µL poço em tampão Carbonato/Bicarbonato, pH 9.6 e foi incubada em câmara úmida por 12h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3x com PBS-T 0.05% e 2x com PBS 1 x e bloqueadas por 6h e adicionado 180 µL /poço de PBS-Tween 0.05% + 10% Soro Fetal Bovino e incubado em câmara úmida. Em seguida, os soros dos pacientes foram diluídos em PBS-T + SFB 2.5% na proporção 1:5 no volume de 100 µL /poço; incubados em câmara úmida por 12h a 4°C. Após a lavagem com PBS-T 0.05% e com PBS 1x , adicionou-se o conjugado 100 µL/poço do conjugado anti-IgE humana biotinilada na diluição de 1:1000 em PBST 0.05% + SFB 2.5%; e incubado em temperatura ambiente por 1h e realizado a

lavagem, logo em seguida foi adicionado 100 µL /poço de Streptavidina-Peroxidase na diluição de 1:1000 em PBS-Tween 0.05% + Soro Fetal Bovino 2.5%; e incubada em câmara úmida a temperatura ambiente por 1h e logo em seguida realizamos a lavagem da placa 6x com PBS-T e 2x com PBS 1x. A revelação do ensaio ocorreu utilizando 100 µL/poço do Tampão de Revelação: solução de uso do TMB 0,1 mg/mL e peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 30%); a placa foi incubada no escuro por 20 minutos a temperatura ambiente e para bloquear a reação utilizou-se a reação com H₂SO₄2N (50 µL/poço) e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 450nm.

No ensaio de inibição seguiu o mesmo protocolo, com exceção das amostras que anteriormente ao plaqueamento os 8 soros dos pacientes atópicos foram inibidos com 500 ug de extrato de *D. pteronyssinus* em rotação constante overnight.

Para análise estatística o teste de Komogorov-smirnov foi utilizado para verificação das normalidades dos dados. A significância das diferenças entre os extratos foi avaliada pelo teste de Wilcoxon, e diferenças com valor de P igual ou inferior a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas.

Western Blot

Após a corrida de SDS-PAGE de acordo com o protocolo estabelecido pelo laboratório e descrita acima, realizamos a transferência para a membrana de nitrocelulose na qual ocorreu a corrida em uma cuba de eletroforese durante 1h à 350mA. Em seguida, em uma placa de Petri foi verificado a transferência com a solução de Red Ponceau durante 5 minutos, após a confirmação da transferência para a membrana ocorreu o bloqueio durante 2h na solução de bloqueio em temperatura ambiente, logo após o período de bloqueio a membrana foi lavada em 3 ciclos de 5 minutos em PBS 1X, adicionamos um pool de soro dos pacientes, no qual utilizados 6 pacientes atópicos para *B.tropicalis* e *D. pteronyssinus*.

Utilizamos 4 membranas para o ensaio com soros absorvidos e não absorvidos. Na primeira membrana utilizamos o pool de soro dos pacientes sem absorção, logo após a adição dos soros ocorreu a lavagem e foi adicionado o Anti-IgE humana na proporção 1:500 e incubado por 1h, em seguida, após a lavagem usando a proporção

1:1000 durante 1h utilizamos a Streptavidina-Peroxidase e revelamos por Quimiluminescência.

O segundo imunoenensaio referente as outras membranas utilizou as mesmas amostras de extratos. No entanto, na segunda membrana o soro foi absorvido com *D.pteronyssinus*, a terceira membrana com *B.tropicalis* e a quarta membrana com *D.pteronyssinus* e *B.tropicalis*. Nesse sentido, as membranas foram inicialmente bloqueadas e em seguida, foram incubadas com o pool de soro de pacientes alérgicos absorvidos em extrato de *B.tropicalis* e *D.pteronyssinus* na diluição 1:500, por 16-18h a 4 C°.

4.7 Digestão do gel de SDS-PAGE para Espectrometria de massa

As 10 bandas selecionadas para a Espectrometria de massa foram cortadas em um tamanho de aproximadamente 1mm² logo após foi adicionado 200µL de washing solution contendo 50 mM NH₄HCO₃ em 40% de acetonitrila (ACN) em agitação no termomixer por 30 minutos a 5000 G esse passo foi repetido de 2 a 3 vezes. Após lavagem foi adicionado 200µL de ACN durante 5 min, sendo a mesma retirada durante 5 minutos no speedvaccum eppendorf, Logo em seguida, Adicionamos Dithiothreitol (DTT) a 60 mM durante 30 minutos em agitação constante e após o descarte foi adicionado Iodoacetamida (IAA) 60 µL a 100 mM durante 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após descartado o IAA adicionamos novamente 200µL de ACN por 5 minutos, em seguida foi adicionado 50mM de NH₄HCO₃ durante 10 minutos e acrescentamos 200µL de ACN novamente, e esse foi removido no speedcum eppendorf. Adicionamos 100ng de Trypsina e completamos com Digestion buffer contendo 10mm NH₄HCO₃+5% ACN. As amostras foram incubadas overnight a 37°C.

Após esse tempo foi utilizado 5µL solução de parada contendo 10% de ácido fórmico. Adicionamos 75µL de extraction solution 40% ACN+ 0.1% FA no thermomixer a 5000 G por 15 minutos em temperatura ambiente por 4x. Logo em seguida concentramos a amostras até 5µL no speedvaccum e adicionamos 2% de ACN+0.1% de ácido fórmico até 20 µL. Posteriormente, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Bioquímica e Biofísica- Butantã.

5- RESULTADOS

5.1 Obtenção dos ácaros da poeira doméstica e cultura de ácaros

Após a obtenção das 29 amostras da poeira doméstica realizada em residências de Salvador-BA, 12 culturas foram contaminadas por fungos ou formigas, enquanto 5 dessas amostras não continham nenhum ácaro e foram descartadas, 6 das amostras restantes estão na estufa esperando o crescimento e desenvolvimento desses ácaros para análise, sendo as últimas 6 amostras coletas e analisadas contendo apenas o ácaro *B. tropicalis*. Algumas dessas amostras foram coletadas mais de uma vez nas residências na tentativa de realizar o cultivo dessas amostras, no entanto algumas questões físicas da sala de cultura impossibilitaram a continuidade do cultivo.

5.2 Caracterização molecular das culturas de ácaros através de PCR

Após avaliação das amostras ambientais da poeira doméstica e não ter tido sucesso no cultivo do *G. malaysiensis*, utilizamos as massas de ácaros disponíveis no laboratório com suspeita de contaminação por *G. malaysiensis* e uma massa pura de *B. tropicalis* que também foi testada no PCR. Realizamos a extração de DNA das 3 massas previamente identificadas morfológicamente no Laboratório e fizemos a caracterização molecular através de PCR.

Posteriormente conseguimos identificar essas 3 massas como sendo, uma massa contendo *B. tropicalis*, uma contendo *B. tropicalis* e *G. malaysiensis* e outra com *G. malaysiensis* e *D. pteronyssinus* (Figura 4) e (Figura 5)

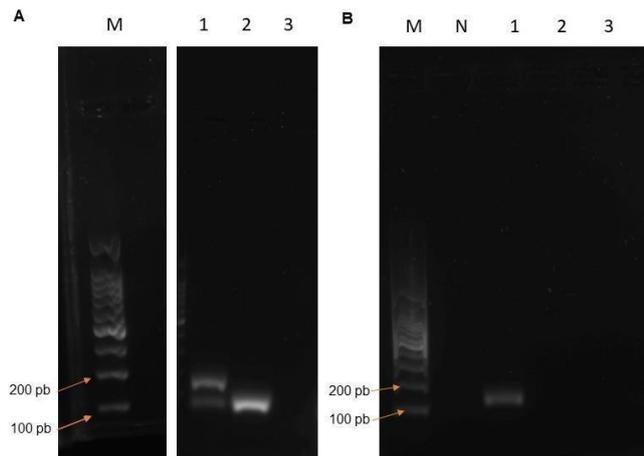


Figura 4. Gel de agarose 1% utilizando DNA extraído de amostra de poeiras das diferentes massas de ácaro a ser testadas. **M:** marcador de peso molecular (100pb); **N:**negativo; **1:** *B.tropicalis* (147bp); **2:** *G. malaysiensis* (138bp); **3:***D. pteronyssinus* (115bp).

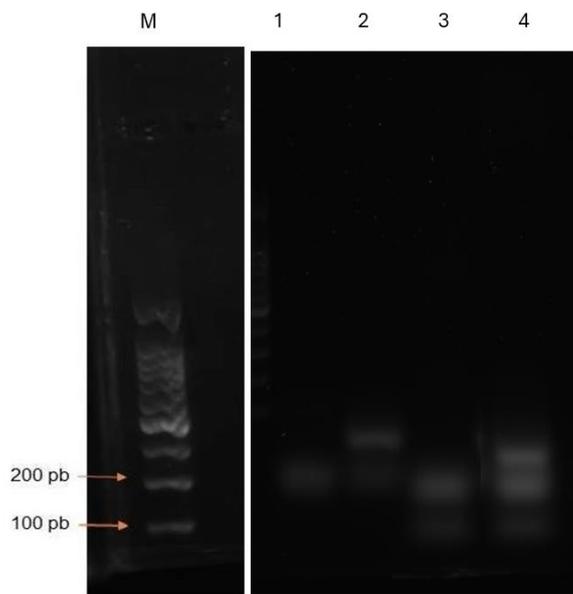


Figura 5. Gel de agarose 1% utilizando DNA extraído de amostra de poeiras das diferentes massas de ácaro a ser testadas. **M:** marcador de peso molecular (100pb); **N:**negativo; **1:** *B. tropicalis* (147bp); **2:** *G. malaysiensis* (138bp); **3:** *D. pteronyssinus* (115bp);**4:** Multiplex PCR, contendo primers de *B. tropicalis* (147bp); *G. malaysiensis* (138bp); *D. pteronyssinus* (115bp);

5.3 Produção dos extratos proteicos de ácaros

Uma vez determinada a identificação molecular das massas do ácaro foi realizado os extratos proteicos e a dosagem feita pela técnica de Bradford, em que foi

obtido um valor de 1220 ug/mL para o extrato de *B. tropicalis*, 158 ug/mL para *D. pteronyssinus* e *G. malaysiensis*, 1189 ug/mL de *B. tropicalis* e *G. malaysiensis*. Apenas a massa de *D. pteronyssinus* não foi testado por PCR, por sua massa ser disponibilizada de forma liofilizado e adquiridos da empresa INDOOR Biotechnologies (USA), quando realizamos a produção de extrato a dosagem foi de 119 ug/mL.

5.4 Avaliação protéica dos extratos através de SDS-PAGE

Após a produção dos extratos proteicos, testamos qual seria a melhor concentração para utilizar os extratos tanto para a avaliação por SDS-PAGE como para a realização do Western Blot. Desta forma, escolhemos o extrato de *B. tropicalis* para fazer essa avaliação tanto pela sua concentração como pela disponibilidade do extrato.

Utilizamos a concentração 10 µg/mL , 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL e 40 µg/mL e após avaliação escolhemos utilizar 35 µg/mL para a avaliação de todos os extratos.

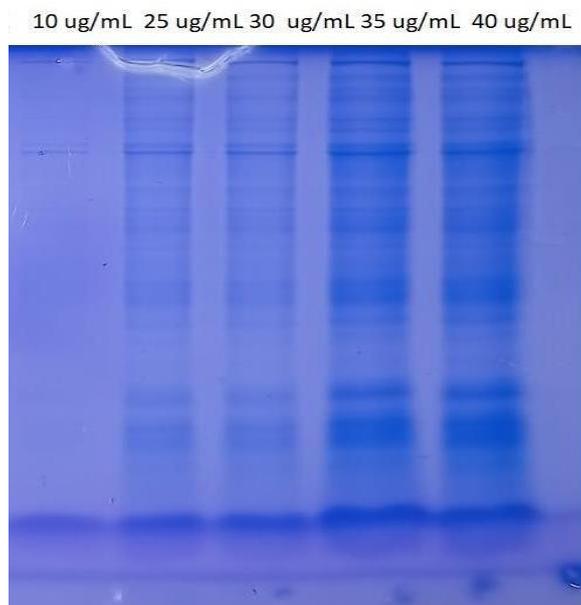


FIGURA 6. Gel de eletroforese do extrato de *B. tropicalis* em diferentes concentrações

Após a escolha da concentração para avaliarmos os extratos, corremos o gel de SDS-PAGE com quatro extratos, *B. tropicalis*, *G. malaysiensis* e *B. tropicalis*, *D. pteronyssinus* e *G. malaysiensis* e *D. pteronyssinus*. No qual é possível observar o padrão de bandas de cada extrato e suas diferenças.

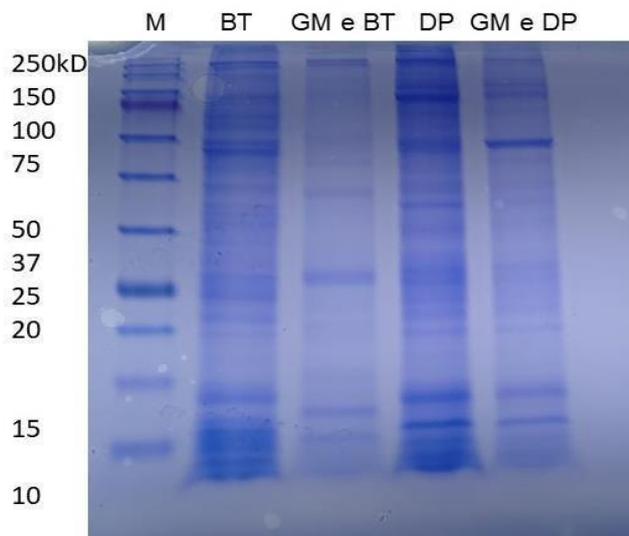


Figura 7. Gel de eletroforese mostrando bandas dos extratos das massas de ácaros. M: marcador BT: *B. tropicalis*, GM: *G. malaysiensis* e DP: *D. pteronyssinus*.

5.5 Avaliação dos extratos utilizando soro de pacientes alérgicos através de ELISA e Western Blot

Uma vez analisado o extrato através do SDS-PAGE, seguimos para avaliar a reatividade desses extratos com soro de pacientes atópicos para o ácaro *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*. Em um primeiro momento, realizamos o western blot sem inibir, (Figura A), ou seja, não absorvemos os soros dos pacientes com extrato de *B.tropicalis* ou *D.pteronyssinus*, conseguindo dessa forma observar que ocorreu uma reação de IgE com os pacientes positivos para todos os extratos como previsto, eles reagiram tanto aos extratos de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* que era o esperado como também para os outros extratos combinados com *G. malaysiensis*.

Quando analisamos o outro western blot no qual absorvemos os soros dos pacientes com o extrato de *D. pteronyssinus* a 300ug/mL (Figura B), conseguimos observar que as bandas do extrato de *D. pteronyssinus* não aparecem tão claramente como no ensaio que não ocorreu a inibição. Além disso, os outros extratos continuaram reagindo positivamente, o extrato de *B. tropicalis* apresentando uma alta reatividade e o extrato contendo *G. malaysiensis* e *D. pteronyssinus* apresentaram menos bandas que no ensaio sem absorção, e provavelmente essas são as bandas referentes ao ácaro *G. malaysiensis*.

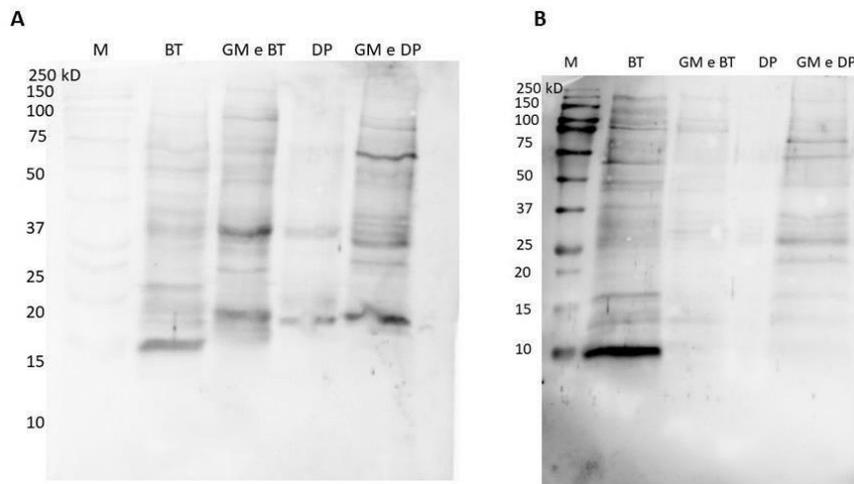


Figura 8. Western Blot utilizando anticorpo anti-IgE, com pool de soro de pacientes atópicos e extratos de massa de ácaro. **M:** marcador, **BT:** *B. tropicalis*, **GM:** *G. malaysiensis*, **DP:** *D. pteronyssinus*. **A)** Membrana com soro não absorvido **B)** Membrana com soro absorvido em extrato de *D. pteronyssinus*

Acrescentando a isso, resolvemos absorver os soros apenas com o extrato de *B. tropicalis* e observar a interação dos soros com os extratos nas membranas (Figura C). Não obtivemos o total bloqueio das bandas de *B. tropicalis* como esperávamos, mas conseguimos analisar melhor o padrão de bandas relacionada a *B. tropicalis* e *G. malaysiensis*. Para entender melhor essa interação, resolvemos absorver os soros com o soro de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*, com o intuito de inibir toda a reatividade ligada a esses ácaros e analisar apenas as bandas de *G. malaysiensis* (Figura D)

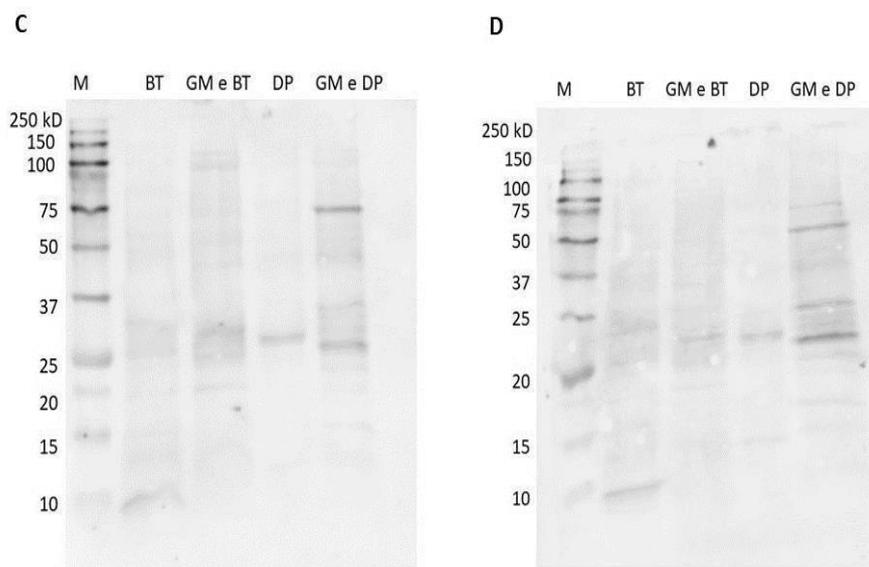


Figura 9. Western Blot utilizando anticorpo anti-IgE, com pool de soro de pacientes atópicos e extratos de massa de ácaro. **M:** marcador, **BT:** *B.tropicalis*, **GM:** *G. malaysiensis*, **DP:** *D. pteronyssinus*. **C)** Membrana com soro absorvido em extrato de *B.tropicalis* **B)** Membrana com soro absorvido em extrato *B.tropicalis* e *D. pteronyssinus*

Com base nas análises de SDS-PAGE e Western Blot, escolhemos 10 bandas referentes aos extratos de *D.pteronyssinus* e *D.pteronyssinus* com *G.malaysiensis* para análise por espectrometria de massa no Butantã. Com isso escolhemos bandas que provavelmente estão relacionadas ao ácaro *G.malaysiensis* quando analisamos a membrana que foi incubada com soro previamente absorvido com o extrato de *B.tropicalis* e *D. pteronyssinus*, esse critério foi baseado nas bandas com maior intensidade o que provavelmente indica ligação de proteínas específicas do *G.malaysiensis* que se ligam à IgE. Foram escolhidas 7 bandas referente ao extrato de *D.pteronyssinus* com *G.malaysiensis* com peso molecular de 15-100 kD e 3 bandas referente ao extrato de *D.pteronyssinus* de peso molecular 25 kD, 20 kD e 15 kD (Figura 10).

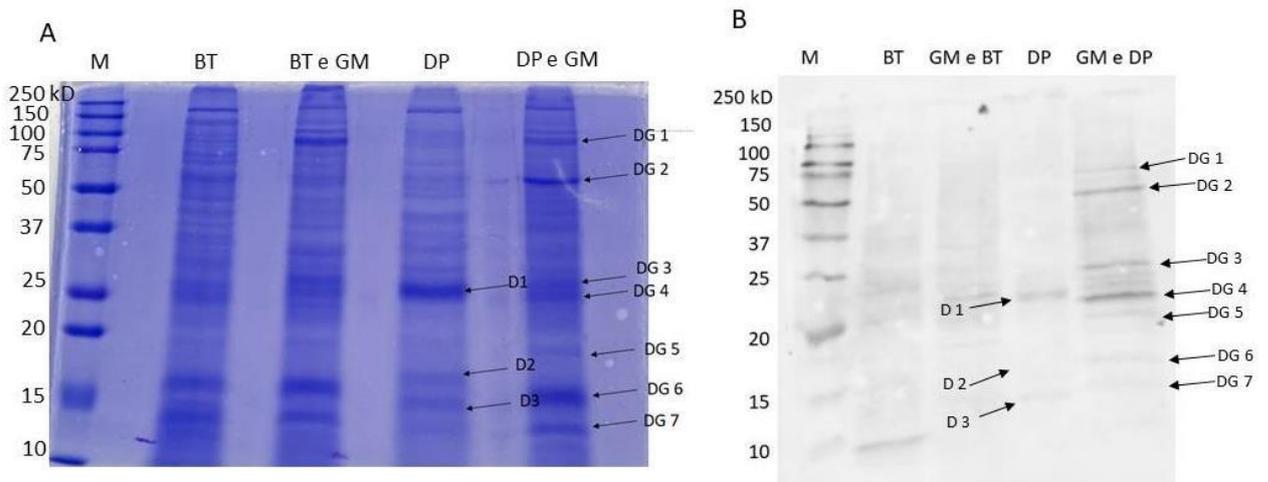


Figura 10. A: Gel de eletroforese utilizado para a Espectrometria de Massa mostrando bandas dos extratos das massas de ácaros. B: Western Blot utilizando anticorpo anti-IgE, com soro absorvido em extrato *B.tropicalis* e *D. pteronyssinus*. : marcador, **BT**: *B.tropicalis*, **GM**: *G. malaysiensis*, **DP**: *D. pteronyssinus*. **DG**: *D. pteronyssinus* com *D. pteronyssinus* e **D**: *D. pteronyssinus*

Na avaliação da reatividade dos extratos produzidos, foi executado um teste de ELISA indireto em 57 soros de indivíduos atópicos para *B. tropicalis* e/ou *D. pteronyssinus*, estes pacientes foram previamente testados por teste cutâneo. Deste modo, foi observado que alguns desses indivíduos testados para os extratos possuíam reatividade a IgE para todos os extratos testados, tanto para o extrato de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* que era o esperado para esses pacientes que possuem teste cutâneo positivo, como também para os extratos de *B. tropicalis* e *G. malaysiensis* e ao extrato de *D. pteronyssinus* e *G. malaysiensis*

Quando analisamos de forma comparativa os extratos correspondentes, observar-se que a reatividade de IgE para o extrato de *B. tropicalis* apresenta uma maior reatividade em comparação com o extrato contendo *B. tropicalis* e *G. malaysiensis* apesar de alguns pacientes apresentarem isoladamente uma reatividade maior ao conjunto dos dois ácaros (Figura 11). Em contrapartida, quando analisamos os extratos de *D. pteronyssinus* e *D. pteronyssinus* com *G. malaysiensis* é possível observar que os pacientes analisados possuem uma reatividade maior para o extrato de *D. pteronyssinus* com *G. malaysiensis* em comparação com o extrato apenas com *D. pteronyssinus* (Figura 11). Além disso, analisando a reatividade individual podemos

perceber uma tendência de reação maior ao conjunto dos dois ácaros com exceção a alguns pacientes.

No gráfico com os soros inibidos com extrato de *D. pteronyssinus*, conseguimos a inibição quase completa de IgE dos 8 pacientes testados. Após a inibição do soro ainda foi possível observar uma reação dos indivíduos aos extratos de *G. malaysiensis* com *D. pteronyssinus* (figura 12).

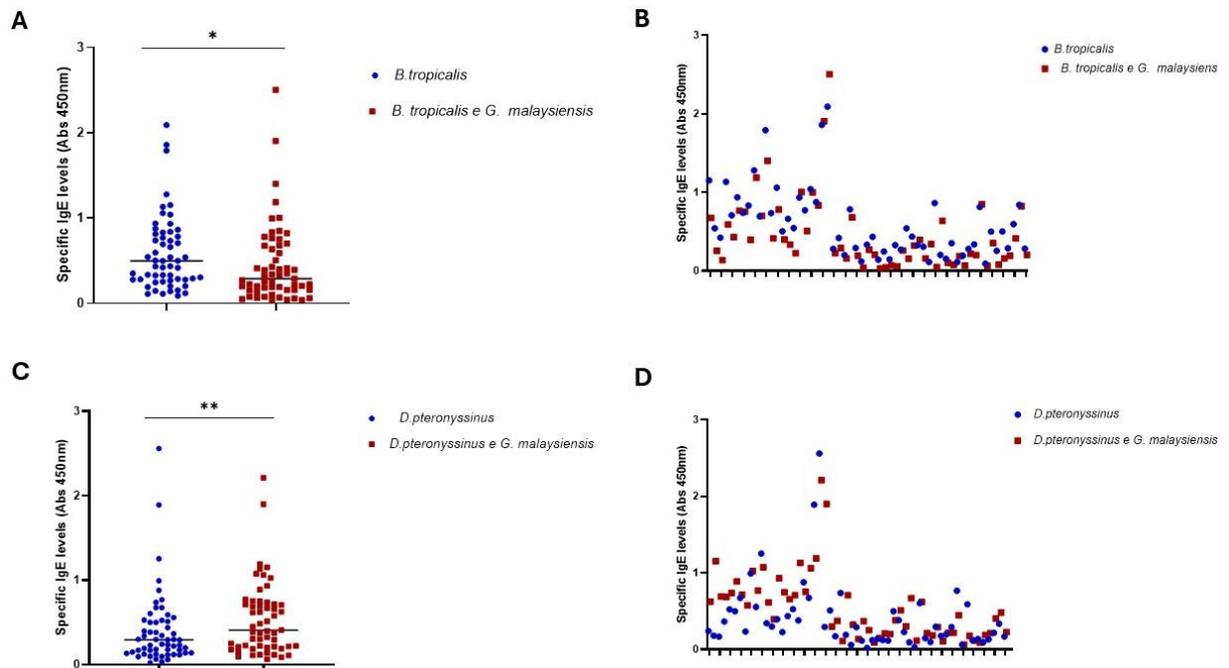


Figura 11. Gráfico representativo da reatividade dos soros aos extratos de ácaros. A: comparação dos níveis de IgE específico dos soros testados em extratos de *B.tropicalis*, *G. malaysiensis* e *B.tropicalis*. B: análise individual de cada soro testado para os soros testados em extratos de *B.tropicalis*, *G. malaysiensis* e *B.tropicalis*. C: comparação dos níveis de IgE específico dos soros testados em extratos de *D. pteronyssinus*, *G. malaysiensis* com *D. pteronyssinus* D: análise individual de cada soro testado para os soros testados em extratos de *D. pteronyssinus*, *G. malaysiensis* com *D. pteronyssinus*. * $P < 0,05$ ** $P < 0,05$ Wilcoxon teste.

ELISA soro inibido com extrato de *D.pteronyssinus*

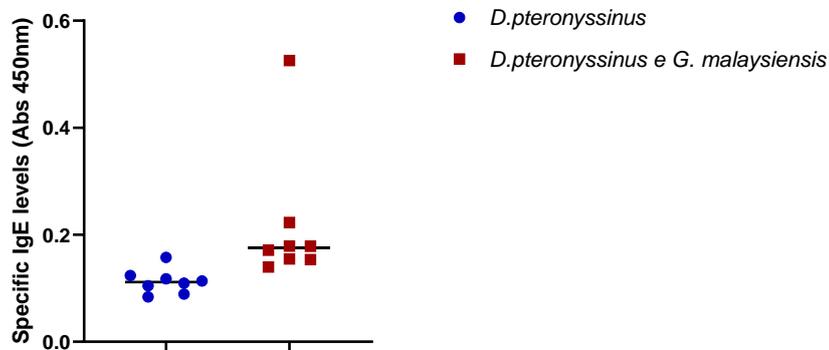


Figura 12. Gráfico representativo da reatividade dos soros inibidos com extrato de *D.pteronyssinus* aos extratos de ácaros . * $p > 0,05$, Wilcoxon teste.

Com os resultados da reatividade desses extratos aos 57 soros à IgE específico, foi possível uma breve análise do potencial imunogênico no ELISA indireto ao ácaro *G. malaysiensis*, tanto com o extrato individual de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* como a combinação de *G. malaysiensis* com os mesmos.

DISCUSSÃO

As doenças alérgicas afetam em média 30% da população mundial. Na última década têm sido observado o aumento da prevalência e gravidade das doenças alérgicas e isso tem sido atribuído às variações ambientais e à exposição a alérgenos da poeira doméstica. Devido ao seu potencial alergênico os ácaros da poeira doméstica são responsáveis por mais de 50% dos casos das doenças alérgicas, induzindo uma hipersensibilidade do tipo I e a produção de anticorpos IgE. (HUBERT et al., 2023; LIU et al., 2023)

No entanto, os espectros dos componentes alergênicos dos ácaros ainda não são totalmente conhecidos e apesar da sua importância clínica os alérgenos não são estudados em todas as espécies de ácaros da poeira doméstica e armazenamento na mesma extensão. Além disso, garantir os componentes dos extratos alergênicos é uma tarefa difícil devido às suas complexidades, ter a identificação precisa e o conhecimento dos seus genomas é fundamental para solucionar questões clínicas e científicas referentes aos ácaros da poeira doméstica e armazenamento, para o entendimento mais aprofundado dos seus alérgenos e mecanismos subjacentes a sua alergenicidade (CHAN et al., 2015).

No ensaio de PCR, os resultados revelaram 1 extrato puro contendo *B.tropicalis*, 1 extrato contendo *B.tropicalis* e *G.malaysiensis*, 1 extrato contendo *D.pteronyssinus* e *G.malaysiensis*, com pares de base 147bp referente a *B.tropicalis*, 138bp para *G.malaysiensis* e 115bp referente a *D.pteronyssinus*, como padronizado anteriormente por ALVES e colaboradores (2022)

Contudo, apesar de ser descrito pela primeira vez na década de 50, o gênero *Glycycometus* foi bastante negligenciado sobre o seu potencial alergênico. No entanto, COLLOFF (2009) sugeriu que por sua familiaridade morfológica e pertencimento a mesma família que o *Blomia* (Glycyphagoidea), o ácaro teve sua identificação morfológica trocada e sua prevalência seja mais comum e ampla em várias regiões que anteriormente os estudos de prevalência relataram. Além disso, *G.malaysiensis* e *B.tropicalis* possuem uma reatividade cruzada, o que torna a identificação precisa desses ácaros ainda mais relevante. (CHEW et al., 1999)

Apesar de não possuir as amostras pura contendo *G.malaysiensis*, conseguimos analisar os padrões de banda e a reatividade desses extratos, através de SDS-PAGE, Western Blot e ELISA. A comparação dos extratos proteicos de ácaros da poeira doméstica por SDS-PAGE, indicou uma diferença na definição das bandas analisadas nos 4 extratos testado, as bandas dos extratos contendo *B.tropicalis* e *B.tropicalis* com *G.malaysiensis*, do mesmo modo nos extratos contendo *D.pteronyssinus* e *D.pteronyssinus* com *G.malaysiensis*, o padrão de bandas proteica apresentou um padrão de bandas distintas das amostras contendo o ácaro puro.

As divergências nos padrões de bandas foram confirmadas por análise através do Western Blot utilizando o pool obtido de paciente atópicos para os ácaros *B.tropicalis* e *D.pteronyssinus*. Na figura 8A, podemos observar os padrões de bandas reativos em todos os poços testados, enquanto na figura 8B, no qual ocorreu uma absorção do soro com o extrato de *D.pteronyssinus*, observa-se que o poço referente ao extrato de *D.pteronyssinus* foi completamente inibido, sendo assim possível observar uma maior intensidade de bandas no poço referente ao *B.tropicalis* principalmente na banda 10kD, mas também bandas específicas referente ao extrato de *G.malaysiensis* com bandas de peso molecular de 250 kD -10 kD e a presença significativa de reatividade a IgE nesse pool de pacientes.

Na figura 9A no qual ocorreu inibição com o extrato de *B.tropicalis* e na figura 9B na qual ocorreu a inibição com o extrato de ambos os ácaros, *B.tropicalis* e *D.pteronyssinus*, conseguimos observar as mesmas bandas que são referentes ao *G.malaysiensis*.

CHEW e colaboradores (1999) Observaram um alto grau de sensibilização entre *G.malaysiensis* e *T.putreacentiae*, outro ácaro de armazenamento, constatando uma possível reação cruzada entre os mesmo e os ácaros *B.tropicalis* e/ou *Dermatophagoides spp.* Além disso, sugeriu que *B.tropicalis* compartilha reatividade cruzada de leve a moderada com *G.malaysiensis* que foi encontrado em 35% das amostras relatada por ele. Na caracterização do extrato alergênico de *G.malaysiensis* demonstrou 20 proteínas de ligação a IgE (11-90 kD).

Enquanto, na análise de imunoblotting de *D.pteronyssinus* apresentou bandas reativas variando de 11 a 130 kD. Outro estudo realizado por CHONG e colaboradores, (2015), na análise de imunoblotting de *D.pteronyssinus* apresentou

bandas reativas variando de 11 a 30kda, enquanto para *G.malaysiensis* os indivíduos apresentaram uma maior imunorreatividade contra o alérgeno de 9-15Kda, 60 kD, 31kD.

O uso de extratos brutos para determinação da concentração de IgE específica de ácaros da poeira doméstica tem sido amplamente utilizado para estabelecer o perfil de sensibilização de uma população previamente definida, considerado um passo importante para a identificação de alérgenos específicos. No entanto, existem informações limitadas sobre os perfis de sensibilização da população no Brasil referente aos ácaros de armazenamento, até o momento poucos estudos foram realizados sobre o perfil de sensibilização do ácaro *G.malaysiensis*.

YU e colaboradores (2014) observaram através da medição de IgE específica que 44% dos pacientes asmáticos eram alérgicos ao *B. tropicalis* e 18% apresentavam reatividade cruzada com Dp e Bt e 90% dos pacientes foram alérgicos a Der p 2.

O *B.tropicalis* apresenta uma reatividade de IgE em 89% dos soros de pacientes adultos com asma em países tropicais. Por ser amplamente encontrado nas residências sua prevalência na poeira doméstica pode alcançar 40% dentre as espécies de ácaros, e essa espécie possui mais de 14 alérgenos descritos até o momento (HUBERT et al., 2023). O *D. pteronyssinus* apresenta uma prevalência de até 80% das amostras dos ácaros de poeira doméstica, e 70% das pessoas com alergia a poeira doméstica possuem sensibilização aos alérgenos de *D.pteronyssinus* (WEGHOFER et al., 2013).

No entanto, estudos mostraram uma maior reatividade de IgE em ácaros de armazenamento do que para o ácaro *D.pteronyssinus*. YU e colaboradores (2014). Demonstraram que pacientes sensibilizados a poeira doméstica apresentaram uma prevalência de sensibilização aos ácaros de armazenamento de 73-83%. Além disso pacientes acima de 50 anos manifestaram uma sensibilização maior ao *T.putrescentiae* de 52% que ao *D.pteronyssinus* de 22%. Achados semelhantes foram encontrados na Coreia, no qual 39.9% da população testada foram sensibilizadas ao *T.putrescentiae*, sendo os mesmos mais sensibilizados ao *T.putrescentiae* do que ao *D.pteronyssinus*.(LIAO; HO; TSAI, 2010)

Na análise de IgE por ELISA indireto, foi possível observar o perfil de sensibilização dos extratos contendo *G.malaysiensis*, no soro de pacientes atópicos. Na figura 11A, podemos observar que os indivíduos alérgicos tiveram uma maior sensibilização ao extrato contendo *B.tropicalis* em comparação com extrato contendo *B.tropicalis* com *G.malaysiensis*. Enquanto, na figura 11C observamos uma mudança de padrão, na qual os pacientes apresentaram uma maior sensibilização ao extrato de *D.pteronyssinus* e *G.malaysiensis* do que ao extrato puro com *D.pteronyssinus*.

CHONG e colaboradores (2015) Em um estudo de soro prevalência de IgE a alérgenos da poeira doméstica e ácaros de armazenamento, observaram na população estudada um padrão diferente de sensibilização, no qual a maioria dos indivíduos foram sensibilizados a *G.malaysiensis* (37%) ao invés de *D.pteronyssinus*. Além disso indivíduos não alérgicos apresentaram níveis elevados de IgE específica para *G.malaysiensis*.

Nosso trabalho fortalece os demais estudos que indicam o potencial alergênico do *G.malaysiensis*. Apesar de anteriormente estudado, uma caracterização do seu extrato através de técnicas mais recentes e com identificação molecular, nunca foram realizadas anteriormente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, comparamos a composição de diferentes extratos proteicos de ácaros da poeira doméstica. Apesar de não possuir o extrato puro foi possível, através dos dados apresentados neste estudo que o ácaro *G.malaysiensis* parece apresentar uma reatividade a IgE em pacientes atópicos. Pacientes reagiram mais ao extrato de *D.pteronyssinus* e *G.malaysiensis* do que apenas com *D.pteronyssinus*, além de ser observado através do imunoblotting as proteínas específicas de ligação a IgE presente nos extratos com *G.malaysiensis* após absorção e analisar os padrões de bandas reativamente positivo ao *G.malaysiensis*.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, para melhor compreensão dos alérgenos de *G.malaysiensis* se faz necessárias análises complementares e caracterização dos seus alérgenos através de técnicas ômicas para entender seu potencial alergênico e no futuro auxiliar no diagnóstico e tratamento das doenças alérgicas.

REFERÊNCIAS

ALITH, M. B. et al. Impact of asthma control on different age groups in five Latin American countries. **World Allergy Organization Journal**, v. 13, n. 4, p. 100113, abr. 2020.

ALVES, V. S. et al. Identification of *Glycycometus malaysiensis* (for the first time in Brazil), *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* through multiplex PCR. **Experimental and Applied Acarology**, v. 86, n. 3, p. 385–406, 14 mar. 2022.

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S. Biology, ecology, and prevalence of dust mites. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 443–468, ago. 2003.

ASHER, I.; PEARCE, N. Global burden of asthma among children. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 11, p. 1269–1278, 1 nov. 2014.

BAQUEIRO, T. et al. Dust Mite Species and Allergen Concentrations in Beds of Individuals Belonging to Different Urban Socioeconomic Groups in Brazil. **Journal of Asthma**, v. 43, n. 2, p. 101–105, 2 jan. 2006.

BERGMANN, K.-C. et al. Efficacy and safety of sublingual tablets of house dust mite allergen extracts in adults with allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 6, p. 1608- 1614.e6, jun. 2014.

BOUSQUET, J. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008*. **Allergy**, v. 63, p. 8–160, abr. 2008.

BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.; MALLING, H. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, n. 4, p. 558–562, out. 1998.

BOUSQUET, J. et al. Allergic rhinitis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 95, 3 dez. 2020.

CASSET, A. et al. Varying Allergen Composition and Content Affects the in vivo Allergenic Activity of Commercial *Dermatophagoides pteronyssinus* Extracts.

International Archives of Allergy and Immunology, v. 159, n. 3, p. 253–262, 2012.

- CHAN, T.-F. et al. The draft genome, transcriptome, and microbiome of *Dermatophagoides farinae* reveal a broad spectrum of dust mite allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 2, p. 539–548, fev. 2015.
- CHEW, F. T. et al. Sensitization to local dust-mite fauna in Singapore. **Allergy**, v. 54, n. 11, p. 1150–1159, nov. 1999a.
- CHEW, F. T. et al. Sensitization to local dust-mite fauna in Singapore. **Allergy**, v. 54, n. 11, p. 1150–1159, nov. 1999b.
- CHONG, K. T. et al. Sero-prevalence study of IgE responses to allergens from Malaysian house dust (HDM) and storage mites (SM). **Tropical biomedicine**, v. 32, n. 3, p. 524–39, set. 2015.
- CHUA, K. Y. et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 1, p. 175–182, 1 jan. 1988.
- COLLOFF, M. J. Taxonomy and identification of dust mites. **Allergy**, v. 53, p. 7–12, dez. 1998.
- COLLOFF, M. J. Identification and taxonomy, classification and phylogeny. Em: **Dust Mites**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. p. 1–44.
- COLLOFF, M. J.; SPIEKSMAN, F. TH. M. Pictorial keys for the identification of domestic mites. **clinical and experimental allergy: journal of the british society for allergy and clinical immunology**, v. 22, n. 9, p. 823–830, 1992.
- DELGADO DOLSET, M. I. et al. Contribution of allergy in the acquisition of uncontrolled severe asthma. **Frontiers in Medicine**, v. 9, 21 set. 2022.
- DEY, D.; SAHA, G. K.; PODDER, S. A review of house dust mite allergy in India. **Experimental and Applied Acarology**, v. 78, n. 1, p. 1–14, 21 maio 2019.
- DURHAM, S. R.; SHAMJI, M. H. Allergen immunotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 5, p. 317–328, 17 maio 2023.
- FACHERIS, P. et al. The translational revolution in atopic dermatitis: the paradigm shift from pathogenesis to treatment. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 20, n. 5, p. 448–474, 16 mar. 2023.
- FORNO, E.; ORTEGA, V. E.; CELEDÓN, J. C. Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Clinics in Chest Medicine**, v. 44, n. 3, p. 519–530, set. 2023.

GAFFIN, J. M.; PHIPATANAKUL, W. The role of indoor allergens in the development of asthma. **Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology**, v. 9, n. 2, p. 128–135, abr. 2009.

GONZÁLEZ-PÉREZ, R. et al. Storage Mite Precision Allergy Molecular Diagnosis in the Moderate-to-Severe T2-High Asthma Phenotype. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4297, 13 abr. 2022.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411–453, dez. 1991.

HUANG, C.-F.; CHIE, W.-C.; WANG, I.-J. Effect of environmental exposures on allergen sensitization and the development of childhood allergic diseases: A large scale population-based study. **World Allergy Organization Journal**, v. 14, n. 1, p. 100495, jan. 2021.

HUANG, H.-J.; SARZSINSZKY, E.; VRTALA, S. House dust mite allergy: The importance of house dust mite allergens for diagnosis and immunotherapy. **Molecular Immunology**, v. 158, p. 54–67, jun. 2023.

HUBER, S. et al. Proteomic profiling of commercial dust mite skin prick test solutions and allergy vaccines from India. **World Allergy Organization Journal**, v. 14, n. 3, p. 100516, mar. 2021.

HUBERT, J. et al. Predicting *Blomia tropicalis* allergens using a multiomics approach. **Clinical and Translational Allergy**, v. 13, n. 10, out. 2023.

INAL, A. et al. Prevention of new sensitizations by specific immunotherapy in children with rhinitis and/or asthma monosensitized to house dust mite. **Journal of investigational allergology & clinical immunology**, v. 17, n. 2, p. 85–91, 2007.

JACOBSEN, L. et al. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. **Allergy**, v. 62, n. 8, p. 943–948, ago. 2007.

JOHANSSON, E. et al. Allergenic crossreactivity between *Lepidoglyphus destructor* and *Blomia tropicalis*. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 27, n. 6, p. 691–699, jun. 1997.

LEMANSKE, R. F.; BUSSE, W. W. Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S95–S102, fev. 2010.

LIAO, E.-C.; HO, C.-M.; TSAI, J.-J. Prevalence of *Tyrophagus putrescentiae*; Hypersensitivity in Subjects over 70 Years of Age in a Veterans' Nursing Home in Taiwan. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 152, n. 4, p. 368–377, 2010.

LING, S. J. et al. Morphology of *Glycycometus malaysiensis*, a domestic mite in Malaysia. **Tropical biomedicine**, v. 36, n. 1, p. 263–273, 1 mar. 2019.

LIU, Y. et al. Serological analysis of allergic components of house dust mite provides more insight in epidemiological characteristics and clinical symptom development in North China. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 27 abr. 2023.

MARIANA, A. et al. House dust mite fauna in the Klang Valley, Malaysia. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 31, n. 4, p. 712–21, dez. 2000.

MESQUITA, K. Unveiling atopic dermatitis burden in Brazil: a report from clinical assistance perspective. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 11, n. 2, p. 153–160, ago. 2019.

MILLER, J. D. The Role of Dust Mites in Allergy. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 57, n. 3, p. 312–329, 23 dez. 2019.

MIRANDA, C. et al. Distinguishing severe asthma phenotypes☆Role of age at onset and eosinophilic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 1, p. 101–108, jan. 2004.

NADCHATRAM, M. House dust mites, our intimate associates. **Tropical biomedicine**, v. 22, n. 1, p. 23–37, jun. 2005a.

NADCHATRAM, M. House dust mites, our intimate associates. **Tropical biomedicine**, v. 22, n. 1, p. 23–37, jun. 2005b.

PAWANKAR, R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. **World Allergy Organization Journal**, v. 7, p. 12, 2014.

POSA, D. et al. Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 139, n. 2, p. 541- 549.e8, fev. 2017.

RESCH, Y. et al. Different IgE recognition of mite allergen components in asthmatic and nonasthmatic children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 4, p. 1083–1091, out. 2015.

ROMANET-MANENT, S. et al. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? **Allergy**, v. 57, n. 7, p. 607–613, jul. 2002.

SÁNCHEZ-BORGES, M. et al. International consensus (ICON) on: clinical consequences of mite hypersensitivity, a global problem. **World Allergy Organization Journal**, v. 10, p. 14, 2017a.

SÁNCHEZ-BORGES, M. et al. International consensus (ICON) on: clinical consequences of mite hypersensitivity, a global problem. **World Allergy Organization Journal**, v. 10, p. 14, 2017b.

SANTOS DA SILVA, E. et al. Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 172, n. 4, p. 203–214, 2017.

SHAKIB, F.; GHAEMMAGHAMI, A. M.; SEWELL, H. F. The molecular basis of allergenicity. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 12, p. 633–642, dez. 2008.

THOMAS, W. R. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. **Allergology International**, v. 64, n. 4, p. 304–311, out. 2015.

TROMPETTE, A. et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Tolllike receptor complex protein. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 585–588, 7 jan. 2009

VENTER, C. et al. Incidence and timing of offspring asthma, wheeze, allergic rhinitis, atopic dermatitis, and food allergy and association with maternal history of asthma and allergic rhinitis. **World Allergy Organization Journal**, v. 14, n. 3, p. 100526, mar. 2021.

WANG, J.-Y. The Innate Immune Response in House Dust Mite-Induced Allergic Inflammation. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 5, n. 2, p. 68, 2013.

WEGHOFER, M. et al. Identification of Der p 23, a Peritrophin-like Protein, as a New Major *Dermatophagoides pteronyssinus* Allergen Associated with the Peritrophic Matrix of Mite Fecal Pellets. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 7, p. 3059–3067, 1 abr. 2013.

YANG, B.; CAI, J.; CHENG, X. Identification of astigmatid mites using ITS2 and COI regions. **Parasitology Research**, v. 108, n. 2, p. 497–503, 12 fev. 2011.

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

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

YU, S.-J.; LIAO, E.-C.; TSAI, J.-J. House dust mite allergy: environment evaluation and disease prevention. **Asia Pacific Allergy**, v. 4, n. 4, p. 241–252, out. 2014.